

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TÜRKİYE' NİN FARKLI BÖLGELERİNDEN PAEONIA
MASCULA L. (MİLL.) SUBSP. MASCULA KÖKLERİNDEKİ
BİYOAKTİF BİLEŞİKLERİN KROMATOĞRAFİK VE
SPEKTROFOTOMETRİK TAYİNİ

İsmail Hakkı DENİZ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY
JÜRİ ÜYELERİ
Prof. Dr. Fatih İSLAMOĞLU
Dr. Öğr. Nesibe ARSLAN BURNAZ

RİZE-2022
Her Hakkı Saklıdır

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

“TÜRKİYE’ NİN FARKLI BÖLGELERİNDEN PAEONIA MASCULA L.
(MİLL.) SUBSP. MASCULA KÖKLERİNDEKİ BİYOAKTİF BİLEŞİKLERİN
KROMATOĞRAFİK VE SPEKTROFOTOMETRİK TAYİNİ”

Doç. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY danışmanlığında, İsmail Hakkı DENİZ tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararı ile oluşturulan jüri tarafından .../.../... tarihinde Kimya Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı, Adı Soyadı	İmza
Başkan	: Prof. Dr. Fatih İslamoğlu	
Üye	: Doç. Dr. Emine Akyüz Turumtay	
Üye	: Dr. Öğr. Nesibe Arslan Burnaz	

Doç. Dr. Ahmet YANIK
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Türkiye’nin farklı bölgelerinden paeonia mascula l. (mill.) subsp. mascula köklerindeki biyoaktif bileşiklerin kromatografik ve spektrofotometrik tayini” adlı bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım sırasında, bana öncülük eden, ilgi ve desteğiyle her konuda yanımda olan, değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY’a teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca tezimin değişik safhalarındaki yardımlarından dolayı Sn. Mehmet Veysi ÇETİZ’e teşekkür ederim.

Eğitim hayatımın her alanında bana inanarak yalnız bırakmayan, maddi ve manevi desteğiyle yanımda olan kıymetli eşim Vahide DENİZ’e teşekkürü borç bilirim.

Bu Yüksek Lisans Tezi TÜBİTAK tarafından 120Z502 nolu proje ile desteklenmiştir.

İsmail Hakkı DENİZ

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “Türkiye’ nin farklı bölgelerinden *paeonia mascula* l. (mill.) subsp. mascula köklerindeki biyoaktif bileşiklerin kromatografik ve spektrofotometrik tayini” başlıklı bu tezi, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. .../.../...

İsmail Hakkı DENİZ

“Uyarı: Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.”

ÖZET

TÜRKİYE' NİN FARKLI BÖLGELERİNDEN PAEONIA MASCULA L. (MİLL.) SUBSP. MASCULA KÖKLERİNDEKİ BİYOAKTİF BİLEŞİKLERİN KROMATOĞRAFİK VE SPEKTROFOTOMETRİK TAYİNİ

İsmail Hakkı DENİZ

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışmanı: Doç. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY

Paeonia mascula L. (Mill.) subsp. *mascula* Osmaniye-Amanos, Afyon-Dereçine, Konya-Doğanhisar ve Çanakkale-Tombalık' tan toplandı. Bitkilerin kök kısımlarının metanol özütlerinin antioksidan aktiviteleri spektrofotometrik olarak ve fitokimyasal içerikleri HPLC-DAD ile araştırıldı. Metanolik kök özütlerinin spektroskopik toplam fenolik madde içerikleri en yüksek Çanakkale örneğinde 1077,0 mg GAE /100g kök olarak tespit edildi. Bu özütün demir (III) indirgeyici antioksidan aktivitesi de (FRAP) 2121,7 mg TE /100g kök olarak en yüksek bulundu. DPPH radikal temizleme aktivitesi açısından en düşük SC₅₀ değeri Afyon örneğinde 255,9 µg/mL olarak tespit edildi. ABTS radikaline karşı Çanakkale örneği 115,1 µg/mL SC₅₀ değeri ile kullanılan antioksidan standardı Troloksun değerine (91,9 µg/mL) yakın bir değer gösterdi. Metanolik kök özütlerinin HPLC-DAD ile belirlenen esas bileşenlerinin paeoflorin, albiflorin, benzoylmudanpioside ve 2.4.6-Trihidroksi-1-methyl benzoat türevi bileşenler olduğu tespit edildi.

2022, 54 sayfa

Anahtar Kelimeler: HPLC-DAD, fenolik bileşikler, antioksidan aktivite, *paeonia mascula* l. (mill.) subsp. *mascula*

ABSTRACT

CHROMATOGRAPHIC AND SPECTROMETRIC ASSIGNMENT OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN THE ROOTS OF PAEONIA MAScula L. (MILL.) SUBSP. MAScula FROM DIFFERENT REGIONS OF TURKEY

İsmail Hakkı DENİZ

Recep Tayyip Erdogan University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry
Master Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY

Paeonia mascula L. (Mill.) subsp. *Mascula* was collected from Osmaniye-Amanos, Afyon-Derecine, Konya-Doğanhisar and Çanakkale-Tombaklık. The antioxidant activity of methanol extracts of the root parts of the plants was investigated spectroscopically and their phytochemical contents were investigated by HPLC-DAD. The spectroscopic total phenolic content of the methanolic root extracts was determined as 1077,0 mg GAE /100g root in Çanakkale sample, which was the highest. The iron (III) reducing antioxidant activity (FRAP) of this extract was also found to be the highest at 2121,7 mg TE /100g root. On the other hand, the lowest SC₅₀ value in terms of DPPH radical scavenging activity was 255,9 µg/mL in the Afyon sample. It was determined that the main components of methanolic root extracts determined by HPLC-DAD were paeoflorin, albiflorin, benzoylmudanpioside and 2,4,6-Trihydroxy-1-methyl benzoate derivative components.

2022, 54 pages

Keywords: HPLC-DAD, phenolic compounds, antioxidant activity, *paeonia mascula* l. (mill.) subsp. *mascula*

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ	II
ÖZET	III
ABSTRACT.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
TABLolar DİZİNİ	VIII
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ	IX
1. GİRİŞ	1
1.1. Paeonia L. (Ayıgülü) Cinsi	2
1.1.1. Paeonia mascula (L.) Miller	3
1.1.2. Paeonia mascula subsp. mascula.....	3
1.2. Sekonder Metabolitler.....	3
1.2.1. Fenolik Bileşikler (Polifenoller)	6
1.2.2. Terpenler	7
1.3. Paeonia Türlerinin Yapısında Bulunan Biyoaktif Bileşikler	8
1.3.1. Paenia Türlerindeki Monoterpenoidler ve Monoterpen Glikozitler	9
1.3.2. Paenia Türlerindeki Triterpenoidler.....	12
1.3.3. Paenia Türlerindeki Flavonoidler	13
1.3.4. Paenia Türlerindeki Fenolik bileşikler.....	14
1.3.5. Paenia Türlerindeki Tanenler.....	15
1.4. Bitki Ekstraksiyonu ve İzolasyonu	16
1.4.1. Bitkisel Bileşiklerin Ekstraksiyonu.....	16
1.4.2. Bitkisel Bileşiklerin Kromatografik Tayini	17
1.5. Kromatografi.....	18
1.5.1.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	19
1.6. Bitki Bileşenlerinin Spektroskopik Yöntemlerle Tanımlanması	20
1.6.1.Toplam Polifenol Tayini	21
1.6.2. DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi	21
1.6.3. ABTS Radikal Temizleme Aktivitesi	22

1.6.4. Demir (III) İndirgeyici Antioksidan Aktivite (FRAP).....	22
1.6.5. Toplam flavonoid tayini.....	23
1.7. Literatür Özetleri.....	24
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	32
2.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	32
2.2. Kullanılan Gereçler	33
2.3. <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>mascula</i> Bitkisinin Toplanması.....	33
2.4. Ekstraksiyon.....	34
2.5. Bitki Ekstraktlarında Sekonder Bileşiklerin HPLC-DAD Analizleri	34
2.5.1. HPLC-DAD Koşulları	34
2.5.2. Standartlar, Validasyon ve Kalibrasyon	35
2.6. Toplam Antioksidan Bileşiklerin Belirlenmesi	35
2.6.1. Toplam Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi	35
2.6.2. DPPH Radikal Temizleme Aktivitesinin Belirlenmesi.....	36
2.6.3. ABTS Radikal Temizleme Aktivitesinin Belirlenmesi.....	36
2.6.4. Toplam Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi.....	37
2.6.5. FRAP (Demir (III) İndirgeyici Antioksidan Aktivite).....	37
3.BULGULAR.....	38
3.1. Fenolik Bileşiklerin Analizi için HPLC-DAD Metot Optimizasyonu.....	38
3.2. Fenolik Bileşiklerin HPLC-DAD Analizleri	39
3.3. Toplam Antioksidan Bileşiklerin Tayini ve Aktivitesi	42
4.TARTIŞMA VE SONUÇ	43
5.ÖNERİLER	45
KAYNAKÇA.....	46

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.(a) <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>mascula</i> , (b) <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>bodurii</i> N. Ozhatay, (c) <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>arietina</i>	3
Şekil 2. Fitokimyasalların sınıflandırılması.....	5
Şekil 3. Fenolik bileşiklerin kimyasal yapılarına göre alt gruplara ayrılması	7
Şekil 4. İzopren' in kimyasal yapısı	7
Şekil 5. Paeoniflorigenone molekülünün kimyasal yapısı.....	9
Şekil 6. Paeoniflorin molekülünün kimyasal yapısı	10
Şekil 7. Oleanolik asidin kimyasal yapısı.....	12
Şekil 8. (a) Astragalin, (b) peonoside ve (c) antosiyanidin moleküllerin kimyasal yapıları	14
Şekil 9. Örnek bir kolon tanımlaması	20
Şekil 10. (a) Fe (III)-TPTZ kompleksinin, (b) Fe (II)-TPTZ kompleksine indirgenme reaksiyonu	23
Şekil 11. Metonolik $AlCl_3$ çözeltisinde flavanoid-Al kompleksinin oluşumu.	23
Şekil 12. Standart bileşiklerin 280 nm' deki kromatogramı	38
Şekil 13. PmO' deki seconder bileşiklerin kromatogramı.....	40
Şekil 14. PmA' daki seconder bileşiklerin kromatogramı.....	40
Şekil 15. PmK ve PmÇ 'deki seconder bileşiklerin kromatogramı.....	41

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1. Fotokimyasalların bazı gruplarının farmakolojik etkileri (Segneanu vd., 2017).	5
Tablo 2. Terpenlerin sınıflandırılması.....	7
Tablo 3. Bazı Paenoia türlerinden izole edilen monoterpenoid bileşikler (Wu vd., 2010).	9
Tablo 4. Bazı Paenoia türlerinden izole edilen monoterpen glikozit bileşikler (Wu vd., 2010).	10
Tablo 5. Bazı Paenoia türlerinden izole edilen triterpenoid bileşikler (Wu vd., 2010) ..	13
Tablo 6. Paenoia türlerinden izole edilen flavonoid bileşikler (Wu vd., 2010)	14
Tablo 7. Paenonia türlerinden izole edilen fenol ve fenolik glikozitler (Wu vd., 2010).	14
Tablo 8. Paenonia türlerinden izole edilen tanenler (Wu vd., 2010).	15
Tablo 9. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması.....	18
Tablo 10. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler.....	32
Tablo 11. Tez çalışmasında kullanılan gereçler	33
Tablo 12. Standart sekonder bileşiklerin HPLC-DAD analizinde validasyon ve kalibrasyon parametreleri.....	38
Tablo 13. Paeonia kök ekstraktlarında HPLC-DAD ile tespit edilen sekonder bileşikler	41
Tablo 14. Paeonia Kök Ekstraktlarının Antioksidan Aktiviteleri	42

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
UV	Ultraviyole Işık
NAPRALERT	Doğal Ürünler Uyarı Veritabanı
LC-MS	Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometrisi
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
GC	Gaz Kromatografisi
DAD	Foto Diyot Dizi Dedektörü
CDD	İletkenlik Dedektörü
MS	Kütle Dedektörü
FRAP	Demir (III) İyonu İndirgeme Antioksidan Gücü
ORAC	Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi
DPPH	1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil Radikali
GC-FID	Gaz KromatografisiAlevİyonizasyon Detektörü
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
SPME	Katı Faz Mikro Ekstraksiyonu
PmO	Osmaniye'den Toplanan Örnek
PmA	Afyon'dan Toplanan Örnek
PmK	Konya'dan Toplanan Örnek
PmÇ	Çanakkale'den Toplanan Örnek
EGCG	Epigallokateşin-3-gallat
LOD	Gözlenebilirlik sınırı
LOQ	Alt tayin sınırı
nm	Nanometre
µM	Mikromolar
µg	Mikrogram
L	Litre
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
g	Gram

mg	Miligram
TEAC	Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite
BSS	Bağıl Standart Sapma
R ²	Tanımlayıcılık Katsayısı
RT	Alıkonma Zamanı
RSA	Radikal Süpürücü Aktiviteleri



1. GİRİŞ

Geçmişten günümüze doğadaki birçok bitkinin insanlar tarafından tedavi amacıyla kullanıldığı bilinmektedir. Halk arasında şifalı bitki olarak adlandırılan bu bitkiler özellikle Uzakdoğu ülkelerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Sentetik ilaçların tehlikeli yan etkileri sebebiyle son yıllarda batı toplumlarında da bu bitkilerden yararlanma alışkanlıklarının arttığı görülmektedir. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre modern ve geleneksel tıpta yaklaşık 20 bin bitki türünün ham madde olarak kullanıldığı bilinmektedir (Demirboğa vd., 2021; Ersöz, 2012; Demir ve Akpınar, 2020; Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011).

Gerek modern gerekse geleneksel tıpta kullanılan bitkilerin yapısındaki kimyasal moleküllerin bilinmesi çok önemlidir. Biyoteknolojik gelişmeler bitkilerin sekonder metabolit olarak adlandırılan molekülleri sentezlediklerini göstermektedir. Bu biyoaktif moleküller bitkinin yaşamsal fonksiyonlarında doğrudan rol oynamazlar ancak bitki sağlığının korunmasında oldukça önemlidirler. Fitokimyasallar olarak da adlandırılan bu biyoaktif moleküllerin bazıları ilaç yapımında ham madde olarak kullanılmaktadır. Ekonomik açıdan önemli fitokimyasalların; gıda, kozmetik, kimya, tarım, tekstil gibi birçok sektörde geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır (Ülger ve Ayhan, 2020; Erkoyuncu ve Yorgancılar, 2015; Alaca ve Arslan, 2012; Asan, 2013).

Geçmişte fitoterapide kullanılan bitkilerin tanınması, bu bitkilerin hangi hastalıkların tedavisinde kullanıldığının bilinmesi, bilimsel çalışmalarda araştırmacılara kolaylık sağlamaktadır. Paeoniaceae familyasından *Paeonia* L. cinsi bitkisi dünden bugüne Çin ve Japonya gibi Uzakdoğu ülkelerinde analjezik, antiinflamatuvar, antiepileptik ve antispazmodik amaçlar için kullanılmaktadır. *Paeonia* L. bitkisine yönelik biyolojik aktivite ve kimyasal madde analiz çalışmalarına araştırmacılar tarafından ilgi duyulmaktadır (Harada, 1969; Tunç vd., 2019; Lee vd., 2003; Koyunoğlu, 2008; Dong ve Xu, 2002; Hijikata vd., 2006).

Paeonia L. cinsinin (Şakayık) ülkemizde yöresel olarak ayı gülü, yörük gülü, kır lalesi, tombak, bocur gülü olarak bilinmektedir. Geçmişte “Otlar Kraliçesi” olarak da isimlendirilen bu bitki 2008 yılından beri “Doğadan Toplanmak Suretiyle İhraç Edilmesi Yasak Olan Çiçek Soğanları” olarak tanınmaktadır. Günümüzde Şakayık’ın fark

edilmeyen değeri EXPO 2016 Antalya fuarında sembol çiçek olarak seçilerek tekrar gün yüzüne çıkmıştır (Demir, 2019; Koyunoğlu, 2008; Çinbilgel, 2016).

Türkiye’ de yetişen *Paeonia mascula* alt türlerinin biyoaktif madde analizleri ile biyolojik aktivite çalışmalarının yapılması bu bitkinin tıp, gıda sektörü ve endüstride kullanım olanakları açısından değerlendirilebileceğini düşündürür.

Bu tez çalışmasında Türkiye florasının farklı bölgelerinden temin edilen *Paeonia mascula* (Miller) subsp. *mascula* alt türlerinin HPLC-DAD sistemi kullanılarak biyoaktif bileşiklerinin ve spektrometrik olarak antioksidan aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır.

1.1. *Paeonia* L. (Ayıgülü) Cinsi

Paeonia L., *Paeoniaceae* familyasının tek cinsidir. Stearn ve Davis’ in “Peonies of Greece” isimli kitaplarında Kuzey Yarım Küredeki *Paeonia* cinsi 3 seksiyona ayrılmıştır; *Paeonia*, *Moutan* ve *Onaepia* seksiyonu. Ağaçsı formlara sahip *Moutan* seksiyonu Doğu Asya’da yer almaktadır. *Onaepia* seksiyonu ise Kuzey Amerika’ nın batısında yayılış gösterir ve 2 tür içermektedir. Bütün Balkan *Paeonia* türlerini içeren *Paeonia* seksiyonu ise İspanya’dan Japonya’nın doğusuna kadar yayılır oradan da Kuzey Batı Afrika’ya iner (Stearn ve Davis, 1984).

Paeonia L., çok yıllık, otsu, rizomlu ve geofit bir bitkidir. Şakayık olarak bilinir. Çiçekleri gösterişlidir ve stamen taşır. Yaprakları ise biternat veya daha da bölünmüştür. Tüm dünyada 146 türü bulunmaktadır (Şahin, 2007; Davis vd., 1998; Güner vd.,2000; Koyunoğlu, 2008; Demir, 2019).

P. H. Davis’in 1965 yılında yayınlanan “Flora of Turkey and the East Aegean Islands” (1. Cilt) adlı eserinde ülkemizde *Paeonia* cinsine ait 6 tür bulunduğu bildirilmiştir (Bkz Tablo 1.). Aynı eserin 2000 yılında yayınlanan 11. Cildinde ise *P. mascula* subsp. *bodurii* ve *P. tenuifolia* türlerinin ülkemizde yetişen *paeonia* türleri arasına girdiği bildirilmiştir. Ülkemizde en son taksonomik durumunu netleştiren *Paeonia* türünün *P. daurica* subsp. *Macrophylla* olduğunu ve Rize il sınırları içerisinde yayılış gösterdiğini bildirilmiştir (Davis vd., 1998; Güner vd., 2000; Demir, 2019).

1.1.1. *Paeonia mascula* (L.) Miller

Paeonia mascula (L.) Miller türü Türkiye’de üç alt tür ile temsil edilmektedir: *Paeonia mascula* subsp. *arietina*, *Paeonia mascula* subsp. *bodurii* ve *Paeonia mascula* subsp. *mascula* (Şahin, 2007; Demir, 2019). Şekil 1’de *Paeonia mascula* alt türlerine ait resimler verilmiştir.



Şekil 1.(a) *Paeonia mascula* subsp. *mascula*, (b) *Paeonia mascula* subsp. *bodurii* N. Ozhatay, (c) *Paeonia mascula* subsp. *arietina*

1.1.2. *Paeonia mascula* subsp. *mascula*

Taç yaprakları (pateller) kırmızı renkli, 2. yapraklar 9-10 segmentli, altta seyrek piloz tüylü veya tüzsüzdür. Nisan ve mayıs aylarında çiçeklenir. Denizden 750 metre yüksekliklerde, açık taşlı, kayalık yamaçlarda ve orman altlarında yetişmektedir. Ülkemizde Antalya, Hatay ve Bitlis illerinde yayılış göstermektedir (Davis vd., 1998; Güner ve Aslan, 2012; Demir, 2019).

1.2. Sekonder Metabolitler

Bitkiler birbirinden farklı birçok biyoaktif kimyasal bileşik üretirler. Bu kimyasal bileşikler, biyosentetik kaynakları, genel oluşumları ve biyokimyasal özelliklerine göre primer ve sekonder metabolitler olarak iki sınıfa ayrılırlar. Primer (birincil) metabolik faaliyetler sonucu karbonhidrat, yağ, protein, klorofil ve nükleik asitler üretilir. Primer metabolitler fotosentez ve solunum reaksiyonlarında aktif görev alır ve bitkinin hayatta kalmasını sağlarlar. (Guedes, 2009; Agostini-Costa, 2012).

1921 yılında Czapek sekonder metabolitleri, bitkilerin azot metabolizmasından deaminasyon gibi ‘‘ikincil modifikasyonlar’’ tarafından üretilen kimyasal madde olarak tanımlamıştır. 3. Binyılın başlarında sekonder metabolitlerinin bazılarının pigment olduğu kanıtlanmıştır. 1970’ lerde ise sekonder metabolitlerin işlevleriyle ilgili iki farklı görüş vardı. Bir görüşe göre kardiyak glikozitler, kanabinoidler, antosiyaninler ve pirolizidin alkaloidler önemli ekolojik roller üstleniyorken, diğer görüşte alkaloidlerin ekolojik rol üstlendiği idi (Bourgaud vd., 2001; Guedes, 2009).

Bazı araştırmacılar sekonder metabolitleri, bitkinin büyüme ve yaşaması için önemli bir rolü olmayan, birincil metabolitlerden sentezlenen ara ürünler olarak tanımlamıştır. Moleküler biyoloji teknolojisinin yükselişi ve biyokimyasal yöntemlerin ilerlemesi sekonder metabolitlerin bitkilerin çevreye adaptasyonunda önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Aslında sekonder metabolitler ekosistem ile etkileşim halinde bitkinin gelişimine büyük katkı sağlamaktadır. Örneğin bitkinin patojen, haşarat ve diğer bitkilere karşı savunmasında önemli rolleri bulunmaktadır. Bu koruyucu etki aslında onların diğer bitkilere karşı antigerminatif veya toksik aktivite, antibiyotik, antifungal ve antiviral özellikte olmalarıyla ilgilidir. Sekonder metabolitler bitkileri hem bakteri, mantar ve hayvan gibi biyotik strese hem de sıcaklık, nem, UV, ağır metaller gibi abiyotik strese karşı korurlar. (Bennett vd.,1989; Bourgaud vd., 2001).

Sekonder metabolitlerin bazılarının insan ve ilaçlarda farmakolojik olarak aktif oldukları da bilinmektedir. Ekonomik değerleri fazla olan bu bileşikler özellikle ilaç, tat, koku, böcek öldürücü ve boya gibi kimyasallar olarak kullanılmaktadır. (Bakır;2020; Erkoyuncu ve Yorgancılar, 2015;Sevindik, 2018; Demir ve Akpınar, 2020).

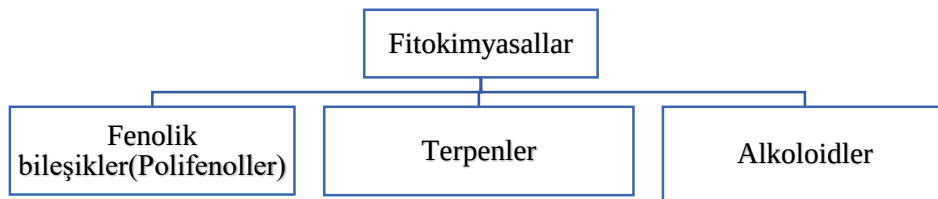
İnsan sağlığı için yararlı etkilerde bulunan ve biyoaktif bileşikler olarak nitelendirilen bitkisel sekonder metabolitler ‘‘fitokimyasallar’’ olarak da bilinmektedir (Demir ve Akpınar, 2020). Fitokimyasallar basta antioksidan aktivite olmak üzere, metal iyonlarını şelatlaştırıcı, detoksifiye enzimleri uyararak tümörü başlatan transkripsiyon faktörlerini inhibe edici özelliğe sahiptirler (Verma vd., 2009). Ayrıca bu bileşikler dejeneratif hastalıkları önleyici, antialerjenik, antienflamatuar, antimikrobiyal, antitrombotik (kanın pıhtılaşmasını önleyici), antikarsinojen, antiaterojen (damar sertliğini önleyici), anti ülser ve vasodilatör (kan damarlarını genişletici) ajan olarak görev yaptığı bilinmektedir (Weisburger, 2000; Halliwell, 2007). Fitokimyasallar kanser tedavisinde komplikasyonların azaltılmasını sağladığı ve kemoterapötik ajanların

olumsuz yan etkilerine karşı koruyucu bir role sahip olduğu bilimsel çalışmalarda yer almaktadır (Benjamin vd., 2015; Doan ve Christensen, 2015). Son zamanlarda sekonder metabolitlerden bazılarının endojen metabolitler, hormonlar ve nörotransmitterler gibi davrandığı bilinmektedir (Briskin, 2000). Bazı fitokimyasal grupların genel farmakolojik etkileri Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Fotokimyasalların bazı gruplarının farmakolojik etkileri (Segneanu vd., 2017)

Fotokimyasal Gruplar	Farmakolojik etkileri
Terpenoid	Antimikrobiyal, antiviral, antihelmit, antibakteriyel, antikanser, antiinflamatuvar.
Fenolik asitler	Antikansorejen, antimutagenik, antiinflamatuvar, anti-alerji.
Flavonoidler	Antioksidan aktivite, kardiovaskular koruyucu, antiinflamatuvar, karaciğer koruyucu, antiviral, antibakteriyel.
Tanninler	Antioksidan, antikanserojen, diüretik, hemostatik, antimutajenik, Antiseptik.

Fitokimyasallar bitki yaşamında belirli fonksiyonları yerine getirdiklerinden dolayı bitkilerin farklı evrelerinde farklı miktarlarda sentezlenebilirler. Çoğunlukla bitkilerin belli kısımlarında bulunurlar. Bazıları fazla miktarlarda üretilirken, bazılarının üretimi sınırlı düzeyde kalmaktadır. Bitkilerin yaklaşık 100.000 çeşit biyoaktif bileşik ürettikleri bilinmektedir. Bu kadar çok ve fazla çeşitliliği olan fitokimyasallar bitkilerde (i) izoprenoid , (ii) şikimat, (iii) poliketid yol olmak üzere 3 farklı biyosentez yolu ile üretilmektedir. Aslında bitkiler modifikasyona uğrayan ve özel moleküllerle sonuçlanan, birbirine benzeyen temel yapıları üretirler. Bu modifikasyonlar yapıya eklenen hidroksil, metoksi, aldehit ve karboksil gibi gruplarla, yapının yükseltgenme reaksiyonları kapsamaktadır (Karaman, 2011; İnceçayır, 2018; Erkoyuncu ve Yorgancılar, 2015; Verpoorte ve Alfermann, 2000). Fitokimyasallar temelde biyosentez yollarına göre Şekil 2.’ de gösterilen 3 ana sınıfa ayrılırlar (Agostini-Costa ve vd., 2012).



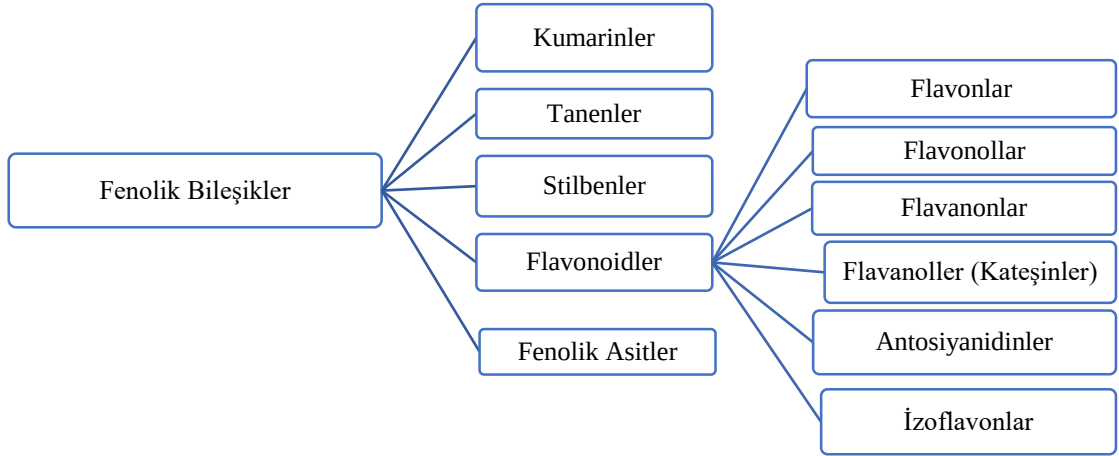
Şekil 2. Fitokimyasalların sınıflandırılması

Fenolik bileşik ve terpenoidlerin bazı bileşikleri tüm bitkilerde bulunurken diğer bileşikleri ile alkaloidlerin bazı özel bileşikleri sadece bitki familyalarının belirli türlerinde bulunmaktadır. Fitokimyasalların bu dar dağılımı onları kimyasal taksonomi ve kimyasal ekoloji için temel olmasıyla önemli taksonomik işaretçiler yapmaktadır. Terpenoid ve alkaloidler, fitokimyasalların en büyük gruplarını oluştururlar. 1998 yılında Doğal Ürünler Uyarı Veritabanında (NAPRALERT) 88.000 fitokimyasal kaydedildi, bunların 33.000'i terpenoid ve 16.000'i alkaloid idi. 1998 'den sonra da farklı fitokimyasallar bilim insanları tarafından izole edilmiştir (Guedes, 2009; Bakır, 2020). (Verpoorte ve Alfermann, 2000).

1.2.1. Fenolik Bileşikler (Polifenoller)

Fenolik bileşikler bitkilerin aromatik aminoasit metabolizması sırasında sentezlenir. Yapılarında hidroksil ve aromatik halkaya sahiptir ve polifenoller olarak da adlandırılır. Bu bileşiklerin suda çözünme, proteinlerle kompleks oluşturarak tortu oluşturma ve kondense olma gibi fizikokimyasal özellikleri bulunmaktadır. Bitkilerde yaygın olarak görülen fenolik bileşikler, bitkinin hemen hemen her kısmında bulunabilirler ve bitkilerin tat, koku ve renk gibi özelliklerine katkı sağlarlar.

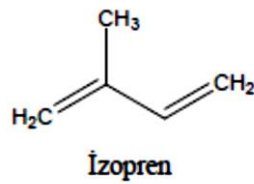
Fenolik bileşikler antioksidan, antiviral, antialerjen, antimitojen, antikarsinojen, antitrombotik, vasodilatör etkiyi kapsayan geniş bir biyolojik etki aralığına sahiptirler. Antioksidan aktivitelerini serbest radikalleri bağlayarak ve metallerle şelat oluşturarak gösterirler. Yapılarındaki fenol halkasına ne kadar fazla OH grubu bağlanırsa antioksidan aktiviteleri artmaktadır (Verma ve vd., 2009; Demir ve Akpınar, 2020). Fenolik bileşikler kimyasal yapısına göre kendi içinde alt gruplara ayrılır (Bkz. Şekil 3.).



Şekil 3. Fenolik bileşiklerin kimyasal yapılarına göre alt gruplara ayrılması

1.2.2. Terpenler

Allilik katyonun bir proton kaybetmesiyle oluşan izopren birimlerinin (2-metil-1,3-bütadien) bir araya gelmesiyle ‘terpenler’ oluşmaktadır (Bkz. Şekil 4). İzopren birimler baş-kuyruk şeklinde bağlanırlarsa düz zincirli, baş-baş, baş-orta şeklinde bağlanırsa halkalı yapılar oluşabilir. Yaygın olarak baş-kuyruk olarak bağlanırlar. Fitokimyasalların en yaygın olarak bulunan gruplarından biri olan terpenler içerdikleri izopren birimlerine göre Tablo 2’ deki gibi sınıflandırılabilirler (Tiring vd., 2020; Işık,2012).



Şekil 4. İzopren’ in kimyasal yapısı

Tablo 2. Terpenlerin sınıflandırılması

	Terpenler	İzopren Sayısı	Kapalı Formülü
1	Hemiterpenler	1	C ₅ H ₈
2	Monoterpenler	2	C ₁₀ H ₁₆
3	Seskitерpenler	3	C ₁₅ H ₂₄

Tablo 2 (Devamı). Terpenlerin sınıflandırılması

4	Diterpenler	4	C ₂₀ H ₃₂
5	Sesterpenler	5	C ₂₅ H ₄₀
6	Triterpenler	6	C ₃₀ H ₄₈
7	Tetraterpenler (Karotenler)	8	C ₄₀ H ₆₄
8	Poliizoprenler	>8	-

Terpenlerin oksitlenmesiyle oksijenli türevleri oluşur. Oksijen içeren terpen türevi esterler, alkoller ve aldehitler terpenoidler olarak adlandırılır Terpen kelimesi herhangi bir terpenoidi belirtmek için kullanılan bir ifadedir (Yaylı, 2013; İnceçayır, 2018; Koyunoğlu, 2008; Işık, 2012).

Monoterpenler bitkilerde, üç farklı şekilde bulunabilirler.

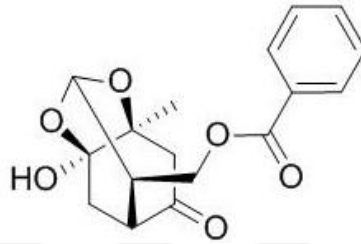
- I. Serbest monoterpenler, genellikle uçucu yağların ana yapısını oluştururlar.
- II. Farklı yapıdaki heterozitlere ester bağlarıyla bağlanmış olabilirler. Örneğin foliamentik asit ve mentiafolik gibi bileşikler monoterpen alkol bileşikler bu tip monoterpenler bu gruba girebilirler.
- III. Doğrudan ozlarla bağlanarak heterozitler oluşabilir. Bu tür bileşiklere ‘Monoterpen Glikozidler’ adı verilir. Eğer monoterpen glikozitlerin aglikon kısmına glukoz bağlanırsa ‘Monoterpen Glukozitler’ adı verilir. Monoterpen heterozitlerinin bitki yapraklardaki uçucu yağın prekürsörü olabileceği, monoterpen metabolizmasında ise ara ürün ve taşıyıcı rol oynayabilecekleri düşünülmüştür (Koyunoğlu, 2008).

1.3. Paeonia Türlerinin Yapısında Bulunan Biyoaktif Bileşikler

Paeonia türlerinin kafes benzeri pinan iskeletine sahip monoterpen bileşiklerince zengin bir bitki olduğu söylenebilir. Bazı Paeonia türlerinin kimyasal bileşenlerinin monoterpenoidler, monoterpen glikozitler, triterpenoidler, flavonoidler, fenoller ve tanenler olduğunu bilinmektedir. (Wu vd.,2010).

1.3.1. Paenia Türlerindeki Monoterpenoidler ve Monoterpen Glikozitler

Paenia türlerinde tespit edilen monoterpenoid bileşik arasında Paeoniflorigenone'nin ana biyoaktif bileşen olduğu söylenebilir (Bkz. Şekil 5). Bu bileşik *Paeonia albiflora*, *Paeonia suffruticosa*, *Paeonia peregrina*, *Paeonia delavayi*, *Paeonia veitchii* türlerinde bulunmaktadır. Bazı Paenoia türlerinden izole edilen monoterpenoid bileşikler Tablo 3' te gösterilmiştir (Wu vd., 2010).



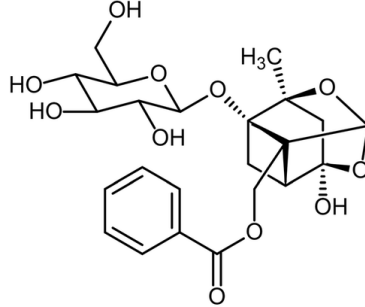
Şekil 5. Paeoniflorigenone molekülünün kimyasal yapısı

Tablo 3. Bazı Paenoia türlerinden izole edilen monoterpenoid bileşikler (Wu vd., 2010)

Monoterpenoid Bileşiğin Adı	Kaynak Paenoia Türü
1 Paeoniflorigenone	<i>Paeonia albiflora</i> , <i>Paeonia suffruticosa</i> , <i>Paeonia peregrina</i> , <i>Paeonia delavayi</i> , <i>Paeonia veitchii</i>
2 Paeonisuffral	<i>P. suffruticosa</i>
3 3-O-Methylpaeonisuffral	<i>P. suffruticosa</i>
4 Paeonilactinone	<i>P. lactiflora</i>
5 Deoxypaeonisuffrone	<i>P. suffruticosa</i>
6 Paeonisuffrone	<i>P. suffruticosa</i>
7 Paeonilactone A	<i>P. albiflora</i>
8 Paeonilactone B	<i>P. albiflora</i>
9 Paeonilactone C	<i>P. albiflora</i>
10 9-Hydroxypaeonilactone A	<i>P. delavayi</i>
11 Lactinolide	<i>P. lactiflora</i>
12 Paeonisohtujone	<i>P. suffruticosa</i>
13 Paeonilide	<i>P. delavayi</i>

Bazı Paenoia türlerinden izole edilen monoterpen glikozit bileşikler Tablo 4' te gösterilmiştir. *Paeonia* cinsinin hemen hemen tüm türlerinde monoterpen glikozit

sınıfında yer alan Paeoniflorinin en önemli ana aktif bileşen olduğu görülmüştür (Bkz. Şekil 6) (Wu vd.,2010).



Şekil 6. Paeoniflorin molekülünün kimyasal yapısı

Tablo 4. Bazı Paenoia türlerinden izole edilen monotermen glikozit bileşikler (Wu vd., 2010).

Monoterpen Glikozit Bileşiğin Adı	Kaynak Paenoia Türü
1 Paeoniflorin	<i>Paeonia alba</i> , <i>Paeonia albiflora</i> , <i>Paeonia anomala</i> , <i>Paeonia moutan</i> , <i>Paeonia lactiflora</i> , <i>Paeonia suffruticosa</i> , <i>Paeonia peregrina</i> , <i>Paeonia tenuifolia</i> , <i>Paeonia triternata</i> , <i>Paeonia emodi</i> , <i>Paeonia delavayi</i> , <i>Paeonia clusii</i> subsp. <i>clusii</i> ,
2 Oxypaeoniflorin	<i>Paeonia alba</i> , <i>Paeonia albiflora</i> , <i>Paeonia moutan</i> , <i>Paeonia suffruticosa</i> , <i>Paeonia emodi</i> , <i>Paeonia delavayi</i>
3 Benzoylpaeoniflorin	<i>Paeonia alba</i> , <i>Paeonia albiflora</i> , <i>Paeonia moutan</i> , <i>Paeonia lactiflora</i> , <i>Paeonia suffruticosa</i> , <i>Paeonia peregrina</i> , <i>Paeonia delavayi</i> , <i>Paeonia clusii</i> subsp. <i>clusii</i>
4 Benzoyloxypaeoniflorin	<i>Paeonia alba</i> , <i>Paeonia moutan</i> , <i>Paeonia lactiflora</i> , <i>Paeonia suffruticosa</i> , <i>Paeonia delavayi</i>
5 Albiflorin	<i>Paeonia alba</i> , <i>Paeonia albiflora</i> , <i>Paeonia lactiflora</i> , <i>Paeonia suffruticosa</i> , <i>Paeonia delavayi</i> ,
6 4-O-Methylpaeoniflorin	<i>Paeonia clusii</i> subsp. <i>clusii</i> , <i>Paeonia parnassica</i> , <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>hellenica</i> , <i>Paeonia lactiflora</i>

Tablo 4 (devamı). Bazı Paenoia türlerinden izole edilen monoterpen glikozit bileşikler (Wu vd., 2010).

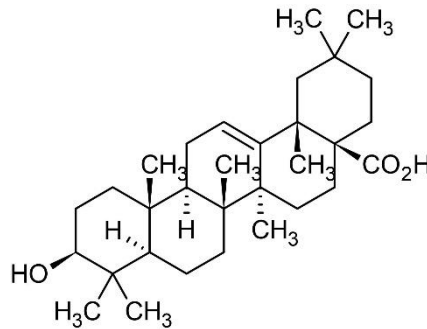
7	Paeonidanin	<i>Paeonia peregrina</i> , <i>Paeonia clusii</i> subsp. <i>clusii</i> , <i>Paeonia parnassica</i> , <i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>hellenica</i> , <i>Paeonia hybrida</i> , <i>Paeonia lactiflora</i>
8	Galloylpaeoniflorin	<i>P. suffruticosa</i> , <i>P. Obovata</i> , <i>P alba</i> , <i>P albifloravar. Trichocarpa</i>
9	Galloxyloypaeoniflorin	<i>P. suffruticosa</i> , <i>P. obovata</i>
10	Lactiflorin	<i>Paeonia alba</i> , <i>Paeonia emodi</i> , <i>Paeonia lactiflora</i>
11	Mudanpioside A	<i>P. suffruticosa</i>
12	Mudanpioside B	<i>P. suffruticosa</i>
13	Mudanpioside C	<i>P. suffruticosa</i>
14	Mudanpioside D	<i>P. suffruticosa</i>
15	Mudanpioside E	<i>P. suffruticosa</i>
16	Mudanpioside F	<i>P. suffruticosa</i>
17	Mudanpioside G	<i>P. suffruticosa</i>
18	Mudanpioside H	<i>P. suffruticosa</i>
19	Mudanpioside I	<i>P. suffruticosa</i>
20	8-Debenzoylpaeoniflorin	<i>P. obovata</i>
21	8-O-Galloyldebenzoylpaeoniflorin	<i>P. obovata</i>
22	8-O-Isovaleryldebenzoylpaeoniflorin	<i>P. obovata</i>
23	6'-O-Galloyldebenzoylpaeoniflorin	<i>P. obovata</i>
24	6'-O-Vanillylpaeoniflorin	<i>P. obovata</i>
25	3',6'-Di-O-galloylpaeoniflorin	<i>P. obovata</i>
26	Isomaltopaeoniflorin	<i>P. obovata</i>
27	6'-O-(Vanillyloxy) paeoniflorin	<i>P. suffruticosa</i>
28	Acetoxypaeoniflorin	<i>P. veitchii</i>
29	6'-O-Benzoyl-4''-hydroxy-3''-methoxypaeoniflorin	<i>P. delavayi</i>
30	4-O-Ethylpaeoniflorin	<i>P. delavayi</i>
31	4''-Hydroxy-3''-methoxy-4-O-methylpaeoniflorin	<i>P. delavayi</i>
32	Wuridin	<i>P. emodi</i>
33	Benzoylwuridin	<i>P. emodi</i>
34	Paeonin A	<i>P. emodi</i>
35	Paeonin B	<i>P. emodi</i>

Tablo 4 (devamı). Bazı *Paenoia* türlerinden izole edilen monoterpen glikozit bileşikler (Wu vd., 2010).

36	Paeonin C	<i>P. emodi</i>
37	6'-O-Galloyl-desbenzoylealbiflorin	<i>P. obovata</i>
38	Paeonivayin	<i>P. delavayi</i>
39	6'-O-Benzoyl-4''-hydroxyalbiflorin	<i>P. delavayi</i>
40	6'-O-(b-d-Glucopyranosyl) albiflorin	<i>P. lactiflora</i>
41	Paeonidaninol A	<i>P. peregrine</i>
42	Paeonidaninol B	<i>P. peregrine</i>
43	1-O-(b-d-Glucopyranosyl) paeonisuffrone	<i>P. lactiflora</i>
44	(Z)-[(1S,5R)-b-Pinen-10-ylb vicianoside]	<i>P. lactiflora</i>
45	6-O-(b-d-Glucopyranosyl) lactinolide	<i>P. lactiflora</i>

1.3.2. *Paenia* Türlerindeki Triterpenoidler

Oleanolic asid *paenia* türlerindeki triterpenoid sınıfında yer alan önemli bileşiklerden biridir (Bkz Şekil 7). Bazı bilimsel çalışmalarda *P. japonica*, *P. lactiflora* ve *P. Suffruticosa* türlerinin kallus dokularında triterpenoid bileşiklerin üretimi için biyosentetik dizi olduğu düşünülmektedir. Bazı *Paenoia* türlerinden izole edilen triterpenoid bileşikler Tablo 5' te gösterilmiştir. (Wu vd., 2010).



Şekil 7. Oleanolik asidin kimyasal yapısı

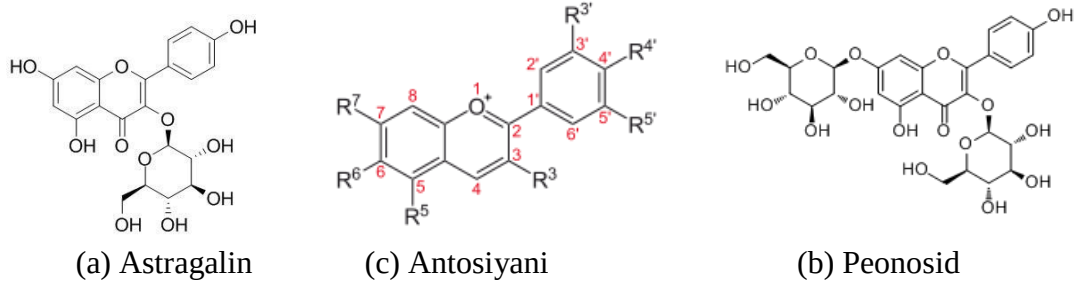
Tablo 5. Bazı *Paenoia* türlerinden izole edilen triterpenoit bileşikler (Wu vd., 2010)

Triterpenoid Bileşiğin Adı		Kaynak <i>Paenoia</i> Türü
1	Oleanolic acid (Bkz. Şekil 6.)	<i>P. lactiflora</i> , <i>P. Suffruticosa</i> , <i>P. japonica</i>
2	2a,3b-Dihydroxyolean-12-en-28-oic acid	<i>P. suffruticosa</i>
3	Hederagenin	<i>P. lactiflora</i> , <i>P. Suffruticosa</i> , <i>P. japonica</i>
4	3b-Hydroxyolean-12-en-28-al	<i>P. lactiflora</i>
5	Mudanpinoic acid A	<i>P. suffruticosa</i>
6	3b-Hydroxyoleana-11,13(18)-dien-28-oic acid	<i>P. suffruticosa</i> , <i>P. japonica</i>
7	3b,23-Dihydroxyoleana-11,13(18)-dien-28-oic acid	<i>P. suffruticosa</i>
8	3b-Hydroxy-11-oxoolean-12-en-28-oic acid	<i>P. japonica</i> , <i>P. lactiflora</i>
9	30-Norhederagenin	<i>P. lactiflora</i> , <i>P. Suffruticosa</i> , <i>P. japonica</i>
10	Akebonic acid	<i>P. delavayi</i>
11	3b,4b,23-Trihydroxy-24,30-dinoroleana-12,20(29)-dien-28-oic acid	<i>P. delavayi</i>
12	Paeonenolide C	<i>P. delavayi</i>
13	Paeonenolide B	<i>P. delavayi</i>
14	1b,3b,5a,23,24-Pentahydroxy-30-noroleana-12,20(29)-dien-28-oic acid	<i>P. emodi</i>
15	11a,12a-Epoxy-3b,23-dihydroxy-30-norolean-20(29)-en-28,13b-olide	<i>P. lactiflora</i>
16	Paeonenolide A	<i>P. delavayi</i>
17	11a,12a-Epoxy-3b-hydroxyolean-28,13b-olide	<i>P. japonica</i> , <i>P. lactiflora</i>
18	1a,12a-Epoxy-3b,23-dihydroxyolean-28,13b-olide	<i>P. japonica</i> , <i>P. lactiflora</i>
19	Betulinic acid	<i>P. lactiflora</i> , <i>P. Suffruticosa</i> , <i>P. japonica</i>
20	23-Hydroxybetulinic acid	<i>P. lactiflora</i> , <i>P. suffruticosa</i> , <i>P. japonica</i>
21	24-Methylidenecycloartanol	<i>P. japonica</i>
22	Palbinone	<i>P. albiflora</i>

1.3.3. *Paenia* Türlerindeki Flavonoidler

P. lactiflora'nın köklerinden astragalin ve peonoside izole edildiği, *P. suffruticosa*'nın çiçeklerinde ise antosiyanidin bulunduğu literatürde yer almaktadır (Bkz.

Şekil 8). Bu bileşikler flavonoid sınıfında yer alan fitokimyasal maddelerdir. Bazı Paenoia türlerinden izole edilen flavonoid bileşikler Tablo 6’ da gösterilmiştir.



Şekil 8. (a) Astragalin, (b) peonoside ve (c) antosiyanidin moleküllerin kimyasal yapıları

Tablo 6. Paenoia türlerinden izole edilen flavonoid bileşikler (Wu vd., 2010)

Flavonoid bileşiğin adı	Kaynak Paenoia türü
1 Astragalin	<i>P. lactiflora</i>
2 Peonoside	<i>P. lactiflora</i>
3 Kaempferol 3-digalactoside	<i>P. decora</i>
4 Quercetin-3-galacto-7-rhamnoside	<i>P. decora</i>
5 Isosalipurposide	<i>P. trollioides</i>
6 Sexangularetin-3-O-yl b-d-sophoroside	<i>P. tenuifolia</i>
7 Limocitrin-3-O-yl b-d-sophoroside	<i>P. tenuifolia</i>
8 Peonin	<i>P. suffruticosa</i>

1.3.4. Paenia Türlerindeki Fenolik bileşikler

Paenonia türlerinden izole edilen fenol ve fenolik glikozitler Tablo 7’ de gösterilmiştir.

Tablo 7. Paenonia türlerinden izole edilen fenol ve fenolik glikozitler (Wu vd., 2010).

Fenol ve Fenolik Glikozit Bileşiğin Adı	Kaynak Paenoia Türü
1 Paeonol	<i>P. suffruticosa</i>
2 2,5-Dihydroxy-4-methoxyacetophenone	<i>P. suffruticosa</i>
3 2,3-Dihydroxy-4-methoxyacetophenone	<i>P. suffruticosa</i>
4 2,5-Dihydroxy-4-methylacetophenone	<i>P. suffruticosa</i>
5 Resacetophenone	<i>P. suffruticosa</i>
6 Acetoisovanillone	<i>P. suffruticosa</i>
7 Acetovanillone	<i>P. suffruticosa</i>
8 Glucopaeonol	<i>P. suffruticosa</i>

Tablo 7 (devamı). Paenonia türlerinden izole edilen fenol ve fenolik glikozitler (Wu vd., 2010).

9	Apiopaeonoside	<i>P. suffruticosa</i>
10	Suffruticoside A	<i>P. suffruticosa</i>
11	Suffruticoside B	<i>P. suffruticosa</i>
12	Suffruticoside C	<i>P. suffruticosa</i>
13	Suffruticoside D	<i>P. suffruticosa</i>
14	Suffruticoside E	<i>P. suffruticosa</i>
15	Paeonolide	<i>P. suffruticosa</i>
16	Gallic acid	<i>P. suffruticosa</i>
17	Gallicin	<i>P. suffruticosa</i>
18	Mudanoside A	<i>P. suffruticosa</i>
19	Mudanoside B	<i>P. suffruticosa</i>
20	(Z)-Resveratrol	<i>P. suffruticosa</i>
21	Suffruticosol A	<i>P. suffruticosa</i>
22	Suffruticosol B	<i>P. suffruticosa</i>
23	Suffruticosol C	<i>P. suffruticosa</i>
24	Paeonocluside	<i>P. clusii</i>
25	2-Methoxy-5-[(E)-prop-1-enyl]phenol b-vicianoside	<i>P. lactiflora</i>
26	1'-O-Benzoylsucrose	<i>P. obovata</i>

1.3.5. Paenia Türlerindeki Tanenler

Paenonia türlerinden izole edilen tanenler Tablo 8' de gösterilmiştir.

Tablo 8. Paenonia türlerinden izole edilen tanenler (Wu vd., 2010)

	Tanen Bileşiminin Adı	Kaynak Paenonia Türü
1	6-O-Galloylsucrose	<i>P. obovata</i>
2	1'-O-Galloylsucrose	<i>P. obovata</i>
3	6'-O-Galloylsucrose	<i>P. obovata</i>
4	1,2,3,6-Tetra-O-galloyl-b-d-glucose	<i>P. lactiflora</i>
5	2-O-(Digalloyl)-1,3,4,6-tetra-O-galloyl-b-d-glucose	<i>P. lactiflora</i>
6	3-O-(Digalloyl)-1,2,4,6-tetra-O-galloyl-b-d-glucose	<i>P. lactiflora</i>
7	2,3-Bis-O-(digalloyl)-1,4,6-tri-O-galloyl-b-d-glucose	<i>P. lactiflora</i>
8	3-O-(Trigalloyl)-1,2,4,6-tetra-O-galloyl-b-d-glucose	<i>P. lactiflora</i>
9	4,6-Bis-O-(digalloyl)-1,2,3-tri-O-galloyl-b-d-glucose	<i>P. lactiflora</i>
10	3,6-Bis-O-(digalloyl)-1,2,4-tri-O-galloyl-b-d-glucose	<i>P. lactiflora</i>

Tablo 8 (devamı). Paenonia türlerinden izole edilen tanenler (Wu vd., 2010)

11	2,6-Bis-O-(digalloyl)-1,3,4-tri-O-galloyl-b-d-glucose	<i>P. lactiflora</i>
12	2,3,6-Tris-O-(digalloyl)-1,4-di-O-galloyl-b-d-glucose	<i>P. lactiflora</i>
13	1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl-b-d-glucose	<i>P. lactiflora</i>
14	6-O-(Digalloyl)-1,2,3,4-tetra-O-galloyl-b-d-glucose	<i>P. lactiflora</i>
15	6-O-(Trigalloyl)-1,2,3,4-tetra-O-galloyl-b-d-glucose	<i>P. albiflora</i>
16	6-O-(Tetragalloyl)-1,2,3,4-tetra-O-galloyl-b-d-glucose	<i>P. albiflora</i>
17	6-O-(Pentagalloyl)-1,2,3,4-tetra-O-galloyl-b-d-glucose	<i>P. albiflora</i>
18	6-O-(Hexagalloyl)-1,2,3,4-tetra-O-galloyl-b-d-glucose	<i>P. albiflora</i>
19	2,3-[(S)-Hexahydroxydiphenoyl]-d-glucose	<i>P. obovata</i>
20	Pterocaryanin B	<i>P. obovata</i>
21	Eugeniin	<i>P. obovata</i>
22	Pedunculagin	<i>P. obovata</i>
23	1b-O-Galloylpedunculagin	<i>P. obovata</i>
24	Casuariin	<i>P. obovata</i>
25	Procyanidin B-7	<i>P. obovata</i>
26	Procyanidin B-3	<i>P. obovata</i>
27	Procyanidin B-1	<i>P. obovata</i>
28	Procyanidin B-1,3-O-gallate	<i>P. obovata</i>
29	Procyanidin B-2,3'-O-gallate	<i>P. obovata</i>
30	Arecatanin A-1	<i>P. obovata</i>

1.4. Bitki Ekstraksiyonu ve İzolasyonu

1.4.1. Bitkisel Bileşiklerin Ekstraksiyonu

Ekstraksiyon, bir katı veya sıvı içerisindeki bir veya daha fazla bileşenin uygun çözücü yardımıyla birbirinden ayrılması işlemidir. Ekstraksiyon işlemi sırasında çözücünün sadece ayırmak istenilen maddeyi çözüp, bulunduğu matriks ile karışmaması gerekmektedir. Ekstraksiyon işlemi fitokimyasal bileşiklerin izolasyonunda, tanımlanmasında ve kullanımında çok önemli bir adımdır ve analiz işlemlerinin ilk basamağında yer alır (Ignat vd., 2011; Dhawan ve Gupta, 2017; Er, 2017; Yağcıoğlu, 2015; Demir, 2019).

Biyokütle durumuna bağlı olarak çözücü ekstraksiyonu katı-sıvı ve sıvı-sıvı ekstraksiyonu olmak üzere ikiye ayrılır. Katı-sıvı ekstraksiyonunda, katı bir örnekteki bileşenler sıvı bir çözücüye göç eder. Göç ederken sıvı çözücüye kütle transferinin fazla

olması için, örneğin mümkün olduğunca küçük partiküllere küçültülerek yüzey alanının genişletilmesi, uygun sıcaklık ve ardışık olarak taze çözücü kullanılması gerekebilir (Pinelo vd., 2004; Er, 2017). Sıvı-sıvı ekstraksiyonu ise sıvı solüsyonunda bulunan bileşiklerin solüsyon ile karışmayan bir sıvıya (çözücü) kütle transferi olarak tanımlanabilir. Farklı yoğunluğa sahip çözücü, solüsyondaki bileşenlerden birine veya daha fazlasına tercihli seçicilik sergileyerek bileşiği sıvı solüsyondan ayırır (Ignat vd., 2011).

Fenolik bileşikler, genellikle bitki örneğinin öğütülüp çözücü ile ıslatılmasıyla ekstrakte edilmektedir (Merken ve Beecher, 2000). Bu şekilde hazırlanan ekstraksiyon işlemi fenolik bileşikler ile birlikte şeker ve protein gibi fenolik olmayan bileşiklerin birlikte ekstraksiyonunu içerir ve daha sonra ilave saflaştırma işlemi gerektirmektedir (Castañeda-Ovando vd., 2009). Bu işlemde özüt, mevcut çözücü ile karışmayan başka bir çözücü ile muamele edilir. Farklı yoğunluktaki çözücü, ortamda bulunan bileşenlere farklı afinite veya seçicilik sergiler ve daha etkili bir ekstraksiyon gerçekleştirilmiş olur (Demir, 2019).

Metanol, bitkilerden biyoaktif bileşiklerin elde edilmesinde, yüksek verim sağlaması nedeniyle araştırmacılar tarafından en yaygın kullanılan çözücüdür. Özellikle fenolik asitler ve flavanoitlerin ekstraksiyonu için metanol en ideal çözücüdür (Dhawan ve Gupta, 2017). Uygun çözücü yardımıyla hazırlanan bitki özütünün fraksiyonlarına ayırmak için gerçekleştirilen sıvı-sıvı ekstraksiyonunda farklı çözücüler kullanılabilir.

Fenolik maddelerin izolasyonunda etil asetat, kloroform, eter ve aseton yaygın kullanılan çözücülere örnektir. Flavonoit ekstraksiyonu için dietil eter ve etil asetat daha uygun olan çözücülerdir. Glikozidik polifenoller ve fenolik asitler için ise su tercih edilmektedir (Temidayo, 2013).

1.4.2. Bitkisel Bileşiklerin Kromatografik Tayini

Bitkilerin çeşitli çözücülerle hazırlanan özütlerine kromatografik yöntemler uygulanarak biyoaktif bileşikler izole edilir. Kromatografinin uygun maliyet, kolay temin edilebilirlik ve sabit fazların çeşitliliği gibi olumlu özelliklerinden dolayı en önemli, etkin ve yaygın olanı likit kromatografi temelli HPLC ve LC-MS/MS cihazlarıdır. HPLC cihazı bileşenleri kolondan çıkış zamanlarına göre, LC-MS/MS ise bileşiklerini hem kütle/yük

oranlarına hem de kolondan çıkış zamanlarına göre analiz etmektedir (Psillakis ve Kalogerakis, 2001; Kacurakova vd., 2000; Demir, 2019; Eser ve Dinçel, 2018).

1.5. Kromatografi

Kromatografi yöntemi ilk olarak Rus botanikçisi Mikhail Tswett tarafından bitki pigmentlerini ayırmak için kullanılmıştır. Biyokimyasal moleküllerin tanımlanmasında etkili bir yöntem olan kromatografi araştırmacılar tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır (Yıldız vd., 1997; Skoog vd., 2000)

Kromatografi, numune içindeki maddelerin uygun bir çözücü yardımıyla fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre çözünerek ayrıldığı ayırma işlemlerine verilen ortak isimdir. Ölçüm, ayrıştırma ve saflaştırma gibi farklı amaçlar için kullanılan kromatografi yönteminin birçok çeşidi bulunmaktadır (Yıldız vd., 1997).

Numunedeki bileşiklerin adsorpsiyon, dağılma ve değiştirme gibi özellikleri kromatografide çok önemlidir. Bu özellikler dikkate alınarak kromatografik yöntemler faz tipleri, ayrılma mekanizmaları ve uygulama biçimine göre Tablo 9’ da gösterilen farklı gruplarda toplanabilir (Yıldız vd., 1997; Eser ve Dinçel, 2018).

Tablo 9. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması

Ayrılma Mekanizmalarına Göre Kromatografiler	Uygulama Biçimine Göre Kromatografiler	Faz Tiplerine Göre Kromatografiler
• Adsorpsiyon kromatografisi • Partisyon kromatografisi • İyon değiştirme kromatografisi • Jel filtrasyon (Moleküler eleme) kromatografisi	• Düzlemsel kromatografi • Kağıt kromatografisi • İnce tabaka kromatografisi (TLC) • Kolon kromatografisi • Gaz kromatografisi (GC) • Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)	• Sıvı kromatografisi • Sıvı-Katı kromatografisi • Sıvı-Sıvı kromatografisi • Gaz kromatografisi

Sabit ve hareketli faz, tüm kromatografik tekniklerde bulunur ve metot geliştirme aşamasında etkin rol oynar. Hareketli faz, numuneyi sabit faz boyunca sürükleyen çözücü

karışımıdır. Hareketli fazı seçerken sabit fazın, detektörün ve numunedeki moleküllerin özellikleri dikkate alınmalıdır. Sabit faz, hareketli faz içerisinde gelen numuneye ait bileşenlerin etkileşime girdikleri ve belirli ölçüde alıkonuldukları fazdır. Sabit faz, kromatografi tekniğinin çeşidine göre tasarlanmıştır. Çeşitli materyallerden, çok farklı ölçülerde imal edilmiştir ve “kolon” olarak da adlandırılmaktadır (Skoog vd.,2000; Eser ve Dinçel, 2018).

1.5.1.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

HPLC cihazı ile çalışma 4 basamakta gerçekleşir. İlk basamakta analiz edilecek olan örnek uygun bir çözücüde çözünür. İkinci basamakta numunedeki bileşenlerin ayrımı gerçekleşir. Ayrım kolonda gerçekleşir. Analit ile hareketli fazdan oluşan karışımın kolonda hareket edebilmesi için basınç uygulanır. Basıncın etkisiyle analitteki farklı bileşenler kolonda farklı hızlarda ilerler. Böylece bileşenler çıkışa farklı zamanlarda ulaşır. Üçüncü basamakta ise ayrılan bileşenler ve miktarları tayin edilir. Miktar tayini, için detektörden yararlanılır. HPLC cihazı ile çalışmanın son basamağında ise kromatogramların değerlendirilmesi yer alır. Detektörden elde edilen kromatogramlar farklı bilgisayar programları yardımıyla yorumlanabilmektedir (Eser ve Dinçel, 2018).

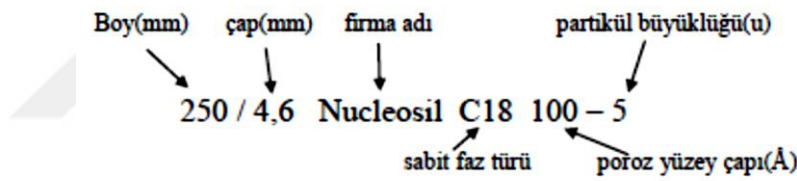
HPLC cihazı genel olarak solvent şişeleri, pompa, enjektör, kolon, dedektör ve kaydedici olmak üzere 6 kısımdan oluşmaktadır. Bu kısımların bazıları cihaz markası ve modeline göre değişiklik gösterebilmektedir (Skoog vd.,2000).

Hareketli faz (çözücü), her biri 200-1000 ml olan bir ya da daha fazla cam veya paslanmaz çelik kabın içinde bulunmaktadır. Kolon ve dedektör performansını etkilediği için öncelikle çözücü içerisindeki eriyik gazların giderilmesi gerekmektedir. Bunun için “degasser” denilen bir sistem kullanılmaktadır (Skoog vd.,200; Eser ve Dinçel, 2018).

Pompa, numune ve çözücünün enjektör ve dedektör boyunca sürekli sabit akışını sağlar. Dakikada akan mL ile gösterilir. Pompanın 600 Bar’a kadar yüksek basınçta çalışması, seçilen herhangi bir akış hızında yüksek akış doğruluğu ve hassasiyette olması çok önemlidir. HPLC sistemlerinde iki farklı pompa çalışma tekniği bulunmaktadır: izokratik ve dereceli (gradiyent) elüsyon. Tek pompa kullanılarak bileşimi değişmeyen hareketli fazla yapılan ayrımlara izokratik elüsyon denir. Bu tür elüsyonların uzun analiz süresi ve zayıf ayırım gibi dezavantajlı yönleri bulunmaktadır. Gradiyent elüsyon ise en

az iki ayrı pompa kullanılarak polariteleri farklı iki veya daha fazla çözücü ile yapılan ayrımlardır. Karmaşık sistem gereksinimleri ve yüksek maliyet gradiyent elüsyonun dezavantajlı yönleridir (Schoog vd.,2000; Eser ve Dinçel, 2018; Kocaimamoğlu, 2014).

Numunenin kolon öncesinde enjektör yardımıyla hareketli faza enjekte edilmesi gerekmektedir. Son zamanlarda oto-enjektör ünitelerinde soğutma, ısıtma, seyreltme ve karıştırma işlemleri de yapılmaktadır. Kolon, HPLC cihazının temel yapıtaşlarından biridir ve numunedeki bileşenlerin birbirinden ayırımından sorumlu sabit fazdır. Kolonlar polaritelerine göre normal faz ve ters faz olarak ikiye ayrılabilir. Çözücüye göre daha polar bir dolgu maddesi içeren kolon kullanılmış ise normal faz, daha apolar bir dolgu kullanılmışsa ters faz olarak adlandırılmaktadır. Normal fazda mobil faz olarak apolar organik çözücüler, ters fazda ise daha polar olan çözücüler kullanılmaktadır. Günümüzde ters faz çalışmaları daha fazla kullanılmaktadır. Şekil 9’ da uluslararası standartlara uygun olarak örnek bir kolon tanımlaması görülmektedir (Schoog vd.,2000; Eser ve Dinçel, 2018; Er, 2017).



Şekil 9. Örnek bir kolon tanımlaması

Kolonun sonundan ayırım (elüe) olan her bir analit dedektöre ulaşır ve sinyal üretir. Oluşan sinyalin intensite ve süresi analitin miktarı ve yapısı ile alakalıdır. Sinyal amplifiye edilir ve entegratör tarafından üretilen kromatogram üzerinde pik oluşur. Kromatogram zamana karşı dedektör cevabına ait grafik olarak tanımlanabilir. HPLC sistemlerinde Görünür Bölge Dedektörü (UV/VIS), Fotodiyot Array Dedektörü (DAD), İletkenlik Dedektörü (CDD), Kütle Dedektörü (MS) gibi farklı dedektörler kullanılmaktadır (Ertuş vd., 2018; Er, 2017; Eser ve Dinçel, 2018).

1.6. Bitki Bileşenlerinin Spektroskopik Yöntemlerle Tanımlanması

Genel olarak sekonder metabolitlerin tayini ayrıştırma, saflaştırma ve miktar tayini olmak üzere üç temel aşamayla yapılmaktadır. Sekonder metabolitlerin analizi için

HPLC, gaz kromatografisi, spektrofotometrik, enzimatik esaslı yöntemler gibi birçok yöntem kullanılmaktadır (Gomez-Caravaca vd., 2006).

Birçok bitki örneğin toplam fenolik ve antioksidan kapasitesi arasında doğrudan bir ilişki olduğu bulunmuştur. Biyolojik örneklerin antioksidan kapasitesini değerlendirmek için son yirmi yılda çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. FRAP (Demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü), ORAC (Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi, ABTS ve DPPH• (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil radikali) gibi yöntemler bitki ekstraktlarının antioksidan aktivitesini ölçmek için kullanılmaktadır (Prior vd., 2005; Akyüz vd., 2013; Scherer ve Godoy, 2009).

1.6.1. Toplam Polifenol Tayini

Toplam polifenol miktarı tayininde Folin-Ciocalteu en çok kullanılan reaktiftir. Bu reaktif fenolik bileşenlerin in vitro analizlerinde kullanılan fosfomolibdik asit ve fosfotungstik asitin karışımından oluşur. Alkali ortamda oluşan sarı renkli molibdenyum kompleksi fenolik bileşiklerden gelen elektronlar nedeniyle mavi renkli tungsten-molibdenyum kompleksine dönüşür. Mavi renkli kompleksin UV spektrofotometresiyle 760 nm’ de ölçülen absorbans şiddeti fenolik yapıdaki moleküllerin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Yöntemde kullanılan referans stardart bileşik genellikle gallik asit ve kuersetindir. Sonuçlar gram özütteki gallik asit veya kuersetin eşdeğeri olarak verilir (Chen vd., 2015).

1.6.2. DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi

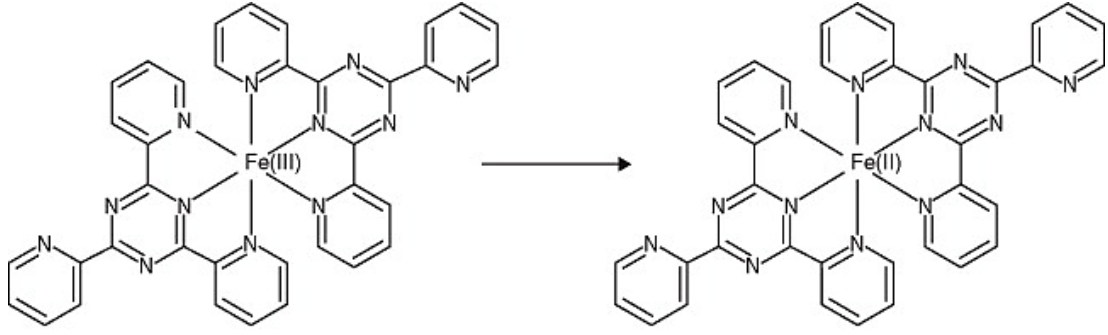
Bu yöntem alkol ortamda mor renkli 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH•) radikalinin hidrojen vericisi olan bir antioksidan molekül ile reaksiyona girmesi ve sarı renkli 2,2- difenilpikrilhidrazin (DPPH-H) formuna indirgenmesi esasına dayanır. Renk değişimi spektrofotometrik olarak ölçülür. Mor rengin şiddetindeki azalma, doğrusal olarak antioksidan derişimine ve kapasitesine bağlıdır. Sonuçlar SC₅₀ ile verilmektedir (Mishra vd., 2012; Arnao, vd., 2001).

1.6.3. ABTS Radikal Temizleme Aktivitesi

ABTS Radikal Temizleme Aktivitesi, antioksidanların eklenmesiyle mavi/yeşil renkli 2,2'-azinobis (3-etil-bezotiazolin 6 sulfonat) (ABTS) radikalın indirgenerek absorbansının değişmesi esasına dayanır. Potasyum persülfat ile oksitlenerek elde edilen ve 734 nm'de maksimum absorbasyon yapan ABTS, radikal bir katyon formundadır. Bir antioksidan bileşen, bu radikal forma bir elektron vererek onu radikal olmayan bir şekle dönüştürerek renginde değişim olmasına neden olur. Bu renk değişiminden yararlanarak çeşitli maddelerin antioksidan hesaplanır. Özütlerin ABTS radikal temizleme kapasitesi troloks, askorbik asit ve gallik asit gibi çeşitli standartlarla karşılaştırılabilir. Sonuçlar SC₅₀, olarak verilmektedir (Ali vd, 2008; Arnao vd., 2001).

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

Demir iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP) yöntemi, antioksidan bileşiklerin tek elektron transferiyle indirgenmesinde renk değiştiren bir oksidantı indirgeme kapasitesinin ölçümüne dayanır. Renk değişiminin derecesi örnekteki antioksidan derişimi ile ilişkilidir. Bileşiklerin yapılarındaki hidroksilasyon ve konjugasyon düzeyleri indirgeme kapasitesini etkilemektedir. Oyaizu (1986) tarafından ortaya konan yöntemde antioksidan maddenin indirgeme gücü, Fe⁺³'ün Fe⁺²'ye indirgenmesi sonucu oluşan renk değişiminin 595 nm'de izlenmesi ile belirlenir. Asidik pH'da Fe⁺³'ün, 2,4,6-tripiridils-triazin (TPTZ) ile reaksiyonu sonucu oluşan Fe(III) tripiridiltriiazin ([Fe(III)-TPTZ]₂Cl₃) kompleksi antioksidanların varlığında Fe(II)-tripiridiltriiazin [Fe (II)-TPTZ] kompleksine indirgenmektedir (Bkz. Şekil 10) (Albayrak vd., 2010). Koyu mavi renkli demir tuzu [Fe (II)-TPTZ] oluşumu sonucunda 595 nm'de absorbans artışı ile antioksidanların indirgeme kapasiteleri doğru orantılıdır.



(a) Fe(III)-TPTZ + indirgen antioksidan

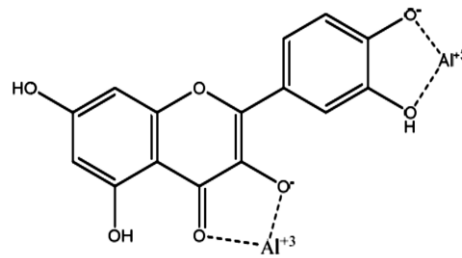
(b) Fe(II)-TPTZ

Şekil 10. (a) Fe (III)-TPTZ kompleksinin, (b) Fe (II)-TPTZ kompleksine indirgenme reaksiyonu

1.6.5. Toplam Flavonoid Tayini

Flavonoidlerin analizi ilk olarak Marcucci tarafından tarif edilen alüminyum klorür (AlCl_3) yöntemi ile yapılmıştır. Bu bileşik flavonoidlerin yapısının belirlenmesi için UV-görünür spektrometride bir kayma reaktifi olarak yaygın kullanılmaktadır (Marcucci vd., 1998).

Alüminyum katyonu, metanoldeki flavonoidlerle kararlı kompleksler oluşturur (Bkz. Şekil 11). Bu katyon, absorpsiyon şiddetinin daha uzun dalga boylarına kaymasına neden olur. Yöntem sayesinde diğer fenolik bileşiklerle bir arada olan flavonoid miktarını belirlemek mümkündür (Marcucci vd., 1998).



Şekil 11. Metonolik AlCl_3 çözeltisinde flavanoid-Al kompleksinin oluşumu.

1.7. Literatür Özetleri

Paeonia türleriyle ilgili bilimsel çalışmalara bakıldığında monoterpenoidler, monoterpen glikozitler, triterpenoidler, flavonoidler, fenoller ve tanenler gibi sekonder bileşikler geniş bir yalpazede analiz edildiği görülmektedir. Lin vd., (2009), *Paeonia lactiflora* Pall köklerinin etanol ile hazırlanan özütünden 5 tanen üyesi (gallotaninler ve proantosiyanidin türleri) ve 5 monoterpen glikoziti (pinan tipi) HPLC-MS metodu ile analiz ettiklerini bildirmişlerdir. Ayrıca geliştirdikleri metodla mevcut HPLC'yi yükseltmeye gerek kalmadan dört kutuplu MS ile daha düşük maliyette, kolay ve daha hassas analiz yapılabileceğini bildirmişlerdir. Zhou ve ark. (1998) ise aynı bitkinin metanol özütlerinden paeoniflorin analizi için oldukça hassas ve kesinlikte bir HPLC-UV yöntemi tarif etmişlerdir.

Zhao ve Sun (2003) çalışmalarında *Paenoia suffruticosa* bitkisinin kurutulmuş köklerindeki paeonol, paeoniflorin ve türevlerinin kalitatif analizi için yüksek performanslı sıvı kromatografisi- elektrosprey iyonizasyon-kütle spektrometrisi (HPLC-EIS-MS) yöntemini uygulamışlardır. Bitkinin kurutulmuş köklerini metanol ile ekstra ettiklerini yöntemlerinde ise negatif iyon ESI modunu kullandıklarını bildirmişlerdir.

Cheng vd., (2004) *Paeonia lactiflora* köklerinin etanol-su ile hazırlanan özütlerinde paeoniflorinin analizi için yüksek hızlı karşıt akım kromatografi yöntemi kullanmışlardır. Çalışmalarında n-butanol-etilasetat-su (1:4:5, h/h/h) solvent sistemi kullanan araştırmacılar %98,2 verimle paeoniflorin maddesini elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Hayes vd. (2005) *Paeonia lactiflora* bitkisinden paeoniflorin analizi için ters faz HPLC yöntemi geliştirmiş, yönteminde hareketli faz olarak asetonitril-fosforik asit kullanmıştır (Hayes vd.2005).

Kim vd. (2006) *Paeonia lactiflora* bitkisinin alkol özütlerinden paeoniflorin ve albiflorin analizi için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. HPLC yönteminde ters fazlı inertsil ODS kolon, hareketli faz olarak asetonitril-su kullandıklarını kullanılmıştır. Optimum analitik koşullarda paeoniflorin ve albiflorin alıkonma süreleri sırasıyla 17.74 ve 14.30 dak. olduğu bildirilmiştir.

Dong vd., (2007) *Paeonia lactiflora* bitkisindeki monoterpen glikozidlerin analizini sıvı kromatografisi-elektrosprey iyonlaşma kütle spektrometresi yöntemi ile

gerçekleştirmişlerdir. Öncelikle elektrosprey iyonlaşma Fourier transform iyon siklotron rezonans kütle spektrometresi ile paeoniflorini incelenmiş, daha sonra bitkinin özütleri sıvı kromatografisi-elektrosprey iyonlaşma kütle spektrometresi yöntemiyle analiz edilmiştir.

Susumu vd., (1990) kapiler zon elektroforez yöntemi ile *Paeonia* kökünün metanol özütündeki paeoniflorin ve oksipaeoniflorinin analizi yapmışlardır.

Sheng vd., (2005) geleneksel Çin tıbbında kullanılan, 4 bitkiden oluşan (*Paeoniae alba*, *Angelicae Sinensis*, *Rhizoma Chuanxiong* ve *Radix Rehmanniae*) kompozitin metanol-su özütünde gallik asit, albiflorin, paeoniflorin, ferulik asit ve benzoik asit analizini gerçekleştirmişler. Çalışmalarında HPLC-DAD yöntemini uygulayan Sheng ve ark. Zorbox SB C18 kolon ve % 0.01 fosforik asitasetonitril içeren gradient elüsyon kullanılmışlar ve bileşenleri 230 nm’de dedekte etmişlerdir.

Wu vd., (2002) *Paeonia delavayi* türünün toprak altı kısımlarından 4-O-ethylpaeoniflorin, 6'-O-benzoyl-4"-hydroxy-3"-methoxy-paeoniflorin, 6'-O-benzoylalbiflorin ve bir monoterpenoid 9-hydroxy-paeonilactone-A izole etmişlerdir. Ayrıca 2010 yılında *Paeonia* cinsiyle yaptıkları başka bir çalışmada 13 monoterpen, 45 monoterpen glikozit, 22 triterpenoid, 8 flavonoid, 26 fenol ve fenolik glikozit ve 31 tanen ve birçok fitokimyasalın izole edildiği bildirilmişlerdir.

He vd., (2014) *Paeonia suffruticosa*, *Paeonia qiui*, *Paeonia ostii*, *Paeonia rockii*, *Paeonia jishanensis*, *Paeonia decomposita*, *Paeonia delavayi*, ve *Paeonia ludlowii* bitkilerin yapısındaki biyoaktif bileşenlerin analizini yapmışlardır. HPLC-DAD yönteminin uygulandığı çalışmalarında 43 bileşik izole edilmiş, bu bileşiklerin 17'si monoterpenoid glikozit, 11'i galloilglukoz 5'i flavonoid, 6'sı paeonol ve 4'ü fenol olduğunu bildirmişlerdir.

Orhan vd., (2010) *Paeonia* (*Paeoniaceae*) cinsinin on iki türünün kök ekstraktında gaz kromatografisi (GC) ve gaz kromatografisi-kütle spektrometresi yöntemiyle uçucu yağları analiz etmişler (GC-MS), çalışmalarının sonucunda salisilaldehit, cis-mirtanal ve metil salisilat maddelerini ana bileşen olarak belirlemişlerdir. Ayrıca bu türlerin 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) ve nitrik oksit (NO) radikallerine karşı antioksidan aktiviteleri test edilmiştir. Etanol ekstraktlarındaki toplam fenolik miktarı Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Ekstraktların orta düzeyde NO süpürücü

etkisi ve önemsiz DPPH radikal süpürücü aktivitesi sergilediği bildirilmiştir (Orhan vd., 2010).

Kosova vd., (1997) yaptığı bir çalışmada *Paeonia peregrina* bitkisinin köklerinden paeonidanini izole etmiş ayrıca paeoniflorigenon, benzoilpaeoniflorin, benzoik, p-hidroksibenzoik ve gallik asitler de tanımlamışlar. (12). Kostova vd. aynı yıl yaptıkları başka bir çalışmada Paeonidaninol A ve B isimli iki monoterpen glikozit daha izole (Kostova vd.,1997).

Ivanova vd., (2002) *Paeonia peregrina* ve *Paeonia tenuifolia* köklerinin 14 aromatik ve 24 alifatik asit içerdiğini GC-MS yöntemiyle bulmuşlardır. Bu bileşiklerden benzoik asit ve monohidroksi-, dihidroksi-trihidroksi türevleri her iki *Paenoia* türü için ana bileşen olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmalarında bu türlerin *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Candida albicans* adlı bakterilerin büyümelerini engellediği de yer almaktadır.

Verma vd., (2015) *P. emodi*' nin taze köklerinin hidrodistillenmiş esansiyel yağ analizinde, gaz kromatografisi-alev iyonizasyon detektörü (GC-FID), gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) ve nükleer manyetik rezonans (NMR, ¹H ve ¹³C) yöntemlerini kullanmışlar, çalışmalarının sonucunda toplamda 24 bileşen tespit etmişlerdir.

Zhang vd., (2017) *Paeonia rockii* ve *Paeonia decomposita* subsp. *rotundiloba* bitkileriyle yapmış oldukları kimyasal analizde yüksek oranda fenolik bileşiklerin olduğunu tespit etmişlerdir. *P. decomposita* subsp. *rotundiloba* türünün toplam fenolik ve flavonoid içeriğinin yanı sıra en güçlü hidroksil radikali süpürme aktivitesine sahip olduğu çalışmalarında yer almaktadır.

Koo vd., (2010) *Paeonia lactiflora* ve *Paeonia suffruticosa* bitkileriyle yaptıkları çalışmalarında paeonol, paeoniflorin, benzoilpaeoniflorin ve benzoiloksifoniflorin gibi biyoaktif bileşiklerinin önemli miktarlarının iki bitkide de bulunduğunu bildirmişlerdir. Koyunoğlu, (2008) *Paeonia mascula* subsp. *arietina* türlerinin toprak altı kısımlarından paeoniflorin ve oksipaeoniflorin'nin nitel ve nicel analizi için HPLC yöntemi geliştirmiştir. Çalışmasında C18 (250x4,6 mm i.ç.,5 µm) kolon, hareketli faz olarak asetonitril:10 mM pH 3.5 fosfat tamponu (20:80 h/h) karışımı, 1 ml dak⁻¹ akış hız ve 230-259 nm UV dedektör kullanmıştır.

Tunç vd., (2019) *Paeonia mascula* subsp. *mascula*'nın antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesine yönelik çalışma yapmışlar ve bu bitkinin çalışmada kullanılan test mikroorganizmalarına (*E. Coli* S. *Epidermidis* B. *Subtilis* E. *Faecalis* S. *Typhimurium* S. *Aureus*) karşı antibakteriyel etkisinin olduğunu bildirmişlerdir.

Kamiya vd., (1997) *Paeonia lactiflora* bitkisinin toprak altı kısımlarından 7 triterpen ve topraküstü kısımlarından da 2 flavonoid izole edildiğini bildirmişlerdir.

Güner vd., (2000) "Flora of Turkey and the East Aegean Islands" adlı eserin 11. cildinde *P. daurica* türünün monoterpenoid, *P. peregrina* türünün ise antosiyan, flavonoid, monoterpenoid, organik asit ve steroidler içerdiğini bildirmişlerdir.

Ryu vd., (2001) *P. suffruticosa* Andrews türünün toprak altı kısmından glikozit α -benzoiloksipaeoniflorini izole ettiklerini duyurmuşlardır (Güner vd.2000).

Papandreou vd., (2002) Yunanistan'da yetişen *P. clusii* Stern subsp. *clusii*, *P. mascula* L. subsp. *hellenica* ve *P. parnassica* türlerinin toprak altı kısmındaki uçucu bileşenleri gaz kromatografi-kütle spektrometrisi ile analiz etmişler, çalışmalarının sonucunda salisilaldehit, paeonol, metil salisilat ve benzoik asit bileşiklerinin majör olarak bulunduğunu bildirmiştir.

Lee vd., (2005) *Paeonia lactiflora* türünün toprak altı kısmının etanol özütünde major bileşik olarak gallik asit ve metil gallat bulunduğunu bildirmiştir.

Guo vd., (2006) *Paeonia lactiflora* türünün toprak altı kısmında glikozit; 2-methoxy-5-(E)-propenyl-phenol- β -vicianoside izole ettiklerini bildirmişlerdir (Guo vd., 2006).

Wu vd., (2007) *Paeonia delavayi* türünün kök kısmından 4-O-methyl-4"-hydroxy-3"-methoxy-paeoniflorini izole etmişlerdir.

Wu vd., (2008) *Paeonia delavayi* türünün kök kısmından ellajik asit (4'-O-methylellagic acid 4-O- β -D-glucopyranoside) izole etmişlerdir.

Okasaka vd., (2008) *P. hybrida* Pall. kök kısmından paeonihybridin, paeobrin, salicylpaeoniflorin, 6-O-b-D-Glucopyranosyl-8-O-benzoyl-paeonisuffrone, 9-Epi-paeonidanin, paeonidanin ve 3-Methyl-O-[α -arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-b-glucopyranosyl]-6-methyl-benzofuran bileşiklerini izole etmişlerdir.

Braca vd., (2008) *P. lactiflora* bitkisinin toprak altı kısımlarından 4-O-methyl-paeoniflorin, isopaeoniflorin, ve isobenzoylpaeoniflorin, paeoniflorin ve benzoylpaeoniflorin glikozitlerini izole etmişlerdir.

Ren vd., (2009) *Paeonia lactiflora* bitkisinin toprak altı köklerinden 4'-O-benzoylpaeoniflorin; 4-O-galloylalbiflorin isimli iki monoterpen glikozit izole etmişlerdir.

Matsuda vd., (2001) *P. Suffruticosa* türlerinin yapısında yer alan apiopaeonoside ve paeonolide bileşiklerinin galloil grubu içerdiği ve paeonol türevleri olan galloil grubunun olmayan gruplara göre radikal süpürücü etki için gerekli olduğunu bildirmişlerdir.

Riaz vd., (2003) *P. emodi*' nin köklerinden izole edilen paenin A ve B adında iki monoterpen galaktozidin lipoksijenaza karşı inhibitör aktiviteler sergilediğini bildirmişlerdir. Ertesi yıl Riaz vd., ABTS yöntemini uygulayarak aynı bitkinin meyvelerinden izole edilen paeonin C' nin lipoksijenaza karşı güçlü bir inhibitör potansiyel sergilediğini bildirmiştir.

Lee vd., (2005) *P. lactiflora*' nın ana bileşenlerinden olan gallik asit ve gallisinin DPPH radikal oluşumuna karşı önemli bir serbest radikal süpürme sergilediklerini ve lipid peroksidasyon, üzerinde inhibe edici bir etkiye sahipti olduklarını bildirmişlerdir (Wu vd.,2010).

Yoshikawa vd., (2000) *P. Suffruticosa*, *P. Obovata*, *P. Suffruticosa*, *P. Albiflora*, *P. Lactiflora* gibi bitkilerin yapısında bulunan galloylpaeoniflorin, galloyloxypaeoniflorin ve suffruticosides A bileşiklerinin DPPH üzerinde atocopherole göre daha güçlü radikal süpürücü etki gösterdiğini, oxypaeoniflorin ise zayıf bir radikal süpürücü etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Çalışmalarında ayrıca bu antioksidatif glikozitlerin, sudaki çözünürlüklerini fazla olması sebebiyle doğal antioksidanlar olarak kullanılabileceğini yer almaktadır.

Demir, (2019) *Paeonia daurica* subsp. *macrophylla*' nın farklı kısımlarından elde edilen özütlerin bakteri ve viral DNA polimerazları üzerinde inhibisyon etki gösterdiğini bildirmiştir. Çalışmasında GC-MS yöntemi kullanan Demir, *Paeonia daurica*' nın taze kök, gövde, meyve ve meyve kabuğunun SPME ve hidrodistilasyon ile elde edilmiş uçucu yağların yapısında salisilaldehit, miritalanal, palmitik asit, metil salisilat ve miritenal olduğunu belirtmiştir.

Koyunoğlu, (2008) *Paeonia mascula* subsp. *arietina* 'nın köklerindeki monoterpen yapıları bileşiklerinin analizini yapmıştır. HPLC yönteminin kullanıldığı çalışmasında paeoniflorin ve oksipaeoniflorin izole edildiğini bildirmiştir.

İnceçayır, (2018) *Paeonia peregrina* L. bitkisinin yaprak, dal ve kök kısımlarının farklı suşlar üzerindeki antibakteriyel etkisi üzerine yaptığı çalışmasında bitkinin yaprak ekstraktlarının *S. aureus* bakterileri üzerinde yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiği bildirmiştir.

Tunç vd., (2019) *Paeonia peregrina*, *Paeonia mascula* subsp. *mascula* ve *Paeonia tenuifolia*’nın antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi çalışmalarında *Paeonia* türlerinin yaprak ekstraktlarında en iyi çözücünün aseton olduğu ve *Paeonia peregrina*’nın aseton ile hazırlanan özütünün *S. aureus* bakterisi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiğini bildirmişlerdir.

Mammadova, (2018) *Paeonia mascula* (L.) Mill. subsp. *mascula* bitkisinin yaprak, dal ve kök, *Paeonia tenuifolia* L. bitkisinin yaprak ve dallarından hazırlanan özütlerin farklı suşlar üzerindeki antibakteriyel etkilerini araştırmıştır. Hazırladığı özütlerin patojen *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Staphylococcus epidermidis* bakterileri üzerinde yüksek oranda antibakteriyel etki gösterdiğini bildirmiştir.

Şahin, (2007) Türkiye’nin çeşitli bölgelerinden toplanan *Paeonia mascula* subsp. *arietina*, *Paeonia kesrouanensis*, *Paeonia peregrina* bitkilerinin belirlenen suşlar üzerindeki antibakteriyel aktiviteleri araştırmasında, *P. mascula* subsp. *arietina*’nın incelenen bitkiler arasında en yüksek antibakteriyel etkiye sahip olduğunu bildirmiştir.

Dünya genelindeki *Paeonia* türleriyle ilgili etnobotanik çalışmalara bakıldığında özellikle Uzak Doğu ülkelerinde bu türün tıbbi kullanımının daha yaygın olduğu görülmektedir. Uzak Doğu ülkelerinde *Paeonia* türünün ağaç formları yetişmektedir. Ülkemizde sadece otsu formlarının yetiştiği *Paeonia* türlerinin kullanılışı da yapılan etnobotanik çalışmalarda kayıt altına alınmıştır (Ünlü, 2010).

Sivas yöresinde şakayık bitkisinin bronsit ve boğmaca tedavisinde yararlanıldığına rastlanmıştır. *Paeonia* türlerinin toprak altı kısımlarıyla hazırlanan infüzyonlar boğmaca ve epilepside yatıştırıcı olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Koyunoğlu, 2008).

Baytopi (1999) “Türkiye’de Bitkiler İle Tedavi” isimli yayınladığı kitabında Şakayık köklerinin yatıştırıcı ve kabız önleyici özelliklere sahip olduğunu, sara nöbetleri ve öksürüğe karşı yatıştırıcı olarak kullanıldığını belirtmiştir. İçeriğinde tanen, uçucu yağ, alkoloit ve paeonol bulunan *Paeonia* infüzyonunun günde 2-3 bardak içilmesi şeklinde kullanılması kitapda yer alır (Ünlü, 2010).

Everest ve Öztürk (2005) *P. Mascula* (L.) Miller (Şakayık, ayıgülü, dedegülü) türünün çiçek ve toprak altı kısımlarının tanen ve uçucu yağlar içerdiği ve hepatoprotektif purgatif, kolagog, stomaşik, üriner sistem hastalıklarında, sarılık tedavisinde ve hemagog olarak dokoksiyon halinde ya da doğrudan uygulama şeklinde kullanıldığını yaptıkları çalışmada bildirmişlerdir (Ünlü, 2010).

Kargioğlu vd., (2008) Batı İç Anadolu bölgesinde kır lalesi olarak bilinen *P. mascula* (L.) Miller subsp. *mascula* türünün bahçelerde süs bitkisi olarak yetiştirildiğini bildirmişlerdir.

Bulut, (2008) *P. mascula* subsp. *arietina* alt türü ile yaptığı çalışmada bu bitkinin Çanakkale'nin Bayramiç yöresinde evlerde süs olarak kullanıldığını, tohumlarından da kolye gibi süs eşyası yapıldığını bildirmiştir.

Karaman ve Kocabaş, (2001) Kahramanmaraş ilinde *P. mascula* türünün halk arasında ayıgülü adıyla tanındığını ve bitki köklerinin epilepsi, sedatif ve öksürük tedavisinde kullanıldığını bildirmişlerdir.

Ugulu vd., (2009) İzmir yöresinde *P. mascula* (L.) Miller türünün köklerinin infüzyon halinde antispazmodik, öksürük, boğmaca, tuberkülozis, sedatif, antihemorajik, sara, boğaz ağrılarına karşı kullanıldığını bildirmişlerdir.

Yıldırım, (1994) *P. mascula* subsp. *arietina* türünün Munzur Dağlarında yöresel olarak "Guluç" olarak tanındığını ve yapraklarının pişirilip yendiğini bildirmiştir.

Doğan, (2008) *P. mascula* subsp. *arietina* türünün Tunceli ilinin Ovacık yöresinde yaygın olarak "Gülörç ve Gülhorç" isimleriyle tanındığını, toprak üstü kısımlarından hazırlanan infüzyonun aç karnına içilerek kan şekerini düşürmede kullanıldığı bildirmiştir.

Tanker vd., (2007) *P. peregrina* türünün halk arasında infüzyon halinde sara ve boğmacada yatıştırıcı olarak kullanıldığını, ayrıca köklerinin *Radix Paeoniae*, peonol isimli heterozit taşıdığını bildirmişlerdir.

Fakir vd., (2009) *P. mascula* subsp. *mascula* türünün köklerinin infüzyon halinde sakinleştirici, yatıştırıcı, antitussif ve epilepside kullanıldığını bildirmişlerdir.

Şimşek vd., (2004) *P. mascula* subsp. *arietina* türünün soğuk suyun içinde 7-8 saat bekletilerek acılığı giderildikten sonra yağ ve yumurtayla kavrulup gıda olarak tüketildiğini bildirmişlerdir.

Ünlü, (2010) Türkiye’de doğal olarak yetişen *Paeonia* taksonları üzerinde anatomik çalışmalar yaparak taksonlar arasındaki yakınlık dereceleri saptanmaya çalışmıştır.

Önal vd., (2014) Şakayık Bitkisinin (*Paeonia Masculula*) Bazı Ekstrem Yetiştirme Ortamı Özellikleri adlı çalışmalarında Erzurum’da Şakayıkın (*Paeonia mascula*), erozyon riskinin az olduğu "Kestane Rengi Orman Toprakları" üzerinde yetiştiğini ve bu toprakların kum oranının fazla olduğunu bildirmişlerdir.



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Çalışma kullanılan kimyasal maddeler Tablo 10' da gösterilmiştir.

Tablo 10. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler

Adı	Formül	Satın Alınan Yer
DPPH (2,2-difenil-1 pikrilhidrazil)	$C_{18}H_{12}N_5O_6$	Sigma Aldrich
ABTS (2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik acid) diamonyum tuz)	$C_{18}H_{24}N_6O_6S_4$	Sigma Aldrich
Gallik asit	$C_6H_2(OH)_3CO_2H$	Sigma Aldrich
Kuersetin	$C_{15}H_{10}O_7$	Sigma Aldrich
Askorbik asit	$C_6H_8O_6$	Sigma Aldrich
Potasyum persülfat	$K_2S_2O_8$	Sigma Aldrich
Gliserol	$C_3H_8O_3$	Sigma Aldrich
EDTA (Etilen Diamin Tetraasetik Asit)	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	Sigma Aldrich
Bütanol	C_4H_9OH	Sigma Aldrich
Poliakrilamit	$(C_3H_5NO)_n$	Sigma Aldrich
Asetik asit (AA) (HPLC saflıkta)	CH_3COOH	Sigma Aldrich
Asetonitril (ACN) (HPLC saflıkta)	CH_3CN	Sigma Aldrich
Metanol (HPLC saflıkta)	CH_3OH	Sigma Aldrich
Sodyum karbonat	Na_2CO_3	Sigma Aldrich
Formamit	CH_3NO	Sigma Aldrich
SDS (sodyum dodesil sülfat)	$NaC_{12}H_{25}SO_4$	Sigma Aldrich
Magnezyum klorür	$MgCl_2$	Sigma Aldrich
Ksilen siyanol	$C_{25}H_{27}N_2NaO_6S_2$	Sigma Aldrich
Bromofenol mavisi	$C_{19}H_{10}Br_4O_5S$	Sigma Aldrich
Sodyum hidroksit	$NaOH$	Sigma Aldrich
Potasyum klorür	KCl	Merck
Potasyum asetat	CH_3CO_2K	Merck
Dötero metanol (HPLC saflıkta)	CH_3OH	Merck
Hekzan (HPLC saflıkta)	C_6H_{14}	Merck
Etilasetat (HPLC saflıkta)	$C_4H_8O_2$	Merck
Dietil eter (HPLC saflıkta)	$(C_2H_5)_2O$	Merck
Troloks (HPLC saflıkta)	$C_{14}H_{18}O_4$	Merck

Tablo 10 (devamı). Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler

Askorbik asit (HPLC saflıkta)	C ₆ H ₈ O ₆	Merck
Tris (trisaminometan)(HPLC saflıkta)	C ₄ H ₁₁ NO ₃	Merck
Etanol, (HPLC saflıkta)	C ₂ H ₅ OH	Merck
Folin ciocalteu reaktifi (HPLC saflıkta)	-	Merck
Sefadex LH-20 kolon	-	Merck

2.2. Kullanılan Gereçler

Çalışmada kullanılan gereçler Tablo 11’ de gösterilmiştir.

Tablo 11. Tez çalışmasında kullanılan gereçler

Adı	Kullanılma Nedeni	Marka
Analitik terazi	Kimyasal madde ve bitki örneklerini tartmak	Precisa
Öğütücü	Örnekleri parçalamak	Waring blender
Isıtıcı çalkalayıcı	Ekstraksiyonu gerçekleştirmek	Heidolph
Su banyosu	Numunelerin çözünmesi sağlamak	Bandelin Sonorex
Santrifüj	Çöktürme işlemi yapmak	Hettich
Etüv	Kurutma işlemleri yapmak	Nuve FN 400
Vorteks	Çözeltileri karıştırmak	Velp Scientifica
Su destile sistemi	Ultra saf su temin etmek	Sartorius Stedim Biotech Arium 61316 Pro-UV
pH metre	pH ayarlamak	VWR Phenomenal
Evaporatör	Ekstraksiyon sonrası çözücüyü uzaklaştırmak	Heidolph
Spektrofotometre	Absorbans ölçmek	Thermo Scientific Multiskan Go

2.3. *Paeonia mascula* subsp. *mascula* Bitkisinin Toplanması

Çalışmada kullanılan *Paeonia mascula* subsp. *mascula* alt türleri Osmaniye-Amanos, Afyon-Dereçine, Konya-Doğanhisar ve Çanakkale-Tombaklık’ ta toplandı. Bitkiler Doğu Akdeniz Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden Prof. Dr. Fatma Neriman Özhatay tarafından tanımlandı. Bu tezde bu bitki örneklerinin kökleri kullanıldı ve Osmaniye’den toplanan örnek PmO, Afyon’dan toplanan PmA, Konya’dan toplanan PmK ve Çanakkale’den toplanan PmÇ olarak kısaca adlandırıldı.

2.4. Ekstraksiyon

Toplanan bitkiler ekstraksiyon işlemine kadar tazeliklerini muhafaza etmek için - 20 °C’de bekletildi. Bitkilerin kök kısımları sıvı azotla kurutularak karıştırıcı ile ayrı ayrı toz haline getirildi. Toz haline getirilen köklerden 3’er gram alındı. Üzerlerine 5 kez 5 mL metanol eklendi ve 1 dk vortex, 10 dk. ultrasonik banyoda karıştırdıktan sonra 40 °C’de çalkalayıcıda 344 rpm de 20 dk çalkalandı. Her defasında ekstraktlar 10 dakika boyunca 4900 rpm’de santrifüjlendi ve süpernatantlar balonda topladı. Supernatantlar evaporatörde 40 °C’de 5 mL nin altında hacme kadar buharlaştırıldı ve mezürde 5 mL hacme metanol ile tamamlandı. Ekstraktın 2,1 mL si tüm analizler için küçük kısımlar halinde alıgotlandı ve analiz gününe kadar derin dondurucuda saklandı. Kalan 2,9 mL si ise tamamen kurutulup ekstrakt konsantrasyonları ve ekstraksiyon verimleri hesaplandı (Tablo 14).

2.5. Bitki Ekstraktlarında Sekonder Bileşiklerin HPLC-DAD Analizleri

2.5.1. HPLC-DAD Koşulları

Kromatografik analizler, bir Ultimate 3000 DAD detektör ile bağlantılı Ultimate 3000 HPLC sistemi kullanılarak yapıldı (Thermo scientific, Germering, Germany). Fenolik bileşenlerin standartlarının ayrımı için geleneksel olarak ters faz C18 kolon kullanılmaktadır ancak bu çalışmadan geniş bir yelpazede ve çok sayıda fenolik bileşik kullanılarak bir HPLC ayırma yöntemi geliştirilmek istendi. Bu yüzden C18 ile istenen ayırım elde edilemedi ve ilk defa C30 kolon iyi ayırım bu proje kapsamında geliştirildi. Macherey Nagel (3mm id) gard kolonu ile birlikte Thermo acclaim C30 kolonu (150mm×3mm id×3µm 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 ve enjeksiyon hacmi 10 µL idi. Kolon sıcaklığı 25°C idi. Kromatogramlar, 200-400 nm’de çalışan diyot dizi dedektörü ile 254, 280, 315 ve 370 nm’de işlendi.

2.5.2. Standartlar, Validasyon ve Kalibrasyon

HPLC-DAD analiz yönteminin kalibrasyonu ve validasyonu için aşağıdaki 32 fenolik standart kullanıldı: Gallik asit, protokatekuik asit, gentisik asit, p-OH benzoik asit, vanilik asit, kateşin, klorojenik asit, kafeik asit, sirincik asit, vanilin, epigallokateşin gallat (EGCG), epikateşin, p-kumarik asit, ferulik asit, kikorik asit, rutin, luteolin-7-glukozit, ellacik asit, naringin, hesperidin, apigenin-7-glukozit, rosmarinik asit, miricetin, fisetin, resveratrol, eriodiktyol, luteolin, kuersetin, naringenin, hesperetin, apigenin ve kamferol. Bunlar stok çözeltilerinden 25; 10; 5; 1,25; 0,625 ve 0,3125 mg.L⁻¹ derişimlerinde 7 farklı noktadan pik alanları kullanılarak kalibrasyon eğrileri elde edildi ve regresyon katsayıları en az 0,999 bulundu. HPLC-DAD yöntemi ile 32 standart fenolik bileşğin ayrılması ve kantitatif analizi neredeyse imkansızdı. Bu nedenle iki gruba ayrıldılar. 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 birlikte analiz edilerek kuersetin grubu olarak kodlandı. Protokatekuik, gentisik, vanillik, kafeik, ferulik ve rosmarinik asit, kateşin, EGCG, vanilin, luteolin-7-glukozit, hesperidin, fisetin, luteolin, naringenin, hesperetin ve kaempferol birlikte analiz edilerek luteolin grubu olarak kodlandı. Yöntemin duyarlılığı kalitatif (LOD) ve kantitatif (LOQ) tayin sınırları ile belirlendi. Bunun için 0,625 mg. L⁻¹ derişimlerdeki iki ayrı karışımın 7 tekrarlı olarak yapılan analizleri 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.

2.6. Toplam Antioksidan Bileşiklerin Belirlenmesi

2.6.1. Toplam Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi

Çalışmada toplam fenolik bileşik belirleme tayini Singleton ve ark. (1999)'na göre yapıldı ve standart olarak gallik asit ve kuersetin kullanıldı. Öncelikle 20 µL farklı

seyreltmelerdeki standart (0,5- 0,0078 mg/mL) veya numuneler 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 ardından absorbans değerleri spektrofotometrede 760 nm dalga boyunda tanık çözeltiye karşı okundu. Elde edilen veriler Tablo 14' te gösterildi.

2.6.2. DPPH Radikal Temizleme Aktivitesinin Belirlenmesi

Farklı seyreltmelerdeki numune ve standart olarak E vitamininin suda çözünür bir türevi olan troloks ((±)-6-Hidroksi 2,5,7,8- tetrametillkroman-2-karboksilik asit), antioksidan bileşiği kullanılarak ekstraktların DPPH• (2,2-Difenilpikrilhidrazil) serbest radikale karşı radikal temizleme aktivitesi belirlendi. Yöntemde 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 çözücüsü ile numune karıştırılarak ekstraktan ya da troloksdan ileri gelen rengin şiddeti o noktadaki absorpsiyon değerinden çıkarıldı. Troloks' un DPPH• radikale karşı 750µg/mL ile 15,63 µg/mL arasında 1:1 seyreltme ile elde edilen 7 konsantrasyon noktası kullanılarak radikal temizleme aktivitesi tespit edildi. Sonuçlar DPPH• radikalinin başlangıç derişimini yarıya düşüren ekstrakt konsantrasyonu cinsinden (SC₅₀) Tablo 14' te sunuldu.

2.6.3. ABTS Radikal Temizleme Aktivitesinin Belirlenmesi

ABTS radikal temizleme aktivitesinin belirlenmesi Re vd.'ye göre yapıldı. 0.1 M, pH 7.4 olan 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 (K₂S₂O₈) oda sıcaklığında 16 saat karıştırıcıda karıştırıldı ve ABTS radikali üretildi. 1950 µl ABTS çözeltisi ile 50 µL ekstrakt ya da Troloks standardı reaksiyona tabi tutuldu. Ekstraktlar üstel azalan radikal miktarının en uygun tespit edileceği aralığa denk gelen konsantrasyon aralıklarına seyreltilerek çalışıldı. Troloksun 500 µg/mL ile 13,00 µg/mL aralığında hazırlanan 7 konsantrasyondaki çözeltileri kullanıldı. Radikal ile standardın ya da ekstraktların reaksiyon süresi karanlık ortamda 30 dakikaydı. Reaksiyon ürünlerinin absorbans değerleri 734 nm' de okundu. Elde edile veriler Tablo 14' te verildi.

2.6.4. Toplam Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi

Toplam flavonoid içeriğini belirlemek için standart olarak kuersetin kullanıldı ve 50 µL farklı seyreltmelerdeki standart (0,5 - 0,00195 mg/mL) veya metanolik özütlerin üzerine 20 µL $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, 20 µL $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ve 860 µL % 40 metanol eklenerek karıştırıldı. Karanlık ortamda 40 dakika bekletilerek spektrofotometrede 415 nm' de ölçüm yapıldı. Elde edilen veriler Tablo 14' te gösterilmiştir.

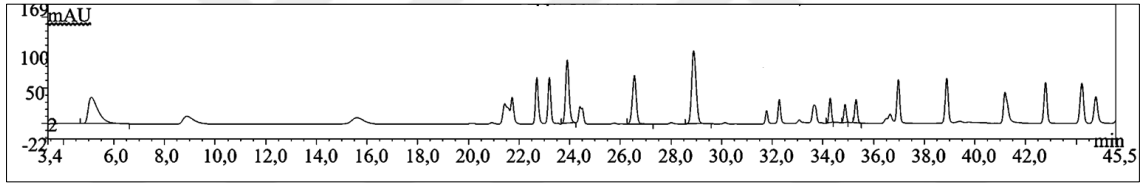
2.6.5. FRAP (Demir (III) İndirgeyici Antioksidan Aktivite)

Bu tayinde standart olarak kullanılan Troloks kalibrasyon grafiği elde etmek üzere seyreltilerek 6 farklı konsantrasyonda (200 – 6,25 µg/mL) çalışıldı. Asetat tamponu (pH= 3,6) içerisinde 0,83 mM TPTZ ve 1,67 mM FeCl_3 (susuz) içeren FRAP reaktifi taze olarak hazırlandı ve spektrofotometrede dalga boyu 595 nm'ye ayarlandı. 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 metanollü saf su (1,95 mL); reaktif körü tüplerine ise numune yerine 100'er µL çözücüsü (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 aktarılmış ve absorbans 595 nm'de okundu. Sonuçlar, 100 gram kökteki mg troloks eşdeğeri cinsinden (mg TE/100 g kök) Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) olarak değerlendirildi.

3.BULGULAR

3.1. Fenolik Bileşiklerin Analizi için HPLC-DAD Metot Optimizasyonu

Thermo acclaim C30 kolonu (150mm×3mm id×3µm pd) kolonu ile optimize edilmiş HPLC-DAD yöntemi, 60 dakikada 32 sekonder metabolit standardının ayrılması için uygundu. Yöntem seçicilik, duyarlılık, kesinlik ve doğrusallık açısından değerlendirildi. LOD ve LOQ değerleri, metanolik Paeonia ekstraktlarındaki fenolik bileşikler analiz etmek için yeterince düşüktü. Standartların kalibrasyon eğrileri, kuersetin ve luteolin grubu için sırasıyla 0,078-25 mg. L⁻¹ aralığında en az 0.99 R² değerleri ile doğrulandı Standart olarak kullanılan fenolik bileşiklerin 280 nm'deki kromatogramı şekil 12'de, validasyon ve kalibrasyon parametreleri ise Tablo 12'de gösterilmiştir.



Şekil 12. Standart bileşiklerin 280 nm' deki kromatogramı

Tablo 12. Standart sekonder bileşiklerin 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
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
4	15,56	p-OH benzoik asit ²	3,62	0,04	1,000	0,47	3,46	0,07	0,22
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
7	21,83	Klorogenik asit ²	1,86	-0,08	1,000	0,26	4,05	0,07	0,25
8	22,82	Kafeik asit ¹	3,16	0,44	0,999	0,18	0,55	0,01	0,04
9	23,27	Sirincik asit ²	1,75	-0,00	1,000	0,19	3,97	0,07	0,25

Tablo 12 (devamı). Standart sekonder bileşiklerin HPLC-DAD analizinde validasyon ve kalibrasyon parametreleri

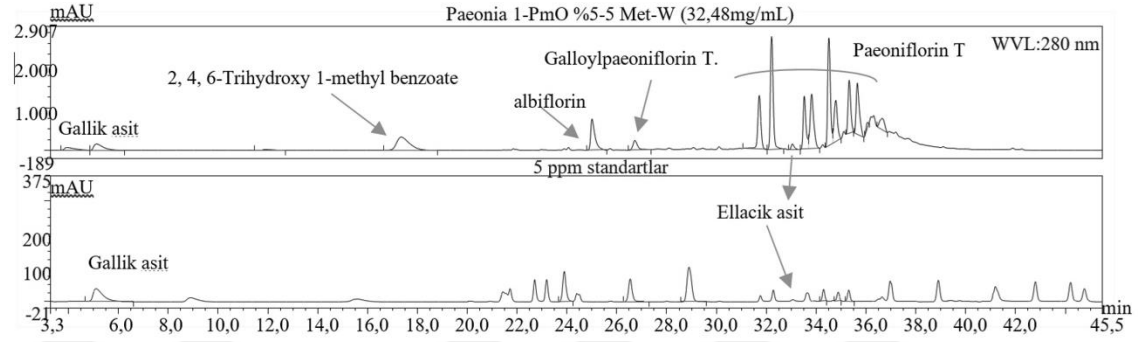
Sıra	RT	Bileşikler	Eğim	Kesim noktası	R ²	BSS% (RT)	BSS% (alan)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
10	24,01	Vanilin ¹	2,66	0,48	0,999	0,25	1,68	0,03	0,11
11	24,53	EGCG ¹	0,80	-0,42	1,000	0,52	3,59	0,03	0,11
12	24,57	Epicateşin ²	0,43	-0,01	1,000	0,06	3,16	0,06	0,20
13	26,61	p-kumarik asit ²	4,35	0,09	1,000	0,12	3,09	0,06	0,19
14	28,90	Ferulik asit ¹	3,47	0,59	0,999	0,90	1,12	0,02	0,07
15	29,10	Kikorik 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
17	32,37	Luteolin-7-glukozit ¹	1,49	0,08	1,000	0,93	2,35	0,05	0,15
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
20	34,39	Hesperidin ¹	0,68	0,47	0,999	0,85	1,42	0,04	0,14
21	34,85	Apigenin-7-glukozit ²	0,96	-0,04	1,000	0,29	3,17	0,06	0,19
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
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	Eriodiktöl ²	1,96	-0,03	1,000	0,25	3,46	0,06	0,21
27	41,37	Luteolin ¹	2,20	0,12	1,000	0,78	5,48	0,11	0,37
28	41,39	Kuersetin ²	2,40	-0,48	0,998	0,24	6,02	0,07	0,24
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
31	44,87	Apigenin ²	1,87	-0,01	1,000	0,24	5,54	0,10	0,33
32	45,99	Kamferol ¹	1,95	-0,01	1,000	0,92	14,50	0,23	0,75

¹: Luteolin grubu, ²: Kuersetin grubu.

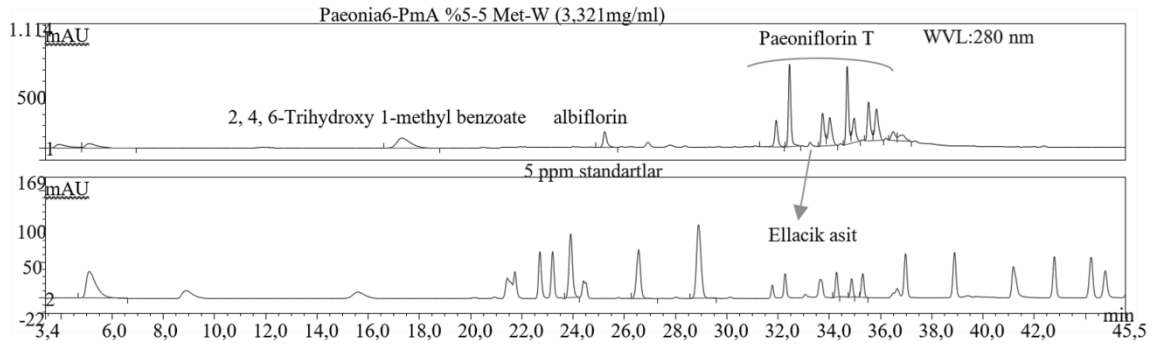
3.2. Fenolik Bileşiklerin HPLC-DAD Analizleri

Piklerin tanımlanması ve miktar tayini, standart fenolik bileşiklerinkilerle alıkonma süreleri ve UV spektrumlarının karşılaştırılmasıyla gerçekleştirildi. Standartlardan farklı alıkonma süreleri ile bazı pikler, bazı standartlarla aynı veya çok benzer UV spektrumlarına sahipti. Bunlar benzer UV spektrumlu standartların türevleri olarak tanımlandılar ve bu standardın eşdeğeri olarak miktarları rapor edildi. Monoterpen glikozitlerin standardı mevcut olmadığı için bu bileşiklerin miktarları gallik asit eşdeğeri

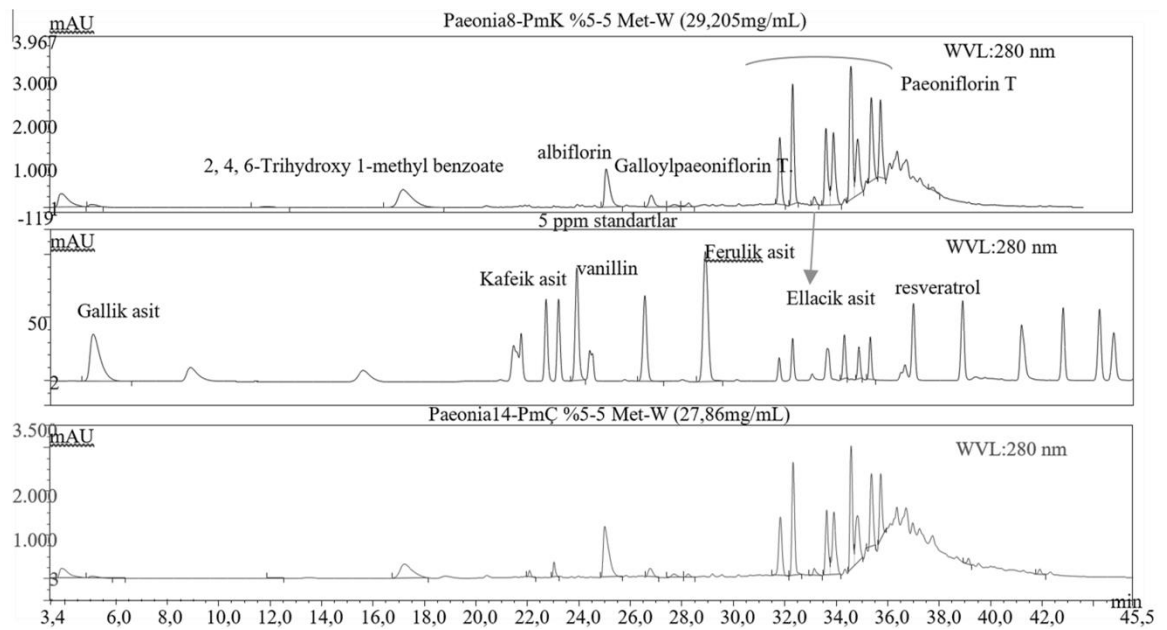
olarak hesaplandı. Osmaniye (PmO), Afyon (PmA), Konya (PmK) ve Çanakkale (PmÇ) bölgelerinden temin edilen *Paeonia mascula* subsp. *mascula* kök ekstraktlarında HPLC-DAD ile tespit edilen seconder bileşiklerin kromatogramları şekil 13-16’da, miktarları da Tablo 13’ de gösterilmiştir.



Şekil 13. PmO’ deki seconder bileşiklerin kromatogramı



Şekil 14. PmA’ daki seconder bileşiklerin kromatogramı



Şekil 15. PmK ve PmÇ ‘deki sekonder bileşiklerin kromatogramı

Tablo 13. Paeonia kök ekstraktlarında HPLC-DAD ile tespit edilen sekonder bileşikler

RT	UV (λ _{max})	Bileşiğin Adı	PmO	PmA	PmK	PmÇ	Kaynak
			mg/ 100g kök	mg/ 100g kök	mg/ 100g kök	mg/ 100g kök	
3.89	272-226	Paeoniflorin T.	0,00	0,00	0,00	10,06	
5.07	272-226	Gallik asit	5,82	12,22	1,50	1,48	
11.80	276-227	Gallik asit T.	0,76	1,73	0,74	0,00	
17.13	272-226	2,4,6-Trihidroksi- metil benzoat	16,66	28,40	23,37	1,42	Demir vd., 2019
21.77	317-294- 235	Kaffeik asit T.	0,00	0,00	0,00	0,08	
23.04	264-294- 225	Vanilik asit T.	0,00	0,00	0,00	4,59	
25.04	241-275	Albiflorin	18,47	23,27	24,77	35,03	Lee vd., 2009
26.78	281-226	Galloylpaeoniflorin T.	4,08	5,50	5,38	3,61	
26.79	254-361	Ellajik Asit T.	0,00	0,00	0,00	3,46	
27.66	231-275	Paeoniflorin	0,00	0,00	0,00	1,69	Lee vd., 2009
28.84	256-326	Benzoilmudanpioside T.	16,87	19,16	26,17	17,24	Li vd., 2018
31.78	274-229	Paeoniflorin T.	16,21	20,05	19,04	17,04	
32.28	285-230	Paeoniflorin T.	30,70	37,34	30,04	28,25	
33.10	254-367- 220	Ellajik Asit	8,26	19,95	12,50	10,95	
33.58	280-230	Paeoniflorin T.	14,10	25,44	19,88	17,24	
33.87	280-230	Paeoniflorin T.	17,76	27,34	23,63	19,45	
34.54	283-230	Paeoniflorin T.	27,17	33,97	34,32	29,19	
34.82	280-230	Paeoniflorin T.	16,62	15,68	20,36	17,63	
35.34	279-230	Paeoniflorin T.	13,85	34,07	23,74	19,03	
35.71	280-230	Paeoniflorin T.	14,67	25,70	20,47	15,59	

3.3. Toplam Antioksidan Bileşiklerin Tayini ve Aktivitesi

Paeonia mascula subsp. *mascula* alt türleri ile yapılan çalışma sonucunda genel olarak bitkinin köklerinde flavonoidlerin düşük olduğu tespit edildi ve en yüksek flavonoid içeriği Osmaniye’den toplanan örnekte 29,0 mg KE /100g kök olarak belirlendi. Örneklerin toplam fenol madde içerikleri ise yüksek bulundu en yüksek toplam fenol miktarı Çanakkale örneğinde 1077,0 mg GAE /100g kök olarak belirlendi. Demir (III) indirgeyici antioksidan aktivite (FRAP) aktivitesi Afyon ve Çanakkale örneklerinde 2210,3 ve 2121,7 mg TE /100g kök en yüksek bulundu. Öte yandan DPPH radikal temizleme aktivitesi açısından en düşük SC₅₀ değeri Afyon örneğinde 255,9 µg/mL tespit edildi. ABTS radikaline karşı Çanakkale örneği 115,1 µg/mL SC₅₀ değeri ile kullanılan antioksidan standardı Troloksun değerine (91,9 µg/mL) yakın bir değer gösterdi. Toplam fenolik madde sonuçlarının gallik asit ve kuersetin eşdeğerinden hesaplanan değerleri arasında yüksek korelasyon (0,99) gözlenmiştir. DPPH ve ABST arasında orta şiddette korelasyon olduğu (0,56) tespit edildi. FRAP ile DPPH arasında (-0,71) ve FRAP ile ABTS arasında (-0,79) negatif yönde yüksek korelasyon olduğu saptanmıştır (Tablo 14)

Tablo 14. *Paeonia* Kök Ekstraktlarının Antioksidan Aktiviteleri

Ekstrakt ve standart	PmO	PmA	PmK	PmÇ	Troloks
Ekstrakt Verimi (g/100g kök)	10,83	8,86	9,74	9,29	
Toplam Flavonoid (KE) mg /100g kök	29,0± 4,0	21,8± 0,8	16,7± 2,6	19,9± 2,3	
Toplam Fenol (KE) mg /100g kök	649,6± 38,4	818,1± 54,6	646,5± 38,9	848,7± 51,9	
Toplam Fenol (GAE) mg /100g kök	809,1± 35,3	1070,1± 50,2	806,3± 35,7	1077,0± 47,7	
FRAP (TE) mg /100g kök	1891,5± 44,2	2210,3± 144,2	1718,3± 16,5	2121,7± 17,3	
DPPH RSA SC ₅₀ (µg/mL)	304,1± 2,5	255,9± 5,2	280,5± 3,6	258,5± 4,8	83,3± 4,0
ABTS RSA SC ₅₀ (µg/mL)	260,1± 8,5	221,8±2,3	339,8±11,9	115,1± 10,7	91,9± 3,0

4.TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitkiler sağlık, kozmetik ve gıda gibi birçok alanda farklı amaçlar için kullanılır. Bitkilerin hangi amaç için kullanılacağı genellikle gösterdikleri biyolojik aktivite ve içerdikleri sekonder moleküller açısından değerlendirilir. Bu tez kapsamında Osmaniye-Amanos (PmO), Afyon-Dereçine (PmA), Konya-Doğanhisar (PmK) ve Çanakkale-Tombaklık' tan (PmÇ) toplanan *Paeonia mascula* subsp. *mascula* alt türünün bazı biyolojik aktiviteleri ve HPLC-DAD analizi ile sekonder bileşikleri araştırıldı.

Paeonia cinsi için karakteristik monoterpen glikozid olan Paeoniflorinin (Bkz Şekil 6) *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).

Çalışmada Çanakkale-Tombaklık'tan toplanan örnekte Paeoniflorinin derişimi 1,69 mg/100g kök olarak ölçüldü. Diğer örneklerde ise Paeoniflorinin ölçülemeyecek kadar az miktarda bulunduğu söylenebilir (Bkz Tablo 14). Ancak standardı olmadığı için pek çok monoterpen glikozit türevi bileşikler tam olarak aydınlatılamadı. Kullanılan HPLC-DAD yöntemi sayesinde kromatogramdaki her pikin UV spektroskopisi elde edilmektedir ve bu spektroskopik 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.

Bu çalışmadaki bitki köklerinde karakterize edilen Albiflorin T. ve galloylpaeoniflorin T. *Paeonia suffruticosa*, *Paeonia Obovata*, *Paeonia alba*, *Paeonia albifloravar* türlerinde de yer alan monoterpen glikozitlerdir (Wu vd., 2010). Galloilpaeoniflorin T. derişimi en fazla PmA' da en az ise PmÇ'de ölçüldü. Albiflorin derişimi ise sırayla PmÇ> PmK> PmA> PmO şeklindeydi.

PmO ve PmA örneklerinin sekonder bileşik analizinde alıkonma zamanı (RT) 27,66 dakika ve maksimum dalga boyu 230 nm olan Paeoniflorin T. bileşiği derişimi en fazla (30,70 mg/100gkök) olan sekonder bileşik olarak belirlendi. PmK numunesinde derişimi en fazla olan sekonder bileşik alıkonma zamanı 34,54 dakika ve maksimum

dalga boyu 230 nm olan Paeoniflorin T., PmÇ numunesinde ise albiflorin T. olarak belirlendi.

Polifenol yapıdaki ellagic acid derişimi en fazla (19,16 mg/100gkök) PmA örneğinde, en az ise PmO örneğinde (8,26 mg/100gkök) ölçüldü. Fenolik asit sınıfında yer alan gallik asit ve gallik asit T. derişimi en fazla PmA örneğinde (sırasıyla 12,22 ve 1073 mg/100g kök) ölçüldü. Tüm numunelerdeki gallik asit derişiminin alıkonma zamanı 11,8 dakika ve maksimum dalga boyu 227 nm olan gallikmasit T.' den daha fazla olduğu belirlendi.

Benzoik asidin türevi olan 2,4,6 trihidroksi-1-metil benzoat en fazla PmA örneğinde, en az ise PmÇ örneğinde ölçüldü. Demir 2019' da Türkiyede yetişen *Paeonia daurica*' nın metanol ekstratından 2,4,6 trihidroksi-1-metil benzoatı saflaştırdığı bildirmişti.

Paeonia mascula'nın kök kısımlarının metanol özütleri toplam fenolik içerik ve radikal süpürme aktivitesi açısından spektrofotometrik tayinlerle incelendi. Özütlerin toplam fenolik içerikleri gallik asit ve kuersetin standartlarına eşdeğer olarak hesaplandı. Tablo 15' e göre özütlerin toplam fenolik bileşik miktarları hem gallik asit hem de kuersetin cinsinden sıralaması sırasıyla PmÇ> PmA> PmO> PmK şeklindeydi.

Kuersetin eşdeğeri cinsinden toplam flavonoid bileşik miktarı sıralaması özütlerde sırasıyla PmO> PmA > PmÇ > PmK olduğu görüldü. Tüm özütler içinde PmK' nin en düşük fenol ve flavonoid içeriğine sahip olduğu söylenebilir.

Elde edilen sonuçlar literatürdeki diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Orhan ve vd. 2010 yılında yaptığı çalışmada Gümüşhane ve Afyon'dan toplanan *Paeonia mascula* subsp. *mascula* türlerinden hem içerdikleri toplam fenolik madde miktarı açısından hem de DPPH radikal süpürme kapasitesi bakımından en yüksek değer Gümüşhane'den toplanan örnekte olduğu bildirilmişti. Bu çalışmada ise toplam özütlerin arasında DPPH radikal süpürme kapasitesitesi en yüksek özütün PmA yani Afyon'dan toplanan özüt olduğu gözlemlendi. Demir 2019 yılında yaptığı çalışmada *Paeonia daurica* Andrews subsp. *macrophylla* bitkisinin kök kısmının yüksek DPPH radikal temizleme kapasitesine sahip olduğunu bildirmiştir.

5.ÖNERİLER

Türkiye’de dağılım gösteren *Paeonia* cinsinden 12 takson bulunmaktadır ancak literatür incelendiğinde bu alanda sadece belirli taksonlarda çalışmalar olduğu ancak ileri düzeyde araştırmaların yapılmadığı görülmektedir. Çevre kirliliğinin artması ve sentetik içerili gıdaların yaygınlaşması neticesinde günümüzde serbest radikaller önemli bir problem olmakta ve buna karşı alternatif tedavilere ve ek maddelere gittikçe ihtiyaç artmaktadır. Türkiye’de bitkisel destek olarak kullanılan *Paeonia* bitkisinin bu tez kapsamında belirlenen antioksidan özellikleri, köklerinin gıda tavsiyesi olarak kullanılabileceğini gösterdi. Bu bitkinin kökleri geleneksel olarak çeşitli hastalıkların tedavisi için doğrudan veya kaynatılarak kullanımı göz önüne alındığında çeşitli hastalıklara karşı potansiyellerini araştırmak için daha ileri çalışmalar gerçekleştirilmelidir. PmO, PmA, PmK ve PmÇ’nin HPLC-DAD sonuçlarından yola çıkılarak *Paeonia* köklerinin Paeoflorin, Benzoylmudanpioside türevleri gibi değerli monoterpen glikozitleri ve gallik asit, ellagik asit ve 2,4,6-Trihydroxy1-methyl benzoate gibi fenolik bileşiklerce zengin olduğu tespit edildi. Bu türevlerin neler olduğunun belirlenmesi için bu bileşenlerin özütten izole edilip saflaştırılmaları gerekmektedir. Saflaştırılıp yapıları NMR, IR ve MS gib spektroskopik yöntemlerle belirlenecek olan bileşenlerin biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi neticesinde bu köklerin ilaç aktif bileşenlerine kaynak olarak da kullanılabileceği belirlenebilir. Dahası bu bileşenlerden yola çıkılarak aktivitelerinin artırılması için aktif fonksiyonel gruplar eklenerek yeni ilaçların keşfedilmesi mümkün olabilir.

KAYNAKÇA

- Agostini-Costa, T. D. S., Vieira, R. F., Bizzo, H. R., Silveira, D., and Gimenes, M. A. (2012). Secondary Metabolites, Chromatography and Its Applications. InTech, London, 131-132.
- Alaca, F., Arslan, N. (2012). Sekonder metabolitlerin bitkiler açısından önemi. Ziraat Mühendisliği, (358), 48-55.
- Albayrak, S., Sağdıç, O., Aksoy, A. (2010). Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi, 26(4), 401-409.
- 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.
- Asan, H. S. Factors Affecting Growth of Callus Cultures Hypericum retusum AUCHER. In International Engineering, Science and Education Conference (INESEC) Science Proceeding Book (p. 283).
- Bakır, Ö. (2020). Sekonder Metabolitler ve Roller. Uluslararası Anadolu Ziraat Mühendisliği Bilimleri Dergisi, 2(4), 39-45.
- Bennett, J. W., Bentley, R. (1989). What's in a name? Microbial secondary metabolism. Advances in applied microbiology, 34, 1-28.
- Benjamin, S., Pradeep, S., Josh, M. S., Kumar, S., & Masai, E. (2015). A monograph on the remediation of hazardous phthalates. Journal of Hazardous Materials, 298, 58-72.
- Braca, A., Van Kiem, P., Yen, P. H., Nhiem, N. X., Quang, T. H., Cuong, N. X., & Van Minh, C. (2008). New monoterpene glycosides from Paeonia lactiflora. Fitoterapia, 79(2), 117-120.
- Briskin, D. P. (2000). Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. Plant physiology, 124(2), 507-514.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant science, 161(5), 839-851.
- Bulut, G.E. (2008). Bayramiç (Çanakkale) yöresinde etnobotanik araştırmalar. Doktora Tezi. Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye 1-25 s.
- Burcu, E. S. E. R., Dinçel, A. S. (2018). Kromatografiye Giriş, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Kullanımında Basit İpuçları. Journal of Health Services and

Education, 2(2), 51-57.

- Çinbilgel, İ. (2016). Şakayık, Ayıgülü. İbradı, İbradı Belediyesi. Tarih, Kültür, Sanat ve Edebiyat Dergisi, Sayı 3, 6-9.
- Chen, G. L., Chen, S. G., Xie, Y. Q., Chen, F., Zhao, Y. Y., Luo, C. X., Gao, Y. Q. (2015). Total phenolic, flavonoid and antioxidant activity of 23 edible flowers subjected to in vitro digestion. *Journal of Functional Foods*, 17, 243-259.
- Cheng, F., Lu, H. T., Jiang, Y. (2004). Purification of paeoniflorin from *Paeonia lactiflora* Pall. by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1040(2), 205-208.
- Costa, T. D. S. A., Vieira, R. F., Bizzo, H. R., Silveira, D., Gimenes, M. A. (2012). Secondary metabolites. Embrapa Agroindústria de Alimentos-Capítulo em livro científico (ALICE).
- Davis, P. H., Mil, R. R., Tan, K. (1998). *Flora of Turkey land the east Aegean islands*.
- Demir, A., Turumtay, H., Emirik, M., Sandalli, C., Kanbolat, Ş., Özgen, U., and Turumtay, E. A. (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(12), 2232-2245.
- Demir, T., Akpınar, Ö. (2020). Bitkilerde Bulunan Fitokimyasalların Biyolojik Aktiviteleri. *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji dergisi*, 8(8), 1734-1746.
- Demirboğa, G., Demirboğa, Y., Özbağ, N., 2021. Types of *Paeonia* and Their Use in Phytotherapy. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 11(1), 318-327.
- Dhawan, D., Gupta, J. (2017). Research article comparison of different solvents for phytochemical extraction potential from datura metel plant leaves. *Int J Biol Chem*, 11(1), 17-22.
- Dong, X. P., Xu, T. L. (2002). Radix paeoniae rubra suppression of sodium current in acutely dissociated rat hippocampal CA1 neurons. *Brain research*, 940(1-2), 1-9.
- Dong, H., Liu, Z., Song, F., Yu, Z., Li, H., Liu, S. (2007). Structural analysis of monoterpene glycosides extracted from *Paeonia lactiflora* Pall. using electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, 21(19), 3193-3199.
- 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, 1-34 s.

- Ersöz, T. (2012). Bitkisel ilaçlar ve gıda takviyeleri ile ilgili genel yaklaşım ve sorunlar. Meslek İçi Sürekli Eğitim Dergisi Türk Eczacıları Birliği Yayını, 27-28.
- Erkoyuncu, M. T., Yorgancılar, M. (2015). Bitki doku kültürü yöntemleri ile sekonder metabolitlerin üretimi. Selçuk Tarım Bilimleri Dergisi, 2(1), 66-76.
- Ertaş, A., Gören, A.C., Haşimi, N., Tolan, V., Kolak, U. 2015. Chemical Constituents of *Mentha longifolia* subsp. *noeana* with Antioxidant, Anticholinesterase and Antimicrobial Activities, Records of Natural Products, 9(1), 105-115.
- Faydaoğlu, E., Sürücüoğlu, M.S. (2011). Geçmisten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. Kastamonu University Journal of Forestry Faculty, 11 (1), 52-67.
- G'omez-Caravaca, A.M., G'omez-Romero, M., Arr'aez-Rom'an, D., Segura-Carretero, A., Fern'andez-Guti'errez, A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 41, 1220-1234.
- Guo, D., Ye, G., Guo, H. (2006). A new phenolic glycoside from *Paeonia lactiflora*. Fitoterapia, 77(7-8), 613-614.
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., Başer, K. H. C. (2000). Flora of Turkey and the east Aegean Islands. University of Edinburg Press, (11), 48-52.
- Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., Babaç, M. T. (2012). Türkiye Bitkileri Listesi. Damarlı Bitkiler, Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını, 262.
- Halliwel, B. (2007). Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? Cardiovascular research. 73(2), 341-347.
- Hayes, P. Y., Lehmann, R., Penman, K., Bone, K. M., Kitching, W., De Voss, J. J. (2006). RP-HPLC detection of a sulphiting-induced artefact from paeoniflorin in dried roots of *Paeonia lactiflora*. Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques, 17(4), 251-254.
- He, C., Peng, B., Dan, Y., Peng, Y., Xiao, P. (2014). Chemical taxonomy of tree peony species from China based on root cortex metabolic fingerprinting. Phytochemistry, 107, 69-79.
- Hijikata, Y., Yasuhara, A., Yoshida, Y., and Sento, S. (2006). Traditional Chinese medicine treatment of epilepsy. Journal of Alternative And Complementary Medicine, 12(7), 673-677
- Honda, S., Suzuki, K., Kataoka, M., Makino, A., Kakehi, K. (1990). Analysis of the components of *Paeonia radix* by capillary zone electrophoresis. Journal of Chromatography A, 515, 653-658.

- Ignat, I., Volf, I., Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food chemistry*, 126(4), 1821-1835.
- İşık, Ç. (2012). Orman gülü bitkisinin çiçeğinden organik bileşiklerin izolasyonu ve biyolojik aktivitelerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya, Türkiye, 2-20 s.
- Ivanova, A., Delcheva, I., Tsvetkova, I., Kujumgiev, A., Kostova, I. (2002). GC-MS analysis and anti-microbial activity of acidic fractions obtained from *Paeonia peregrina* and *Paeonia tenuifolia* roots. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57(7-8), 624-628.
- İnceçayır, D. (2018). *Paeonia peregrina* L., *Salix alba* L. ve *Salix babylonica* L. bitkilerinin antibakteriyel aktivitesinin araştırılması. , Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya, Türkiye, 4-18 s.
- Kacurakova, M., Capek, P., Sasinkova, V., Wellner, N., Ebringerova, A. (2000). FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate polymers*, 43(2), 195-203.
- Karaman, P. (2011). Bazı aromatik bitki türlerinin antimikrobiyal, antioksidan ve DNA koruyucu aktivitelerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas, Türkiye, 2-18 s.
- Karaman, S., Kocabas, Y. Z. (2001). Traditional medicinal plants of K. Maras (Turkey). *The Sciences*, 1(3), 125-128.
- Kamiya, K., Yoshioka, K., Saiki, Y., Ikuta, A., Satake, T. (1997). Triterpenoids and flavonoids from *Paeonia lactiflora*. *Phytochemistry*, 44(1), 141-144.
- Kargioğlu, M., Cenkci, S., Serteser, A., Konuk, M., Vural, G. (2010). Traditional uses of wild plants in the middle Aegean region of Turkey. *Human Ecology*, 38(3), 429-450.
- Kim, N., Park, K. R., Park, I. S., Park, Y. H. (2006). Application of novel HPLC method to the analysis of regional and seasonal variation of the active compounds in *Paeonia lactiflora*. *Food chemistry*, 96(3), 496-502.
- Kocaimamoğlu, F. (2014). *Sorbus caucasica* var. *yaltirikii* ve *sorbus aucuparia* meyvelerinin fenolik bileşiklerinin ekstraksiyonu ve hplc-uv analizleri. Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 1-16 s.
- Koo, Y. K., Kim, J. M., Koo, J. Y., Kang, S. S., Bae, K., Kim, Y. S., ... Yun-Choi, H. S. (2010). Platelet anti-aggregatory and blood anti-coagulant effects of compounds isolated from *Paeonia lactiflora* and *Paeonia suffruticosa*. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65(8), 624-628.
- Kostova, I. N., Simeonov, M. F., Todorova, D. I. (1998). A monoterpene glucoside from *Paeonia peregrina* roots. *Phytochemistry*, 47(7), 1303-1307.

- Koyunoğlu, S., (2008). *Paeonia* türleri İçerisindeki monoterpen glikozitlerinin yapı tayinleri ve kromatografik analizleri için yöntem geliştirilmesi. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 1-40 s.
- Lee, S. E., Hwang, H. J., Ha, J. S., Jeong, H. S., Kim, J. H. (2003). Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life sciences*, 73(2), 167-179.
- Lee, S. C., Kwon, Y. S., Son, K. H., Kim, H. P., Heo, M. Y. (2005). Antioxidative constituents from *Paeonia lactiflora*. *Archives of pharmacal research*, 28(7), 775-783.
- Mammadova, V., (2018). *Paeonia mascula* (l.) mill. subsp. *mascula* ve *Paeonia tenuifolia* l. bitkilerinin antibakteriyel aktivitesinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya, Türkiye, 1-24
- Marcucci, M. C., Woisky, R. G., Salatino, A. (1998). Use of aluminium chloride in the flavonoids quantification of propolis samples. *Mensagem doce*, 46, 3-9.
- Matsuda, H., Ohta, T., Kawaguchi, A., Yoshikawa, M. (2001). Bioactive constituents of chinese natural medicines. VI. Moutan cortex.(2): structures and radical scavenging effects of suffruticosides A, B, C, D, and E and galloyl-oxypaeoniflorin. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 49(1), 69-72.
- Merken, H. M., Beecher, G. R. (2000). Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(3), 577-599.
- Mishra, K., Ojha, H., Chaudhury, N. K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food chemistry*, 130(4), 1036-1043.
- Okan, O. T., Varlıbaş, H., Mehmet, Ö. Z., Deniz, İ. (2013). Antioksidan analiz yöntemleri ve doğu Karadeniz bölgesinde antioksidan kaynağı olarak kullanılabilecek odun dışı bazı bitkisel ürünler. *Kastamonu University Journal of Forestry Faculty*, 13(1), 48-59.
- Okasaka, M., Kashiwada, Y., Kodzhimatov, O. K., Ashurmetov, O., & Takaishi, Y. (2008). Monoterpene glycosides from *Paeonia hybrida*. *Phytochemistry*, 69(8), 1767-1772.
- Orhan, I., Demirci, B., Omar, I., Siddiqui, H., Kaya, E., Choudhary, M. I., Ecevit-Genç, G., Özhatay, N., Sener, B., Başer, K.H., (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
- Papandreou, V., Magiatis, P., Kalpoutzakis, E., Skaltsounis, A. L., Harvala, C. (2002). Paeonocluside, a new salicylic glycoside from the Greek endemic species *Paeonia clusii*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57(3-4), 235-238.
- Pinelo, M., Del Fabbro, P., Manzocco, L., Nuñez, M. J., Nicoli, M. C. (2005). Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food*

chemistry, 92(1), 109-117.

- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- Psillakis, E., Kalogerakis, N. (2001). Solid-phase microextraction versus single-drop microextraction for the analysis of nitroaromatic explosives in water samples. *Journal of Chromatography A*, 938(1-2), 113-120.
- 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.
- Ren, M. L., Zhang, X., Ding, R., Dai, Y., Tu, F. J., Cheng, Y. Y., Yao, X. S. (2009). Two new monoterpene glucosides from *Paeonia lactiflora* Pall. *Journal of Asian natural products research*, 11(7), 670-674
- Riaz, N., Anis, I., Malik, A., Ahmed, Z., Muhammad, P., Nawaz, S. A., Choudhary, M. I. (2003). Paeonins A and B, lipoxygenase inhibiting monoterpene galactosides from *Paeonia emodi*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 51(3), 252-254
- Ryu, G., Park, E. K., Joo, J. H., Lee, B. H., Choi, B. W., Jung, D. S., Lee, N. H. (2001). A new antioxidant monoterpene glycoside, α -benzoyloxypaeoniflorin from *Paeonia suffruticosa*. *Archives of pharmacal research*, 24(2), 105-108.
- Şahin, G., (2007). Türkiye’den toplanan bazı paeonia türlerinin antibakteriyel etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 1-23 s.
- Scherer, R., Godoy, H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food chemistry*, 112(3), 654-658.
- Sevindik, M. (2018). Pharmacological properties of *Mentha* species. *Journal Traditional Medicine Clinic Nature* 7(259), 2.
- Segneanu, A. E., Velciov, S. M., Olariu, S., Cziple, F., Damian, D., Grozescu, I. (2017). Bioactive molecules profile from natural compounds. *Amino Acid-New Insights and Roles in Plant and Animal*; Asao, T., Ed, 209-228.
- 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*.
- Sheng, Y. X., Li, L., Wang, Q., Guo, H. Z., Guo, D. A. (2005). Simultaneous determination of gallic acid, albiflorin, paeoniflorin, ferulic acid and benzoic acid in Si-Wu decoction by high-performance liquid chromatography DAD method.

Journal of Pharmaceutical and biomedical analysis, 37(4), 805-810.

- 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
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A. (2000). *Enstrümantal Analiz İlkeleri*. Çeviri Editörleri: Kılıç E, Yılmaz H. 6. Baskıdan çeviri. Bilim yayıncılık, Ankara.
- Stearn, W. T., Davis, P. H. (1984). *Peonies of Greece*. Goulondris Natural History Museum, Kifissia, Greece.
- Takagi, K., Harada, M. (1969). Pharmacological studies on herb paeony root. II. Anti-inflammatory effect, inhibitory effect on gastric juice secretion, preventive effect on stress ulcer, antidiuretic effect of paeoniflorin and combined effects with licorice component Fm 100. *Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 89(7), 887-892.
- Temidayo, A. R. (2013). Extraction and isolation of flavonoids present in the methanolic extract of leaves of *Acanthospermum hispidum* Dc. *Global Journal of Medicinal Plant Research*, 1(1), 111-23.
- Thi Quynh Doan, N., Brogger Christensen, S. (2015). Thapsigargin, origin, chemistry, structure-activity relationships and prodrug development. *Current pharmaceutical design*, 21(38), 5501-5517.
- Tiring, G., Satar, S., Özkaya, O. (2020). Sekonder Metabolitler. *Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 35(1), 203-215.
- Tunç, K., İnceçayır, D., Mammadova, V., Semerci, A.B., (2019). *Paeonia* türlerinin antibakteriyal aktivitesi. *Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 4 (1), 21-27.
- Turumtay, E. A., İslamoğlu, F., Çavuş, D., Şahin, H., Turumtay, H., Vanholme, B. (2014). Correlation between phenolic compounds and antioxidant activity of Anzer tea (*Thymus praecox* Opiz subsp. *caucasicus* var. *caucasicus*). *Industrial Crops and Products*, 52, 687-694.
- Ugulu, I., Baslar, S., Yorek, N., Dogan, Y. (2009). The investigation and quantitative ethnobotanical evaluation of medicinal plants used around Izmir province, Turkey. *Journal of Medicinal plants research*, 3(5), 345-367.
- Ülger, T.G., Ayhan, N.Y., (2020). Bitki sekonder metabolitlerinin sağlık üzerine fonksiyonel etkileri. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, (3), 384-390.
- Ünlü, S. (2010). Türkiye'nin *paeonia* L. türleri üzerinde farmasötik botanik araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü., İstanbul, Türkiye, 1-19 s.
- Verma, B., Hucl, P., Chibbar, R. N. (2009). Phenolic acid composition and antioxidant capacity of acid and alkali hydrolysed wheat bran fractions. *Food Chemistry*,

116(4), 947-954.

- 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*, 27(6), 477-480.
- Verpoorte, R., Alfermann, A.W (Eds). (2000). *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*. Springer Science & Business Media, ISBN 0-7923-6360-4, 217s., Verpoorte, R., Alfermann, A.W (Ed.), 1-5.
- Yağcıoğlu, P. (2015). Farklı ekstraksiyon metotları ile adaçayı (*salvia officinalis* l.) bitkisinden antioksidan ekstraksiyonunun optimizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, 1-24 s.
- Yaylı, N. (2013). Uçucu yağlar ve tıbbi kullanımları, 1. İlaç kimyası, Üretimi, Teknolojisi, Standardizasyonu Kongresi, Antalya,
- Yıldız, A., Genç, Ö., Bektaş, S. (1997). *Enstrümantal Analiz Yöntemleri*, Hacettepe Üniversitesi Yayınları. 975s, 1-1 s.
- Wu, S., Wu, D., Chen, Y. (2010). Chemical constituents and bioactivities of plants from the genus *Paeonia*. *Chemistry and biodiversity*, 7(1), 90-104.
- Wu, S. H., Luo, X. D., Ma, Y. B., Hao, X. J., Wu, D. G. (2002). Monoterpenoid derivatives from *Paeonia delavayi*. *Journal of Asian natural products research*, 4(2), 135-140.
- Wu, H., Wei, W., Song, L., Zhang, L., Chen, Y., Hu, X. (2007). Paeoniflorin induced immune tolerance of mesenteric lymph node lymphocytes via enhancing beta 2-adrenergic receptor desensitization in rats with adjuvant arthritis. *International Immunopharmacology*, 7(5), 662-673.
- Wu, S. H., Chen, Y. W., Yang, L. Y., Li, S. L., Li, Z. Y., 2007. Monoterpene glycosides from *Paeonia delavayi*. *Fitoterapia*, 78(1), 76–78.
- Wu, S. H., Chen, Y. W., Yang, L. Y., Li, S. L., Li, Z. Y. (2008). A new ellagic acid glycoside from *Paeonia delavayi*. *Fitoterapia*, 79(6), 474-475.
- Weisburger, J. H. (2000). Eat to live, not live to eat. *Nutrition*, 16(9), 767-773.
- Zhou, M., Cai, H., Huang, Z., Sun, Y. (1998). HPLC method for the determination of paeoniflorin in *Paeonia Lactiflora* Pall and its preparations. *Biomedical chromatography*, 12(1), 43-44.
- Zhao, X., Sun, Y. (2003). Analysis of *Paeoniae Radix* by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *Analytical sciences*, 19(9), 1313-1315.
- 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.

