



T.C
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

***Paeonia mascula* L.(Mill.) subsp. *bodurii* (ÖZHATAY) BİTKİ KÖK**
KISIMLARININ ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ VE FENOLİK BİLEŞENLERİNİN
KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLERLE TAYİNİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Ayfer KIYAK

Danışman
Doç. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY

RİZE
2023

KABUL VE ONAY

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında, Doç. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY danışmanlığında, Ayfer KIYAK tarafından hazırlanan *Paeonia mascula L.(Mill.) subsp. bodurii (ÖZHATAY) Bitki Kök Kısımlarının Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi ve Fenolik Bileşenlerinin Kromatografik Yöntemlerle Tayini* adlı bu tez çalışması, 28/12/2022 tarihinde yapılan savunma sınav sonucunda oy birliği/oy çokluğuyla başarılı bulunarak jürimiz tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı, Adı SOYADI	İmzası
Başkan	: Doç. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY	
Üye	: Doç. Dr. Emine ÜLKER	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Fatma YAYLACI KARAHALİL	

ETİK BEYAN

Kimya Tezli Yüksek Lisans Programından mezun olmak üzere teslim ettiğim “*Paeonia mascula* L.(Mill.) subsp. *bodurii* (ÖZHATAY) Bitki Kök Kısımlarının Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi ve Fenolik Bileşenlerinin Kromatografik Yöntemlerle Tayini” adlı tezim, bilim ve araştırma etiği prensiplerine riayet edilerek tarafımdan yazılmıştır.

Tez çalışmamda, başka kaynaklardan aktarılan bütün bilgi ve alıntılar, Enstitünüz Tez Yazım Klavuzunu uygun olarak açıkça gösterilmiştir. Kaynağı gösterilenler dışında kalan bütün bilgiler uygun araştırma yöntemi kullanılarak tarafımdan edinilmiş ve esere bu şekilde yansıtılmıştır. Şahsıma ait olmayan hiçbir bilgi, kasıt veya kusurlar, şahsıma aitmiş gibi gösterilmemiştir. İnternet kaynakları dahil, sahibine/kaynağına atıf yapılmaksızın hiçbir bilgi kullanılmamıştır. Aksinin ortaya çıkması halinde doğacak bütün hukuki, idari, akademik ve etik sorumluluk tarafıma ait olacaktır. Eserin tesliminden sonra herhangi bir zamanda, bilim etiğine aykırılık tespit edilmesi ve / veya eserimle ilgili intihal veya intihal şeklinde anlaşılabilecek bir durumun ortaya çıkması halinde; Üniversiteniz ve eğitim kadronuzun hiçbir şekilde sorumlu tutulmayacağını hür irademle kabul, beyan ve taahhüt ederim.

28/12/2022

Ayfer KIYAK

ÖN SÖZ

“*Paeonia mascula* L.(Mill.) subsp. *bodurii* (ÖZHATAY) Bitki Kök Kısımlarının Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi ve Fenolik Bileşenlerinin Kromatografik Yöntemlerle Tayini” adlı bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Tez konumun belirlenmesinde, fikir ve katkılarıyla çalışmalarımın ve yüksek lisans eğitimimin her aşamasında beni yönlendiren, titizliği ve sabrıyla çalışmama destek olan danışman hocam Doç. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY’a teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek Lisans eğitimim süresince her türlü desteğini esirgemeyen RİZE TİCARET BORSASI YÖNETİM KURULU’na ve RİZE ÇAY ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ’nde çalışan iş arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Her zaman başarılı olacağıma inanan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ÇAYMER ÖZEL GIDA KONTROL LABORATUVARI ekip arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Canım oğlum Mustafa Yasir KIYAK, sana ayırmam gereken zamanı eğitim hayatımda kullanmama izin verdiği için sana minnettarım ve bu hayatta güçlü bir insan olmama yardımcı olan can yoldaşım, çok değerli eşim Yunus KIYAK sabrın, sevgin, özverin ve desteğin için sonsuz teşekkür ederim.

“Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Proje Numarası: 120Z502.”

(“This work was supported by the TÜBİTAK. Project number: 120Z502”)

Ayfer KIYAK

2023/RİZE

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	I
ETİK BEYAN.....	II
ÖN SÖZ.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÖZET.....	VI
ABSTRACT.....	VII
KISALTMALAR	VIII
TABLolar LİSTESİ	X
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	XI
GİRİŞ.....	1
1. GENEL BİLGİLER.....	2
1.1. Paeonia Bitkisi Hakkında Genel Bilgiler.....	2
1.2. Paeonia Bitki Türlerinin Türkiye’deki ve Dünya’daki Dağılımı.....	3
1.3. <i>Paeonia mascula</i> (L.) MILLER	7
1.4. <i>Paeonia mascula</i> (L.) MILLER subsp. <i>bodurii</i> (N. ÖZHATAY).....	7
1.5. Antioksidanlar.....	9
1.6. Sekonder Metabolitler.....	12
1.6.1. Fenolik Bileşikler.....	12
1.6.2. Terpenler (Uçucu Yağlar).....	13
1.6.2.1. Monoterpenler.....	14
1.7. Paeonia Türlerindeki Monoterpenler ve Monoterpen Glikozitler.....	15
1.8. Bitki Bileşenlerinin Kromatografik Yöntemlerle Tanımlanması.....	16
1.8.1. Yüksek-Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	18
1.9. Bitki Bileşenlerinin Spektroskopik Yöntemlerle Tanımlanması	19
1.9.1. Folin Ciocalteu Yöntemiyle Toplam Polifenol İçeriğinin Belirlenmesi.....	20
1.9.2. Toplam Flavonoid İçeriği (TF).....	21
1.9.3. DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesi.....	22
1.9.4. ABTS Radikal Temizleme Aktivitesinin Belirlenmesi.....	23
1.10. Literatür Özeti.....	24
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	30

2.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	30
2.2. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	30
2.3. <i>Paeonia mascula</i> (L.) MILLER subsp. <i>bodurii</i> (N. ÖZHATAY) Bitkisinin Toplanması.....	30
2.4. Bitki Örneklerinin Ekstraksiyonu.....	31
2.5. Bitki Ekstraktlarında Sekonder Bileşiklerin HPLC-DAD Analizleri.....	31
2.5.1. HPLCD-DAD Koşulları.....	31
2.5.2. Standartlar, Validasyon ve Kalibrasyon.....	32
2.6. Toplam Antioksidan Bileşiklerin Belirlenmesi.....	33
2.6.1. Toplam Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi.....	33
2.6.2. DPPH Radikal Temizleme Aktivitesinin Belirlenmesi.....	33
2.6.3. ABTS Radikal Temizleme Aktivitesinin Belirlenmesi.....	34
2.6.4. Toplam Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi.....	36
2.6.5. FRAP (Demir (III) İndirgeyici Antioksidan Aktivite).....	36
3. BULGULAR.....	38
3.1. Fenolik Bileşiklerin Analizi için HPLC-DAD Metot Optimizasyonu.....	38
3.2. Fenolik Bileşiklerin HPLC-DAD Analizleri.....	40
3.3. Toplam Antioksidan Bileşiklerin Tayini ve Aktivitesi.....	44
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	45
4.1. Öneriler.....	47
KAYNAKÇA.....	49

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Anabilim Dalı : Kimya Anabilim Dalı

Tez Türü : Yüksek Lisans Tezi

Danışman : Doç Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY

Hazırlayan : Ayfer KIYAK

Yıl : 2023

Sayfa Sayısı : 54

ÖZET

***Paeonia mascula* L.(Mill.) subsp. *bodurii* (ÖZHATAY) BİTKİ KÖK KISIMLARININ ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE FENOLİK BİLEŞENLERİNİN KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLERLE TAYİNİ**

Bu tez çalışmasında *Paeonia mascula* L. (Mill.) subsp. *bodurii* (N. ÖZHATAY) bitkisinin kök kısımlarından elde edilen metanolik özütlerin antioksidan ve fitokimyasal içerikleri spektrofotometrik ve kromatografik yöntemlerle (HPLC-DAD) tespit edildi. Metanolik kök özütlerinin toplam fenolik madde içeriği gallik asit ve kuersetin standartları kullanılarak tespit edildi ve sırasıyla 932,8 mg GAE /100g kök ve 691,8 mg KE /100g kök olarak belirlendi. Toplam flavonoid miktarının ise 12,2 mg KE /100g kök olduğu tespit edildi. Bitki kök kısımlarında Demir (III) indirgeyici antioksidan aktivitesi (FRAP) 1869,0 mg TE /100g kök olarak tespit edildi ve bu değer kökün yaklaşık %2 oranında antioksidan içeriğe sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca DPPH radikal temizleme aktivitesi SC₅₀ değeri 213,8 µg/mL ve ABTS radikale karşı 205,1 µg/mL SC₅₀ değerine sahip olduğu belirlendi. Metanolik kök özütlerinin HPLC-DAD ile belirlenen esas bileşenlerinin gallik asit, paeoflorin, albiflorin, elacik asit, benzoilmudanpiosid türevi ve gallik asit türevi bileşenler olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: HPLC-DAD, fenolik bileşikler, antioksidan aktivite, *Paeonia mascula* L.(Mill.) subsp. *bodurii*

Recep Tayyip Erdogan University Institute of Graduate Studies
Department : Department of Chemistry
Thesis Type : Master Thesis
Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY
Author : Ayfer KIYAK
Year : 2023
Pages : 54

ABSTRACT

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT PROPERTIES OF PLANT ROOT PARTS OF *Paeonia mascula* L. (Mill.) subsp. *bodurii* (ÖZHATAY) AND DETERMINATION OF PHENOLIC COMPONENTS BY CHROMATOGRAPHIC METHODS

In the thesis study, antioxidant and phytochemical contents of methanolic extracts obtained from the root parts of *Paeonia mascula* L. (Mill.) subsp. *bodurii* (N. ÖZHATAY) were determined by spectrophotometric and chromatographic methods (HPLC-DAD). The total phenolic content of methanolic root extracts was determined using gallic acid and quercetin standards and it was found as 932,8 mg GAE /100g root and 691,8 mg KE /100g root, respectively. Total flavonoids were found as 12,2 mg KE /100g root value. Iron (III) reducing antioxidant activity (FRAP) in plant root parts was determined as 1869,0 mg TE /100g root and this value shows that the root has approximately 2% antioxidant content. Besides, it was determined that DPPH radical scavenging activity had a SC50 value of 213,8 µg/mL and a SC50 value of 205,1 µg/mL against ABTS radical. Gallic acid, paeoniflorin, albiflorin, ellagic acid, benzoylmudanpioside derivative and gallic acid derivatives were determined as the main components of methanolic root extracts by HPLC-DAD.

Keywords: HPLC-DAD, phenolic compounds, antioxidant activity, *Paeonia mascula* L.(Mill.) subsp. *bodurii*

KISALTMALAR

BHA	:Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	:Bütillenmiş hidroksitoluen
BSS	: Bağlı Standart Sapma
<i>B.subtilis</i>	: Bacillus subtilis
CV	: Varyasyon Katsayısı
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DnaE	: <i>E.coli</i> DNA polimeraz III proteini
DPPH	: 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil Radikali
EGCG	: Epigallokateşin Gallat
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EO	: Uçucu Yağ
<i>E. faecalis</i>	: Enterococcus faecalis
FRAP	: Demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü
GAE	: Gallik Asit Eşdeğeri
GC	: Gaz Kromatografisi
GC-FID	: Gaz Kromatografisi Alevİyonizasyon Detektörü
GC/MS	: Gaz Kromatografisi/ Kütle Spektroskopisi
HD	: Hidro-distilasyon
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPLC-DAD	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi- Diyot Dizisi Dedektörü
LOD	: Tespit Sınırı (Limit of Detection)

LOQ	: Tayin Sınırı (Limit of Quantitation)
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
ODS	: Oktadesil Silan
ORAC	: Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi
PolC	: <i>B.subtilis</i> DNA polimeraz III proteini
rpm	: Dakikadaki devir
RSA	: Radikal Süpürücü Aktiviteleri
<i>S. aureus</i>	: Staphylococcus aureus
SOD	: Süperoksit dismutaz
SPME	: Katı Faz Mikro Ekstraksiyonu
TEAC	: Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite
TF	: Toplam Flavonoid
TÜBİVES	: Türkiye Bitkileri Veri Serisi
UV	: Ultraviole
Vis	: Görünür
λ	: Dalga Boyu

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Paeonia cinsinin sistematigi	2
Tablo 2. Paeonia bitkisinin bazı türlerinin Dünya'daki dağılımı	6
Tablo 3. Antioksidanların sınıflandırılması	11
Tablo 4. Ters faz ve normal faz sıvı kromatografilerinin karşılaştırılması.....	18
Tablo 5. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler	30
Tablo 6. Standart sekonder bileşiklerin (Luteolin grubu) HPLC-DAD analizinde validasyon ve kalibrasyon parametreleri	39
Tablo 7. Standart sekonder bileşiklerin (Kuersetin grubu) HPLC-DAD analizinde validasyon ve kalibrasyon parametreleri	40
Tablo 8. Paeonia kök ekstraktında HPLC-DAD ile tespit edilen sekonder bileşikler.....	43
Tablo 9. Paeonia kök ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri.....	44

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Şakayık çiçeği ve Pluton'un Herakles'ten aldığı yaranın şakayıkla tedavi edilişi	3
Şekil 2. Türkiye'de yetişen <i>Paeonia</i> türleri	4
Şekil 3. <i>Paeonia</i> türlerinin Türkiye'deki dağılımı.....	5
Şekil 4. (a) <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>mascula</i> , (b) <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>bodurii</i> (N. ÖZHATAY), (c) <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>arietina</i>	7
Şekil 5. <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>bodurii</i>	8
Şekil 6. <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>bodurii</i> bitkisinin meyve verme ve tohum olgunlaşma aşaması	8
Şekil 7. Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması	13
Şekil 8. İzopren' in kimyasal yapısı.....	14
Şekil 9. Paeoniflorin molekülünün kimyasal yapısı.....	16
Şekil 10. HPLC cihazının şematik gösterimi.....	19
Şekil 11. Gallik asitin alkali ortamda Folin-Ciocalteu reaktifiyle etkileşimi	20
Şekil 12. Metanolik $AlCl_3$ çözeltisinde Flavonoid-Al kompleksinin oluşumu	22
Şekil 13. DPPH• serbest radikal temizleme yönteminin çalışma mekanizması	23
Şekil 14. ABTS radikal temizleme yönteminin çalışma mekanizması	24
Şekil 15. <i>Paeonia daurica</i> Andrews bitkisinin kök kısmından saflaştırılan moleküller	28
Şekil 16. Gallik asit standardına ait kalibrasyon eğrisi	33
Şekil 17. Farklı seyreltmelerdeki ekstrakt ile DPPH• serbest radikali reaksiyon grafiği.....	34
Şekil 18. Farklı seyreltmelerdeki troloks ile DPPH• serbest radikali reaksiyon grafiği	34
Şekil 19. ABTS çözeltisi ile ekstrakt reaksiyon grafiği	35
Şekil 20. ABTS çözeltisi ile troloks standardı reaksiyon grafiği.....	35
Şekil 21. (Fe^{3+}) -TPTZ kompleksinin, (Fe^{2+}) formuna indirgenmesi	37
Şekil 22. Troloks standardı kalibrasyon grafiği.....	37

Şekil 23. <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>bodurii</i> kök ekstraktının (üstte) ve 32 standart fenolik bileşenin HPLC-DAD ile 280nm’de kromatogramı.....	41
Şekil 24. Gallik asit ve Elacik asitin UV spektrumu.....	41
Şekil 25. Benzoilmudanpiosid T. UV spektrumu	42
Şekil 26. Albiflorin UV spektrumu.....	42
Şekil 27. Paeoniflorin UV spektrumu.....	43
Şekil 28. Elacik asit’in HPLC-DAD ile 370 nm’de kromatogramı.....	46



GİRİŞ

İnsanlığın var oluşundan günümüze kadar ekosistem, teknoloji, tarım ve gıda alanlarındaki değişimler sonucu birçok hastalık ortaya çıkmaktadır. İnsanoğlu bu ortaya çıkan hastalıklara karşı mücadele için birçok sentetik kökenli ilaçlar geliştirmiştir. Bu ilaçların sağlık açısından olumlu etkilerinin yanısıra olumsuz etkiler bırakması da kaçınılmazdır.

Özellikle son zamanlarda tedavi amaçlı kullanılan sentetik kökenli ilaçlardan mikroorganizmaların fazla etkilenmemesi önemli bir sorun oluşturmaktadır. Bu sorunları azaltmak ve insan sağlığına kalıtsal zarar vermemek adına sentetik ilaçlara karşı doğal bitkisel kaynaklar kullanılmaya başlanılmıştır (Tunç vd., 2019).

Türkiye bitki çeşitliliği bakımından zengin bir ülkedir ve Avrupa Kıtası'nın tamamında bulunan bitki çeşitliliği sayısına yakındır. Yapılan araştırmalarda Türkiye'nin tür, alt tür ve varyete olarak yaklaşık 12000 adet bitki çeşidine sahip olduğu belirlenmiş olup bu sayıya her yıl yeni bulgular eklenmektedir. Kısa mesafelerde görülen iklim farklılıkları, morfolojik özelliklerden ortaya çıkan çeşitlilikler, toprak yapısındaki farklılık gibi çok sayıda coğrafi etken bitki formasyonlarının ayrılmasına ve türce çeşitlenmesine neden olmaktadır (Özyavuz, 2011).

İnsanlık tarihinden bugüne kadar diğer ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de tıbbi ve aromatik bitkilerin tedavi edici özelliğinden faydalanılmıştır. Her geçen gün ekonomik değeri daha da artan bu bitkiler sağlık dışında gıda, endüstri ve kozmetik sanayinde de kullanılmaktadır (Göktaş vd.; 2019).

Bu çalışmamızda Türkiye'de yetişen, tıbbi açıdan değerli bir bitki olan *Paeonia mascula* L.(Mill.) subsp. *bodurii* (ÖZHATAY) bitki kök kısımlarının antioksidan özelliklerinin belirlenmesi ve fenolik bileşenlerinin kromatografik yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Paeonia Bitkisi Hakkında Genel Bilgiler

Türkiye’de süs bitkisi olarak yetiştirilen Paeonia (yabani şakayık), halk arasında ayı gülü, bocur, ayı kulağı, tombak, yaban gülü, orman gülü, dağ gülü, kame, gülora olarak bilinen; rizomlu, otsu veya odunsu bir gövdeye sahip olan çok yıllık bir bitkidir (Önal vd., 2014; Mammadova, 2018). Paeonia cinsi, paeoniaceae ailesinde bulunan tek cins olup sistematigi Tablo 1’de verilmektedir.

2008 yılından itibaren “Doğadan Toplanmak Suretiyle İhraç Edilmesi Yasak Olan Çiçek Soğanları” olarak bilinen Paeonia, geçmiş tarihte “Otlar Kraliçesi” olarak isimlendirilmiştir (Deniz, 2022).

Tablo 1. Paeonia cinsinin sistematigi

Alem	Plante
Şube	Magnoliophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Takım	Dilleniales
Aile	Paeoniaceae
Cins	Paeonia

Paeonia L. (Şakayık), ülkemizin zengin florasında bulunmaktadır ve birçok tıbbi etkisinden dolayı kullanılmaktadır (Demirboğa vd.; 2021).

Şakayık bitkisine Yunan mitolojisinde rastlanmaktadır ve Antik çağlarda büyük öneme sahiptir. Şakayık çiçeğinin bilimsel adının Yunan tanrısı Asklepios’un öğrencisi Paeon’dan geldiği literatürlerde belirtilmiştir. Başka bir literatüre göre Apollon’nun annesi Leto, Olimpos Dağı’nda bulunan ve doğum sancılarına iyi gelen bir bitki kökünü bulması için Paeon’u görevlendirmiştir. Paeon’u kıskanan Apollon onu öldürmeye çalışmış ancak Zeus genç tanrıyı şakayığa dönüştürerek onu kurtarmıştır. Başka bir mite göre de Truva Savaşı’nda Pluto ve yanındaki tanrıların yaralarının şakayık kökleri ile tedavi edildiği bilgisi verilmiştir (Bkz. Şekil 1). Anlatılan mitosa göre Asklepios, Paeon’u kurtarmak, şükranlarını sunmak için Paeon’u şakayık çiçeğine dönüştürmüş ve ölümsüzlük hediye ettiğinden bahsedilmiştir (Tarhan vd., 2016).



Şekil 1. Şakayık çiçeği ve Pluton'un Herakles'ten aldığı yaranın şakayıkla tedavi edilişi

Şakayık bitkisi Roma döneminde ve orta çağda da önemli bir bitki olmuştur. Bu bitki Hippocrates (MÖ 377-470) ve İbni- el Baitar tarafından epilepsi hastalığının tedavisinde kullanılmıştır (Önal vd., 2014).

Şakayık köküne Mısır'da, haçotu adı verildiği, haç şeklinde sara nöbeti geçiren hastanın göğsünde gezdirilerek veya boynuna asarak hastanın tedavi edildiği bilgisi literatürde verilmiştir. Ayrıca sara hastası olan kişiler meyveleri ile tütsü yaptıkları da bilinmektedir (Tarhan vd., 2016).

Günümüzde de alternatif tıp ile uğraşan uzmanlar şakayık bitkisinin kök, tohum ve çiçeklerinden elde edilen kürleri; iltihapların giderilmesinde, mikropların öldürülmesinde, kanın temizlenmesinde, kalp, mide, bağırsak ve kas ağrılarının giderilmesinde ve histerik bozuklukların tedavi edilmesinde kullanılmaktadırlar (Önal vd., 2014).

1.2. Paeonia Bitki Türlerinin Türkiye'deki ve Dünya'daki Dağılımı

Dünyada, Kuzey Yarım Küre'de Paeoniaceae familyasına geniş bir alanda rastlanır. Fas, İspanya, Avrupa ve Akdeniz'in dağlık bölgeleri; Kafkas dağları vasıtasıyla Orta Asya, Çin, Japonya ve Amerika Birleşik Devlet'lerine kadar yayılım gösterir (İnceçayır, 2018). Bu familyaya ait olan Paeonia L. cinsinin, dünyada 36 tür altında 52 taksonu bulunmaktadır (Kökçü vd.; 2021).

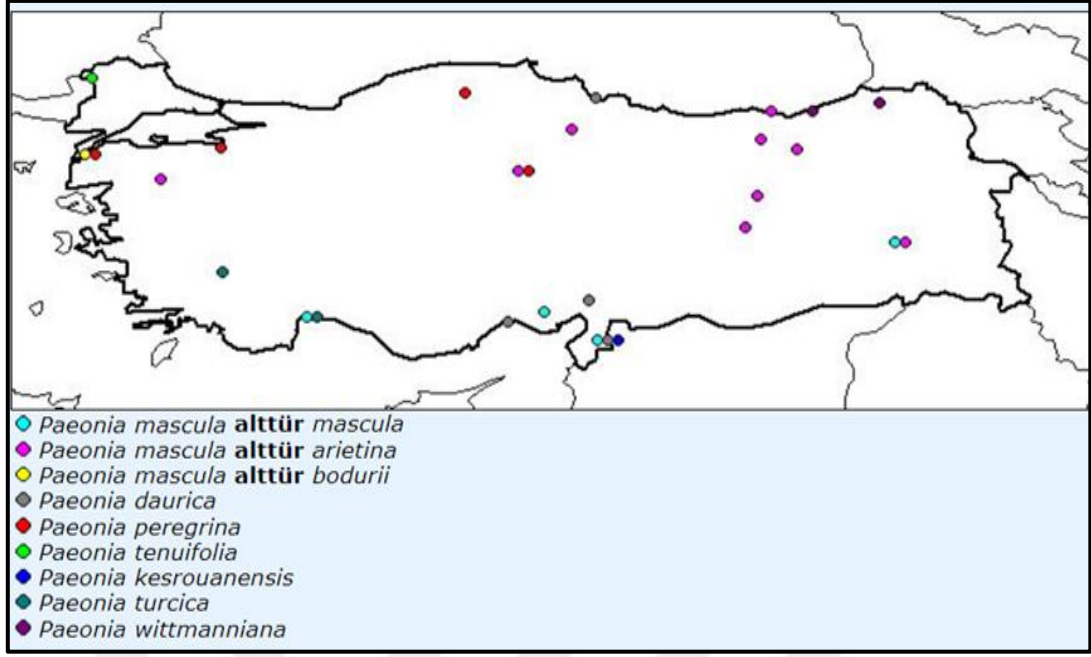
Türkiye'de yetişen Paeonia cinsi 12 taksondur (Ünlü, 2010). Türleri arasında çiçek rengi, yaprak çeşidi, tohumu tüylü veya tüysüz olarak farklılık gösteren paeonia

(*Paeonia arietina* subsp. *arasicola*, *Paeonia arietina* subsp. *arietina*, *Paeonia daurica*, *Paeonia kesrouanensis*, *Paeonia mascula* subsp. *mascula*, *Paeonia officinalis*, *Paeonia peregrina*, *Paeonia tenuifolia*, *Paeonia turcica*, *Paeonia wittmanniana*, *Paeonia kayae* ve *Paeonia mascula* subsp. *bodurii*) bitkisinin çiçekli halleri Şekil 2’de gösterilmektedir.



Şekil 2. Türkiye’de yetişen Paeonia türleri

Paeonia bitkisinin bazı türlerinin (*Paeonia turcica*, *Paeonia wittmanniana*, *Paeonia kesrouanensis*, *Paeonia tenuifolia*, *Paeonia peregrina*, *Paeonia daurica*, *Paeonia mascula* subsp. *macula*, *Paeonia mascula* subsp. *arietina*, *Paeonia mascula* subsp. *bodurii*) Türkiye’deki dağılımı Türkiye Bitkileri Veri Serisi (TÜBİVES) bilgilerine göre Şekil 3’te gösterilmektedir.



Şekil 3. Paeonia türlerinin Türkiye'deki dağılımı

Türkiye'de olduğu gibi Dünya'nın farklı bölgelerinde de kendine yer edinen Paeonia bitki türlerinin bazı özellikleri ve dağılımı TÜBİVES verilerine göre Tablo 2'de gösterilmektedir.

Tablo 2. Paeonia bitkisinin bazı türlerinin Dünya'daki dağılımı

Paeonia türü	Ömür	Yapı	Çiçek lenme	Habitat	Yüksek lık (m)	Endemik	Türkiye Dağılımı	Genel Dağılım
<i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>mascula</i>	Çok Yıllık	Otsu	4-6	Meşe, çalılık, kayalık, yamaç	1000- 2200	Endemik değil	Adana Bitlis Antalya Hatay	Avrupa Kafkasya Kıbrıs K. Irak K. İran Türkiye
<i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>arietina</i>	Çok Yıllık	Otsu	6-7	Çalılık, kayalık, yamaç	1000- 2000	Endemik değil	Bitlis Amasya Balıkesir Elazığ Gümüşhan eTrabzon Tunceli Yozgat Bayburt	İtalya, Balkan Yarımadası Türkiye
<i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>bodurii</i>	Çok Yıllık	Otsu	4-5	Açık kayalık yerler, aşınmış kaya çıkıntılar	750-750	Endemik	Çanakkale	Türkiye
<i>Paeonia daurica</i>	Çok Yıllık	Otsu	4-4	Çalılık	0-1300	Endemik değil	Osmaniye Hatay İçel Samsun	Kırım, Transkafka sya K. İran Yugoslavya Türkiye
<i>Paeonia peregrina</i>	Çok Yıllık	Otsu	4-5	Tarla	1000- 1200	Endemik değil	Kastamonu Bursa Çanakkale Yozgat	İtalya Romanya Balkanlar Türkiye GD, Avrupa'da n Balkan Yarımadası'na kadar: Romanya, Yugoslavya, Bulgaristan, G. ve O. Rusya, Türkiye
<i>Paeonia tenuifolia</i>	Çok Yıllık	Otsu	4-5	Kuru açık yerler, nadasa bırakılmış iş tarlalar	250-250	Endemik değil	Edirne	B. Suriye Lübnan Türkiye
<i>Paeonia kesrouanensis</i>	Çok Yıllık	Otsu	4-4	Kuru açık yerler, sıcak bölgeler	1000- 1000	Endemik değil	Hatay	B. Suriye Lübnan Türkiye
<i>Paeonia turcica</i>	Çok Yıllık	Otsu	7-7	Dağ	1500- 1800	Endemik	Antalya Denizli	Türkiye
<i>Paeonia wittmanniana</i>	Çok Yıllık	Otsu	6-6	Alpin çayır, Granit yamaç	2000- 2400	Endemik değil	Artvin Rize	B. Kafkasya K. İran Türkiye

1.3. *Paeonia mascula* (L.) MILLER

Paeonia mascula (L.) Miller türünde yapraklar basit biternat veya bazı yaprakçıklar daha çok bölünmüş, yaprakçıklar 9-16 adet daralandan genişleyen eliptiğe kadar değişen şekildedir. Yaprığın alt kısmında tüysüzden yumuşak tüylüye değişen tüy örtüsü mevcuttur. Çiçekler 8-14 cm çapında, petaller kırmızı veya beyazdır. Foliküller 3-5 adet, 2-4 cm, beyaz-tomentoz tüylü, tepede kesik uçlu stigması sapsızdır.

Türkiye’de *Paeonia mascula* (L.) Miller türünün üç alt türü (Bkz. Şekil 4) bulunmaktadır. Bunlar;

1. *Paeonia mascula* (L.) Miller subsp. *bodurii*: 1. Petaller beyaz
2. *Paeonia mascula* (L.) Miller subsp. *arietina*: 1. Petaller kırmızı, 2.yapraklar 12-16 segmentli, altta yumuşak piloz tüylü
3. *Paeonia mascula* (L.) Miller subsp. *mascula*: 1.Petaller kırmızı, 2.yapraklar 9-10 (-12) segmentli, altta tüysüz veya seyrek piloz tüylü (Koyunoğlu, 2008).



Şekil 4. (a) *Paeonia mascula* subsp. *mascula*, (b) *Paeonia mascula* subsp. *bodurii* (N. ÖZHATAY), (c) *Paeonia mascula* subsp. *arietina*

Kaynak: Deniz, 2022

1.4. *Paeonia mascula* (L.) MILLER subsp. *bodurii* (N. ÖZHATAY)

Paeonia mascula (L.) Miller subsp. *bodurii* (Bkz. Şekil 5), 1995 yılında Neriman ÖZHATAY tarafından Türkiye’den yeni bir tür olarak tanımlanmıştır (Kökçü vd.; 2021). Endemik bir tür olan *Paeonia mascula* (L.) Miller subsp. *bodurii* bitkisi, tüysüz hafif mor-kırmızı, çizgili, gövdeye sahip ve 50-80 cm boyundadır. Yapraklar tüysüz, üst kısmı gri-yeşil, alt kısmı ise mat mavi-yeşil renktedir. Üst gövde yaprakları üç parçalı, verimli tohumlar koyu mor renktedir. Çiçekler 11-12 cm çapında, beyaz tabanda morumsu renktedir (Koyunoğlu, 2008). *Paeonia* bitkisinin bu

alt türünün meyve verme ve tohum olgunlaşma aşamasına ait görsel Şekil 6'da verilmektedir.

Türkiye'de Kuzey Batı Anadolu bölgesinde özellikle Çanakkale ilinin Çan-Çanakkale, Çam yayla, Kalkim dolaylarında rastlanmaktadır. Yıl içerisinde Nisan ve Haziran aylarında çiçeklenir. 1000-2200 m yüksekliklerde kayalık yamaçlarda ve meşe kayın çalılıklarda yetişir (Koyunoğlu, 2008).

Kökçü vd.'nin 2018-2021 yılları arasında yapmış olduğu çalışmada, taksonu ilk yayınlandığında sadece bir bölgede olduğu bilinen *Paeonia mascula* (L.) Miller subsp. *bodurii*'nin Çanakkale ilinin Ağı Dağı (921 m), Kiraztaş (Üçpınar) (720 m), Beşiktepe (Karamusalar) (454 m) ve Aşağıçavuş (440 m) bölgelerinde de doğal olarak yaşadığını belirlediler.



Şekil 5. *Paeonia mascula* subsp. *bodurii*

Kaynak. Ünlü, 2010



Şekil 6. *Paeonia mascula* subsp. *bodurii* bitkisinin meyve verme ve tohum olgunlaşma aşaması

Kaynak. Kökçü vd., 2021

1.5. Antioksidanlar

İnsanların yaşamlarını sürdürebilmeleri için büyük öneme sahip olan oksijenin metabolik faaliyetler esnasında oluşan bazı reaktif türleri canlıda ciddi risk oluşturmaktadır. Canlı hücrelerdeki oksijen metabolizması, çevre kirliliği, radyasyon, kirli sular ve pestisitler gibi birçok faktör serbest radikallerin oluşumunda etkili olmaktadır. Serbest radikaller dış yörüngesinde eşleşmemiş elektrona sahip olması nedeni ile kararsız ve kısa ömürlü olan molekül ağırlığı düşük moleküller olarak tanımlanır. Dış yörüngesinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip oldukları için diğer moleküller ile rahatlıkla elektron alışverişine girerler. Serbest radikaller vücut hücrelerinin membranına, hücre yapısındaki lipidlere, proteinlere, nükleik asitlere ve DNA'ya zarar vermesi sonucu koroner hastalıklar, diyabet, kanser, karaciğer tahribatı, katarakt gibi çok çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. (Kasnak ve Palamutoğlu., 2014). Serbest radikallerin çoğunluğu oksijen kaynaklı olması nedeni ile radikal oksijen türleri olarak tanımlanır. Fakat radikal yapıda olmadığı halde reaktif olan oksijen türleri de mevcuttur. Bu sebeple radikal tanımı yetersiz kaldığı için tüm bu reaktif moleküller “reaktif oksijen türleri” olarak adlandırılmaktadır. Reaktif oksijen ve azot türleri radikalik ve radikalik olmayan türleri içermektedir. Örnek olarak radikalik oksijen türlerine süperoksit anyon ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil ($OH^{\cdot}$), peroksit ($HOO^{\cdot}$) ve alkoksi ($RO^{\cdot}$) radikalleri; azot türlerine ise azot monoksit ($NO^{\cdot}$) radikalleri verilebilir. Radikalik olmayan oksijen türlerine örnek olarak hidrojen peroksit (H_2O_2), ozon (O_3) ve singlet oksijen (1O_2); azot türlerine örnek olarak ise, nitroz asit (HNO_2), nitrozil katyonu (NO^+) ve nitroksi anyonu (NO^-) verilebilir. Ayrıca bu radikallerin yanı sıra tiyil radikalleri ($RS^{\cdot}$) ve karbon merkezli radikaller de mevcuttur (Aydın, 2012).

Serbest radikaller, reaktif oksijen ve azot türleri yani prooksidanlar olarak adlandırılan bu tehlikeli bileşiklerin sağlık açısından zararını engellemek için antioksidanlar önemlidir. Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek veya mevcut radikalleri süpürerek hücrenin zarar görmesini engelleyen ve yapısında çoğunlukla fenolik fonksiyon taşıyan moleküllerdir. Antioksidanlar, yükseltgenebilen substratlara oranla daha düşük derişimlerde, substratın prooksidanlarla başlatılan oksidasyonunu ciddi derecede engeller ya da geciktirirler. Böylece prooksidanlar düşük toksisiteli veya toksik olmayan ürünlere dönüştürler (Yavaşer, 2011).

Antioksidanların kimyasal yapıları, çözünürlükleri, yapı/aktivite ilişkileri ve doğal kaynaklardan elde edilebilmeleri gibi özellikleri insan sağlığındaki yerini belirlerler. Antioksidanlar vücut hücreleri tarafından oluşturulabildiği gibi, gıdalardan da alınabilmektedir. Başlıca doğal antioksidanlar; C, E ve A vitaminleri, flavonoidler, karotenoidler, en önemlileri polifenoller ve bunların türevleridir (Yavaşer, 2011).

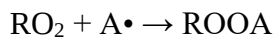
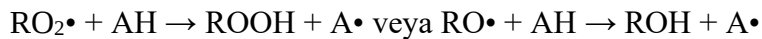
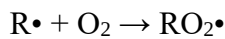
Antioksidanlar, serbest radikaller ile reaksiyona girer ve serbest radikallerin başlattığı zincir reaksiyonu durdurarak vücudumuz için önemli olan bileşenlerin zarar görmesini engellerler (Aydın, 2012).

Antioksidan savunma etkisini gösterdiği mekanizmalar aşağıdaki gibidir.

- Radikal metabolit üretiminin önlenmesi
- Üretilmiş radikallerin temizlenmesi (radikallerin detoksifikasyonu)
- Hücre deformasyonunun onarılması
- Sekonder radikal üreten zincir reaksiyonlarının durdurulması
- Endojen antioksidan kapasitesinin artırılması

Zincirleme reaksiyonda, oksijen ile ootokside özelliğine sahip madde, oksijen ile birleşmektedir. Birleşim sonucu oluşan etkinleşmiş peroksit radikal ve molekülüleri, enerjilerini ootokside özelliğine sahip maddenin yükseltgenebilen diğer molekülerine aktarır ve besinlerdeki ootoksidasyon devam eder. Antioksidanlar araya girerek bu zincir reaksiyonunun kopmasına neden olur ve bileşiklerin aktivasyon enerjisini alırlar. Antioksidanlar aldıkları bu enerjiyi diğer moleküllere aktaramazlar ve ootokside olabilen maddenin birçok molekülünde yükseltgenme olayı gerçekleşmez (Aydın, 2012).

Antioksidanların etki mekanizması aşağıdaki gibi gerçekleşmektedir.



(AH: Antioksidan molekülü, $A\bullet$: Antioksidan etkin molekülü) (Aydın, 2012).

Antioksidanlar yükseltgenebilen madde özelliğine sahip oldukları için zincirleme reaksiyonu koparmaları sırasında yükseltgenerek bozunurlar. Bu sebeple antioksidanlar sadece belirli bir zamanda yükseltgenebilen maddeyi koruyabilir ve

belirli bir zaman sonra madde ortamda hiç antioksidan yokmuş gibi yükseltgenmeye devam eder (Aydın, 2012).

Antioksidanların kimyasal aktivitesi aşağıda belirtilen esaslara bağlıdır.

- Radikal süpürme yeteneği
- Hidrojen veya elektron donör aracı olarak göstermiş olduğu reaktivite (redüksiyon potansiyeline bağlı olan)
- Metal kelatlama potansiyeli
- Diğer antioksidanlarla olan etkileşim (Aydın, 2012).

Antioksidanlar ilk olarak doğal antioksidanlar ve yapay antioksidanlar olmak üzere iki grupta sınıflandırılır. Kimyasal bileşimine göre fenolik yapıda olan, aromatik amino ve organik sülfür bileşiminde ayrıca etkili mekanizmasına göre ise primer ve sekonder antioksidanlar olmak üzere gruplanmaktadır. Doğal antioksidanlar enzimatik etki gösteren ve enzimatik etki göstermeyen antioksidanlar şeklinde ikiye ayrılır. Enzimatik etki göstermeyen antioksidanlar ise endojen ve eksojen antioksidanlar olarak ikiye ayrılmaktadır. Endojen antioksidanlar bulundukları ve etkinliklerini yerine getirdikleri yerlere göre de hücre içi (intraselüler), membranal ve hücre dışı (ekstraselüler) antioksidanlar olarak üç sınıf altında toplanabilir (Akyüz, 2007)

Tablo 3. Antioksidanların sınıflandırılması

Antioksidanlar			Yapay Antioksidanlar BHT, BHA, Troloks SOD mimikleri ve çeşitli şelat oluşturucu maddeler
Doğal Antioksidanlar			
Enzimatik	Enzimatik Olmayan		
SOD	Endojen	Eksojen	
Katalaz	Glutasyon	E Vitamini	
Glutasyon peroksidaz	Serüloplazmin	β-Karoten	
Glutasyon transferaz	Bilirubin	Askorbik Asit	
Sitokrom oksidaz	Ferritin	Flavonoidler	
	Laktoferrin		
	Ürik asit		
	Haptoglobinler		
	Albumin		

1.6. Sekonder Metabolitler

Bitkilerin; primer ve sekonder metabolitler olmak üzere iki çeşit metabolit sentezledikleri bilinmektedir (Onat vd., 2021). Primer metabolitlerin oluşumu hemen hemen her bitkide aynıdır ve bitkide yaşamsal faaliyetlerin sürdürülebilmesi için büyüme, metabolizma ve üreme gibi temel görevleri vardır (Topcu ve Çölgeçen, 2015). Bitkiler de olduğu gibi insanoğlunda hayatını devam ettirebilmesi için bitkilerin temel kaynağını oluşturan karbonhidrat, protein ve yağlara yani primer metabolitlere ihtiyaçları vardır (Erkoyuncu Tanur ve Yorgancılar, 2015).

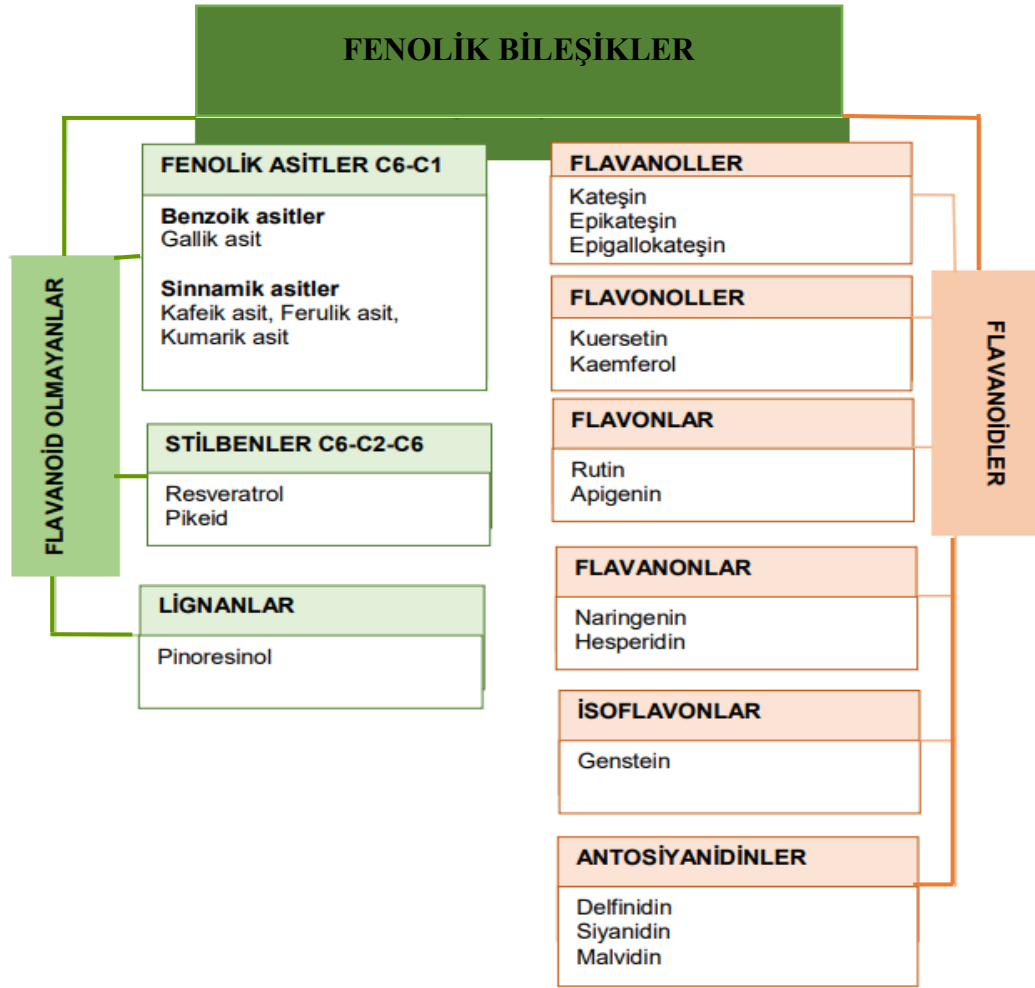
Bitkilerin temel yapı taşları olan protein, yağ ve karbohidratlar haricinde sentezledikleri bileşikler, sekonder metabolitler olarak tanımlanmaktadır. Bitkilerin farklı kısımlarında (çiçek, yaprak, tohum, sap, kök, gövde gibi) bulunan sekonder metabolitlerin çoğunluğu primer metabolitlerden biyosentez yolu ile sentezlenmektedir (Onat vd., 2021).

Sekonder metabolitler; fenolikler, terpenler ve alkaloidler olarak üç gruba ayrılmaktadır (Letsididi vd., 2018, Topcu Çölgeçen, 2015).

1.6.1. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler, doğal olarak gıdaların yapısında bulunan ve onlara birçok nitelik (renk, tat, koku gibi) kazandıran fitokimyasallardır (Karabulut ve Yemiş, 2019).

Bir benzen halkasına Hidroksil grubu (-OH) veya grupları eklenmesi ile fenolik bileşikler oluşmaktadır (Onat vd., 2021). Bu bileşikler flavanoidler ve flavanoid olmayanlar olarak Şekil 7'deki gibi sınıflandırılmaktadır (Karabulut vd., 2019)



Şekil 7. Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması

Gıda maddeleri 500-25000 civarında sekonder metabolit içermektedir. Bu bileşiklerin hemen hemen 500 tanesinin sağlık üzerine olumlu etkilerinden dolayı popüler bileşik gruplarının başında yer almaktadırlar (Acosta-Estrada vd., 2014). Ayrıca antioksidatif (Albishi vd., 2013), antimikrobiyal (Kaur vd., 2014), antienflamatuvar (Zhang vd., 2016), antiviral (Zhang vd., 2014) gibi biyolojik aktivite özellikleri göstermektedirler.

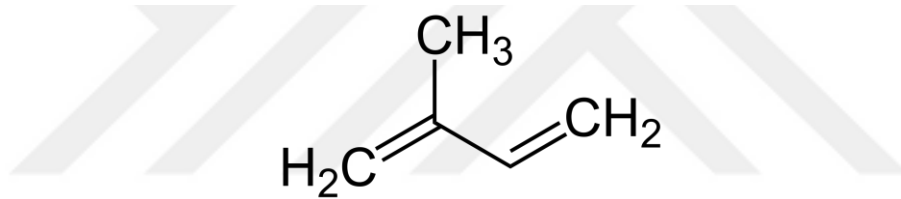
1.6.2. Terpenler (Uçucu Yağlar)

Terpenler, bitkilerden veya bitki kısımlarından elde edilen saydam, kendine özgü kokusu ve oda şartlarında sıvı olan uçucu madde karışımlarıdır. Bitki kısımları olarak genellikle kök, odun, kabuk, yaprak, çiçek ve meyve kullanılarak elde edilirler. Bu bileşiklerin çeşitliliği ve miktarları; bitkinin türüne, bitkiden alınan bölüme, elde edilme şekline, iklime ve bulunduğu bölgenin coğrafik konumuna bağlı olarak

değişmektedir. Bitkilerden yapıdaki miktarları, ısı ile etkileşimleri ve bileşenlerin özellikleri dikkate alınarak farklı yöntemlerle elde edilebilirler. Tüm apolar çözücülerde (kloroform, benzen, eter vs.) iyi çözünmelerine rağmen suda çok az çözünürler veya çözünmezler (Arsal Kor, 2016).

Uçucu yağları yapısal olarak incelediğimizde bileşiklerin birçoğunun terpenoitler, çoğunlukla da monoterpenler ve seskiterpenler olduğunu görmekteyiz. Ayrıca diterpenleri, düşük molekül ağırlıklı alifatik hidrokarbonları, asitleri, alkoller, aldehytleri, asiklik esterleri veya laktonları, ender olarak azot ve sülfür içeren bileşikler, kumarinleri ve fenilpropanoidlerin homologlarını da içerirler (Arsal Kor, 2016).

Terpenler yapısında kimyasal olarak izopren birimine (2-metil-1,3-bütadien) sahiptir ve izopren birimi (Şekil 8) sayısına göre hemiterpen, monoterpen, seskiterpen, diterpen, sesterpen, triterpenler, tetraterpen ve politerpen olarak sınıflanırlar (Arsal Kor, 2016).



Şekil 8. İzopren' in kimyasal yapısı

1.6.2.1. Monoterpenler (C10)

Monoterpenler 10 karbon içermektedirler ve iki izopren birimine sahip bileşiklerdir. Çoğunlukla distilasyon yöntemi kullanılarak bitkilerden elde edilirler ve bitkilerin kendine has kokusunu taşıyan uçucu yağlar olarak tanımlanırlar. Monoterpenler yapılarında sahip oldukları halka sayısına göre asiklik, monosiklik, bisiklik ve trisiklik olarak sınıflandırılırlar. Yapılarındaki izopren gruplarının bağlanma şekline göre ise düzenli veya düzensiz olarak tanımlanırlar. Asiklik terpenler açık yapıya sahiptir. Bir adet halka yapıya sahip olanlar monosiklik terpenler, iki adet sahip olanlar bisiklik terpenler ve üç adet sahip olanlar ise trisiklik terpenler olarak sınıflandırılırlar. Birçok uçucu yağın ana bileşeni olan monoterpenler sanayide tatlandırıcı ve kozmetik ürünlerinde kullanılmaktadır. (Arsal Kor, 2016).

1.7. Paeonia Türlerindeki Monoterpenler ve Monoterpen Glikozitler

1753'ten beri Paeonia cinsinden 180'den fazla bileşik izole edilmiştir ve yapılan kimyasal çalışmalarda daha çok bitkinin kök kısımları kullanılmıştır (Zhao vd., 2016).

Paeonia cinsinin kimyasal bileşenleri arasında monoterpenler, monoterpen glikozitler, triterpenoidler, flavonoidler, fenoller, tanenler bulunur ve yapıda monoterpen glikozitler baskın bileşenlerdir (Wu vd., 2010).

Paeonia türlerinde monoterpen bileşikleri, "kafes benzeri" bir pinan iskeletine sahip olan ve biyolojik olarak aktif ana bileşenlerdir (Ding vd., 2012).

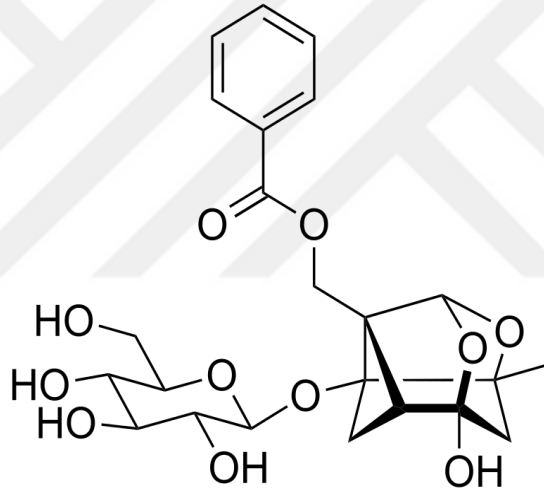
Wu vd. 2010 yılında yapmış oldukları çalışmada Paeonia cinsinin 13 monoterpen, 45 monoterpen glikozit, 22 triterpenoid, 8 flavonoid, 31 tanen, 26 fenol ve fenolik glikozit içerdiğini bildirmişlerdir.

P. peregrina'nın köklerinde yapılan çalışmada paeonidanin isimli bir monoterpen glikozit izole edilmiş ve paeoniflorigenon, benzoilpaeoniflorin, benzoik, *p*-hidroksibenzoik ve gallik asit de tanımlanmıştır (Kostova vd., 1998).

Zhao vd. 2016'da yapmış oldukları çalışmada, Paeonia türlerinden paeoniflorin A, paeoniflorigenone, paeonisuffral, 3-O- methylpaeonisuffroll, paeonilactinone, deoxypaeonisuffrone, paeonisuffrone, paeonilactone A, paeonilactone C, 9-hydroxypaeonilactone A, paeonilactone B, lactinolide, paeonisothujone, paeonilide olmak üzere on dört monoterpen izole etmişlerdir. Paeoniflorin A, kök korteks *P. suffruticosa*'dan elde edilmiştir. Ana biyoaktif bileşenlerden biri olan paeoniflorigenone *P. suffruticosa*, *P. peregrina* ve *P. albiflora* olmak üzere üç türde bulunmuştur. Çoğu monoterpen, *P. suffruticosa*'dan elde edilmiştir. Üç *p*-mentan monoterpen, paeonilactone A, paeonilactone C, 9-hydroxypaeonilactone A, *P. albiflora*'dan elde edilmiştir. Ayrıca çalışmada Paeonia türlerinden toplam 58 monoterpen glikozit izole edilmiştir. Bu bileşiklerden paeoniflorin, oxypaeoniflorin, benzoylpaeoniflorin, benzoyloxypaeoniflorin, mudanpioside A, mudanpioside B, mudanpioside C, mudanpioside D, mudanpioside E, mudanpioside F, mudanpioside G, mudanpiosdie H, mudanpioside I, galloylpaeoniflorin, galloyloxypaeoniflorin, 8-debenzoylpaeoniflorin, 8-O-galloyldebenzoylpaeoniflorin, 8-O-isovaleryldebenzoylpaeoniflorin, 6'-O-galloyldebenzoylpaeoniflorin, 6'-O-vanillylpaeoniflorin, 3',6'-di-O-galloylpaeoniflorin, isomaltopaeoniflorin, 6'-O-benzoyl-4''-hydroxy-3''-ethoxypaeoniflorin, 4-O-ethypaeoniflorin, 4''-hydroxy-3''-

methoxy-4-O-methylpaeoniflorin, 4-O-methylpaeoniflorin, wurdin, paeonin A, paeonin B, paeonin C, albiflorin, 6'-O-galloyldesbenzoylalbiflorin, paeonivayin, 6'-O-benzoyl-4''-hydroxyalbiflorin, 6'-O-(β -D-glukopiranosil) albiflorin, paeonidaniol A, paeonidaniol B, 1-O-(β -D-glukopiranosil) paeonisuffrone, paeonidanin, (Z)-((1S,5R)- β -piren-10-yl β -vicianoside)) çeşitli sübstütüentlere sahip pinan tipi türevler olduğu bildirilmiştir. Daha sonra *P. lactiflora*'dan 6-O-(β -D glukopiranosil) laktinolid ve laktiflorin elde edilmiştir.

Paeonia köklerindeki biyoaktif bileşenler üzerinde kimyasal yapı, biyolojik aktivite, metabolizma ve farmakokinetik açısından yapılan çalışmaların gözden geçirilmesi, paeoniflorin (Şekil 9) ve albiflorinin önemli bileşenler olduğunu ortaya koymaktadır (Lee vd. 2009). Bu moleküller, bir kafes yapısına sahip monoterpenin bir benzoik asit ve bir glukoz şekeri ile oluşturdukları bileşenlerdir.



Şekil 9. Paeoniflorin molekülünün kimyasal yapısı

Kaynak. URL-1

1.8. Bitki Bileşenlerinin Kromatografik Yöntemlerle Tanımlanması

Kromatografi, analitik bir yöntemdir ve çoğunlukla kimyasal bileşenlerin ayrılması, nitelendirilmesi ve miktar tayini için kullanılmaktadır. Kromatografik yöntemde bir sabit faz ve bir de hareketli faz bulunmaktadır. Karışımındaki bileşenler, gaz veya sıvı bir faz ile birlikte hareket ettirilerek sabit faz üzerinden geçirilir ve bileşenlerin sabit fazı terketmelerine bağlı olarak ayırım gerçekleşir. Bu yöntemler kolon kromatografisi ve düzlemsel kromatografi olmak üzere ikiye ayrılır. Kolon kromatografisinde, sabit faz ince bir kolonda tutulur ve hareketli faz basınç altında bu sabit faz arasından geçirilir. Düzlemsel kromatografide ise, sabit faz düz bir plaka

üzerine veya bir kâğıdın gözenekleri arasına tutturulur ve hareketli faz sabit faz arasından kapiler veya yerçekimi etkisiyle hareket eder. Kromatografi hareketli fazın (sıvı, gaz, süper akışkan) tipine göre de sıvı kromatografi, gaz kromatografi ve süperkritik akışkanlı kromatografi şeklinde sınıflandırılır (Koyunoğlu, 2008).

Kromatografik yöntemlerde sabit ve hareketli faz ile numune arasındaki etkileşimler dikkate alınarak kullanılan mekanizma çeşitliliğine göre kromatografi, adsorpsiyon, dağılma, iyon çifti, iyon değiştirme, moleküler eleme ve afinite kromatografisi şeklinde sınıflandırılır (Koyunoğlu, 2008).

Adsorpsiyon kromatografisi bir sıvı-katı veya gaz-katı kromatografisidir. Bu kromatografide sıvı veya gaz hareketli faz olup ve katı sabit faz ayrılacak molekülleri tersinir olarak adsorblayarak ayırım gerçekleşir. Dağılma kromatografisi, sıvı-sıvı kromatografisi olarak da adlandırılır ve prensibi birbirleriyle karışmayan iki sıvı faz arasında maddelerin dağılması ilkesine dayanmaktadır. Sabit faz olarak, inert bir destek katının üzeri kaplanmış veya destek katıya kimyasal olarak bağlanmış sıvı sabit fazlar kullanılır. Dağılma kromatografisi sabit faz ve hareketli faz polaritelerinin farklılığına göre ters faz sıvı kromatografisi ve normal faz sıvı kromatografisi olarak ikiye ayrılmaktadır (Koyunoğlu, 2008).

Ters faz sıvı kromatografisinde sabit faz polaritesi hareketli faz polaritesinden daha düşüktür ve sabit fazda daha çok alıkonulan apolar maddelerin ayırımında kullanılır. Bu kromatografide sabit faz olarak en fazla oktadesil silan (ODS) kullanılır ve 18 karbon atomu içerir. Ayrıca C8 ve daha kısa alkil zincirleri, sikloheksil ve fenil bağlanmış sabit fazlar da kullanılmaktadır. Hareketli fazlar genellikle su veya sulu tampon çözeltileri ile suyla karışabilen organik çözücü karışımlarından oluşmaktadır (Koyunoğlu, 2008).

Normal faz sıvı kromatografisinde sabit faz polaritesi, hareketli faz polaritesinden daha yüksektir. Bu kromatografide; polaritesi yüksek olan maddeler, polar olan sabit faz ile daha fazla etkileşmekte, buna bağlı olarak kolonu daha geç terketmektedir. Sabit faz olarak genellikle silika veya alümina ve hareketli faz olarak ise hekzan, metilen klorür, kloroform, dietil eter veya bunların karışımı kullanılır. Kimyasal bağlarla -CN, -NO₂ veya -NH₂ gibi polar fonksiyonel gruplar silika jelin üzerine bağlanarak farklı sabit fazlar elde edilir (Koyunoğlu, 2008).

Ters faz ve normal faz sıvı kromatografilerindeki farklılıklar Tablo 3'te özetlendi.

Tablo 4. Ters faz ve normal faz sıvı kromatografilerinin karşılaştırılması

Özellikler	Ters faz	Normal faz
Sabit Faz Polaritesi	Düşük	Yüksek
Hareketli Faz Polaritesi	Ortadan Yüksekçe	Düşükten Ortaya
Elüsyon Sırası	En polar önce	En az polar önce
Hareketli Faz Polarite Artışı	Artan elüsyon zamanı	Azalan elüsyon zamanı

Ters faz sıvı kromatografisinin uygulama alanının çok olması, sistem kontrolünün daha kolay olması, hareketli faz olarak kullanılan organik çözücülerin ekonomik olması ve sulu tampon çözeltilerinin oranının yüksek tutulması nedeni ile günümüzde en çok tercih edilen ayırım tekniğidir (Koyunoğlu, 2008).

1.8.1.Yüksek-Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, kromatografik ayırma teknikleri arasında geniş kullanım alanına sahiptir. HPLC'nin çalışma prensibi; sıvı fazda çözünebilen analitlerin kolon içerisindeki hareketsiz dolgu materyaline (sabit faz) olan ilgilerine göre kolondan hareketli faz yardımı ile farklı sürelerde uzaklaşmasına dayanır. Karışım halindeki örnek; uygun çözücüde çözülür, yüksek basınç altında kromatografik kolondan geçirilir ve bu işlem ile bileşenlerine ayrılması sağlanır. Bileşenlerin birbirinden ayrılması çözünmüş bileşenler ile sabit faz arasındaki etkileşime bağlıdır. Sabit faz ve hareketli faz olarak kullanılan çözücüler değiştirilerek çözünmüş bileşenler ile istenilen etkileşim elde edilir. (Çavuş, 2011).

HPLC sistemi; Şekil 10'da belirtildiği gibi pompa, enjektör, kolon ve kolon fırını, dedektör ve bilgisayar birimlerinden oluşmaktadır. Kolon, HPLC sisteminde en önemli bölümdür ve ayırma işlemi bu bölümde gerçekleşir. Uygun çözücüde çözünmüş karışım halindeki örnek sisteme enjekte edilir. Hareketli faz ile birlikte kolona pompalanan örnek, kolon içinden geçerken bileşenlerine ayrılmaya başlar. Her ayrılan bileşenin gönderdiği sinyaller dedektör tarafından kaydedilir. Dedektör tarafından kaydedilen ve bilgisayara aktarılan sinyallerin tamamına kromatogram adı verilir (Çavuş, 2011).



Şekil 10. HPLC cihazının şematik gösterimi

Kaynak. Er, 2017

HPLC sistemlerinde kullanılan hareketli faz ve bileşimi, kromatografik performansı etkiler. Bunun için kullanılacak hareketli fazların seçiminde bazı özelliklere dikkat edilmesi gerekmektedir. Bunlar; yüksek derecede saflık, dedektör ile uyumluluk, düşük viskozite, örneği çözebilme, kimyasal açıdan inert olması ve uygun fiyat olmasıdır (Çavuş, 2011).

HPLC analizlerinde genellikle UV dedektörler kullanılır. Çoğu organik molekül ve fonksiyonel grup 190 nm'den 800 nm'ye kadar olan ultraviyole (UV) ve/veya görünür (Vis) alanda elektromagnetik enerji absorplar. Çözeltiden sürekli ışın geçmesi sonucu analitler tarafından ışının bir kısmı absorbe edilebilir. Bu absorpsiyon olayı çoğunlukla moleküllerdeki bağ elektronlarının uyarılmasından kaynaklanır. Bu yöntemle dayanarak çalışan moleküler absorpsiyon spektroskopisi ile bir moleküldeki fonksiyonel grupların tanımlanması ve fonksiyonel grupları taşıyan bileşiklerin kantitatif tayini sağlanır (Çavuş, 2011).

1.9. Bitki Bileşenlerin Spektroskopik Yöntemlerle Tanımlanması

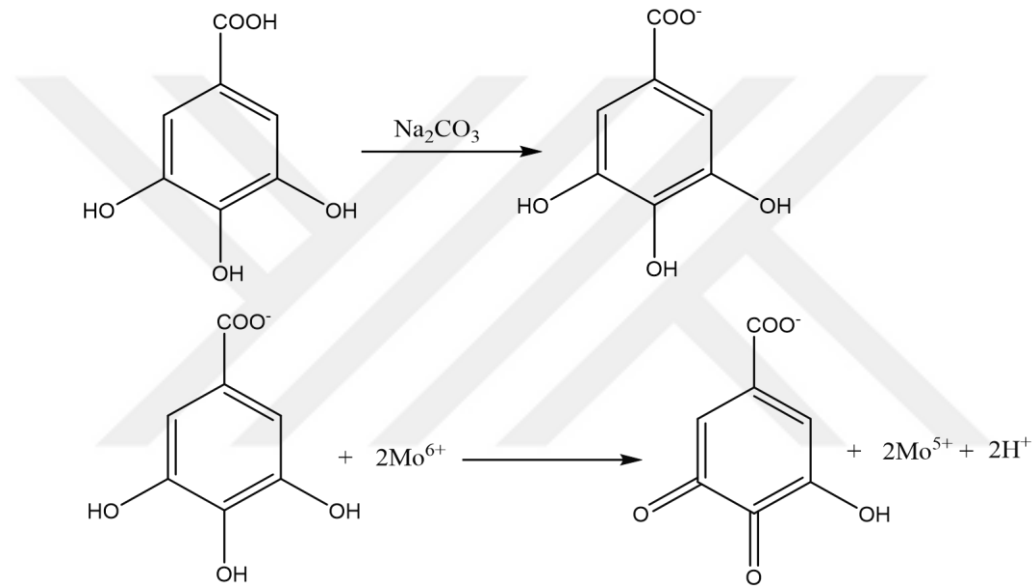
Fenolik bileşiklerin analizinde genellikle üç önemli basamak olan ayrıştırma, saflaştırma ve miktar tayini kullanılır. Bu bileşiklerin tespitinde spektrofotometrik (kolorimetrik reaksiyonlar), HPLC, gaz kromatografisi (GC), enzimatik esaslı ve biyosensörlere dayalı yöntemler başta olmak üzere birçok yöntem kullanılmaktadır (Gomez-Caravaca vd., 2006).

Yapılan çalışmalar incelendiğinde bitki türlerinde toplam fenolik ve antioksidan kapasitesi arasında doğrudan bir ilişkinin olduğu görülmüştür. Son yirmi yıldır bitki ekstraktlarında antioksidan kapasitesini tayin etmek için birçok yöntem geliştirilmiş ve uygulanmıştır. Bu yöntemler, Demir (III) iyonu indirgeme antioksidan

gücü (FRAP), Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi (ORAC), 2,2'-azinobis (3-etil-bezotiazolin 6 sulfonat) (ABTS) ve 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil radikali (DPPH•)'dir (Deniz, 2021).

1.9.1. Folin Ciocalteu Yöntemiyle Toplam Fenol İçeriğini Belirleme

Polifenolik bileşiklerin antioksidan kapasiteleri yüksektir ve bu bileşikler metal iyonlarını kompleksleştirme, radikal reaksiyonları inaktif hale getirme, hidroperoksitin reaktif oksiradikallere dönüşmesini engelleme özelliğine sahiptir (Dimitros, 2006).



Şekil 11. Gallik asitin alkali ortamda Folin-Ciocalteu reaktifiyle etkileşimi

Fenolik bileşiklerin miktar tayininde Folin-Ciocalteu en fazla kullanılan reaktiftir. Folin-Ciocalteu fosfomolibdik asit ve fosfotungstik asitin karışımından oluşur. Alkali ortamda oluşan molibdenyum sarı renkli kompleksinin ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) oksidasyon basamağı +6' dır. Fenolik bileşikler gibi indirgeme ajanının varlığında bu kompleks oksidasyon basamağı +5 ila +6 arasında olan tungsten-molibdenyum mavi kompleksine indirgenir. Mavi renkli kompleksin absorbans şiddeti 760 nm de ölçülür. İndirgeme ajanı ile absorbans şiddeti doğru orantılıdır (Singleton vd., 1999; Huang vd., 2005; Abdille vd., 2005; Dastmalchi vd., 2007).

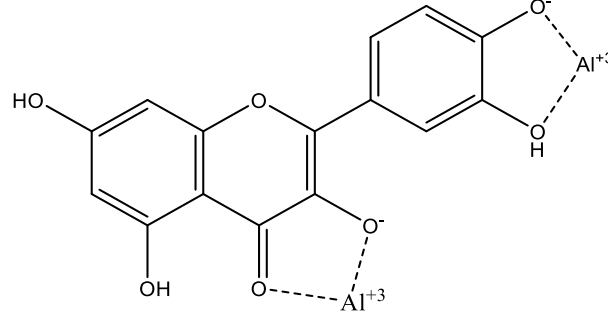
Şekil 11' de gallik asitin bazik bir ortamdaki fenolat anyonu üretmek suretiyle yükseltgenmesini göstermektedir. Burada, Singleton'a (1999) göre oluşan fenolat

anyonu ve Folin-Ciocalteu reaktifi arasındaki oksidasyon tepkimesinde Folin-Ciocalteu reaktifinin bir bileşeni olan molibden indirgenir ve reaksiyon ortamında sarı renk maviye döner (Singleton vd., 1999).

1.9.2. Toplam Flavonoid İçeriği (TF)

Alüminyum klorür ($AlCl_3$), ilk olarak antisiyaninler olmak üzere birtakım kimyasal gruplarının tanımlanmasında kullanılmıştır. Alüminyum klorür, enstrümental yöntemlerde kayma reaktifi olarak görev alır. Flavonoidlerin yapısal analizi için de kullanılır. Alüminyum katyonu, flavonoidlerle kararlı kompleksler oluşturur ve spektrofotometrik analizle, absorpsiyon şiddetini daha uzun dalga boylarına doğru kaydırır. Sonuç olarak bitkide en çok bulunan fenolik asitlerle etkileşimden kaçarak flavonoid miktarını belirlemek mümkündür (Marcucci vd., 1998). Spektrofotometrede 425 nm' de alüminyum klorür kullanılarak ölçüm yapılır. 425 nm' de flavonoid-Al kompleksi ilgili flavonoidten çok daha uzun dalga boylarında ışığı emer. Fenolik asitler çok daha düşük dalga boylarında ışığı absorbe ettikleri için absorpsiyon ölçümlerinde karışımı önlerler (Marcucci vd., 1998). Bitkilerde en çok bulunan flavonoid çeşidi bir flavonol olan kuersetindir. Flavonollerin alüminyum ile kompleksleri 425 nm'ye yakın dalga boylarını absorblarken, flavonlardan türetilen kompleksler daha düşük dalga boylarını absorbe eder ve bu da flavon açısından zengin karışımların saptanmasında daha düşük bir değere neden olur (Marcucci vd., 1998). Alüminyum klorür ($AlCl_3$) kolorimetrik metodunun kuralı, $AlCl_3$ 'ün, flavonların ve flavonollerin C-4 keto grupları ve C-3 veya C-5 hidroksil grubu ile kararlı asit kompleksleri oluşturmasıdır. Ayrıca, flavonoidlerin A veya B halkasındaki ortodihidroksil grupları ile kararsız asit kompleksleri formundadır (Bag vd., 2015). Şekil 12' de Al (III)'un kuersetin ile oluşturduğu kompleksin kimyasal yapısı verilmiştir. Toplam flavonoid tayininde kullanılan bu spektrofotometrik yöntem, alüminyum nitrat ve potasyum asetat içeren çözelti ile flavonoid içeren

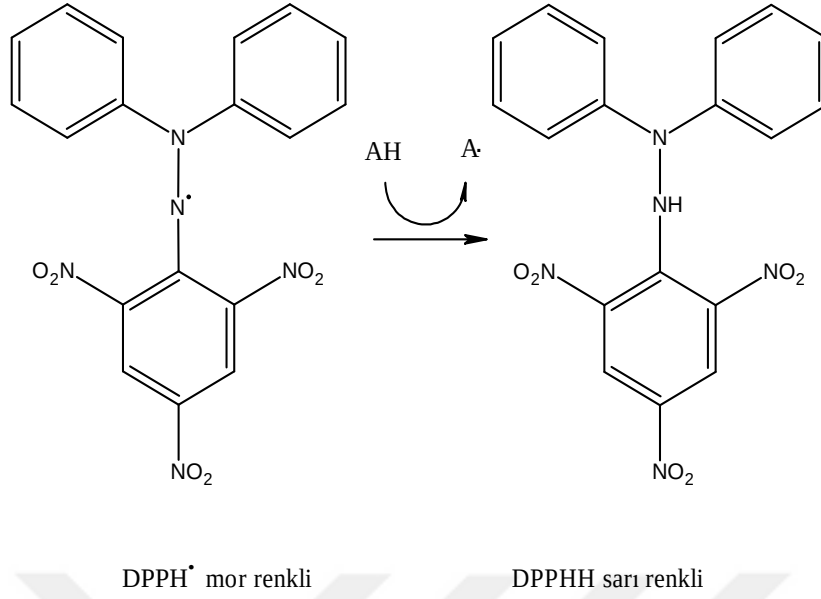
çözeltinin karıştırılması ve 30 dakika sonunda oluşan sarı rengin 415 nm’de absorbands değerlerinin ölçülmesinden ibaredir.



Şekil 12. Metanolik AlCl₃ çözeltisinde Flavonoid-Al kompleksinin oluşumu

1.9.3. DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesi

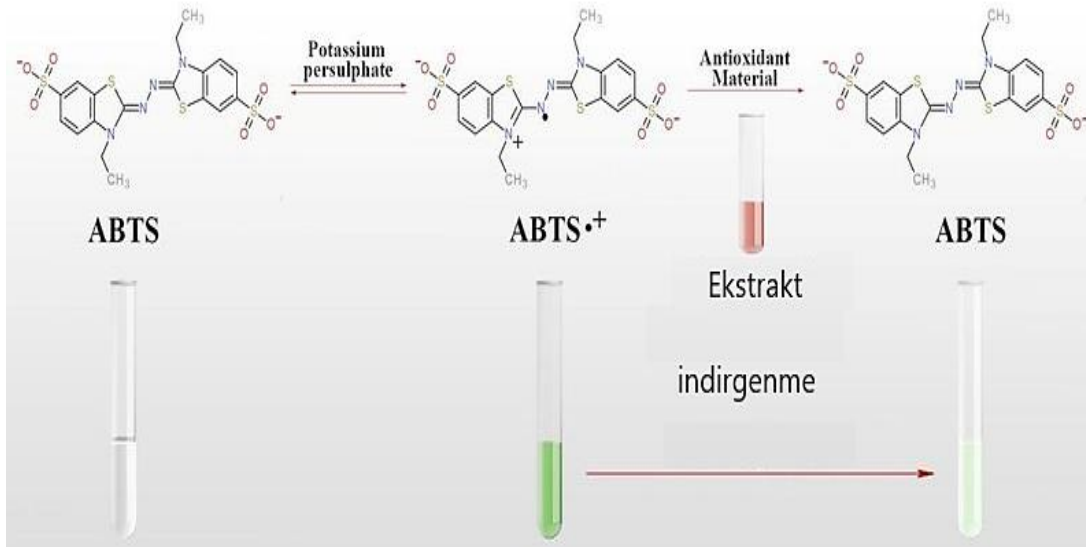
DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) sentetik bir serbest radikal olup çözeltilerindeki mor rengi 517 nm’de maksimum absorbands vermektedir (Cuendet vd., 1997). Antioksidanlarla DPPH•’ın tepkimesi sonucunda DPPH•’ın indirgenerek radikal olmayan forma dönüşmesi rengin mordan sarıya dönüşmesiyle gözlenir (Şekil 13). Bu özellik tepkimenin görsel olarak izlenmesine izin verir (Teixeira vd., 2013). Bu durumda mor rengin şiddetindeki azalma antioksidan maddenin radikal temizleme aktivitesinin hesaplanmasında kullanılır. Standartlarla ve ekstraktlarla reaksiyona giren DPPH• reaktifinin oluşturduğu absorbands değişimi 517 nm’de ölçülüp, değişen derişimlere karşı absorbands şiddeti grafiğe geçirilir.



Şekil 13. DPPH• serbest radikal temizleme yönteminin çalışma mekanizması (AH: antioksidan bileşiği temsil etmektedir).

1.9.4. ABTS Radikal Temizleme Aktivitesinin Belirlenmesi

ABTS Radikal Temizleme Aktivitesi, antioksidanların ilavesiyle mavi/yeşil renkli 2,2'-azinobis (3-etil-benzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikalın indirgenmesi sonucu absorbansının değişmesi esasına dayanır. ABTS, potasyum persülfat ile oksitlenerek radikal bir kation formuna dönüşür ve 734 nm'de maksimum absorbans yapar. Bir antioksidan bileşen, bu radikal forma bir elektron verir ve onu radikal olmayan bir forma dönüştürerek renginde değişime sebep olur. Bu renk değişiminden faydalanılarak çeşitli maddelerin antioksidan değeri hesaplanır. Ekstraktların ABTS radikal temizleme kapasitesi 24 troloks, askorbik asit, gallik asit gibi standartlarla karşılaştırılabilir ve sonuçlar SC_{50} olarak verilir (Ali vd, 2008; Arnao vd., 2001).



Şekil 14. ABTS radikal temizleme yönteminin çalışma mekanizması

1.10. Literatür Özeti

Yeşilada vd. 1989'da *Paeonia peregrina* ve *Paeonia daurica* türlerinin antienflamatuar aktivitesi üzerine yaptıkları çalışmada *Paeonia daurica* türünün köklerinin metanollü ekstresinin standart olarak kullanılan aspirine göre yüksek antienflamatuar aktivite göstermesine karşılık *P. peregrina* köklerinde belirgin bir aktivite tespit edilmemiştir. Bundan yola çıkarak Yeşilada vd. 1992 yılında *Paeonia daurica* türünün köklerinin antienflamatuar özelliği üzerinde bir çalışma yapılmış ve Türkiye'de halk tıbbında kullanılmayan bu bitkinin aslında hazır ilaç yerine kullanılabileceği ortaya konulmuştur.

Ivanova vd. 2002 yılında yapmış oldukları çalışmada; *Paeonia peregrina* ve *Paeonia tenuifolia* köklerinden elde edilen aromatik ve alifatik asidik fraksiyonların GC-MS analizinde yüksek miktarda benzoik asit ve monohidroksi, dihidroksi ve trihidroksi türevleri olduğunu belirlemişlerdir.

Şahin, 2007 yılında yapmış olduğu çalışmada; Çanakkale-Kazdağ'dan toplanan *Paeonia mascula* subsp. *arietina*, Denizli-Bozdağ'dan toplanan *Paeonia kesrouanensis*, Çanakkale-Çam Yayla'dan toplanan *Paeonia peregrina* bitkilerinden elde edilen ekstraktların antibakteriyel aktivitelerini araştırmıştır. Elde edilen ekstraktların antibakteriyel etkileri disk difüzyon yöntemi kullanılarak *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Shigella*

sp. ATCC, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica* O:3, *Escherichia coli* ATCC 11230, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Salmonella enteritidis* ATCC 40376 bakterileri üzerinde denenmiştir. *P. mascula* subsp. *arietina*'nın incelenen bitkiler arasında en yüksek antibakteriyel etkiye sahip olduğu, *S. aureus*'un iki suşunun ve *E. coli* O157:H7'nin en duyarlı ve *E. coli* ATCC 35218 ve *E. faecalis* ATCC 29212 suşlarının en dirençli olduğu ve *P. mascula* subsp. *arietina* ve *P. peregrina*'nın 0,5M Tris-HCl, PH: 8,0 ekstraktlarının sadece *S. aureus* ATCC 25923 suşuna etkili olduğu tespit edilmiştir.

Braca vd. 2008'de *Paeonia lactiflora* köklerinden yeni monoterpenler (4-O-methyl-paeoniflorin, isopaeoniflorin, isobenzoylpaeoniflorin, paeoniflorin ve benzoylpaeoniflorin glikozitleri) izole etmişlerdir.

Koyunoğlu, 2008 yılında; *Paeonia* türleri içerisindeki monoterpen glikozitlerinin yapı tayinleri ve kromatografik analizleri için yöntem geliştirilmesi adlı çalışmada, *Paeonia mascula* subsp. *arietina*'nın toprak altı kısımlarının monoterpen yapıları bileşiklerini incelemiştir. n-BuOH fazından elde edilen özüt ön fraksiyonlama ve saflaştırma işlemleriyle, kromatografik yöntemler kullanılarak izolasyon çalışmaları sonunda, monoterpen glikozit yapısındaki 2 bileşik; Paeoniflorin ve Oksipaeoniflorin elde edilmiş ve bileşikler yapıları spektroskopik yöntemler ile aydınlatılmıştır.

Ünlü, 2010 yılında, Türkiye'de doğal olarak yetişen 10 *Paeonia* (*P. mascula* (L.) Miller subsp. *mascula*, *P. mascula* (L.) Miller subsp. *bodurii* N.Özhatay, *P. mascula* (L.) Miller subsp. *arasicola*, *P. daurica*, *P. arietina*, *P. tenuifolia*, *P. peregrina* Miller, *P. kesrouanensis*, *P. turcica*, *P. wittmanniana*) taksonlarının kök, rizom, gövde, yaprak ve yaprakçık sapı ile yaprakları üzerinde anatomik çalışmalar yaparak taksonlar arasındaki yakınlık derecelerini saptamaya çalışmıştır. Yapılan karşılaştırmalı anatomik çalışmalar sonucunda ise incelenen 10 *Paeonia* taksonunun anatomik özelliklerine dayanarak birbirinden ayrılmasının mümkün olmadığı saptanmıştır. Taksonları birbirinden ayırt edici fark olmamasına rağmen taksonların yakınlıklarının belirlenmesinde anatomik özelliklerinin faydalı olduğu görülmüştür.

Wu vd., 2010 tarafından *Paeonia* cinsinin kimyasal içerik ve biyoaktiviteleri ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalara göre 13 monoterpen, 45 monoterpen

glikozit, 22 triterpenoid, 8 flavonoid, 26 fenol ve fenolik glikozit ve 31 tanen ve birçok sekonder metabolitin izole edildiği bildirilmiştir.

Koo vd., 2010 Kore, Çin ve Japonya'da uzun süredir geleneksel ilaçlar olarak kullanılan iki Paeoniaceae familyasının köklerini (*Paeonia lactiflora*'nın kuru kökleri ve *P. suffruticosa*'nın kuru kök kabuğu) incelemiştir. Hem *Paeonia lactiflora* hem de *P. suffruticosa*, kardiyovasküler hastalıklara çare olarak, kan dolaşımını iyileştirmek veya başka kullanımlar için kullanılmıştır. Her iki bitkinin de kan pıhtılaşmasının ve/veya trombosit agregasyonunun engellenmesine katkıda bulunan ortak aktif bileşenler içerebileceği varsayılmıştır. Her iki bitki ilacında da bulunduğu bildirilen on sekiz bileşik, trombosit agregasyonu ve kan pıhtılaşması üzerindeki etkileri açısından değerlendirilmiştir. Paeonol, paeoniflorin, benzoylpaeoniflorin ve benzoyloxypaeoniflorin başlıca ortak aktif bileşenler olarak bulunmuş ve hem trombosit agregasyonu hem de kan pıhtılaşması üzerindeki inhibe edici etkileriyle toplu olarak kan dolaşımını iyileştirmeye katkıda bulunacakları düşünülmüştür.

Sevim vd., 2011 Türk Paeonia taksonlarının tohum etanol ekstraktlarının in vitro yöntemlerle anti-amnezik aktivite taraması çalışmasında; Paeonia türlerinin nörodejenerasyon ile ilişkili enzim inhibisyonu yoluyla in vitro güçlü anti-amnezik aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışma ile bitkinin geleneksel tıpta amneziye karşı kullanılabileceğini savunmuşlardır.

Verma vd., 2015 yılında yaptıkları çalışmada, uzun zamandan beri epilepsi için geleneksel bir ilaç olarak kullanılan Himalaya Şakayıkı (*Paeonia emodi* Royle) köklerinden hidrodamıtılmış uçucu yağı, gaz kromatografisi-alev iyonizasyon dedektörü (GC-FID), gaz kromatografisi-kütle spektrometresi deneyi (GC-MS) ve nükleer manyetik rezonans (NMR, ¹H&¹³C) kullanılarak araştırılmıştır. Toplam yağ bileşiminin %94'ünü oluşturan yirmi dört bileşen tanımlanmıştır. Salisilaldehit, Paeonia türlerinin kök uçucu yağlarının ana bileşeni olarak da tanımlanmıştır.

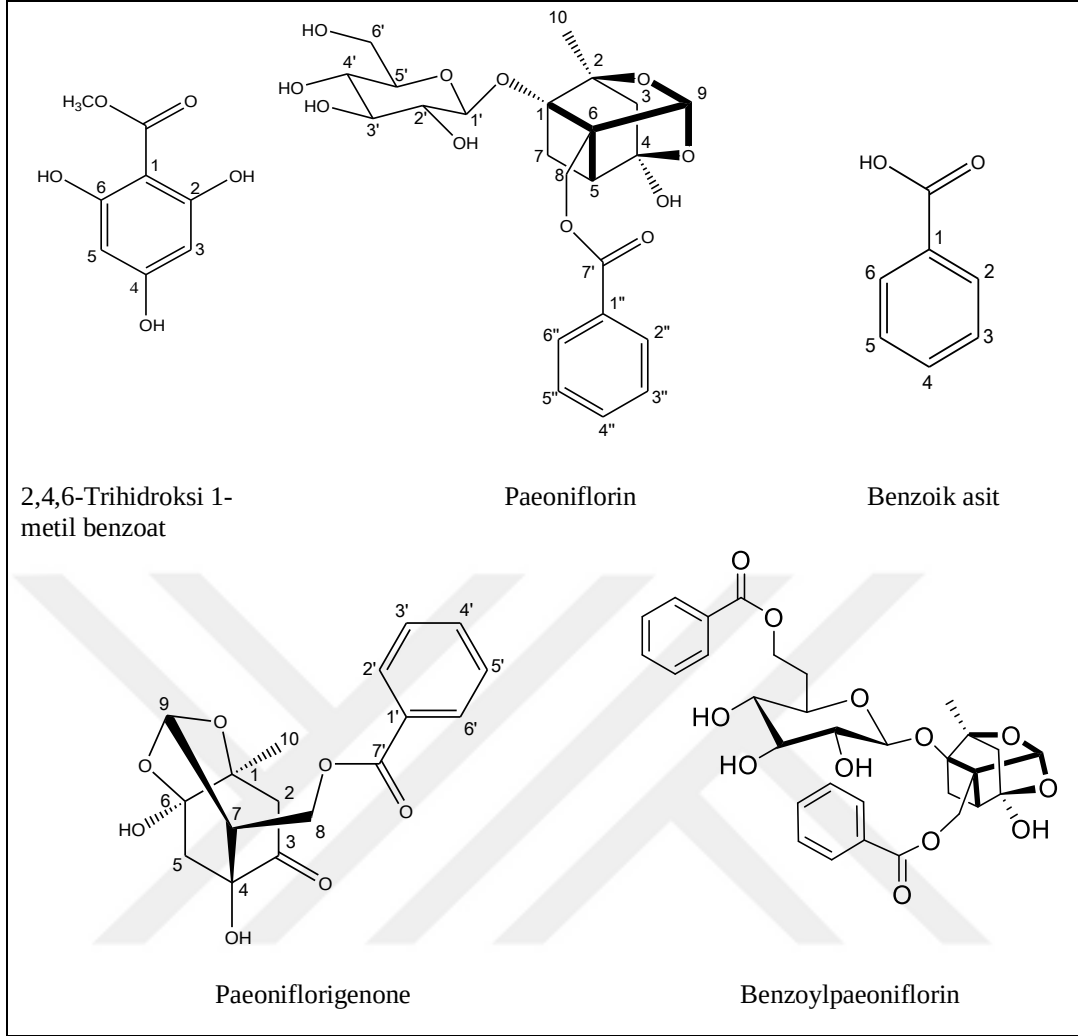
2018 yılında Mammadova, *Paeonia mascula* (L.) Mill. subsp. *mascula* ve *Paeonia tenuifolia* L. bitkilerinin antibakteriyel aktivitesini araştırmıştır. Çalışmada *Paeonia mascula* (L.) Mill. subsp. *mascula* bitkisinin yaprak, dal ve kök, *Paeonia tenuifolia* L. bitkisinin yaprak ve dallarından etanol, metanol, aseton, hexan, distile su, kloroform ve etil asetat çözücülerini kullanılarak ekstraktlar hazırlanmıştır. Hazırlanan ekstraktın bazı patojen bakteriler üzerine antibakteriyel etkileri disk difüzyon yöntemi

kullanılarak incelenmiştir. Ekstraktların *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Staphylococcus epidermidis* bakterilerine karşı en yüksek antibakteriyel aktiviteyi gösterdiği tespit edilmiştir.

İnceçayır, 2018 yılında yapmış olduğu çalışmada *Paeonia peregrina* L. yaprak ekstraktlarının *S. aureus* bakterileri üzerinde yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiğini belirlemiş ve test bakterileri üzerinde geniş spektrumlu antibakteriyel etki tespit etmiştir.

Tunç vd., 2019 yılında yapmış olduğu çalışmada; *Paeonia peregrina*, *Paeonia mascula* subsp. *mascula* ve *Paeonia tenuifolia*'nın antibakteriyel aktivitesi incelenmiştir. *Paeonia peregrina* aseton ile hazırlanan yaprak ekstraktının *S. aureus* bakterisi üzerinde 17,3 mm inhibisyon zonu oluşturduğu belirlenmiştir ve *Paeonia* türlerinin patojenlerin neden olduğu hastalıkların tedavisinde bazı sentetik antibiyotiklere alternatif olarak kullanılabileceği gösterilmiştir.

Demir vd., 2019 yılında yapmış oldukları çalışmada; *Paeonia daurica* subsp.'nin meyve, yaprak, gövde ve köklerinin metanolik özütleri bakteriyel ve viral DNA polimerazları üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Bu nedenle *Paeonia daurica* subsp.'in kökü ele alınarak inhibisyona etki eden bileşenlerin neler olduğu araştırılarak beş molekül (Şekil 15) saflaştırılmıştır. MMLV-RT (lösemi) virüsünü bu beş molekül güçlü bir şekilde inhibe ettiği görülürken bakteriyel polimerazlar (PolC ve DnaE2) yalnızca paeoniflorigenone (PD-4) tarafından güçlü bir şekilde inhibe edildiği tespit edilmiştir.



Şekil 15. *Paeonia daurica* Andrews bitkisinin kök kısmından saflaştırılan moleküller

Kaynak. Demir vd., 2019

2021 yılında Demir vd., *Paeonia daurica* Andrews bitkisinin kök, sap, meyve ve meyve kabuğunun uçucu yağ (EO) içeriğini araştırmıştır. Her bitki numunesi için EO ekstraktları hazırlamak için hem katı fazlı mikro ekstraksiyon (SPME) hem de hidro-distilasyon (HD) kullanılmıştır. SPME-EO özütünde elli iki bileşik tanımlanırken, HD-EO özütünde altmış sekiz bileşik tanımlanmış ve her iki özütte de birlikte on sekiz bileşik bulunmuştur. EO'ların ana bileşenleri salisilaldehit, mirtanal, palmitik asit, metil salisilat ve myrtenal olarak belirlenmiştir. Bitki kısımları arasında tanımlanmış en zengin EO içeriği meyve kabuğunda tespit edilmiştir. Ayrıca, toplam SPME-EO ve HD-EO özütleri, Moloney Murine Lösemi Virüsü Ters Transkriptaz (M-MLV-RT) üzerindeki inhibisyonları için primer uzatma testi (tek dATP ölçümü)

kullanılarak değerlendirilmiştir. M-MLV-RT, her iki EO ztnn varlığında 14-mer primerine tek bir nükleotid ekleyememiş ve hem SPME hem de HD toplam EO ztlerinin M-MLV-RT üzerinde gl inhibisyon etkisine sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. HD-meyve ekstraktındaki α -bisabolol, β -bisabolol ve benzoik asit-
etilester (bir benzoik asit türevi), literatüre göre inhibitör etkiden sorumlu potansiyel bileşikler olarak değerlendirilmiştir.



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler Tablo 5’te belirtildi.

Tablo 5. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler

Sıra No	Kimyasalın Adı	Kimyasalın Formülü	Kimyasalın Markası
1	ABTS (2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik acid) diamonyum tuz)	C ₁₈ H ₂₄ N ₆ O ₆ S ₄	Sigma Aldrich
2	Asetik asit (AA) (HPLC saflıkta)	CH ₃ COOH	Sigma Aldrich
3	Asetonitril (ACN) (HPLC saflıkta)	CH ₃ CN	Sigma Aldrich
4	DPPH (2,2-difenil-1 pikrilhidrazil)	C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆	Sigma Aldrich
5	Folin ciocalteu reaktifi (HPLC saflıkta)	-	Merck
6	Gallik asit	C ₆ H ₂ (OH) ₃ CO ₂ H	Sigma Aldrich
7	Kuersetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Sigma Aldrich
8	Metanol (HPLC saflıkta)	CH ₃ OH	Sigma Aldrich
9	Potasyum persülfat	K ₂ S ₂ O ₈	Sigma Aldrich
10	Sodyum karbonat	Na ₂ CO ₃	Sigma Aldrich
11	Troloks (HPLC saflıkta)	C ₁₄ H ₁₈ O ₄	Merck

2.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Tez çalışmasında bitki örneklerini ve kimyasal maddeleri tartmak için Pressica marka analitik terazi, ekstraksiyon sonrası çözücüyü uzaklaştırmak için Heidholph marka evaporatör, kurutma işlemleri yapmak için Nüve FN 400 marka etüv, ekstraksiyonu gerçekleştirmek için Heidholph marka ısıtıcılı çalkalayıcı, örnekleri parçalamak için Waring Blender marka öğütücü, çöktürme işlemi yapmak için Hettich marka santrifüj, absorbans ölçmek için Thermo Scientific Multiskan Go marka spektrofotometre, numunelerin çözünmesi sağlamak için Bandelin Sonorex marka su banyosu kullanıldı.

2.3. *Paeonia mascula* (L.) MILLER subsp. *bodurii* (N. ÖZHATAY) Bitkisinin Toplanması

Tez çalışmasında kullanılan *Paeonia mascula* (L.) MILLER subsp. *bodurii* (N. ÖZHATAY) bitkisi 20 Mayıs 2021 tarihinde Türkiye’nin Çanakkale iline ait Kalkım ilçesinin 950 metre yükseklikteki bölgesinden toplandı. Toplanan bitkilerin

tanımlaması Prof. Dr. Fatma Neriman ÖZHATAY tarafından yapıldı. Tez çalışmasında toplanan bitkilerin kökleri kullanıldı.

2.4. Bitki Örneklerinin Ekstraksiyonu

Tez çalışması için toplanan bitki örnekleri, tazeliklerini koruması için derin dondurucuda ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de) yapılacak ekstraksiyon işlemine kadar bekletildi. Sıvı azot ile bitki örneklerinin kök kısımları kurutuldu ve her bir bitki kök örneği karıştırıcı yardımı ile toz haline getirildi. Toz haline getirilen bitki kök örneklerinden 3'er gram alındı. Üzerlerine 5 kez 5 mL metanol eklendi ve 1 dk vorteks, 10 dk. ultrasonik banyoda karıştırdıktan sonra $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de çalkalayıcıda 344 rpm de 20 dk çalkalandı. Her defasında ekstraktlar 10 dakika boyunca 4900 rpm'de santrifüjlendi ve süpernatantlar balonda toplandı. Supernatantlar evaporatörde $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 5 mL'den daha az hacme kadar buharlaştırıldı ve daha sonra mezürde 5 mL hacme metanol ile tamamlandı. Ekstraktın 2,1 mL'si tüm analizler için çok düşük mL halinde alıgotlandı ve analiz gününe kadar derin dondurucuda saklandı. Geride kalan 2,9 mL ekstrakt ise tamamen kurutuldu. Kuru ekstraktan ekstrakt konsantrasyonları ve ekstraksiyon verimleri hesaplandı.

2.5. Bitki Ekstraktlarında Sekonder Bileşiklerin HPLC-DAD Analizleri

2.5.1. HPLC-DAD Koşulları

Bir Ultimate 3000 DAD dedektör ile bağlantılı Ultimate 3000 HPLC sistemi kullanılarak kromatografik analizler yapıldı (Thermo scientific, Germering, Germany). Fenolik bileşenlerin standartlarının ayrımı için Macherey Nagel (3 mm id) gard kolonu ile birlikte Thermo acclaim C30 kolonu ($150\text{ mm}\times 3\text{ mm id}\times 3\text{ }\mu\text{m pd}$) kullanıldı. Hareketli fazlar; A: Suda %2 asetik asit ve B: %70 asetonitril-%30 su kullanılarak gradient elüsyon ile ayırım sağlandı. Akış hızı 0,37 mL/dk, enjeksiyon hacmi 10 μL ve kolon sıcaklığı $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ idi. 200-400 nm'de çalışan diyot dizi dedektörü ile 254, 280, 315 ve 370 nm'de görülen kromatogramlar değerlendirildi.

2.5.2. Standartlar, Validasyon ve Kalibrasyon

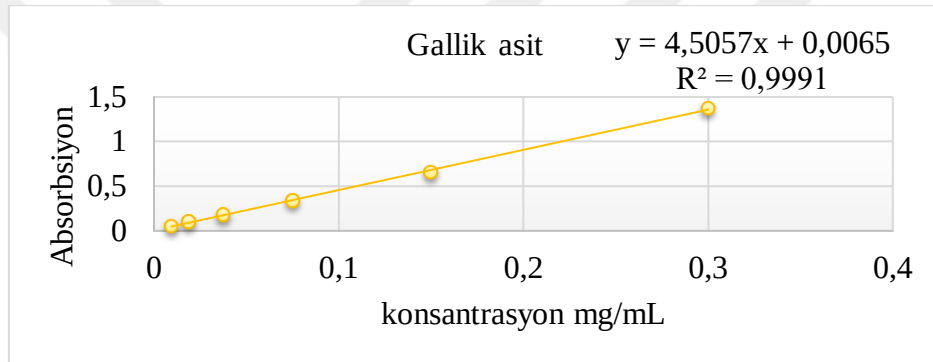
HPLC-DAD analiz yönteminin kalibrasyonu ve validasyonu için 32 fenolik standart kullanıldı. Kullanılan standartların 1 mg/mL olmak üzere stok çözeltileri metanol ile hazırlandı. 32 adet standart bileşiğin aynı çözeltide hazırlanıp birlikte analizlerinde bazı bileşenlerin tam olarak ayrımları mümkün olmadı. Ayrıca bu bileşiklerin tamamının %50 sulu metanol içerisinde en yüksek 25 mg/mL derişimde çözeltilerinin hazırlanmasının mümkün olamayışı nedeniyle iki gruba ayrılarak analiz edildiler. Birinci grup luteolin grubu olarak kodlandı ve bu grupta yer alan standart fenolik bileşikler ise gallik, protokatekuik, gentisik, vanillik, kafeik, ferulik ve rosmarinik asit, kateşin, EGCG, vanilin, luteolin-7-glukozit, hesperidin, fisetin, luteolin, naringenin, hesperetin ve kaempferol olup birlikte analiz edildi (Tablo 6). İkinci grup kuersetin grubu olarak kodlandı ve bu grupta yer alan standart fenolik bileşikler gallik, p-OH benzoik, klorojenik, sirincik, p-kumarik, kikorik ve ellacik asit, epikateşin, rutin, naringin, apigenin-7-glukozit, mirisetin, trans-resveratrol, eriodiktyol, kuersetin ve apigenin olup birlikte analiz edildi (Tablo 7). Kullanılan yöntemin duyarlılığı kalitatif (LOD) ve kantitatif (LOQ) tayin sınırları ile belirlendi. Bunun için 0,625 mg/L derişimlerdeki iki ayrı karışımın 7 tekrarlı yapılan analizler sonucunda her bir standardın pik alanları için elde edilen standart sapma değerinin LOD için 3 ve LOQ için 10 katının kalibrasyon eğimine bölünmesi ile hesaplandı. Burada tanık çözeltilerin pik alanının en az 3 katını sağlayan konsantrasyon LOD ve en az 10 katını sağlayan konsantrasyon ise LOQ olarak hesaplandı. Kesinliğin ölçüsü olarak hem piklerin alıkonma zamanları hem de pik alanları için bağıl standart sapma yani varyasyon katsayısı (CV) hesaplandı.

Kalibrasyon eğrilerinin elde edilmesi için standart fenoliklerin stok çözeltilerinden faydalanarak her birinin 0,3125; 0,625; 1,25; 5; 10 ve 25 mg/L derişimlerde oldukları kalibrasyon çözeltileri hazırlandı. Bu 6 konsantrasyon noktalarına karşılık gelen pik alanları kullanılarak her bir standart için kalibrasyon eğrileri elde edildi ve regresyon katsayıları elacik asit ve kuersetin dışında en az 0,999 olarak bulundu.

2.6. Toplam Antioksidan Bileşiklerin Belirlenmesi

2.6.1. Toplam Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi

Toplam fenolik bileşik belirleme tayini Singleton vd., (1999)'na göre yapıldı. Çalışmada gallik asit ve kuersetin standart olarak kullanıldı. Şekil 16'da gallik asit standardına ait kalibrasyon eğrisi verildi. 20 µL farklı seyreltmelerdeki standart (0,5-0,0078 mg/mL) veya numunelerin üzerine 680 µL saf su, 400 µL 0,2 N folin reaktifi ve 400 µL %10'luk Na₂CO₃ eklendi. Hazırlanan karışımlar karanlık ortamda 30 dakika bekletildi ve daha sonra tanık çözeltiye karşı absorbans değerleri 760 nm dalga boyundaki spektrofotometrede okundu. Elde edilen veriler Tablo 8' de verildi.

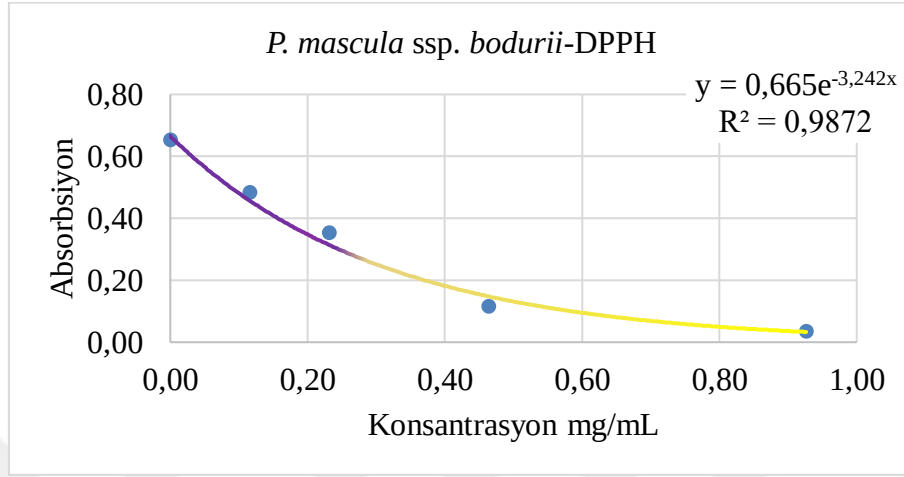


Şekil 16. Gallik asit standardına ait kalibrasyon eğrisi

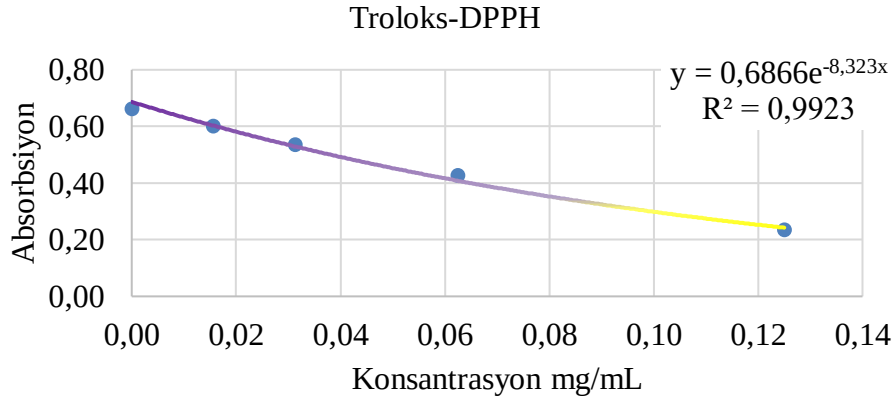
2.6.2. DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesinin Belirlenmesi

Çalışmada standart olarak E vitamininin suda çözünür bir türevi olan troloks ((±)-6-Hidroksi 2,5,7,8- tetrametilkroman-2-karboksilik asit) antioksidan bileşiği kullanıldı. Farklı seyreltmelerdeki ekstrakt veya troloks ile DPPH• (2,2-difenilpikrilhidrazil) serbest radikalının radikal olmayan formuna dönüşümünde meydana gelen renk değişimi Şekil 17 ve Şekil 18'de görüldüğü gibi izlendi. Bu amaçla 2,9 mL 60 µM DPPH• çözeltisi, 100 µL seyreltilmiş ekstraktlar veya troloks ile 1 saat karanlıkta reaksiyona tabi tutuldu ve DPPH•' in mor renginin absorbans değişikliği 517 nm'de ölçüldü. Tanık olarak DPPH•' in metanollü çözücüsü ile karıştırılan ekstrakt ya da troloksun renk şiddeti bu noktadaki absorbsiyon değerinden çıkarıldı. Troloks'un DPPH• radikale karşı 125 µg/mL ile 15,63 µg/mL arasında 1:1 seyreltme ile elde edilen 7 konsantrasyonu kullanıldı. Sonuçlar DPPH• radikalının

başlangıç derişimini yarıya düşüren ekstrakt veya troloks konsantrasyonu cinsinden (SC_{50}) Tablo 8’de verildi.



Şekil 17. Farklı seyreltmelerdeki ekstrakt ile DPPH• serbest radikali reaksiyon grafiğı

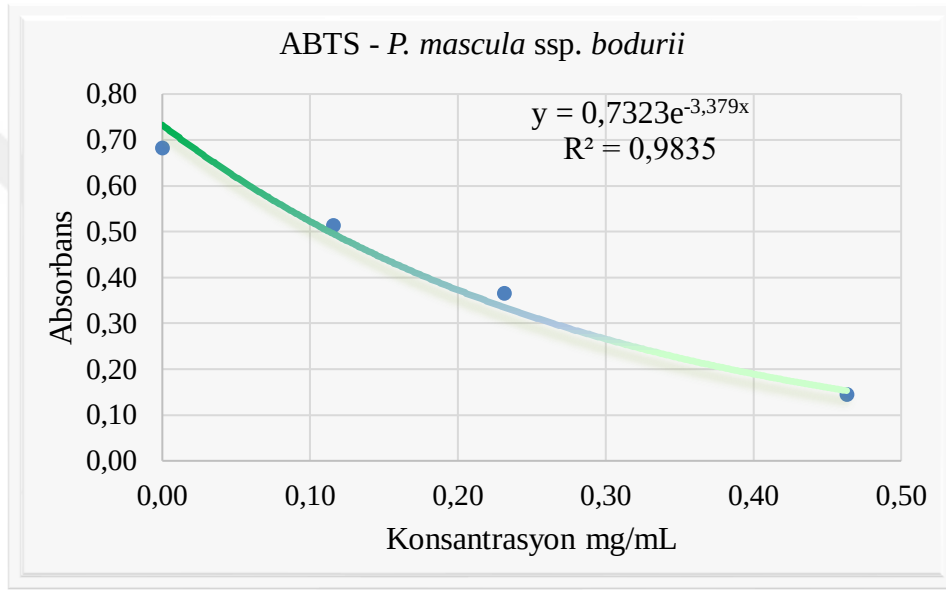


Şekil 18. Farklı seyreltmelerdeki troloks ile DPPH• serbest radikali reaksiyon grafiğı

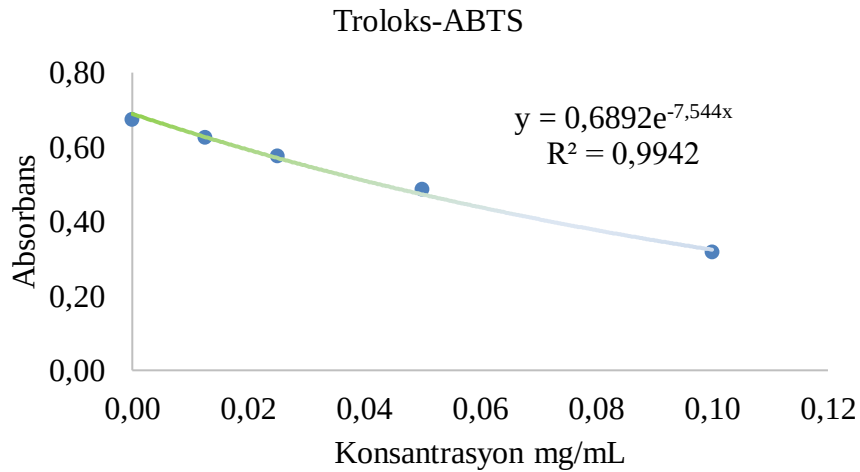
2.6.3. ABTS Radikal Temizleme Aktivitesinin Belirlenmesi

Ekstraktın ABTS radikal temizleme aktivitesinin belirlenmesi Re vd., (1999)’a göre yapıldı. pH 7,4 olan 0,1 M fosfat tamponu içerisinde 7 mM ABTS (2,2’-azinobis (3-etil-bezotiazolin 6 sulfonat)) çözeltisi hazırlandı. Bunun 5 mL’si ile 5 mL 2.45 mM potasyumpersulfat ($K_2S_2O_8$) oda sıcaklığında 16 saat karıştırılarak ABTS radikali üretildi. 1950 μ L ABTS çözeltisi ile 50 μ L ekstrakt ya da troloks standardı reaksiyona tabi tutuldu. Şekil 19’da görüldüğü gibi ekstraktların radikal miktarını üstel

azaltmalarının en uygun tespit edileceği aralıkta ekstrakt konsantrasyonları kullanıldı. Troloksun 500; 400; 200; 100; 50; 25; 12,5 µg/mL olarak 7 farklı derişimdeki çözeltileri ile ABTS radikalının temizlenmesi izlendi (Şekil 20). Karanlık ortamda radikal ile standardın ya da ekstraktların reaksiyonu için 30 dakika bekletildi. Reaksiyon ürünlerinin absorbans değerleri 734 nm’de okundu ve elde edilen veriler ABTS radikalının başlangıç derişimini yarıya düşüren ekstrakt veya troloks konsantrasyonu cinsinden (SC₅₀) Tablo 9’da verildi.



Şekil 19. ABTS çözeltisi ile ekstrakt reaksiyon grafiği



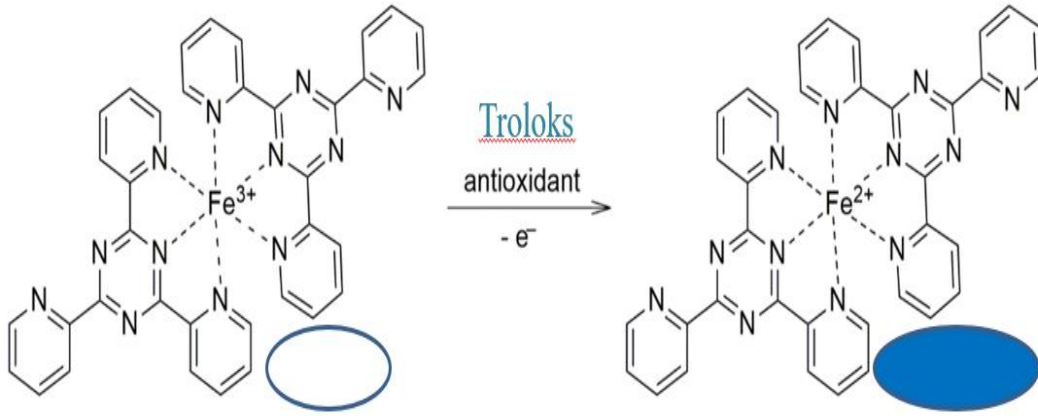
Şekil 20. ABTS çözeltisi ile troloks standardı reaksiyon grafiği

2.6.4. Toplam Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi

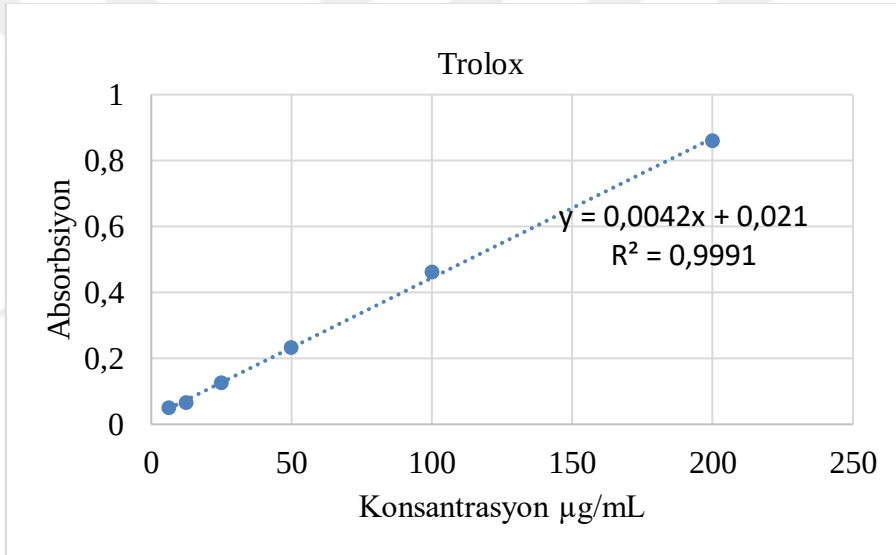
Çalışmada toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesi için Marcucci yöntemi kullanıldı. 50 µL farklı seyreltmelerdeki kuersetin (0,5-0,00195 mg/mL) veya metanolik özütlerin üzerine 20 µL Al(NO₃)₃, 20 µL CH₃COONH₄ ve 860 µL %40 metanol eklenerek karıştırıldı ve karanlık ortamda 40 dakika reaksiyon için bekletildi. Süre sonunda spektrofotometrede 415 nm’de ölçüm yapıldı. Elde edilen veriler Tablo 9’da verildi.

2.6.5. FRAP (Demir (III) İndirgeyici Antioksidan Aktivite)

Aktioksidan varlığında renksiz Fe³⁺-2,4,6-tripiridil-s-triazin kompleksinden yoğun mavi Fe²⁺- 2,4,6-tripiridil-s-triazin kompleksine dönüşüm gerçekleşir (Şekil 21). Çalışmada standart olarak kullanılan Troloks seyreltilerek 6 farklı konsantrasyonda (200-6,25 µg/mL) ölçüm yapılarak Şekil 22’de görüldüğü gibi kalibrasyon grafiği elde edildi (Şekil 21). Asetat tamponu (pH= 3,6) içerisinde 0,83 mM 2,4,6-Tris(2-pyridyl-s-triazine) (TPTZ) ve 1,67 mM FeCl₃ (susuz) içeren FRAP reaktifi taze olarak hazırlandı. Numune ve standart çözeltileri için hazırlanan deney tüplerine önce 50’şer µL numune/standart aktarıldı. Numune körü tüplerine FRAP reaktifi yerine FRAP çözücüsü olan %60 metanol (1,95 mL); reaktif körü tüplerine ise numune yerine 100’er µL metanol aktarıldı. Sonrasında; numune körü tüpleri dışındaki tüm tüplere 30 saniye aralıklarla tek tek 1,95 mL FRAP reaktifi eklenerek, vortekslendi ve 20 dakika bekletildi. Bu sürenin sonunda ilk pipetlenen tüpten başlanarak 20 dakikası dolan tüp alınıp plastik küvete aktarılarak dalga boyu 595 nm olan spektrofotometrede’de absorbans değeri okundu. Sonuçlar, 100 gram kökteki mg troloks eşdeğeri cinsinden (mg TE/100 g kök) Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) olarak değerlendirildi.



Şekil 21. (Fe³⁺)-TPTZ kompleksinin, (Fe²⁺) formuna indirgenmesi



Şekil 22. Troloks standardı kalibrasyon grafiği

3. BULGULAR

3.1. Fenolik Bileşiklerin Analizi için HPLC-DAD Metot Optimizasyonu

HPLC-DAD yöntemi Thermo acclaim C30 kolonu (150 mm×3 mm id×3 µm pd) kolonu ile optimize edildi ve 32 sekonder metabolit standardının ayrılması 60 dakikada gerçekleştirildi. Kullanılan yöntem seçicilik, duyarlılık, kesinlik ve doğrusallık açısından değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda LOD ve LOQ değerlerinin metanolik Paeonia ekstraktlarındaki fenolik bileşikleri analiz etmek için yeterince düşük olduğu görüldü. Standartların kalibrasyon eğrileri, kuersetin ve luteolin grubu için sırasıyla 0,078-25 mg/ L aralığında en az 0.99 R² değerleri ile doğrusal olduğu tespit edildi. Standart olarak kullanılan fenolik bileşiklerin 280 nm'deki kromatogramı Şekil 23'te, validasyon ve kalibrasyon parametreleri ise Tablo 6 ve Tablo 7'da gösterildi.

Tablo 6. Standart sekonder bileşiklerin (Luteolin grubu) HPLC-DAD analizinde validasyon ve kalibrasyon parametreleri

Sıra	RT	Bileşikler	Eğim	Kesim Noktası	R ²	BSS% (RT)	BSS% (alan)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
2	8,67	Protokatekuik asit ¹	2,44	0,45	0,999	1,03	1,82	0,05	0,16
3	15,22	Gentisik asit ¹	0,71	0,09	1,000	0,33	2,66	0,02	0,05
5	21,55	Vanilik asit ¹	2,10	0,32	0,999	0,05	2,64	0,05	0,16
6	21,72	Kateşin ¹	0,60	-0,05	1,000	0,10	2,82	0,05	0,16
8	22,82	Kafeik asit ¹	3,16	0,44	0,999	0,18	0,55	0,01	0,04
10	24,01	Vanilin ¹	2,66	0,48	0,999	0,25	1,68	0,03	0,11
11	24,53	EGCG ¹	0,80	-0,42	1,000	0,52	3,59	0,03	0,11
14	28,90	Ferulik asit ¹	3,47	0,59	0,999	0,90	1,12	0,02	0,07
17	32,37	Luteolin-7-glukozit ¹	1,49	0,08	1,000	0,93	2,35	0,05	0,15
20	34,39	Hesperidin ¹	0,68	0,47	0,999	0,85	1,42	0,04	0,14
22	35,42	Rosmarinik asit ¹	1,35	0,07	0,999	0,83	3,22	0,06	0,20
23	36,64	Fisetin ¹	2,80	-1,04	1,000	0,75	2,35	0,02	0,08
27	41,37	Luteolin ¹	2,20	0,12	1,000	0,78	5,48	0,11	0,37
29	43,03	Naringenin ¹	1,76	0,29	0,999	0,78	2,08	0,04	0,14
30	44,46	Hesperetin ¹	1,96	0,39	0,999	0,86	3,39	0,07	0,22
32	45,99	Kamferol ¹	1,95	-0,01	1,000	0,92	14,50	0,23	0,75

¹: Luteolin grubu

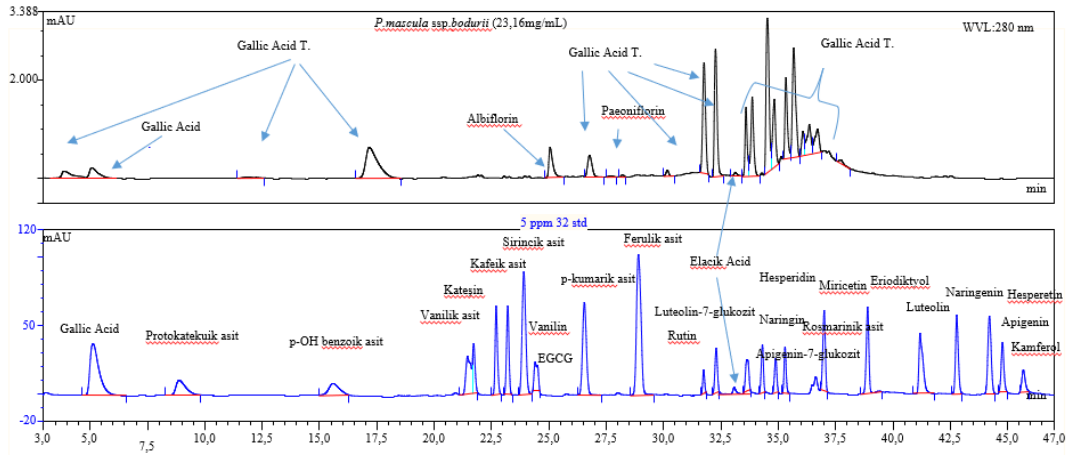
Tablo 7. Standart sekonder bileşiklerin (Kuersetin grubu) HPLC-DAD analizinde validasyon ve kalibrasyon parametreleri

Sıra	RT	Bileşikler	Eğim	Kesim Noktası	R ²	BSS% (RT)	BSS% (alan)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
1	4,77	Gallik asit ²	1,90	0,18	0,999	1,05	1,66	0,03	0,11
4	15,56	p-OH benzoik asit ²	3,62	0,04	1,000	0,47	3,46	0,07	0,22
7	21,83	Klorogenik asit ²	1,86	-0,08	1,000	0,26	4,05	0,07	0,25
9	23,27	Sirincik asit ²	1,75	-0,00	1,000	0,19	3,97	0,07	0,25
12	24,57	Epikateşin ²	0,43	-0,01	1,000	0,06	3,16	0,06	0,20
13	26,61	p-kumarik asit ²	4,35	0,09	1,000	0,12	3,09	0,06	0,19
15	29,10	Kikoric asit ²	5,55	-0,21	1,000	0,34	3,58	0,06	0,21
16	31,71	Rutin ²	1,14	-0,04	1,000	0,37	3,07	0,05	0,18
18	33,04	Ellagik asit ²	1,40	0,62	0,989	0,28	4,89	0,15	0,50
19	33,60	Naringin ²	0,98	0,01	1,000	0,28	3,56	0,07	0,22
21	34,85	Apigenin-7-glukozit ²	0,96	-0,04	1,000	0,29	3,17	0,06	0,19
24	36,77	Miricetin ²	2,18	-0,76	0,996	0,25	5,06	0,05	0,17
25	37,02	Resveratrol ²	3,92	-0,15	1,000	0,25	3,52	0,06	0,21
26	38,93	Eriodiktyol ²	1,96	-0,03	1,000	0,25	3,46	0,06	0,21
28	41,39	Kuersetin ²	2,40	-0,48	0,998	0,24	6,02	0,07	0,24
31	44,87	Apigenin ²	1,87	-0,01	1,000	0,24	5,54	0,10	0,33

²: Kuersetin grubu

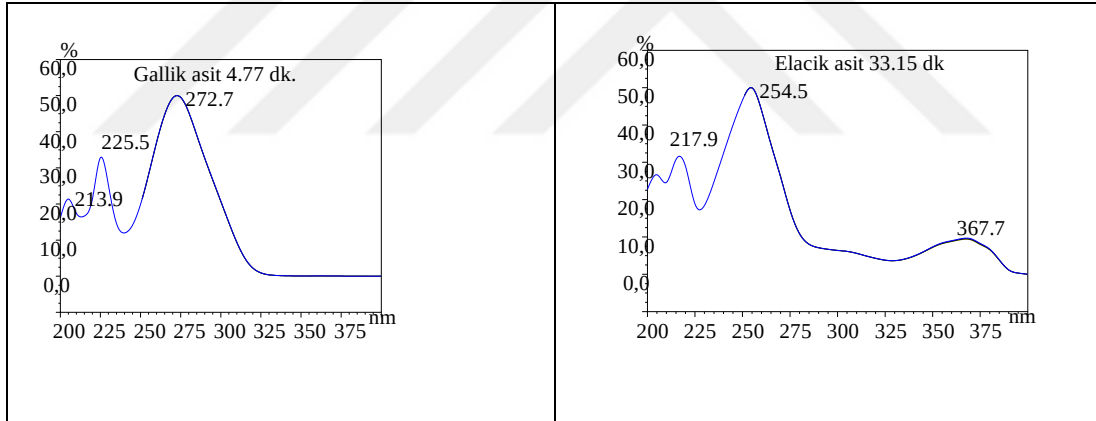
3.2. Fenolik Bileşiklerin HPLC-DAD Analizleri

Fenolik bileşiklere ait piklerin tanımlanması ve miktar tayini, standart fenolik bileşiklerin alıkonma süreleri ve UV spektrumları ile karşılaştırılarak gerçekleştirildi. Standart bileşiklerimizin içerisinde *Paeonia* türlerinin köklerinde yaygın olarak bulunan monoterpen glikozitlerinin standart bileşikleri mevcut değildi. Bundan dolayı literatürde mevcut olan monoterpen glikozitlerinin UV spektrumları ve HPLC-DAD kromatogramlarındaki piklerin UV spektrumları karşılaştırılarak bilinmeyen piklerin karakterizasyonu yapıldı. Çanakkale ilinin Kalkım bölgesinden temin edilen *Paeonia mascula* subsp. *bodurii* kök ekstraktının HPLC-DAD ile elde edilen kromatogramı standart fenolik bileşiklerin kromatogramı ile birlikte Şekil 23'te gösterildi. Pik tanımlama, karakterizasyon ve kantitatif sonuçlar ise Tablo 8'de verildi.



Şekil 23. *Paeonia mascula* subsp. *bodurii* kök ekstraktının (üstte) ve 32 standart fenolik bileşenin HPLC-DAD ile 280nm’de kromatogramı

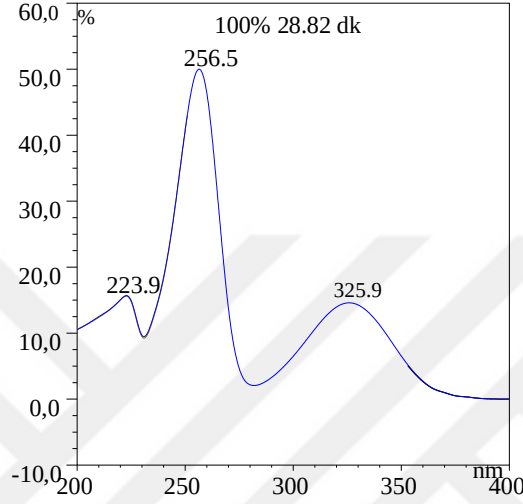
Kalibrasyonu ve validasyonu yapılan 32 standart fenolik bileşenlerde gallik asit ve elacik asit kök ekstraktında tespit edildi. Bu bileşenlerin UV spektrumları Şekil 24’de verildi.



Şekil 24. Gallik asit ve Elacik asitin UV spektrumu

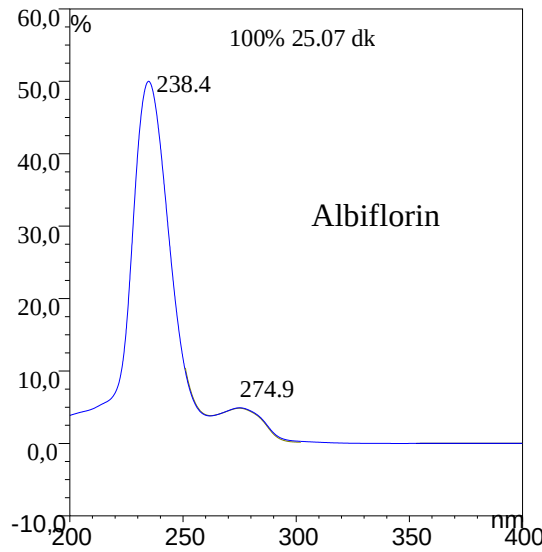
Bunların haricindeki piklerin spektrumları genel olarak gallik asit gibi benzoik asit türevlerinin spektrumlarına benzemektedir. Genellikle benzoik asit, *p*-hidroksibenzoik asit ve gallik asit gibi bir aromatik asitle esterleştirilmiş monoterpen bileşikler, bu aromatik asitle tutarlı maksimum UV absorpsiyon dalga boylarını açığa çıkarır çünkü ne monoterpen iskeleti ne de glikoz kısmı UV absorpsiyonuna sahiptir (Wang vd., 2017). *Paeonia* türlerinin içerdikleri monoterpen glikozitler yapılarında bulunan bu benzoik asit türevleri sayesinde DAD dedektörü ile tespit edilebilirler. *Paeonia mascula* subsp. *bodurii* kök ekstraktının HPLC-DAD kromatogramındaki

spektrumlarından 12 tanesinin gallik asite benzer olması nedeniyle bu bileşenleri gallik asit türevi olarak karakterize edilerek gallik asit eşdeğeri cinsinden miktarları hesaplandı (Tablo 8). Geri kalan piklerin spektrumlarının detaylı incelenmesi sonucunda bazı monoterpen glikozitler olabilecekleri literatür verilerine dayandırılarak belirlendi (Şekil 25).



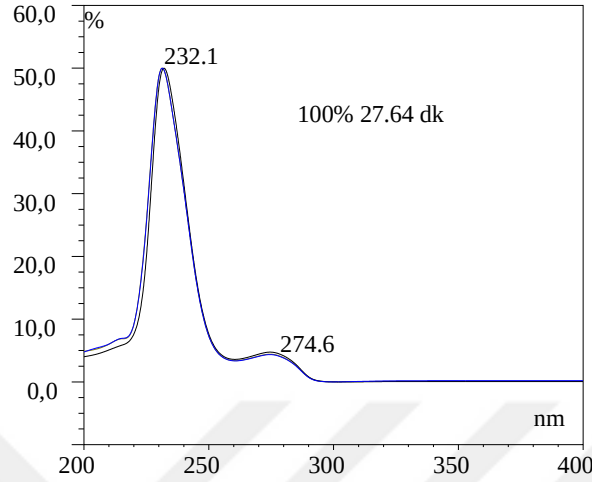
Şekil 25. Benzoilmudanpiosid T. UV spektrumu

HPLC-DAD ile 280 nm’de elde edilen albiflorin UV spektrumu (Şekil 26) Shen vd., 2021 yılında 274 nm’de yapmış oldukları çalışmada tespit ettikleri albiflorin UV spektrumu ile karşılaştırılarak karakterize edildi.



Şekil 26. Albiflorin UV spektrumu

Aynı şekilde paeoniflorin UV spektrumu (Şekil 27) aynı literatürde tespit edilen paeoniflorin UV spektrumu ile karşılaştırılarak karakterize edildi.



Şekil 27. Paeoniflorin UV spektrumu

Monoterpen glikozitlerin standardı mevcut olmadığı için bu bileşiklerin miktarları gallik asit eşdeğeri olarak hesaplandı.

Tablo 8. Paeonia kök ekstraktında HPLC-DAD ile tespit edilen sekonder bileşikler

No	RT (dk)	UV λ_{max}	Bileşiğin Adı	mg standart/L ekstrakt	mg/100g kök
1	3,87	280-226	Gallik asit T.	39,03	6,5
2	5,07	272-226	Gallik asit	47,6	7,93
3	11,85	275-226	Gallik asit T.	8,11	1,35
4	17,17	273-226	Gallik asit T.	211,36	35,23
5	25,07	238-275	Albiflorin	92,54	15,42
6	26,78	281-226	Gallik asit T.	28,45	4,74
7	27,69	231-275	Paeoniflorin	3,68	0,61
8	28,82	256-326-223	Benzoilmudanpiosid T.	100,59	16,77
9	31,75	274-229	Gallik asit T.	177,3	29,55
10	32,28	285-230	Gallik asit T.	169,09	28,18
11	33,13	254-367	Elacik asit	27,21	4,54
12	33,58	279-230	Gallik asit T.	93,33	15,56
13	33,86	280-229	Gallik asit T.	126,88	21,15
14	34,54	281-230	Gallik asit T.	230,82	38,47
15	34,81	281-229	Gallik asit T.	117,97	19,66
16	35,34	280-230	Gallik asit T.	121,85	20,31
17	35,68	280-230	Gallik asit T.	179,65	29,94

3.3. Toplam Antioksidan Bileşiklerin Tayini ve Aktivitesi

Paeonia mascula L.(Mill.) subsp. *bodurii* ile yapılan çalışma sonucunda toplam fenol madde içeriği galik asit eşdeğeri (GAE) ve kuersetin eşdeğeri (KE) olarak çalışıldı ve sırasıyla 932.8 mg GAE /100g kök ve 691.8 mg KE /100g kök olarak belirlendi. Bitkinin köklerinde flavonoidlerin 12,2 mg KE /100g kök olduğu tespit edildi. Örnekte Demir (III) indirgeyici antioksidan aktivitesi (FRAP) 1869,0 mg TE /100g kök olarak tespit edildi. Bu değer kökün yaklaşık %2 oranında antioksidan içeriğe sahip olduğunu göstermektedir. Öte yandan DPPH radikal temizleme aktivitesi SC₅₀ değeri 213,8 µg/mL tespit edildi. ABTS radikaline karşı 205,1 µg/mL SC₅₀ değerine sahip olduğu belirlendi (Tablo 9).

Tablo 9. *Paeonia* kök ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri

Ekstrakt	Troloks	
Esktrakt verimi (g/100g kök)	7,72	
Toplam flavonoid (KE) mg /100g kök	12,2±0,5	
Toplam fenol (KE) mg /100g kök	691,8±47,5	
Toplam fenol (GAE) mg /100g kök	932,8±43,7	
FRAP (TE) mg /100g kök	1869,0±80,2	
DPPH RSA SC ₅₀ (µg/mL)	213,8±2,5	83,3±4,0
ABTS RSA SC ₅₀ (µg/mL)	205,1±4,2	91,9±3,0

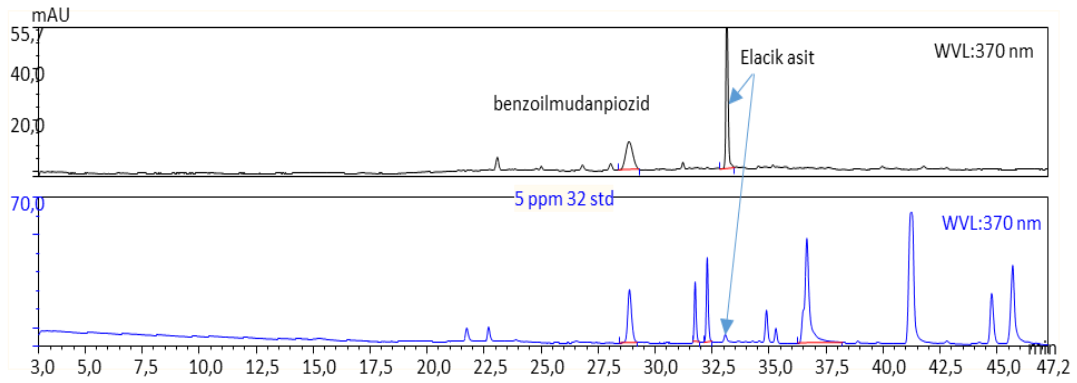
4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Her geçen gün değişen çevre, beslenme vb. gibi şartlara bağlı olarak hastalıkların artması bitkisel çözümlere olan ilgiyi artırmıştır. Başta sağlık, kozmetik ve gıda olmak üzere farklı amaçlar için kullanılan bitkiler geniş bir yelpazede kullanılmaktadır. Bitkilerin hangi amaç için kullanılacağı genellikle gösterdikleri biyolojik aktivite ve içerdikleri sekonder metabolitler açısından değerlendirilir. Bu tez kapsamında *Paeonia mascula* L.(Mill.) subsp. *bodurii* türünün bazı biyolojik aktiviteleri ve HPLC-DAD analizi ile sekonder bileşikleri araştırıldı.

Çanakkale-Kalkim'den toplanan örnekte ağırlıklı olarak gallik asit türevleri tespit edildi. Biyoaktif bileşenler üzerinde önemli bileşenler olan albiflorinin derişimi 15,42 mg/100g kök ve paeoniflorin derişimi 0,61 mg/100g kök olarak ölçüldü. Bu bileşiklerin UV spektrum doğrulaması Shen vd., 2021, Lee vd., 2009 ve Li vd., 2016 yapmış oldukları çalışmalar ile karşılaştırılarak karakterize edildi. Ancak standardı olmadığı için pek çok monoterpen glikozit türevi bileşikler tam olarak aydınlatılamadı. Kullanılan HPLC-DAD yöntemi sayesinde kromatogramdaki her pikin UV spektrumu elde edildi ve bu veriler ile bileşiklerin hangi tür bileşen oldukları tahmin edilmektedir. Önceki yapılan çalışmalara da dayanarak standardı olmadığı halde pek çok bileşen olası bileşenlerin türevleri (T.) şeklinde karakterize edildi.

Benzoilmudanpiosid T. bileşiğinin alıkonma zamanı (RT) 28,82 dakika ve dalga boyu 256-326-223 nm'dir. bu bileşiğin derişimi 16,77 mg/100g kök olarak ölçüldü. Elde edilen Benzoilmudanpiosid T.'ye ait UV spektrumu, Li vd., 2018 yılında yapmış oldukları çalışmada tespit ettikleri 8-O-Benzoylmudanpioside'ye ait UV spektrumuna benzetilerek karakterize edildi.

Fenolik asit sınıfında yer alan, alıkonma zamanı (RT) 34,54 dakika ve dalga boyu 281-230 nm olan gallik asit türevi bileşiği derişimi en fazla 38,47 mg/100g kök olarak belirlendi. Polifenol yapıdaki elacik asit 4,54 mg/100g kök olarak ölçüldü ve HPLC-DAD kromatogramı Şekil 29'daki gibi tespit edildi.



Şekil 28. Elacik asit'in HPLC-DAD ile 370 nm'de kromatogramı

Paeonia cinsi için karakteristik monoterpen glikozid olan paeoniflorinin (Şekil 9) *Paeonia alba*, *Paeonia albiflora*, *Paeonia anomala*, *Paeonia moutan*, *Paeonia lactiflora*, *Paeonia suffruticosa*, *Paeonia peregrina*, *Paeonia tenuifolia*, *Paeonia triternata*, *Paeonia emodi*, *Paeonia delavayi*, *Paeonia clusii* subsp. *clusii* türlerinde de yer aldığı daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Wu vd., 2010).

Li vd., 2018 yılında yaptıkları çalışmada *P. lactiflora* köklerinden dört paeoniflorin analogu ve altı başka monoterpen glikozit içeren on yeni bileşik belirlenmiştir.

Lee vd.,'nın 2009 yılında yapmış oldukları çalışmada *Paeonia* köklerindeki biyoaktif bileşenler üzerinde paeoniflorin ve albiflorinin önemli bileşenler olduğunu bildirmiştir.

Li vd., 2016 yılında yapmış oldukları çalışmada, albiflorin, paeoniflorin, oksipaeoniflorin, 4-O-etilpaeoniflorin, benzoiloksipaeoniflorin, benzoilpaeoniflorin, galloyl paeoniflorin, mudanpioside C, mudanpioside E ve mudanpioside J dahil olmak üzere on monoterpen glikozit karakterize edilmiştir.

Shen vd., 2021 yılında *Paeoniae Radix Alba* (*Paeonia lactiflora* Pall.)'nın kökünde yapmış oldukları çalışma ile gallik asit, oksipaeoniflorin, kateşin, albiflorin, paeoniflorin, etil galat, galloyl paeoniflorin, pentagalloilglikoz, benzoik asit, benzoilpaeoniflorin ve paeonol biyoaktif bileşenleri tanımlamıştır.

Paeonia mascula L.(Mill.) subsp. *bodurii*'nin kök kısımlarının metanol özütləri toplam fenolik içerik ve radikal süpürme aktivitesi açısından spektrofotometrik olarak incelendi. Özütlerin toplam fenolik içerikleri gallik asit ve kuersetin standartlarına eşdeğer olarak sırasıyla 932,8 mg GAE /100g kök ve 691,8

mg KE /100g kök olarak hesaplandı. DPPH radikal temizleme aktivitesi SC₅₀ değeri 213,8 µg/mL ve ABTS radikaline karşı 205,1 µg/mL SC₅₀ olarak belirlendi.

Orhan vd., (2010) on iki Anadolu *Paeonia* taksonunun köklerinin uçucu yağ bileşimleri ve antioksidan özelliklerini incelemiştir. *Paeonia mascula* subsp. *bodurii*'de fenolik içerikleri 14,9 mg GA/100 mg ekstrakt olarak tespit edilmiştir. Ancak DPPH radikal temizleme aktivitesinin olmadığı tespit edilmiştir.

Zhang vd., 2017 yılında yapmış oldukları çalışmada *Paeonia rockii* 1879,10 mg RE /100g (100 gramlık kuru ağırlık numunesi başına miligram rutin eşdeğerleri) en yüksek toplam flavonoid içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir. 387,18 mg TE/100 g kurumadde ile en güçlü DPPH ve 572,69 mg TE/100 g kurumadde ile ABTS radikal temizleme aktivitelerine ve en güçlü bakır azaltma kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. 1754,14 GAE mg/100 g ve 1736, 27 CE mg/100 g ile *P. decomposita* subsp. *rotundiloba*, en yüksek toplam fenolik ve flavanol içeriğinin yanı sıra en güçlü hidroksil radikali süpürme aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. (+)-kateşin en bol bulunan bileşen olmak üzere on altı ayrı fenolik bileşik nicel olarak ölçülmüştür.

Demir (2019) yaptığı çalışmada, *Paeonia daurica* Andrews subsp. *macrophylla* bitkisinin kök kısmının yüksek DPPH radikal temizleme kapasitesine sahip olduğunu belirtmiştir.

4.1. Öneriler

Geçmişten bu yana şifalı bitkiler olarak adlanları ve birçok hastalıkların tedavisinde kullanılan *Paeonia* cinsinin 12 taksonu ülkemizde yetişmektedir. Literatür incelemelerinde belirli taksonlarda bilimsel çalışmaların olduğu ancak özellikle endemik bir bitki olarak ülkemizde yetişen *Paeonia mascula* subsp *bodurii* için ileri düzeyde araştırma yapılmadığı görülmüştür.

Yapılan çalışmada *Paeonia mascula* subsp *bodurii* köklerinde Albiflorin, Paeoniflorin Gallik asit, Gallik asit T., Elajik asit, Benzoil-mudanpiosid T. gibi monoterpen glikozitleri tespit edildi. Bioaktif özellikler *paeonia* köklerinde yaygın olarak bulunan monoterpen glikozitler ve onların fenolik bileşiklerle olan türevlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca antioksidan özelliği incelenerek bitki köklerinin gıda takviyesi olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Bu bitkinin

kökleri günümüzde kullanılan sentetik kökenli ilaçlara alternatif olarak kullanılabılme potansiyeli araştırılmalı ve daha ileri çalışmalar yapılmalıdır.

Çalışmada tespit edilen Gallik asit T. ve Benzoilmudanpiosid T. türevlerinin neler olduğunun belirlenmesi için bu bileşenlerin özütten izole edilerek saflaştırılmaları gerekmektedir. NMR, IR ve MS gibi spektroskopik yöntemlerle belirlenecek olan bileşenlerin biyolojik aktivitelerine göre bu köklerin kozmetik, gıda ve ilaç sektöründe aktif bileşenler olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.



KAYNAKÇA

- Acosta-Estrada, B.A, Guti  rrez-Urbe, J.A, Serna-Sald  var, S.O, 2014. Bound phenolics in foods, a review. Food Chemistry, 152, 46-55.
- Abdille, M.H, Singh, R.P, Jayaprakasha, G.K, Jena, B.S, 2005. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. Food Chemistry, 90, 891  896. 119.
- Albishi, T, John, J.A, Al-Khalifa, A.S, Shahidi, F, 2013. Antioxidant, anti-inflammatory and DNA scission inhibitory activities of phenolic compounds in selected onion and potato varieties. Journal of Functional Foods, 5(2), 930-939.
- Akyüz, E, 2007. *Polygonum bistorta* ssp. *carneum* Bitki Ekstraktlarının Kromatografik Yöntemlerle Kimyasal Bileşiminin Belirlenmesi ve Antioksidan ve Antibakteriyal Aktiviteleri, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon.
- Ali, S. S, Kasoju, N, Luthra, A, Singh, A, Sharanabasava, H, Sahu, A, Bora, U, 2008. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. Food research international, 41(1), 1-15.
- Arnao, M. B, Cano, A, Acosta, M, 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. Food chemistry, 73(2), 239-244
- Arsal Kor, S, 2016. KKTC'de Yetişen *Lathyrus Ochrus* (L.) DC. Uçucu Yağ İçeriğinin, Uçucu Sekonder Metabolitlerinin ve Bazı Aktivite   zelliklerinin Tayin Edilmesi. KKTC Yakın Doğu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Aydın,   , 2012. Denizli İlinde Yayılış Gösteren Bazı Endemik *Allium* L. Taksonlarının Ekstraktlarının Aktif Bileşenlerinin Karakterizasyonu, Antioksidan ve Antibakteriyal Etkilerinin Belirlenmesi. Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Bag, G.C, Grihanjali Devi, P, Bhaigyabati, T, 2015. Assessment of total flavonoid content and antioxidant activity of methanolic rhizome extract of three hedychium species of manipur valley. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 30 (1), 154-159.
- Braca, A, Kiem, P.V, Yen, P.H, Nhiem, N.X, Quang, T.H, Cuong, N.X, Minh, C.V, 2008. New Monoterpene Glycosides from *Paeonia lactiflora*. Fitoterapia 79, 117  120 p.
- Çavuş, D, 2008. *Thymus praecox* opiz subsp. *caucasicus* var. *caucasicus* Ekstraktlarındaki Fenolik Bileşiklerin Kromatografik ve Spektrofotometrik Yöntemler İle Belirlenmesi.Yüksek Lisans Tezi, Rize Üniveritesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize, Türkiye.

- Dastmalchi, K, Damien Dorman, H.J, Kosar, M, Hiltunen, R, 2007. Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a water-soluble Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract. LWT- Food Science and Technology, 40, 239–248.
- Demir, A, Turumtay, H, Emirik, M, Sandalli, C, Kanbolat, Ş, Özgen, U, Akyüz Turumtay, E, 2019. Paeoniflorigenone purified from *Paeonia daurica* roots potently inhibits viral and bacterial DNA polymerases: investigation by experimental validation and docking simulation. Medicinal Chemistry Research, 28:2232–2245p.
- Demir, A, Turumtay, H, Sandalli, A, Baykal, H, Atamov, V, Sandalli, C, Akyuz Turumtay, E, 2019. M-MLV Reverse Transcriptase Was Strongly Inhibited By Essential Oil Extract Of *Paeonia daurica* Subsp. *Macrophylla*. Fresenius Environmental Bulletin, Volume 30– No. 06 pages 5616-5624.
- Deniz, İ, 2022. Türkiye’ nin Farklı Bölgelerinden *Paeonia mascula* L. (mill.) subsp. *mascula* Köklerindeki Biyoaktif Bileşiklerin Kromatografik ve Spektrofotometrik Tayini. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Dimitrios, B, 2006. Sources of natural phenolic antioxidants. Trends in Food Science and Technology, 17 (9), 505-512.
- Ding, L, Jiang, Z, Yue Liu, Y, Chen, L, Zhao, Q, Yao, X, Feng Zhao, F, Qiu, F, 2012. Monoterpenoid inhibitors of NO production from *Paeonia suffruticosa*. Elsevier / Fitoterapia 83 (2012) 1598–1603 doi:10.1016
- Er, H, 2017. *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze çiçeğinin ekstraktlarındaki biyoaktif bileşiklerin hplc-dad ile aydınlatılması ve bakteriyel dna-polimeraz inhibisyonları. Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize, Türkiye.
- Erkoyuncu Tanur, M, Yorgancılar, M, 2015. Bitki Doku Kültürü Yöntemleri İle Sekonder Metabolitlerin Üretimi. Selçuk Tarım Bilimleri Dergisi, 2(1):66-76.
- Gomez-Caravaca, A.M, Gomez-Romero, M, Arraez-Roman, D, Segura-Carretero, A, Fernandez-Gutierrez, A, 2006. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 41, 1220–1234.
- Güleşçi, N, Aygöl, İ, 2016. Beslenmede Yer Alan Antioksidan ve Fenolik Madde İçerikli Çerezler. Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 2016;5(1)
- Huang, D, Ou, B, Prior, R.L, 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53 (6), 1841-1856.

- Ivanova, A, Delcheva, I, Tsvetkova, I, Kujumgiev, A, Kostova, I, 2002. GC-MS Analysis and Anti- Microbial Activity of Acidik Fractions Obtained from *Paeonia peregrina* and *Paeonia tenuifolia* Roots. Zeitschrift für Naturforschung C Volume 57 Issue 7-8.
- İnceçayır, D, 2018. *Paeonia peregrina* L., *Salix alba* L. Ve *Salix babylonica* L. Bitkilerinin Antibakteriyel Aktivitesinin Araştırılması. Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Karabulut, G, Yemiş, O, 2019. Fenolik Bileşiklerin Bağlı Formları ve Biyoyararlılığı. Akademik Gıda 17(4) (2019) 526-537, DOI: 10.24323/akademik-gida.667270 Derleme Makale / Review Paper.
- Kasnak, C, Palamutoğlu, R, 2014. Doğal Antioksidanların Sınıflandırılması ve İnsan Sağlığına Etkileri. Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 3(5): 226-234, 2015.
- Kaur, S, Mondal, P, 2014. Study of total phenolic and flavonoid content, antioxidant activity and antimicrobial properties of medicinal plants. Journal of Microbiology & Experimentation, 1(1), 00005.
- Koo, Y.K, Kim, J.M, Koo, J.Y, Kang, S.S, Bae, K.H, Kim, Y.S, Chung, J.H, Yun-Choi, H.S, 2010. Platelet Anti-Aggregatory And Blood Anti-Coagulant Effects Of Compounds Isolated From *Paeonia Lactiflora* And *Paeonia Suffruticosa*. International Journal of Pharmaceutical Sciences, Volume 65, Number 8, pp. 624-628(5).
- Koyunoğlu, S, 2008. *Paeonia* Türleri İçerisindeki Monoterpen Glikositlerinin Yapı Tayinleri ve Kromatografik Analizleri İçin Yöntem Geliştirilmesi. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Kostova, I.N, Simeonov, M.F, Todorova, D.I, 1998. A monoterpene glucoside from *Paeonia peregrina* roots. Phytochemistry, 47 (7), 1303- 1307.
- Kökçü, B, Karabacak, E, 2021. Phenological behaviours of the local endemic *Paeonia mascula* (L.) Mill. subsp. *bodurii* Özhatay in Çanakkale. Trakya University Journal of Natural Sciences, 22(2): 207-213.
- Lee, S, Khoo, C.S, Hennell, J. R, Pearson, J. L, Jarouche, M, Halstead, C. W, Bensoussan, A, 2009. LC Determination of Albiflorin and Paeoniflorin in Bai Shao (*Paeonia lactiflora*) as a Raw Herb and Dried Aqueous Extract. Journal Of Aoac International, Vol. 92, No. 4
- Letsididi KS, Lou Z, Letsididi R, Mohammed K, Maguy BL, 2018. Antimicrobial and antibiofilm effects of trans-cinnamic acid nanoemulsion and its potential application on lettuce. Lwt, 94, 25-32.
- Li, J, Yang, X, Huang, L, 2016. Anti-Influenza Virus Activity and Constituents Characterization of *Paeonia delavayi* Extracts. Molecules, 21, 1133; doi:10.3390/molecules21091133

- Li, R, Zhang, J.F, Wu, Y.Z, Li, Y.C, Xia, G.Y, Wang, L.Y, Qiu, B.L, Min Ma, M, Lin, S, 2018. Structures and Biological Evaluation of Monoterpenoid Glycosides from the Roots of *Paeonia lactiflora*. Journal of Natural Products, Article, DOI: 10.1021, 81, 1252–1259
- Mammadova, V, 2018. *Paeoniamascula* (L.) Mill. subsp. *mascula* ve *Paeoniatenuifolia* L. Bitkilerinin Antibakteriyel Aktivitesinin Araştırılması. Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Marcucci, M.C, Woisky, R.G, Salatino, A, 1998. Use of aluminum chloride in the flavonoids quantification of propolis samples. Mensagem Doce 46.
- Ocak, A, Öztürk, D, Kara, İ, 2017. Bilecik Florası. Turkuvaz Haberleşme ve Yayıncılık A.Ş., İstanbul, 89.
- 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.
- Orhan, I, Demirci, B, Omar, I, Siddiqui, H, Kaya, E, Choudhary, M.I, Ecevit-Genç, G, Özhatay, N, Şener, B, Başer, K.H.C, 2010. Essential oil compositions and antioxidant properties of the roots of twelve Anatolian *Paeonia* taxa with special reference to chromosome counts. Pharmaceutical Biology, 48(1): 10–16.
- Önal, M, Dindaroğlu, T, Bolat, Ö, 2014. Şakayık Bitkisinin (*Paeonia mascula*) Bazı Ekstrem Yetiştirme Ortamı Özellikleri. III. Uluslararası Odun Dışı Orman Ürünleri Sempozyumu, Kahramanmaraş, Türkiye
- Özyavuz, M, 2011. Bitki Örtüsünün Ekolojik Şartlarının Coğrafi Bilgi Sistemleri ve Uzaktan Algılama Teknikleri ile Analizi, Ganos (Işıklar) Dağı, Tekirdağ. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi.
- Re, R, Pellegrini, N, Proteggente, A, Pannala, A, Yang, M, Rice-Evans, C, 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free radical biology and medicine, 26(9-10), 1231-1237.
- Sevim, D, Şenol, F.S, Orhan, I, Şener, B, Kaya, E, 2011. Türk *Paeonia* Taksonlarının Tohum Etanol Ekstraktlarının İn Vitro Yöntemlerle Anti-Amnezik Aktivite Taraması. Planta Med;77. DOI: 10.1055/s-0031-1282924.
- Shen, M, Zhang, Q, Qin, L, Yan, B, 2021. Single Standard Substance for the Simultaneous Determination of Eleven Components in the Extract of *Paeoniae Radix Alba* (Root of *Paeonia lactiflora* Pall.). Journal of Analytical Methods in Chemistry; Volume 2021, Article ID 8860776, 12 pages doi:10.1155/2021/8860776

- Singleton, V. L, Orthofer, R, Lamuela-Raventós, R. M, 1999. Analysis of total Phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299, 152-178.
- Şahin, G, 2007. Türkiye’de Toplanan Bazı Paeonia Türlerinin Antibakteriyel Etkisi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Tarhan, N, Arslan, M, Şar, S, 2016. Some Medical Plants and Their Myths. *Lokman Hekim Dergisi*, 6(1):1-9.
- Tiring, G, Satar, S, Özkaya, O, 2021. Sekonder Metabolitler. *Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 35(1), 203 - 215.
- Topcu, Ş, Çölgeçen, H, 2015. Bitki Sekonder Metabolitlerinin Biyoreaktörlerde Üretilmesi. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 8(2), 09-29.
- Tunç, K, İnceçayır, D, Mammadova, V, Semerci, A.B, 2019. Paeonia Türlerinin Antibakteriyel Aktivitesi. *Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi* 4 (1): 21-27s.
- URL-1, 2022. <https://en.wikipedia.org/wiki/Paeoniflorin>
- Ünlü, S, 2010. Türkiye’nin Paeonia L. Türleri Üzerinde Farmasötik Botanik Araştırmalar. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Verma, R.S, Padalia, R.C, Chauhan, A, Yadav, A, Chanotiya C.S, 2015. Essential oil composition of Himalayan Peony (*Paeonia emodi* Royle). *Journal of Essential Oil Research*, Vol. 27, No. 6, 477–480 p.
- Wang, Z, He, C, Peng, Y, Chen, F, Xiao P, 2017. Origins, Phytochemistry, Pharmacology, Analytical Methods and Safety of Cortex Moutan (*Paeonia suffruticosa* Andrew): A Systematic Review. *Molecules*. 2017; 22(6):946. doi:10.3390/molecules22060946
- Wu, S.H, Wu, D.G, Chen, Y.W, 2010. Chemical Constituents and Bioactivities of Plants from the Genus *Paeonia* (Review). *Chemistry and Biodiversity*, Vol. 7.
- Yavaşer, R, 2011. Doğal ve Sentetik Antioksidan Bileşiklerin Antioksidan Kapasitelerinin Karşılaştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Yeşilada, E, Mutlugil, A, Şener, B, 1992. The Antiinflammatory Principle of the Roots of *Paeonia daurica*. *Int. J. Pharmacognosy*, 30 (1): 66-70.
- Yücel, N, Gülen, H, Çakır Hatır, P, 2019. Elajik asidin spesifik olarak tanınması için moleküler baskılanmış polimerlerin sentezi. 978-1-7281-1013-4/19/IEEE

- Zhang, X.L, Guo, Y.S, Wang, C.H, Li, G. Q, Xu, J.J, Chung, H.Y, Ye, W.C, Li, Y.L, Wang, G.C, 2014. Phenolic compounds from *Origanum vulgare* and their antioxidant and antiviral activities. *Food Chemistry*, 152, 300-306.
- Zhang, H, Tsao, R, 2016. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and antiinflammatory effects. *Current Opinion in Food Science*, 8, 33-42.
- Zhang, X.X, Shi, Q.Q, Ji, D, Niu, L.X, Zhang, Y.L, 2017. Determination of the phenolic content, profile, and antioxidant activity of seeds from nine tree peony (*Paeonia* section *Moutan* DC.) species native to China. *Food Research International*, 97: 141–148 p.
- Zhao, D.D, Jiang, L.L, Li H.Y, Yan, P.F, ve Zhang, Y.L, 2016. Chemical Components and Pharmacological Activities of Terpene Natural Products from the Genus *Paeonia*. *Molecules*, review, 21, 1362; doi:10.3390/molecules21101362.

