

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ  
ECZACILIK FAKÜLTESİ**

***VİTEX AGNUS-CASTUS L. BİTKİSİNDE BULUNAN AGNUSİT BİLEŞİĞİNİN  
PLAZMADA SIVI KROMATOĞRAFİK ANALİZİ VE  
BİYOYARARLANIMININ İNCELENMESİ***

**UZMANLIK TEZİ**

**Derya EGELİ**

**Fitofarmasi Uzmanlık Programı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şerife Evrim TEKKELİ**

**TEMMUZ 2022**

**BEZMIALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ  
ECZACILIK FAKÜLTESİ**

***VİTEX AGNUS-CASTUS L. BİTKİSİNDE BULUNAN AGNUSİT BİLEŞİĞİNİN  
PLAZMADA SIVI KROMATOĞRAFİK ANALİZİ VE  
BİYOYARARLANIMININ İNCELENMESİ***

**UZMANLIK TEZİ**

**Derya EGELİ**

**Fitofarmasi Uzmanlık Programı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şerife Evrim TEKKELİ**

Bu tez Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 20210219 proje numarası ile desteklenmiştir.

**TEMMUZ 2022**

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Fitofarmasi Uzmanlık Programında Eczacılıkta Uzmanlık Öğrencisi olan Ecz. Derya EGELİ ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “*VİTEX AGNUS-CASTUS* L. BİTKİSİNDE BULUNAN AGNUSİT BİLEŞİĞİNİN PLAZMADA SIVI KROMATOĞRAFİK ANALİZİ VE BİYOYARARLANIMININ İNCELENMESİ” başlıklı tezini 19/07/2022 tarihinde aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

**Tez Danışmanı :**      **Prof. Dr. Şerife Evrim TEKKELİ**      .....

Bezmialem Vakıf Üniversitesi

**Jüri Üyeleri :**      **Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU**      .....

Bezmialem Vakıf Üniversitesi

**Prof. Dr. Emine AKALIN**      .....

İstanbul Üniversitesi



*Biricik aileme,*

## ÖNSÖZ

Fitofarmasi uzmanlık eğitimim boyunca bilgi birikiminden ve tecrübelerinden her daim yararlandığım, her konuda sabır ve anlayışıyla güvenini her zaman hissettiğim değerli danışman hocam Prof. Dr. Şerife Evrim TEKKELİ'ye değerli fikirleri, rehberliği ve akademik gelişimime sağladığı katkıları için,

Uzmanlık eğitimimin her aşamasında sahip olduğu bilgi birikimlerini benimle paylaşan, mesleki bilgi ve becerilerimin artmasına önemli katkıları bulunan Sayın Dekanımız Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU'ya ve Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde görev alan tüm değerli hocalarıma,

Uzmanlık eğitimim boyunca beni her aşamada destekleyen, her konuda anlayış ve hoşgörüsüyle güvenini her daim hissettiğim Öğr. Gör. Dr. Betül SÜMBÜL ŞEKERCİ'ye ve birbirimize her zaman destek olduğumuz, aynı yolda ilerlediğimiz arkadaşlarım Uzm. Ecz. Melike Nur AKBAŞ, Arş. Gör. Kadriye COŞKUN, Arş. Gör. Özge ÖZMEN, Arş. Gör. Damla SOSYAL, Arş. Gör. Berre MERCÜMEK ve Ecz. Tubanur BEKLER'e,

Laboratuvar çalışmalarım boyunca bana yardımcı olan ve benimle bilgi birikimlerini paylaşan başta Arş. Gör. Dr. Gizem TIRIS olmak üzere, Dr. Öğr. Üyesi Halil ŞENOL, Arş. Gör. Gülbahar Özge ALİM TORAMAN, Ahmet BALCI ve Şule YALÇIN'a,

Tez çalışmalarımın tüm aşamalarında sabırla bana yardımcı olan başta Bilgihan BAŞTUĞ olmak üzere Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi çalışanlarına,

Sabır ve emekle beni en iyi koşullarda yetiştiren, bugünlere gelmemi sağlayan ve hayatımın her aşamasında her türlü desteğiyle her daim yanımda olan canım annem ve babam Şengül-İbrahim EGELİ'ye, ablalarım ve sevgili yeğenlerime,

Hayatımın ilk dakikalarından itibaren her daim yol göstericim, en büyük destekçim, motivasyon kaynağım ve aynı zamanda hem arkadaşım hem de ikizim Av. Hülya EGELİ'ye,

tüm içtenliğimle teşekkürlerimi sunuyorum.

Temmuz 2022

Derya EGELİ

(Eczacı)

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Ecz. Derya EGELİ  
İmza

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖNSÖZ.....	iiv
BEYAN.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	viii
TABLO LİSTESİ.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xxii
ÖZET .....	xixiii
SUMMARY .....	xixiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Tarihçe.....	3
2.2 Botanik Bilgiler .....	4
2.2.1 Verbenaceae familyası.....	4
2.2.2 Vitex L. cinsi.....	4
2.2.3 Vitex agnus – castus L. türünün özellikleri.....	5
2.3 Vitex agnus – castus L. Kimyasal İçeriği.....	7
2.3.1 Sekonder metabolitler .....	7
2.3.2 Terpenler .....	8
2.3.3 İridoitler .....	8
2.3.4 İridoit glikozitler .....	9
2.4 Vitex agnus – castus L. Farmakolojik Özellikleri .....	10
2.4.1 Premenstrual sendrom (PMS) üzerine etki .....	10
2.4.2 Antimikrobiyal aktivite.....	15
2.4.3 Antioksidan aktivite .....	16
2.4.4 Antienflamatuvar aktivite .....	18
2.4.5 Antikanser etki .....	19
2.4.6 Hipoglisemik etki.....	20
2.4.7 Nöroprotektif etki .....	21
2.4.8 Diğer etkiler .....	23
2.5 Analiz Yöntemleri .....	23
2.6 Farmakokinetik Çalışmalar .....	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler, Cihazlar ve Ekipman .....	28
3.1.1 Kimyasal maddeler ve çözücüler .....	28
3.1.2 Çözeltiler.....	28
3.1.2.1 Hareketli faz çözeltisi .....	28
3.1.2.2 Standart çözeltiler .....	29
3.1.3 Aletler ve diğer gereçler .....	29
3.2 Plazmadan Analitin Ekstre Edilmesi İşlemi.....	30

3.3 Agnusitin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Analizi	31
3.3.1 Kromatografik koşulların belirlenmesi	31
3.4. Yöntem Validasyonu	31
3.4.1 Seçicilik	31
3.4.2 Tayin ve gözlenebilme sınırı	32
3.4.3 Doğrusallık	32
3.4.4 Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik	32
3.4.5 Doğruluk	32
3.4.6 Sağlamlık	33
3.4.7 Çözelti stabilitesi	33
3.5 Kromatogram Üzerinde Belirlenen Agnusit Maddesinin Yapısının Aydınlatılması	33
3.6 Agnusitin Farmasötik Preparatta Analizi	33
3.6.1 Geliştirilen yöntem ile analizi	33
3.6.2 Kıyas yöntemi ile analizi	34
3.7 Biyoyararlanım ve Farmakokinetik Çalışmalar	34
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA</b>	<b>35</b>
4.1 Agnusitin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Analiz Sonuçları	35
4.1.1 Plazmadan ekstraksiyon işlemi	35
4.2 Kromatografik Koşulların Belirlenmesi	36
4.2.1 Dedeksiyonun belirlenmesi	36
4.2.2 Kromatografik ayırma koşullarının belirlenmesi	36
4.2.3 Kromatografik sistem parametreleri	37
4.3 Yöntem Validasyonu	37
4.3.1 Seçicilik	37
4.3.2 Tayin sınırı (LOQ) ve gözlenebilme sınırı (LOD)	38
4.3.3 Doğrusallık	38
4.3.4 Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik	39
4.3.5 Doğruluk	40
4.3.6 Sağlamlık	41
4.3.7 Çözelti stabilitesi	41
4.4 Kromatogram Üzerinde Belirlenen Agnusit Maddesinin Yapısının Aydınlatılması	42
4.5 Agnusitin Farmasötik Preparatta Analizi	45
4.5.1 Geliştirilen yöntem ile analizi	45
4.5.2 Kıyas yöntemi ile analizi	47
4.5.3 Geliştirilen yöntemin kapsüllerde agnusit tayinine uygulanması ve sonuçların kıyas yöntemi ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması	49
4.6 Farmakokinetik Çalışma Sonuçları	50
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>52</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>55</b>
<b>EKLER</b>	<b>63</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>74</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>%</b>	: Yüzde
<b>°C</b>	: Derece Santigrat
<b>ABTS<sup>+</sup></b>	: 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit
<b>AUC</b>	: Konsantrasyon-Zaman Eğrisinin Altındaki Alan
<b>BHA</b>	: Bütilendirilmiş Hidroksi Anisol
<b>C18</b>	: Oktadesil silan
<b>CGI</b>	: Klinik Global İzlenim Ölçeği
<b>cm</b>	: Santimetre
<b>C<sub>maks</sub></b>	: Maksimum Plazma Konsantrasyon
<b>COX</b>	: Siklooksijenaz
<b>DAD</b>	: Diyot Dizi Dedektörü
<b>DNA</b>	: Deoksiribo Nükleik Asit
<b>DPPH<sup>•</sup></b>	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
<b>ES COP</b>	: Avrupa Bilimsel Fitoterapi Kooperatifi (European Scientific Cooperative on Phytotherapy)
<b>FRAP</b>	: Ferrik İyon İndirgeyici Antioksidan Güç
<b>g</b>	: Gram
<b>h/h</b>	: hacim/hacim
<b>HDL</b>	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
<b>HETP</b>	: Teorik Plakaya Eşdeğer Yükseklik
<b>HMBC</b>	: Heteronükleer Çoklu Bağ Korelasyon Spektroskopisi
<b>HOMA-IR</b>	: Homeostatik Model Değerlendirme-İnsülin Direnci
<b>HPLC</b>	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
<b>HPLC-DAD</b>	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi - Diyot Dizi Dedektörü
<b>HPLC-UV</b>	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi - Ultraviyole
<b>HPTLC</b>	: Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi
<b>HRT</b>	: Hormon Replasman Tedavisi
<b>HSQC</b>	: Heteronükleer Tek Kuantum İlişkisi Spektroskopisi
<b>IC50</b>	: Yarı-Maksimum İnhibisyon Konsantrasyonu

<b>ICH</b>	: Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>kg</b>	: Kilogram
<b>L</b>	: Litre
<b>LC-MS/MS</b>	: Sıvı Kromatografisi - Tandem Kütle Spektrometrisi
<b>LDL</b>	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
<b>LOD</b>	: Gözlenebilme Sınırı
<b>LOQ</b>	: Tayin Sınırı
<b>M</b>	: Molarite
<b>mg</b>	: Miligram
<b>mL</b>	: Mililitre
<b>mm</b>	: Milimetre
<b>MMP-9</b>	: Matriks Metalloproteinaz-9
<b>MS</b>	: Kütle Spektrometresi
<b>ng</b>	: Nanogram
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>NMR</b>	: Nükleer Manyetik Rezonans
<b>OPA</b>	: Orto-ftalaldehit
<b>PDA</b>	: Photo-Diode Array
<b>PHBA</b>	: p-hidroksibenzoik asit
<b>pMCAO</b>	: Kalıcı Orta Serebral Arter Tıkanıklığı
<b>PMDD</b>	: Premenstrual Disforik Bozukluk
<b>PMS</b>	: Premenstrual Sendrom
<b>PMTS</b>	: Premenstrual Gerginlik Sendromu (Premenstrual Tension Syndrome)
<b>ppm</b>	: Milyonda bir kısım
<b>RP</b>	: İndirgeme Potansiyeli
<b>RP-HPLC</b>	: Ters Fazlı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
<b>rpm</b>	: Dakikadaki Devir Sayısı
<b>RSD</b>	: Bağlı Standart Sapma
<b>SD</b>	: Standart Sapma
<b>SRI</b>	: Serotonin Geri Alım İnhibitörleri
<b>t<sub>1/2</sub></b>	: Eliminasyon Yarı Ömrü
<b>TAC</b>	: Toplam Antioksidan Kapasite
<b>TGF-β</b>	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü-β (Transforming Growth Factor-β)

<b>TLC</b>	: İnce Tabaka Kromatografisi
<b>t<sub>maks</sub></b>	: Maksimum Konsantrasyona Ulaşma Zamanı
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	: Tümör Nekroz Faktör Alfa
<b>TRH</b>	: Tirotropin Salınım Hormonu
<b>UHPLC</b>	: Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
<b>UHPLC-MS/MS</b>	: Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi - Tandem Kütle Spektrometrisi
<b>UV</b>	: Ultraviole
<b>VAC</b>	: <i>Vitex agnus-castus</i>
<b>VAS</b>	: Vizüel Analog Skala
<b>WHO</b>	: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
<b><math>\mu</math></b>	: Mikro
<b><math>\mu</math>L</b>	: Mikrolitre

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 2.1:</b> Vitex agnus-castus L. bitki sistematığı.....	5
<b>Tablo 3.1 :</b> Plazmadan analitlerin ekstraksiyonu için denenen sıvı-sıvı ekstraksiyon sistemleri.....	30
<b>Tablo 4.1 :</b> Agnusitin 5-125 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alanı değerleri ve istatistik veriler.....	39
<b>Tablo 4.2 :</b> Ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler.....	39
<b>Tablo 4.3 :</b> Aynı gün içinde ve farklı günlerde yapılan analizlerin tekrarlanabilirliği.....	40
<b>Tablo 4.4 :</b> Standart katma yöntemine ait analiz sonuçları.....	41
<b>Tablo 4.5 :</b> Sağlık çalışması sonuçları.....	41
<b>Tablo 4.6 :</b> Agnusit standart çözeltilerine ait stabilite sonuçları.....	42
<b>Tablo 4.7 :</b> Agnusit içeren kapsüllerin analiz sonuçları ve sonuçların istatistiki olarak değerlendirilmesi.....	50
<b>Tablo 4.8 :</b> 750 mg hayıt ekstresinin uygulanmasından sonra agnusitin farmakokinetik parametreleri.....	51

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 2.1 : Vitex agnus-castus L. bitkisinin Türkiye’de bulunduğu bölgeler .....	6
Şekil 2.2 : Vitex agnus-castus L. ....	6
Şekil 2.3 : İridoitlerin genel halka yapısı.....	8
Şekil 2.4 : Vitex agnus-castus L. bitkisinde bulunan bazı iridoitler.....	9
Şekil 4.1 : Plazmadan ekstraksiyon işlemi. ....	35
Şekil 4.2 : Agnusitin metanol çözeltisinin UV-görünür bölgede gözlenen absorpsiyon spektrumu.....	36
Şekil 4.3 : (a): Boş plazma numunesi, (b): 100 µg/mL agnusit eklenmiş plazma ve (c): Vitex agnus-castus L. ekstresinin gönüllüye oral uygulanmasının 1 saat ardından alınan plazma numunesine ait kromatogramlar. ....	37
Şekil 4.4 : Agnusitin 5-125 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi	38
Şekil 4.5 : Agnusit bileşiğinin HMBC korelasyonları.....	45
Şekil 4.6 : Agnusitin 1-10 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi.	46
Şekil 4.7 : (a): sulu ortam boş denemesine, (b): 10 µg/mL standart (sulu) agnusit çözeltisine ait kromatogramlar .....	46
Şekil 4.8 : Agnusitin 1-10 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi.	48
Şekil 4.9 : Plazmada agnusit konsantrasyonunun zamana karşı değişimi. ....	51

**VİTEX AGNUS-CASTUS L. BİTKİSİNDE BULUNAN AGNUSİT  
BİLEŞİĞİNİN PLAZMADA SIVI KROMATOĞRAFİK ANALİZİ VE  
BİYOYARARLANIMININ İNCELENMESİ**

**ÖZET**

Bu çalışmada *Vitex agnus-castus* L. bitkisinde bulunan ve başta östrojenik etki olmak üzere çeşitli farmakolojik etkileri olduğuna dair bilimsel çalışmalar bulunan agnusit adlı bileşiğin farmasötik preparatlarda ve insan plazmasında miktar tayininin yapılabilmesini sağlayan yeni bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) metodu geliştirilmiştir. Bu amaçla plazma numunelerinden sıvı-sıvı ekstraksiyon tekniği ile ekstre edilen madde; C18 (150 mm × 4,6 mm × 5 µm) kolon ve metanol:su (% 0,1 formik asit) (35:65, h/h) karışımından oluşan bir mobil fazla izokratik akışta ve 0,6 mL/dk akış hızıyla ayrılmıştır. Analit UV dedeksiyonla 258 nm'de tespit edilmiştir ve alıkonma zamanı  $9,7 \pm 0,01$  dakikadır. Geliştirilen yöntem seçicilik, doğrusalılık, doğruluk, tekrarlanabilirlik, gözlenebilme sınırı (LOD), tayin sınırı (LOQ), sağlamlık ve dayanıklılık açısından ICH kriterlerine göre valide edilmiştir. Yöntemin doğrusallık sınırları 5-125 µg/mL, kalibrasyon sonucu elde edilen doğru denkleminin korelasyon katsayısı 0,9915'tir. Yöntemin gün içi ve günler arası kesinliğini gösteren % RSD değerlerinden en yükseği 6,35'tir. Geliştirilen yöntemin klinik uygulanabilirliğini test etmek amacıyla, sağlıklı gönüllüye hayıt ekstresi içeren Castonex® kapsül oral yolla tek doz verilmiş, ardından yöntem bileşiğin farmakokinetik parametrelerinin ( $C_{maks}$ ,  $t_{maks}$ ,  $t_{1/2}$  ve  $AUC_{0-t}$ ,  $AUC_{0-\infty}$ ) hesaplanmasında kullanılmıştır. Plazmada agnusit analizinin yanısıra, bileşiğin preparattaki miktarı sulu standart çözeltilere ait doğru denklemi ile hesaplanmış ve sonuçlar kıyas yöntemi ile elde edilenlerle % 95 olasılık düzeyinde kıyaslanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Agnusit, *Vitex agnus-castus* L., HPLC-UV, metot validasyonu, farmakokinetik

## LIQUID CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS AND EXAMINATION OF BIOAVAILABILITY OF AGNUSIDE COMPOUND FOUND IN *VITEX AGNUS-CASTUS* L. PLANT IN PLASMA.

### SUMMARY

In this study, a new high-performance liquid chromatography (HPLC) method was developed for plasma and pharmaceutical preparation assays that enables the determination of the compound called agnuside, which is found in *Vitex agnus-castus* L. plant and has various pharmacological effects, especially estrogenic effect. For this purpose, the analyte extracted from plasma samples by liquid-liquid extraction technique, then separated with C18 (150 mm × 4,6 mm × 5 μm) column and methanol:water (0.1 % formic acid) (35:65, v/v) mixture as mobile phase with isocratic flow and at a flow rate of 0.6 mL/min. The analyte has been detected by UV detection at 258 nm and with  $9.7 \pm 0.01$  minutes retention time. The developed method has been validated according to ICH criteria in terms of selectivity, linearity, accuracy, repeatability, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), robustness and stability. The linearity limits of the method are 5-125 μg/mL, and the correlation coefficient of the linearity equation obtained as a result of the calibration is 0.9915. The maximum RSD % value indicating the intra-day and inter-day precision of the method is 6.35. In order to check the clinical applicability of the developed method, a single dose of Castonex® capsule containing chasteberry extract was administered orally to a healthy volunteer, and then the method was used to calculate the pharmacokinetic parameters ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$ ,  $t_{1/2}$  and  $AUC_{0-t}$ ,  $AUC_{0-\infty}$ ) of the compound. In addition to plasma assays, the amount of agnuside in pharmaceutical preparation was calculated with the regression equation of the aqueous standard solutions and the results were compared with those obtained by the validated comparison method at 95 % confidence level.

**Keywords:** Agnuside, *Vitex agnus-castus* L., HPLC-UV, method validation, pharmacokinetics

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığından ruhsatlı bitkisel ekstre içeren ürünler ‘takviye edici gıdalar’ adı altında piyasada bulunmaktadır. Günümüzde bu ürünler gerek hastalıklardan korunmak amacıyla gerek destek tedavi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Piyasada hayıt, iffetli ağaç gibi isimleriyle bilinen *Vitex agnus-castus* L. bitkisini içeren çeşitli takviye edici gıdalar bulunmaktadır.

Hayıt bitkisinin tedavi amacıyla kullanımı antik çağlara dayanmaktadır. Ülkemizde halk arasında meyvelerinin infüzyonu idrar arttırıcı, mide bulantısını önleyici, soğuk algınlığını giderici ve sakinleştirici amaçlarla kullanılmaktadır. 17. yüzyıldan itibaren, menstrual bozukluklarda ve emzirme döneminde süt salgılanmasında takviye amacıyla yaygın olarak kullanılmıştır [1, 2]. Hayıt günümüzde menstruasyon bozuklukları, premenstrual sendrom (PMS), mastodini ve menopozda görülen şikayetlerin giderilmesinde drog ya da standardize ekstreler halinde kullanılmaktadır [3].

Hayıtın bileşiminde başlıca diterpenler, diterpenoit alkaloidler, iridoit glikozitleri, flavonoidler, trigliseritler ve uçucu yağlar bulunmaktadır [4]. Bitki içerdığı sekonder metabolitler nedeniyle antioksidan, antimikrobiyal, östrojenik, antienflamatuvar, hipoglisemik, antikanser ve nöroprotektif etki gibi birçok farmakolojik aktivite göstermektedir [5-9].

*Vitex* cinsinin kemotaksonomik belirteci olan agnusit, iridoit glikozit yapısında bir bileşiktir. Agnusit premenstrual ve menstrual problemlerde yaygın olarak tercih edilmektedir [10, 11]. Hayvan modellerinde yapılan çalışmalara göre, agnusitin antienflamatuvar, hepatoprotektif, analjezik ve östrojenik etkileri bildirilmiştir [10-12]. Farmakolojik etkilerini değerlendirmek için hücre dizileri ve hayvan modellerinde birçok prelinik çalışma yapılmış olsa da agnusitin terapötik kullanımlarını bildirmek için daha fazla klinik çalışmaya ihtiyaç vardır. Yeni bir ilaç olarak geliştirilmesi için, klinik öncesi biyofarmasötik ve klinik farmakoloji çalışmalarında agnusitin kantitatif tahminine yönelik seçici ve hassas bir analitik yöntem oluşturmak gerekmektedir.

Bu çalışmada uzun yıllardır premenstrual sendrom, mastodini tedavisinde kullanılan, farmakolojik etkileri çeşitli çalışmalarla gösterilmiş, hayıt bitkisinde bulunan agnusit bileşiğinin farmasötik preparatlarda ve insan plazmasında miktarını tayin edebilen analitik yöntem geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Ardından 26 yaşında bir sağlıklı kadın gönüllüye oral yolla hayıt ekstresi içeren preparat uygulanarak alınan plazma rneklelerinde yeni yöntem ile agnusit miktar tayinleri yapılmış ve bu maddenin başlıca farmakokinetik parametreleri ( $C_{maks}$ ,  $t_{maks}$ ,  $t_{1/2}$  ve  $AUC_{0-t}$ ,  $AUC_{0-∞}$  gibi) hesaplanmıştır.

Yapılan bu prototip faz 1 klinik çalışma ile bu HPLC yönteminin ekstrelerin ve preparatların biyoyararlanım, biyoeşdeğerlik çalışmalarında, agnusitin farmakokinetik araştırmalarında ve toksikolojik incelemelerinde kullanılabilir olması hedeflenmektedir. Geliştirilen yöntem hayıt ekstreleri - ilaç ve hayıt ekstreleri - gıda etkileşimleri ile ilgili araştırmalar yapmaya da olanak sağlayacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tarihçe

*Vitex agnus-castus* L. bitkisinin tıbbi kullanımı ile ilgili ilk kayıtlar M.Ö. IV. yüzyılda yaşamış olan Hipokrat'a aittir. Hipokrat bitkiyi menstruasyon bozukluklarında kullanmıştır. Dioscorides "Materia Medica" adlı kitapta bitkinin süt salgısını arttırdığından ve menstruasyon bozukluklarında kullanımından bahsetmiştir [13].

Antik çağlarda hayıtın tohumları; gaz giderici, karaciğer faaliyetlerini düzenleyici, emenagog ve sakinleştirici olarak da kullanılmış, aynı zamanda zehirli böcek ve yılan sokmalarına karşı etkili olduğu belirtilmiştir [13]. Eski çağlardan beri namus simgesi haline gelen bitki, ilerleyen zamanlarda cinsel arzuları baskılamak amacıyla orta çağ keşişleri tarafından kullanılmıştır. Bu nedenle bitki İngilizcede "Monk's pepper" yani rahip biberi ya da keşiş biberi olarak da adlandırılmıştır [14]. Roma'da kadınların tapınak ayinlerinde namus simgesi olarak bilinen bitkinin çiçekleriyle süslendiği bilinmektedir [13].

1700'lü yıllarda hayıtın Avrupa'daki popüleritesi azalmaya başlamış, ancak Akdeniz havzasında sindirim rahatsızlıklarında kullanımı devam etmiştir [13]. Bitki jinekolojik hastalıklarda kullanımıyla 1900'lü yılların başında yeniden gündeme gelmiş ve bitki ile ilgili bilimsel araştırmalar yapılmaya başlanmıştır. Gerhard Madaus (1890-1942) bitkinin jinekolojik hastalıklarda kullanımıyla ilgili yaptığı araştırmalar sonucunda, 1938 yılında kurutulmuş hayıt meyve ekstresinden ilaç geliştirmiştir. Madaus patentini aldığı bu ilaca 'Agnolyte' adını vermiş ve bu ilaç daha sonra hayıt ile ilgili yapılan birçok bilimsel araştırmada kullanılmıştır [14].

*Vitex agnus-castus* L. bitkisi hormonlar üzerinde düzenleyici etkiye sahip olup, günümüzde menstrual siklus bozuklukları, premenstrual sendrom şikayetleri ve menopozun ilk evresinde görülen şikayetlerin giderilmesinde kullanılmaktadır [15].

## 2.2 Botanik Bilgiler

### 2.2.1 Verbenaceae familyası

Verbenaceae familyası bitkiler aleminde yaklaşık 100 cins ve 3000 tür ile temsil edilen bir familyadır. Bitkileri nadiren otsu, çoğunlukla bodur ağaç veya çalılardan oluşmakta ve tropikal ve subtropikal bölgelerde yetişmektedir [16].

Yapraklar stipulasız, vertisillat ya da karşılıklıdır. Yaprakları genellikle basit, nadiren palmatipartit veya pennat parçalanmıştır. Çiçek durumları ise brakteli, sık terminal spika veya simoz panikulat şeklindedir [16].

Çiçekler hermafrodit olup; küçük soluk mavi, menekşe, beyaz veya pembe renkli, genellikle zigomorf veya bazen aktinomorftur. Kaliks gamosepal 2-5 dişli ve kalıcıdır. Korolla gamopetal, 4-5 loblu sıklıkla bilabiattır. Stamenler 4 tane, didinam, epipetaldir. Ovaryum üst durumlu, 2-4 gözlü, 2 karpelli, ovüller her gözde bir tane şeklindedir [16]. Meyve 2-4 adet tek tohumlu küçük nukslar veya drupa şeklindedir [17].

Türkiye’de Verbenaceae familyasında 3 cins ve 6 tür bulunmaktadır:

(www.tubives.com, erişim tarihi: 15.10.2021)

1-Phyla L. (*P. nodiflora* L., *P. canescens* L.)

2-Verbena L. (*V. officinalis* L., *V. supina* L.)

3-Vitex L. (*V. agnus-castus* L., *V. pseudo-negundo* L.)

### 2.2.2 Vitex L. cinsi

Vitex L. cinsi, Verbenaceae familyasının en geniş cinsi olup, tüm dünyada yayılış gösteren 250 türden oluşmaktadır [18]. Türkiye’de ise sadece *Vitex agnus-castus* L. ve *Vitex pseudo-negundo* olmak üzere iki tür bulunmaktadır [19]. Tıpta kullanılan türler *Vitex agnus-castus* L. ve *Vitex negundo* L.’dir. *Vitex agnus-castus* L., Akdeniz bölgesi, Güney Avrupa ve Orta Asya’da yayılış gösteren bir türdür [20]. *Vitex negundo* L. ise başlıca Pakistan, Hindistan ve Sri Lanka’da yetişmektedir [21]. *Vitex agnus-castus* L. bitki sistematığı Tablo 2.1’de sunulmuştur.

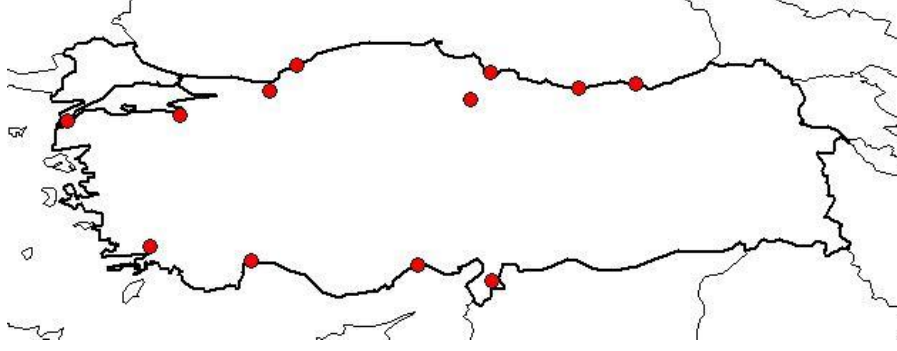
**Tablo 2.1:** *Vitex agnus-castus* L. bitki sistematigi (TÜBİVES, erişim tarihi: 18.10.2021).

<b>Alem</b>	Plantae
<b>Alt Alem</b>	Tracheobionta
<b>Bölüm</b>	Magnoliophyta
<b>Sınıf</b>	Magnoliopsida
<b>Alt Sınıf</b>	Asteridae
<b>Takım</b>	Lamiales
<b>Aile</b>	Verbenaceae
<b>Cins</b>	Vitex
<b>Tür</b>	<i>Vitex agnus-castus</i> L.

### 2.2.3 *Vitex agnus – castus* L. türünün özellikleri

Verbenaceae familyası, *Vitex* cinsine ait *Vitex agnus-castus* L., 1 - 3 metre uzunluğunda, çok yıllık, yoğun aromatik kokuya sahip, çalı veya küçük ağaç formunda bir bitkidir [22]. *Vitex agnus-castus* L., Türkçe’de hayıt, ayıd, acı ayıt, beşparmak otu, keşiş biberi, iffetli ağaç olarak adlandırılmaktadır. İngiltere’de Chasteberry, Chaste tree, Monk’s pepper, Vitex; İtalya’da Agnucasto, Lagano, Vitice; Almanya’da Keuschlamm, Möchspfeffer ve Fransa’da Agneau-chaste isimleriyle bilinmektedir [13, 23]. Bitki geleneksel halk tıbbında yaygın bir şekilde idrar arttırıcı, gaz çıkartıcı, mide bulantısını önleyici, baş ağrısını azaltıcı, soğuk algınlığını giderici ve sakinleştirici olarak kullanılmaktadır. Ayrıca kurutulmuş toz haline getirilen meyve ve yaprakların güveleri uzaklaştırmak için kullanıldığı bilinmektedir [24, 25].

*Vitex agnus-castus* L., Akdeniz bölgesi, Güney Avrupa ve Orta Asya’da yayılış göstermektedir [20]. Ülkemizde Düzce, Zonguldak, Amasya, Antalya, Bursa, Çanakkale, Giresun, Mersin, Muğla, Samsun ve Trabzon bölgelerinde doğal olarak yetişmektedir (Şekil 2.1) (TÜBİVES, erişim tarihi: 18.10.2021). Bitkinin çiçeklenme dönemi Haziran-Eylül ayları arasındadır [26].



**Şekil 2.1 :** *Vitex agnus-castus* L. bitkisinin Türkiye’de bulunduğu bölgeler (TÜBİVES, erişim tarihi: 18.10.2021).

Yaprakları palmat, üst yüzü yeşil, alt yüzü beyaz tüylü olup 5-7 parçalıdır. Yapraklar genellikle 3,5-15x0,5-2,8 cm, bazen daha geniş olabilir veya belirgin dentat, tepesi akuttur. Yapraklar her iki uca doğru daralmaktadır, sapsız veya bazen tepedekiler saplıdır. Yaprak sapı uzundur ve alt yapraklar 4 cm’e kadar uzayabilmektedir [16].

Çiçek yapısı sıklıkla küremsi sapsızdır. Kaliks iç yüzeyi çok belirgin ana damarlı, dış yüzeyi sık yumuşak tüylü ve belirgin olmayan şekilde damarlıdır. Korolla ise açık leylak renginden maviye dönen renktedir. Meyve 3-4 mm kadar, yuvarlak drupa ve siyah ya da kırmızı renktedir [16]. Bitkinin resmi Şekil 2.2’de görülmektedir [27].



**Şekil 2.2 :** *Vitex agnus-castus* L.

*Vitex agnus-castus* L.’nin bileşiminde başlıca diterpenler, flavonoidler, fenolik asitler, iridoit glikozitleri ve uçucu yağlar yer almaktadır [17]. Bitkiden hazırlanan ekstratlarla yapılan biyolojik aktivite çalışmalarıyla ekstratların antioksidan, antimikrobiyal, antienflamatuar, antikanser, nöroprotektif ve hipoglisemik aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir [5-9].

## 2.3 *Vitex agnus - castus* L. Kimyasal İçeriği

### 2.3.1 Sekonder metabolitler

Bitkiler, primer veya sekonder metabolit olarak bilinen çeşitli kimyasal bileşikleri veya fitokimyasalları sentezlemektedir. Primer metabolitler tüm bitkilerde bulunan, esas olarak bitkinin büyüme ve gelişimini sağlayan bileşiklerdir [28]. Bitki primer metabolitleri proteinler, karbonhidratlar, lipitler, enzimler ve nükleik asitler gibi canlı yapı taşını oluşturan organik moleküllerden oluşur ve bitkinin gelişiminde önemli rolleri bulunmaktadır [29].

Sekonder metabolitler ise bitkinin temel yaşamsal faaliyetleri ile doğrudan ilişkisi olmayan ancak bitkinin çevresiyle etkileşiminde rol oynayan bileşiklerdir. Bitkilerin hem biyotik hem de abiyotik streslere karşı korunmasında rol oynamaktadırlar. Bitkilerde bulunan sekonder metabolitler biyosentez kökenlerine göre üç gruba ayrılmaktadır: terpenoidler, poliketidler ve fenilpropanoidler [29].

*Vitex agnus-castus* L. bitkisinin sekonder metabolitleri flavonoid, iridoit, diterpen ve fenolik asit yapısında bileşiklerden oluşmaktadır [17]. Yapılan çalışmalarda bitkinin bileşiminde labdan iskeleti taşıyan (rotundifuran, viteksilakton) ve klerodan iskeleti taşıyan en az iki sınıf bisiklik diterpen bulunduğu tespit edilmiştir [30]. Bitkide lipofilik yapıda katisin, penduletin ve krizofenol-D flavonoidleri; hidrofilik yapıda orientin, homoorientin, izoviteksin, luteolin-7-glikozit flavonoidleri bulunmaktadır [9, 31, 32]. Ana flavonoid lipofilik yapıdaki katisindir. *Vitex agnus-castus* L. meyvelerindeki temel iridoit glikozitlerinin agnusit ve okubin olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [33]. Bitkinin çiçekli dalları ile yapılan bir başka fitokimyasal çalışmada ise agnusit ve okubine ek olarak üç yeni iridoit elde edilmiştir. Bunlar; 6'-O-foliomentolmussenozidik asit (agnukastozid A), 6'-O-6,7-dihidrofoliomentolmussenozidik asit (agnukastozid B), 7-O-trans-p-kumaroil-6'-O-trans-kafeoil-8-epiloganik asit (agnukastozid C)'tir [34]. Bitkinin gövde ve dalları ile yapılan çalışmada en yüksek miktarda p-hidroksibenzoik asit olmak üzere, sinamik asit, gallik asit, benzoik asit ve klorojenik asit gibi fenolik bileşiklerin varlığı tayin edilmiştir [35]. Yapılan bir çalışmada bitkinin çiçek, meyve ve yapraklarından elde edilen uçucu yağın ana bileşenleri 1,8-sineol, sabinen,  $\alpha$ -terpineol,  $\beta$ -karyofillen, trans- $\beta$ -farnesen olarak tespit edilmiştir [36, 37].

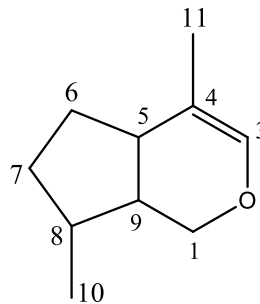
### 2.3.2 Terpenler

Terpenler sekonder metabolitlerin en geniş sınıfını temsil etmektedir. Terpen adı, grubun ilk bileşiklerinin terebentinden izole edilmesinden gelmektedir. Terpenler sadece hidrokarbonlardan oluşabileceği gibi, oksijen içeren terpenler de bulunmaktadır. Oksijen içeren terpenler ‘terpenoitler’ olarak adlandırılmaktadır. Bitkilerde serbest olarak bulunabileceği gibi, bazen proteinlerle birleşmiş olarak, bazen de glikozitleri ya da organik asit esterleri halinde bulunabilmektedir [38].

Terpenler biyosentezinde temel birim olan izopren ( $C_5H_8$ ) birimlerinin sayısına göre sınıflandırılmaktadır. İzopren birimlerinin baş-kuyruk şeklinde bağlanarak düz zincir oluşturmasıyla veya baş-baş, baş-orta şeklinde bağlanarak halka oluşturmasıyla terpenler meydana gelmektedir [28]. İzopren birimlerinin sayısına göre; hemiterpenler, monoterpenler, seskiterpenler, diterpenler, sesterpenler, triterpenler, tetraterpenler ve politerpenler olarak sınıflandırılmaktadır [39].

### 2.3.3 İridoitler

İridoitler çok çeşitli bitkilerde ve hayvanlarda bulunan, monoterpenlere ait bir grup doğal bileşiktir. Özellikle *Apocynaceae*, *Scrophulariaceae*, *Verbenaceae*, *Lamiaceae*, *Loganiaceae* ve *Rubiaceae* gibi farklı dikotil familyalarında doğal olarak sentezlenen sekonder metabolitlerdir [40]. Bir siklopentan halkasının, bir oksijen atomu içeren altı elemanlı bir halka ile birleşmesi ile oluşan siklopentanopiran halkası, iridoitlerin temel iskelet halkasını oluşturmaktadır (Şekil 2.3) [41, 42]. 8, 9, 10 karbonlu iridoitler 3. ve 4. karbon atomları arasında bir çifte bağ taşımaktadır. 9 karbonlu iridoitler 4. veya 8. konumda, 10 karbonlu olanlar hem 4. hem 8. konumda birer sübstitüent taşımaktadır [43].



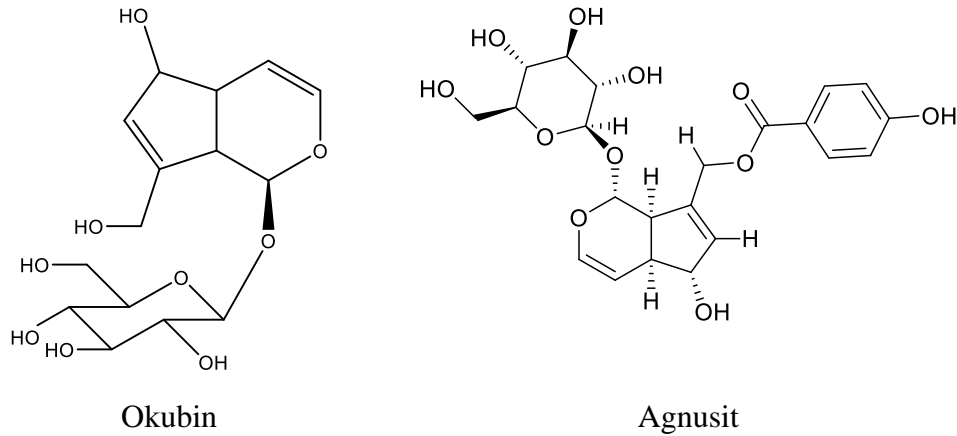
Şekil 2.3 : İridoitlerin genel halka yapısı.

İridoit bileşikleri bitkilerden ilk defa 1800'lü yıllarda izole edilmiştir. Ancak yapılarının aydınlatılması ve adlandırılmaları 1950'lerin ortalarında yapılmıştır [44]. İridoit adı, *Iridomyrmex* cinsi karınca türünden izole edilen iridodiyal (iridodial), iridomirmesin (iridomyrmecin) ve iridolakton (iridolactone) bileşiklerinden gelmektedir. İridoitler bu türlerde savunma salgıları olarak bulunmaktadır [44]. İridoitler terpen türevlerinin büyük bir grubunu oluşturmaktadır ve iridoit glikozitler, non-glikosidik (aglikon) iridoitler, bisiridoitler ve sekoiridoitler olmak üzere 4 gruba ayrılmaktadır [45].

### 2.3.4 İridoit glikozitler

Monoterpenlere ait bir grup doğal bileşik olan iridoitler, doğada genellikle glikozit formlarında bulunmaktadır [46]. İridoit glikozitler 8, 9 veya 10 karbonlu iskelet yapısına sahip ve piran halkasının 1. karbon atomuna bir monosakkaridin bağlanması sonucu oluşan siklopentanoid monoterpen türevli bileşiklerdir [41, 47]. İridoit glikozitleri *Apocynaceae*, *Gentianaceae*, *Lamiaceae*, *Loganiaceae*, *Menyanthaceae*, *Plantaginaceae*, *Rubiaceae*, *Scrophulariaceae*, *Valerianaceae*, *Verbenaceae* familyalarında bulunan sekonder metabolitlerdir [48].

İridoitler ve iridoit glikozitleri, yapılarına göre farklı farmakolojik etkiler gösteren biyolojik olarak aktif bileşiklerdir [41]. Sahip oldukları çeşitli farmakolojik özellikler nedeniyle birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadırlar. İridoit glikozitlerin kan glukoz seviyelerini düşürdüğü [49-51], histamin ve serotonin salgılanmasını azalttığı [52] yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Ayrıca hepatoprotektif, antiinflamatuvar, antimikrobiyal ve antiviral etkilerinin olduğu da bulunmuştur [53].



Şekil 2.4 : *Vitex agnus-castus* L. bitkisinde bulunan bazı iridoitler.

Yapılan çalışmalarla *Vitex agnus-castus* L. meyvelerindeki temel iridoit glikozitlerin agnusit ve okubin olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.4) [33]. Umut verici bir hepatoprotektif ajan olan okubunun, farelerde ve sıçanlarda karbontetraklorür veya alfa-amanitin ile indüklenen karaciğer hasarına karşı koruduğu bulunmuştur [54]. Ayrıca koleretik, hemodinamik, antispazmodik, antimikrobiyal ve antinosiseptif etkileri de bulunmaktadır [55-58]. Okubin ve p-hidroksibenzoik asitin esteri olan agnusit, premenstrual ve menstrual problemlerde ve menopoza semptomlarında kullanılmaktadır [10, 11]. Hayvan modellerinde yapılan çalışmalara göre, agnusitin antienflamatuvar, hepatoprotektif, analjezik ve östrojenik etkileri de bildirilmiştir [10-12, 59].

## **2.4 *Vitex agnus - castus* L. Farmakolojik Özellikleri**

*Vitex agnus-castus* L. bitkisi eski çağlardan beri kullanılmaktadır. Bitki Komisyon E Monograflarında, WHO Monograflarında, ESCOP Monograflarında, Amerikan Tıbbi Bitki Farmakopesinde (American Herbal Pharmacopoeia), İsviçre Farmakopesinde ve Hint Farmakopesinde kayıtlıdır [4]. Hayıt içerdiği sekonder metabolitler sayesinde birçok farmakolojik aktiviteye sahiptir. Ancak bitkinin etki mekanizması ve farmakolojik özelliklerinden sorumlu etkin maddeler kesin olarak bilinmemektedir [3]. Bitki üzerinde çeşitli in vivo, in vitro ve klinik çalışmalar yapılmış olup bunlar şu şekilde sınıflandırılabilir:

- Premenstrual Sendrom (PMS) Üzerine Etki
- Antimikrobiyal aktivite
- Antioksidan aktivite
- Antienflamatuvar aktivite
- Antikanser etki
- Hipoglisemik etki
- Nöroprotektif etki
- Diğer etkiler

### **2.4.1 Premenstrual sendrom (PMS) üzerine etki**

Premenstrual sendrom, menstrual siklusun luteal fazı sırasında fiziksel, davranışsal ve psikolojik semptomların ortaya çıkması ve menstruasyonun başlamasından sonraki birkaç gün içinde kaybolması ile karakterizedir [60]. Memelerde hassasiyet, ağrı

(mastalji), ödem, ateş basması, bitkinlik, gerginlik ve baş ağrısı gibi semptomlarla karakterize siklik bir bozukluktur [61]. Premenstrual sendrom yaşayan birçok kadın tarafından serotonin geri alım inhibitörleri ve oral kontraseptifler gibi ilaçların yanı sıra, *Vitex agnus-castus* L. gibi tamamlayıcı ve alternatif ilaçlar da kullanılmaktadır [62].

*Vitex agnus-castus* L. östrojen, progesteron ve prolaktin gibi hormonların seviyelerini dengelemek ve menstruasyonu düzenlemek amacıyla kullanılmaktadır. Bununla birlikte yapılan çalışmalarla bitkinin premenstrual sendromda görülen semptomların giderilmesinde ve luteal faz bozuklukları, ovulasyon, laktasyon yetersizliği, hiperprolaktinemi ve menopoza gibi şikayetlerde etkili olduğu gösterilmiştir [63-65]. Bitki ekstresinin premenstrual sendrom, menstruasyon düzensizliği ve mastalji tedavisinde kullanımı Alman Komisyon E tarafından onaylanmıştır [3].

Hayıtın etki mekanizması ve farmakolojik aktivitelerinden sorumlu etkin maddeler kesin olarak bilinmemekle birlikte, yapılan çalışmalar plazmada prolaktin seviyesini düşürerek etkili olduğunu göstermektedir [3]. Hipofiz bezinin ön lobundan salgılanan prolaktin hormonu, hipotalamus tarafından sentezlenen tirotropin salınım hormonu (TRH) ile stimüle edilmektedir, dopamin tarafından da inhibe edilmektedir. Yapılan çeşitli in vivo ve in vitro deneylerle hayıt ekstresinin dopaminerjik prolaktin sekresyonunu inhibe edici aktivite gösterdiği tespit edilmiştir [66, 67]. Sliutz ve ark., yaptıkları in vitro çalışmada *Vitex agnus-castus* L. preparatı ve ekstrelerinin, sıçan hipofiz hücrelerinde bazal ve TRH ile indüklenen prolaktin sekresyonunu inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Göstermiş olduğu dopaminerjik etki sayesinde hafif hiperprolaktinemi tedavisinde kullanılabileceği düşünülmüştür [68].

Premenstrual sendrom şikayeti olan 18-45 yaş aralığındaki 175 kadının dahil edildiği randomize, çift kör klinik bir çalışma yapılmıştır. Bir gruba *Vitex agnus-castus* L. (VAC) preparatı (%60 etanollü *Vitex agnus-castus* L. ekstresi, 3,5-4,2 mg), diğer gruba ise piridoksin (vitamin B6) üç menstrual siklus boyunca verilmiştir. Piridoksin verilen gruba siklusun 1-15. günlerinde günde iki kez plasebo kapsül, 16-35. günlerinde günlük 2x100 mg dozda piridoksin verilmiştir. Diğer gruba ise her gün 1 kapsül *Vitex agnus-castus* L. ekstresi içeren preparat verilmiştir. Terapötik cevap premenstrual gerginlik sendromu (PMTS) değeri aracılığıyla ve Klinik Global İzlenim (CGI) skalası ile değerlendirilmiştir. Çalışma sonunda PMTS değeri ve CGI sonuçları her iki grupta

yaklaşık aynı değerlerde bulunmuştur. Bununla birlikte tipik şikayetlerin VAC grubunda daha çok azaldığı tespit edilmiştir. Çalışmadan elde edilen verilere göre, *Vitex agnus-castus* L. premenstrual sendrom tedavisinde piridoksin grubu kadar etkili ve güvenli bulunmuştur [63].

Almanya'da jinekoloji hekimleri PMS şikayeti olan 1634 hastayı dahil ettiği bir klinik çalışma yapmıştır. Çalışmada hastalara üç menstrual siklus boyunca günde 2 adet 1,6-3,0 mg ekstre içeren (20 mg droğa eşdeğer) *Vitex agnus-castus* L. kapsülleri verilmiştir. Üç dönemin sonunda premenstrual sendromun başlıca şikayetlerinin (depresyon, anksiyete, yeme isteği, aşırı ödem gibi) %93 azaldığı veya hiç kalmadığı tespit edilmiştir. Hastaların %81'i tedavi sonrası durumlarını çok iyi olarak belirtirken, doktorların %85'i VAC preparatının klinik etkisini iyi veya çok iyi olarak değerlendirmiştir [65].

Prospektif, çok merkezli bir çalışmada, premenstrual sendromlu hastalarda *Vitex agnus-castus* L.'nin etkinliği araştırılmıştır. VAC ekstresi içeren ürün 3 siklus boyunca kullanılmış ve ürünün PMS semptomlarını iyileştirdiği ve bir yan etki göstermediği tespit edilmiştir. Hastalar ürünü kullanmayı bıraktıktan sonra semptomların geri döndüğü bildirilmiştir. Uygulanan tedavinin premenstrual sendromun süresinden çok semptomların azalması açısından önemli olduğu belirtilmiştir [7].

Premenstrual sendromun tedavisinde VAC ekstresinin etkinliğini değerlendirmek amacıyla prospektif, açık etiketli bir çalışma yapılmıştır. Çalışmaya 18-44 yaşları arasındaki 69 hasta dahil edilmiştir. Hastalara 20 mg VAC ekstresi içeren preparat üç siklus boyunca günde bir kez verilmiştir. Sonuçlar vizüel analog skala (VAS) aracılığıyla hastalar tarafından kaydedilen on adet PMS semptomunun (sinirlilik, depresif ruh hali, öfke, baş ağrısı, şişkinlik, göğüste dolgunluk, cilt bozukluğu, yorgunluk, uyuşukluk ve uykusuzluk) yoğunluğuna göre değerlendirilmiştir. İlk menstrual siklustan itibaren toplam VAS skorunda istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlenmiştir ( $p < 0,001$ ). Çalışmadan elde edilen verilere göre yazarlar, VAC ekstresinin önemli bir yan etki olmaksızın PMS semptomlarını iyileştirdiğini raporlamıştır [69].

*Vitex agnus-castus* L. ekstresinin etkinliğini değerlendirmek amacıyla orta ve şiddetli PMS tanısı almış 67 kadının dahil edildiği, prospektif, randomize, çift kör, plasebo kontrollü bir çalışma yapılmıştır. Hastalar rastgele plasebo ve VAC olmak üzere 2

gruba ayrılmıştır. Sonuçlar PMS toplam skorunun yüzdesi ve dört semptom (olumsuz duygudurum, ödem, yeme isteği ve ağrı) faktörü skoru ile değerlendirilmiştir. VAC grubundaki PMS toplam skoru, plasebo grubundan anlamlı olarak düşük ( $p = 0,015$ ) bulunmuştur, özellikle olumsuz duygudurum ( $p = 0,047$ ) ve ödem ( $p = 0,036$ ) açısından farklılıklar bulunmuştur. İyileşme yüzdesi VAC grubunda % 80,1- 92,4 iken, plasebo grubunda % 48,9-73,7 olarak tespit edilmiştir [70].

Klinik çalışmalar, serotonin geri alım inhibitörlerinin (SRI) ve *Vitex agnus-castus* L. ekstresinin premenstrual disforik bozukluk (PMDD) tedavisinde etkili olduğunu göstermiştir. Bu bağlamda selektif serotonin geri alım inhibitörü olan fluoksetin ile *Vitex agnus-castus* L. ekstresinin etkisini karşılaştırmak amacıyla bir klinik çalışma yapılmıştır. Çalışmaya 24-45 yaşları arasında PMDD tanısı konulan 41 hasta dahil edilmiştir. Hastalar randomize olarak iki gruba ayrılmış, bir gruba 20-40 mg/gün fluoksetin, diğer gruba ise 20-40 mg/gün *Vitex agnus-castus* L. ekstresi iki ay boyunca verilmiştir. Sonuçlar Penn günlük semptom raporu, Hamilton depresyon değerlendirme ölçeği ve hastalığın klinik izlenim ve iyileşme değerinin ölçümü ile değerlendirilmiştir. *Vitex agnus-castus* L. ve fluoksetin grubunun her ikisi de benzer sonuçlar göstermiştir. Bununla birlikte, fluoksetin psikolojik semptomlar için daha etkiliyken, *Vitex agnus-castus* L. fizyolojik semptomlar için daha etkili bulunmuştur [71]. Hu ve ark., *Vitex rotundifolia* meyvelerinin etanol ekstresi ve *Vitex* türlerinin ana bileşenleri olan kastisin, luteolin, rotundifuran ve agnusitin östrojenik aktivitesini değerlendirmek amacıyla bir çalışma yapmıştır. Çalışmada *Vitex rotundifolia* ekstresi, agnusit ve rotundifuran bileşiklerinin östrojenik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Araştırmacılar bileşiklerin bu etkilerinden dolayı menopozun yanısıra premenstrual sendrom tedavisinde kullanılabileceğini, bununla birlikte bileşiklerin fizyolojik önemini değerlendirmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu belirtmişlerdir [11].

Kadınlarda premenstrual dönemde veya menstrual siklus süresince mastalji görülebilmektedir. Mastalji terimi memedeki ağrı, gerginlik veya sızı duyusunu tanımlamak için kullanılmaktadır [72]. Dinç ve Coşkun, premenopozal kadınlarda siklik mastalji tedavisinde VAC meyve ekstresi ve flurbiprofenin etkinliğini karşılaştırmak amacıyla prospektif bir çalışma yapmıştır [73]. Çalışmaya 114 hasta dahil edilmiş ve hastalar iki gruba ayrılmıştır. 3 ay boyunca bir gruba VAC meyve

ekstresi (40 mg/gün) verilmiş, diğer gruba ise flurbiprofen (200 mg/gün) uygulanmıştır. Üç aylık tedavi sonrasında hastaların ağrı değerlendirmesi vizüel analog skala (VAS) ile yapılmıştır. Çalışma sonunda iki grup arasında VAS skorlarında anlamlı fark çıkmamıştır. Araştırmacılar, her iki ilacın da şikayetleri önemli ölçüde azalttığını ve kabul edilebilir yan etkileri olduğunu belirtmişlerdir.

Beles ve ark., her siklusta en az 5 gün mastalji şikayeti olan 97 hastayı dahil ettikleri randomize, çift kör, plasebo kontrollü bir klinik çalışma yapmıştır. Hastaların yarısına (n=48) günde 2 kez 30 damla VAC ekstresi, diğer yarısına da (n=49) plasebo verilmiştir. Çalışma üç siklus boyunca devam etmiş ve VAC ekstresi ile tedavi başarısı büyük oranda ikinci siklustan sonra elde edilmiştir. VAC ekstresi verilen gruptaki hastaların % 71,4'ünde semptomlar ya tam olarak düzelmiş ya da iyileşme görülmüştür [5].

*Vitex agnus-castus* L. preparatının mastalji ve hiperprolaktinemi üzerine etkisini araştırmak amacıyla prospektif ve plasebo kontrollü klinik çalışma yapılmıştır [74]. Çalışmaya 19-54 yaş arası mastalji şikayeti olan 95 hasta dahil edilmiştir. Hastalar 3 gruba ayrılmış. Grup 1 siklik mastaljisi ve hiperprolaktinemisi olan hastalar, grup 2 ve 3 siklik mastaljisi ve prolaktin seviyesi normal olan hastalardan oluşmuştur. Grup 1'e 40 mg/gün VAC preparatı, grup 2'ye 15 mg/gün meloksikam, grup 3'e ise plasebo verilmiştir. Çalışma sonunda VAC preparatı alan grupta mastalji yoğunluğu plasebo grubuna göre anlamlı ölçüde azalmıştır ( $p < 0,0001$ ). Ayrıca prolaktin seviyesi tedavi öncesine göre anlamlı derecede azalmıştır ( $p < 0,0001$ ). Araştırmacılar çalışmadan elde edilen verilere göre, VAC preparatının mastalji ve hiperprolaktinemi tedavisinde etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Yapılan sistematik bir derlemede, kadın sağlığını araştıran randomize, kontrollü çalışmalardan *Vitex agnus-castus* L. (VAC) ekstrelerinin etkinliği ve güvenliğine ilişkin elde edilen veriler değerlendirilmiştir [75]. *Vitex agnus-castus* L. için randomize, kontrollü çalışmalar ya da klinik çalışmalar 8 veri tabanında araştırılmış ve 12 randomize, kontrollü çalışma değerlendirmeye alınmıştır. Çalışmalardan 8'inde premenstrual sendrom, 2'sinde latent hiperprolaktinemi ve 2'sinde premenstrual disforik bozukluk tedavisinde VAC ekstrelerinin etkisi incelenmiştir. PMS ile ilgili yapılan 8 araştırmanın 7 tanesinde VAC ekstreleri piridoksin, magnezyum oksit ve plasebo ile karşılaştırıldığında, tedavide ekstreinin daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

Premenstrual disforik bozuklukla ilgili yapılan bir çalışmada VAC ekstresinin fluoksetine eşdeğer düzeyde etkili olduğu görülürken, diğer çalışmada ise fluoksetinin etkisinin ekstreden daha iyi olduğu bildirilmiştir. Latent hiperprolaktinemi ile ilgili yapılan çalışmalardan birinde, VAC ekstresinin orta luteal progesteron ve 17 $\beta$ -östradiol seviyelerini arttırmada, TRH ile uyarılmış prolaktin sekresyonunu azaltmada ve kısaltılmış bir luteal fazı normalleştirmede plasebodan daha etkili olduğu bulunmuştur. Diğer çalışmada ise ekstrenin siklik mastaljiyi iyileştirmede ve serum prolaktin seviyelerini azaltmada bromokriptinden daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

#### 2.4.2 Antimikrobiyal aktivite

*Vitex agnus-castus* L. bitkisinden hazırlanan etanol, etil asetat, aseton ve kloroform ekstralarının antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Disk difüzyon metodu ile bazı Gram (+) ve Gram (-) bakteriler üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Çalışmadan elde edilen verilere göre bu metotla etanol ekstresinin diğer ekstrele göre daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği görülmüştür. Bitkiden elde edilen ekstralar araştırmada kullanılan Gram (+) bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Ancak ekstraların *Escherichia coli* dahil Gram (-) bakteriler ile maya kültürleri üzerine antimikrobiyal aktivite göstermediği tespit edilmiştir [76].

Arokiyaraj ve ark., *Vitex agnus-castus* L. yapraklarının hekzan, etil asetat, metanol ve sulu ekstralarının in vitro antibakteriyel aktivitesini incelemiştir. Etil asetat ekstresinin test edilen klinik patojenlere karşı güçlü antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ekstrenin fitokimyasal analiz sonucuna göre araştırmacılar, yüksek antibakteriyel etkinin bitkinin içerdiği flavonoidler, terpenoidler ve steroidlerden kaynaklanabileceğini belirtmiştir [77].

Taze hayıt yapraklarından elde edilen uçucu yağın antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Çalışmada bitkiden elde edilen uçucu yağın *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus subtilis* bakterilerine karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği ancak *Listeria monocytogenes* ve *Escherichia coli* üzerinde etkisinin olmadığı belirlenmiştir [78].

Yapılan başka bir çalışmada VAC meyvelerinden elde edilen uçucu yağın *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* olmak üzere Gram (+) veya Gram (-) sekiz farklı bakteri üzerindeki antibakteriyel aktivitesi incelenmiştir.

Meyvelerden elde edilen uçucu yağ önemli antibakteriyel aktivite göstermiştir. Buna ek olarak uçucu yağın Gram (+) bakterilere daha fazla antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir [79].

Denizli'den toplanan hayıt bitkisinin yaprak ve tohumlarından elde edilen esansiyel yağların antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Gram (+) *Staphylococcus aureus* ve *Micrococcus luteus* bakterileri ile Gram (-) *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterileri üzerine olan antimikrobiyal etkileri standart disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Çalışma sonucunda hayıt bitkisinin yaprak yağının tohum yağına göre daha yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Hayıttan elde edilen yağların test edilen Gram (+) ve Gram (-) bakteriler üzerine antimikrobiyal etkisinin olduğu görülmüştür [80].

### **2.4.3 Antioksidan aktivite**

Son zamanlarda çeşitli bilimsel araştırmalar, oksidatif stresin kanser, diyabet ve otoimmün hastalıklar gibi sayısız patolojinin gelişiminde önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur. Antioksidanlar, kararsız serbest radikalleri ortadan kaldıran ve dolayısıyla oksidasyon hızını engelleyen ve hücreleri hasardan koruyan moleküllerdir [81]. Bu biyoaktif moleküller çoğunlukla diyabet, Alzheimer hastalığı ve kanser gibi oksidatif stresle ilişkili hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için kullanılmaktadır [82]. Hayıt üzerine yapılan çeşitli çalışmalarla, hayıtın yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve bu amaçla kullanılabilceği bildirilmiştir.

Hayıt yaprak ve meyvelerinden elde edilen ekstrelerin antioksidan aktivitesini araştırmak amacıyla bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada bitkinin yaprak ve meyvelerinden elde edilen etanol, hekzan ve su ekstrelerinin antioksidan aktivitesi ABTS<sup>+</sup> (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) katyonu serbest radikalini yakalama yeteneğine göre değerlendirilmiştir. Ekstrelerin ABTS<sup>+</sup> katyonu serbest radikalini yakalama yeteneği 0.097-2.5 mM Trolox eşdeğeri/g olarak belirlenmiştir ve bitkinin içerdiği tanen ve flavonoidlerin bu etkiden sorumlu olabileceği belirtilmiştir. Buna ek olarak etanol ve su ekstrelerinin, hekzan ekstresinden daha güçlü antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir [83].

Yapılan bir başka çalışmada, Antalya'dan toplanan *Vitex agnus-castus* L. meyve ve yapraklarının metanollü ekstrelerinin antioksidan aktivitesi araştırılmıştır. Radikal

süpürücü aktivitesi 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) testi kullanılarak değerlendirilmiş ve ekstrelerin IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 0,612±0,004 mg/mL ve 0,449±0,001 mg/mL olarak bulunmuştur. Sonuç olarak meyve ve yaprakların belirgin derecede radikal süpürücü etki gösterdiği, bununla birlikte meyve ekstrelerinin daha yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca araştırmacılar bitkinin önemli flavonoit bileşenlerinden biri olan viteksinin meyve ve yapraklarda belirgin miktarlarda bulunduğunu ve ekstrelerin antioksidan potansiyelinden sorumlu olabileceğini belirtmişlerdir [84].

Sarıkürkçü ve ark., hayıt uçucu yağı ve çeşitli ekstrelerinin (diklorometan, hekzan, metanol, etil asetat ve su) antioksidan aktivitesini değerlendirmek amacıyla yaptıkları çalışmada, su ekstresinin uçucu yağa ve diğer ekstreler göre daha yüksek antioksidan aktivite (% 64-82) gösterdiğini ve toplam fenolik bileşen içeriğinin daha yüksek (112,46 ± 1,22 µg gallik asit eşdeğeri/mg ekstre) olduğunu tespit etmişlerdir [85]. En yüksek toplam flavonoit madde miktarı ise diklorometan ekstresinde görülmüştür. Araştırmacılar, antioksidan aktivite potansiyeli ile toplam fenolik ve flavonoit seviyeleri arasında pozitif bir korelasyon olduğunu tespit etmişlerdir. Bu nedenle polifenol, flavonoit ve tanenlerin hayıtın antioksidan aktivitesinden sorumlu potansiyel bileşikler olabileceğini bildirmişlerdir.

Negundosit, agnusit ve 6'-p-hidroksi benzoil mussanozidik asit Vitex türlerinde bulunan iridoit glikozitlerdir. *Vitex agnus-castus* L., *Vitex trifolia* L. ve *Vitex negundo* L.'nin başlıca biyoaktif bileşenleridir [86]. Tiwari ve ark., yaptıkları bir çalışmada *Vitex trifolia* L.'den bu bileşikleri izole etmiş ve in vitro antioksidan aktivitesini incelemiştir. Bileşiklerin antioksidan aktivitesini DPPH ve nitrik oksit radikalini süpürme etkisi, toplam antioksidan kapasite (TAC), ferrik iyon indirgeyici antioksidan güç (FRAP) ve indirgeme potansiyeli (RP) olmak üzere beş deney protokolü ile değerlendirmişlerdir. Çalışma sonunda bütün bileşiklerin DPPH ve nitrik oksit radikalini süpürücü etki gösterdiği, TAC testinde agnusit aktivite gösterirken negundosit ve 6'-p-hidroksi benzoil mussanozidik asitin aktivite göstermediği bulunmuştur. Bununla birlikte bileşiklerin FRAP ve RP testlerinde önemli aktivite göstermediği tespit edilmiştir. Çalışmadan elde edilen antioksidan aktivite sonuçlarına göre araştırmacılar, negundosit, agnusit ve 6'-p-hidroksi benzoil mussanozidik asitin proton verme yeteneğine sahip olduğunu ve serbest radikal süpürücü olarak kullanılabileceğini rapor etmişlerdir [87].

*Vitex agnus-castus* L. bitkisinden bir iridoit glikozit olan agnusit bileşiği izole edilmiş ve antioksidan aktivitesi DPPH, nitrik oksit, hidroksil radikallerini süpürücü etkisi üzerinden test edilmiştir. Agnusitin serbest radikal süpürücü etkisi, standart (BHA: Bütilhidroksianisol) ile karşılaştırıldığında önemli aktivite göstermiştir. Agnusitin 100 µg/mL konsantrasyonda DPPH, nitrik oksit ve hidroksil radikallerini inhibe etme yüzdesi sırasıyla % 68,11, % 69,88 ve % 70,83 olarak bulunmuştur. Çalışmanın sonuçlarına göre, *Vitex agnus-castus* L.'den izole edilen agnusit bileşiği önemli serbest radikal süpürücü etki göstermektedir. Bu nedenle araştırmacılar, agnusitin antioksidan olarak iyi bir terapötik değere sahip olabileceğini belirtmişlerdir [88].

#### **2.4.4 Antienflamatuvar aktivite**

*Vitex agnus-castus* L. yapraklarının çeşitli ekstralarının (petrol eteri, etil asetat, metanol ve su ekstresi) antienflamatuvar etkisi araştırılmıştır. Bitkinin TNF- $\alpha$  ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımını önemli ölçüde azaltarak antienflamatuvar etki gösterdiği tespit edilmiştir. Antienflamatuvar etkinin bitkinin içerdiği flavonoidlere bağlı olabileceği bildirilmiştir [89].

*Vitex agnus-castus* L. toprak üstü kısımlarının metanol ekstresinden 10 bileşik (artemetin, kastisin, 3,3'-dihidroksi-5,6,7,4'-tetrametoksi flavon, penduletin, metil 4-dihidroksibenzoat, p-hidroksibenzoik asit, metil 3,4-dihidroksibenzoat, 5-hidroksi-2-metoksbenzoik asit, vanillik asit ve 3,4-dihidroksibenzoik asit) izole edilerek bileşiklerin antienflamatuvar etkisi ve lipooksijenaz inhibitör aktivitesi araştırılmıştır [90]. P-hidroksibenzoik asit, metil 3,4-dihidroksibenzoat ve 3,4-dihidroksibenzoik asit bileşikleri belirgin derecede, kastisin ve penduletin bileşikleri ise orta derecede antienflamatuvar aktivite göstermiştir. Lipooksijenaz inhibisyon deneyinde ise kastisin bileşiği kuvvetli aktivite göstermiştir. *Vitex agnus-castus* L. bitkisinden elde edilen bu bileşikler potansiyel non-steroidal antienflamatuvar ajan olarak değerlendirilebilir.

*Vitex* cinsine ait birçok bitki, enflamatuvar hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Yapılan farmakolojik çalışmalarla, *Vitex* cinsinden izole edilen bazı terpenlerin önemli antienflamatuvar etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Agnusit, sıçanlarda karragenan, histamin ve dekstran ile indüklenen akut inflamasyon modellerinde önemli antienflamatuvar aktivite göstermiştir [12].

*Vitex peduncularis* kök kabuğunun butanol ekstresinden peduncularisit ve agnusit isimli iki iridoit izole edilmiştir. Bu iki iridoit murin hücre dizileri kullanılarak COX-1 ve COX-2 tarafından düzenlenen prostaglandin biyosentezinin inhibisyonu için test edilmiş ve hem peduncularisit hem agnusitin COX-1 üzerinde düşük inhibitör etkiye sahip olduğu, COX-2 üzerine seçici inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir [91].

#### 2.4.5 Antikanser etki

*Vitex agnus-castus* L. bitkisinden elde edilen ekstrelerin antikanser etkilerini değerlendirmek amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalarla *Vitex agnus-castus* L. meyvelerinden ve aynı familyadan olan *Vitex trifolia* L.'nin yaprak ve dallarından elde edilen çeşitli ekstrelerin farklı kanser hücre dizileri üzerinde sitotoksik [92-94] ve apoptotik [95-97] etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.

Aslantürk ve Çelik, *Vitex agnus-castus* L. tohumunun su, metanol, etil asetat, dietil eter, petrol eteri ekstrelerinin in vitro antikanser ve antioksidan etkilerini araştırmak amacıyla bir çalışma yapmıştır [98]. MCF-7 insan meme kanseri hücre hattında yapılan analizlerde DNA hasarı, apoptotik etki ve önemli sitotoksik etki gözlenmiştir. VAC tohum ekstrelerinin bu etkisinin konsantrasyona bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir.

Ohyama ve ark., insan kanser hücreleri üzerinde *Vitex agnus-castus* L. meyvesinin etanol ekstresinin etkisini incelemek amacıyla bir çalışma yapmıştır. Ekstrenin kolon karsinomu (COLO 201), gastrik signet ring karsinoması (KATO-III), insan uterin servikal kanal fibroblastı (HCF), yumurtalık kanseri (SKOV-3), meme karsinoması (MCF-7), insan embriyo fibroblastı (HE-21), servikal karsinom (SKG-3a) ve küçük hücreli akciğer karsinoması (Lu-134-AH) hücrelerine karşı sitotoksikite gösterdiği tespit edilmiştir. *Vitex agnus-castus* L. meyve ekstresinin, mitokondriyal membran hasarı ve artan hücre içi oksidasyondan kaynaklı apoptozise sebep olarak sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur [96, 99].

Weisskopf ve ark., VAC meyve ekstresinin insan kanser hücrelerinde antitümör aktivite göstermesinden hareketle bir araştırma yapmışlardır. Araştırmada ekstrenin üç farklı insan prostat epitel hücresi (BPH-1, LNCaP, PC-3) üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda ekstrenin üç prostat epitel hücre dizisinde hücre büyümesini inhibe ettiği ve apoptozise neden olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen verilere göre

araştırmacılar, ekstrenin hem benign prostat hiperplazisinde hem de insan prostat kanserinde koruyucu ve tedavi edici olabileceğini belirtmişlerdir [97].

İbrahim ve ark., *Vitex agnus-castus* L. meyve ekstresinin insan prostat kanseri hücre hattına (PC3) karşı etkisini araştırmış, ayrıca sıçanlarda kimyasal olarak indüklenen prostat kanseri üzerine etkisini in vivo olarak değerlendirmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlar, ekstrenin herhangi bir toksisite belirtisi olmadan apoptoz indüksiyonu ile prostat kanserini tedavi edebileceğini, ayrıca koruyucu bir ajan olarak iyi huylu prostat hiperplazisinde kullanıldığında prostat kanseri riskini azaltabileceğini göstermiştir [100].

*Vitex agnus-castus* L. meyve ve meyvesiz bitkilerinden hidrodistilasyon yöntemiyle elde edilen uçucu yağların sitotoksik etkilerini değerlendirmek amacıyla bir çalışma yapılmıştır [101]. Her uçucu yağın C6 glioma hücreleri, insan akciğer adenokarsinom hücreleri (A549) ve meme kanseri hücre serileri (MCF-7) üzerindeki sitotoksik ve apoptotik aktivitesi in vitro olarak değerlendirilmiştir. Meyve uçucu yağı, test edilen tüm kanser hücreleri üzerinde daha yüksek sitotoksik etki göstermiştir. MCF-7 hücre dizisinin her iki uçucu yağa da diğerlerine göre daha duyarlı olduğu bulunmuştur. Ayrıca meyve uçucu yağının hem A549 hem de MCF-7 hücre dizilerinde apoptozu indüklediği bulunmuştur.

*Vitex agnus-castus* L. bitkisinden bir iridoit glikozit olan agnusit bileşiği izole edilmiş ve COLO 320 kanser hücre hatları kullanılarak in vitro sitotoksik etkisi incelenmiştir [88]. Agnusit COLO 320 kanser hücrelerinde sitotoksik etki ( $IC_{50}=15.99 \mu\text{g/ml}$ ) göstermiştir.

#### **2.4.6 Hipoglisemik etki**

*Vitex agnus-castus* L.'nin toprak üstü kısımlarının (gövde ve yaprak) metanol ekstresinin hipoglisemik aktivitesini değerlendirmek amacıyla sıçanlar üzerinde bir çalışma yapılmıştır. Sıçanlar 55 mg/kg dozunda streptozotosin enjeksiyonuyla diyabetik hale getirilmiştir. Sıçanların toplam kolesterol, trigliserit, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) düzeyleri spektrofotometri ile belirlenmiş, daha sonra kan glikozu ölçülmüştür. *Vitex agnus-castus* L. metanol ekstresinin oral yoldan 300 mg/kg'lık dozda verilmesi sonucu 2 saat sonra kan glikozunu düşürdüğü ve 21 gün boyunca glisemide azalma ve lipit profilinde iyileşme

olduğu görülmüştür. Çalışmadan elde edilen bu sonuçlar, bitkinin antidiyabetik etkiye sahip olduğunu doğrulamaktadır [8].

*Vitex agnus-castus* L.'nin hidroalkolik ekstresinin D-galaktoza bağlı yaşlanmada hipoglisemik ve pankreas koruyucu etkilerini değerlendirmek amacıyla bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada 30-35 g ağırlığında fareler kullanılmış ve fareler kontrol, VAC hidroalkolik ekstresi, D-galaktoz, D-galaktoz + VAC hidroalkolik ekstresi, yaşlandırılmış, yaşlandırılmış + VAC hidroalkolik ekstresi grubu olmak üzere 6 gruba ayrılmıştır. Serum glikoz düzeyi kontrol grubuna göre VAC ve D-galaktoz + VAC grubunda azalmıştır. İnsülin düzeyi VAC grubunda artmış, D-galaktozda ve VAC ile tedavi edilmiş yaşlı farelerde ise kontrole kıyasla azaldığı gözlenmiştir. D-galaktoz, yaşlanma ve VAC hidroalkolik ekstre uygulanan gruplarda homeostatik model değerlendirme-tahmini insülin direncinin (HOMA-IR) arttığı gözlenmiştir. Bununla birlikte VAC hidroalkolik ekstresinin uygulanmasının D-galaktoz ile muamele görmüş fare gruplarında HOMA-IR'yi iyileştirdiği tespit edilmiştir. Yaşlı ve D-galaktoz gruplarında pankreas adacıklarının boyutu küçülmesine rağmen, VAC uygulaması ile düzelmiştir. Çalışmadan elde edilen veriler, doğal yaşlanan ve yaşlandırılmış fare modellerinde VAC hidroalkolik ekstresinin hipoglisemik ve pankreas koruyucu etkilere sahip olduğunu göstermiştir [102].

Berrani ve ark., *Vitex agnus-castus* L. bitkisinin farklı kısımlarının (yaprak, gövde, çiçek, kök ve tohum) metanol ekstrelerinin antidiyabetik, antioksidan ve antibakteriyel aktivitelerini değerlendirmek amacıyla bir çalışma yapmıştır. Antidiyabetik aktivite in vitro  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukosidaz enzim inhibisyonu deneyleri ile değerlendirilmiştir. Bitkinin farklı kısımlarının metanol ekstrelerinin  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukosidazın etkili inhibitörleri olduğu görülmüştür. Çiçek ( $IC_{50}=2921.84 \mu\text{g/mL}$ ) ve tohum ( $IC_{50}=2992.75 \mu\text{g/mL}$ ) ekstreleri  $\alpha$ -glukosidaza karşı ve yaprak ( $IC_{50}=2156.80 \mu\text{g/mL}$ ) ve kök ( $IC_{50}=2357.30 \mu\text{g/mL}$ ) ekstreleri ise  $\alpha$ -amilaza karşı daha yüksek etki göstermiştir. Çalışmanın sonuçları *Vitex agnus-castus* L. bitkisinin antidiyabetik biyoaktif bileşikler için umut verici bir kaynak olduğunu göstermiştir [103].

#### **2.4.7 Nöroprotektif etki**

Nörodejeneratif hastalıklar, sinir hücrelerindeki yapısal ve işlevsel dejenerasyon veya sinir hücrelerinin ölümü ile karakterize hastalıklardır. Alzheimer hastalığı en sık görülen nörodejeneratif bozukluklardan biridir ve hafıza kaybı, kognitif yeteneklerde

azalma, konuşma bozuklukları ve nöropsikiyatrik semptomlar gibi çeşitli belirtilerle karakterizedir. Nörodejeneratif hastalıkların kesin tedavisi bulunmamakla birlikte, son zamanlarda hastalığın prognozunu yavaşlatmak amacıyla bitkisel kaynaklı nöroprotektif ajanların kullanımı araştırılmaktadır [104]. Yapılan araştırmalarla *Vitex agnus-castus* L. bitkisinin antioksidan, antiinflamatuvar, nöroprotektif etkileri olduğu bildirilmiştir. Bir çalışmada sıçanlarda lipopolisakkarit ile indüklenen Alzheimer hastalığı benzeri semptomlara karşı bitkinin etkileri değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda bitki ekstresinin öğrenme ve hafızayı geliştirdiği tespit edilmiştir. Bu etkinin *Vitex agnus-castus* L. ekstresinin antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir [105].

Premenopozal dönemde kadınlarda inme sıklığı erkeklerden daha düşüktür. Östrojen premenopozal dönemde serebral iskemide güçlü bir nöroprotektif ajan olarak bilinmektedir. Yapılan çalışmalarla fitoöstrojenlerin *Vitex agnus-castus* L. gibi bazı bitki ekstrelerinde yüksek miktarda bulunduğu ve östrojenik ve antiinflamatuvar etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [106].

*Vitex agnus-castus* L. bitkisinin fitoöstrojenik özelliği dikkate alınarak yapılan bir çalışmada, bitki ekstresinin kalıcı orta serebral arter tıkanıklığı (pMCAO) modelinin indüklenmesinden sonra ovariektomize edilmiş fareler üzerindeki etkileri incelenmiştir [106]. Çalışmada fareler kontrol, Vitex ekstresi, Östrojen, Tamoksifen ve Tamoksifen-Vitex ekstresi olmak üzere 5 gruba ayrılmıştır. Orta serebral arteri koterize edilerek ovariektomize edilmiş farelerde inme indüklenmiş ve enfarktüs hacmi ve duyu-motor bozukluğu incelenmiştir. Ayrıca serum matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) ve interlökin-10 (IL-10) seviyeleri ölçülmüştür. Vitex ekstresi ve östrojenin uygulandığı farelerde, kontrol grubuna kıyasla enfarktüs hacminin ve nörolojik defisitlerin azaldığı bulunmuştur. Buna ek olarak Vitex ekstresinin MMP-9 seviyesini azaltarak ve serum IL-10 seviyesini artırarak serebral iskeminin zararlı etkilerini iyileştirdiği tespit edilmiştir. Çalışmadan elde edilen bulgulara göre, Vitex ekstresinin ovariektomize edilmiş farelerde orta serebral arter tıkanmasının ardından östrojene benzer nöroprotektif etkilere sahip olduğu rapor edilmiştir.

Ovariektomize edilmiş sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, VAC ekstresinin proenflamatuvar sitokin seviyesini düşürdüğü ve doku homeostazının

sürdürülmesinde önemli rol oynayan TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) seviyesini artırdığı tespit edilmiştir [107]. Ayrıca ekstrenin sıçan mikrogliya hücresi üzerinde antienflamatuvar ve nöroprotektif etki gösterdiği rapor edilmiştir.

#### 2.4.8 Diğer etkiler

*Vitex agnus-castus* L. bitkisinin diğer etkileri arasında kemopreventif, immünomodulatör, antiosteoporotik aktiviteler yer almaktadır [108]. Ayrıca böcek kovucu etki gösterdiği ve kırık iyileşmesinde faydalı olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir [109-111]. Bununla birlikte içerdiği bazı bileşenlerin antienflamatuvar, analjezik ve sedatif özellikler gösterdiği de bilinmektedir [108].

*Vitex agnus-castus* L. meyvesinin n-hekzan ve metanol ekstrelerinin kemoprevensiyon potansiyellerini değerlendirmek için bir çalışma yapılmıştır. Ekstrelerin kemoproventif aktiviteye sahip olduğu ve bu etkiden bitkinin içerdiği vitetrifolin D ve vitexlaktam C bileşiklerinin sorumlu olduğu belirlenmiştir [112].

*In vivo* olarak yapılan bir çalışmada, sağ tibia kırığı olan tavşanlarda *Vitex agnus-castus* L. meyvelerinin etanol ekstresinin kırık iyileşmesinin erken döneminde faydalı olduğu gösterilmiştir. Bu etkiden bitkinin zengin flavonoit içeriğinin sorumlu olabileceği düşünülmüştür [111]. Orşiektomize edilmiş sıçanlarla yapılan bir başka çalışmada, *Vitex agnus-castus* L. etanol ekstresi osteoprotektif etkiler göstermiştir [113]. Bitkinin kortikal ve trabeküler kemiği koruduğu ve hormon replasman tedavisi (HRT) için güvenli bir alternatif olabileceği bildirilmiştir.

*Vitex agnus-castus* L. tohum ekstresinin kan emici böceklerin saldırılarını engelleme potansiyellerini araştırmak için bir çalışma yapılmıştır [114]. Ekstrenin özellikle insanların ve hayvanların maruz kaldığı *Rhipicephalus sanguineus* ve *Ixodes ricinus* kenelerine karşı böcek kovucu etkiye sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca ekstrenin sivrisinekleri ve pireleri yaklaşık 6 saat boyunca uzak tuttuğu gözlenmiştir.

#### 2.5 Analiz Yöntemleri

Agnusit, negundosit ve 6'-p-hidroksi benzoil mussanozidik asit *Vitex* türlerinde bulunan iridoit yapısında biyoaktif bileşiklerdir [86]. Tiwari ve ark, yaptıkları bir çalışmada agnusit, negundosit ve 6'-p-hidroksi benzoil mussanozidik asitin eşzamanlı analizi için basit, kesin ve tekrarlanabilir bir analitik yöntem geliştirmişlerdir [87]. Çalışmada *Vitex trifolia* L.'den bileşikler izole edilmiş ve bitkisel hammaddelerin ve

formülasyonların analiz çalışmalarında yaygın olarak kullanılan Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (HPTLC) yöntemi ile analizi gerçekleştirilmiştir. Standart karışım, tüm analitler ve numune çözeltileri, TLC plakalarına bant şeklinde uygulanmıştır. Plakalar, petrol eteri (60-80)/toluen/aseton/su (10:10:80:2 v/v/v/v) çözücü sistemi kullanılarak bir CAMAG ikiz oluk geliştirme tankında  $25 \pm 2$  °C'de tutulmuş ve 263 nm'de kurutulduktan sonra CAMAG TLC tarayıcı III ile 263 nm dalga boyunda taranmıştır. Geliştirilen yönteme göre bu 3 bileşiğin 58,14-72,22 ng olmak üzere hassas düzeyde tespit limiti elde edilmiş ve agnusit için tayin sınırı 212,75 ng olarak bulunmuştur.

Hoberg ve ark., *Vitex L.* cinsinin kemotaksonomik bir belirteci olan agnusit [115] ve p-hidroksibenzoik asitin (PHBA) belirlenmesi için ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) yöntemi geliştirmişlerdir [116]. Çalışmada *Vitex agnus-castus L.* meyvelerinin metanol ekstresi ile çalışılmıştır. Kromatografik ayırma, 1,3 mL/dk akış hızında, hareketli faz olarak asetonitril ve % 0,5 fosforik asit çözeltisi kullanılarak ve 258 nm'de 23 dakika içinde gradient elüsyon modu ile gerçekleştirilmiştir. Ters fazlı HPLC-DAD ile yapılan analizde agnusit 7.8-8.1 dakika arasında ve PHBA 2,0-2,3 dakika arasında gözlenmiştir.

*Vitex negundo L.* ve *Vitex trifolia L.* ekstrelerinde agnusit, negundosit ve p-hidroksibenzoik asitin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi için izokratik yüksek performanslı sıvı kromatografisi-Photo-Diode Array (HPLC-PDA) yöntemi geliştirilmiştir [117]. Kromatografik ayırma, RP-18 kolonu (4,6 mm x 250 mm, 5 µm) ile izokratik elüsyon modunda gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak asetonitril:%0,05 trifloroasetik asit (15:85) ve 1 mL/dk akış hızında çalışılmıştır. Dedektör dalga boyu, *Vitex negundo L.* ve *Vitex trifolia L.*'nin farklı ekstrelerinde 3 bileşiğin de belirlenmesi için 258 nm'ye ayarlanmıştır. Geliştirilen yönteme göre agnusit, negundosit ve p-hidroksibenzoik asitin tespit limiti sırasıyla 2,5, 2,5 ve 1,0 µg/mL, aynı şekilde tayin sınırı ise 5,0, 5,0 ve 2,5 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Araştırmacılar geliştirilen bu yeni yöntem ile *Vitex* türlerinde bulunan bu bileşiklerin 25 dakikalık bir analiz süresinde eş zamanlı olarak tanımlanıp miktarının belirlenebileceğini belirtmişlerdir.

Shah ve ark., yaptıkları başka bir çalışmada *Vitex negundo L.* ve *Vitex trifolia L.*'nin farklı ekstrelerinde (metanol, hekzan, kloroform, su ve etil asetat) agnusit ve p-hidroksibenzoik asitin tayini için ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi

(RP-HPLC) yöntemini kullanmışlardır [118]. Kromatografik ayırma, izokratik koşullar altında, RP-18 kolonu (250 mm x 4 mm, 5 µm) üzerinde, 1,0 mL/dk akış hızında, hareketli faz olarak asetonytril ve %0,5 o-fosforik asit-su (15:85) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PDA dedektörü dalga boyu, farklı *Vitex negundo* L. ve *Vitex trifolia* L. ekstrelerinde agnusit ve p-hidroksibenzoik asitin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi için 254 nm'ye ayarlanmıştır. Bu yöntemle göre agnusit ve p-hidroksibenzoik asit için tespit limitleri sırasıyla 2,5 ve 10 µg/mL, aynı şekilde tayin sınırları da 5 ve 25 µg/mL olarak bulunmuştur.

Patil ve Laddha, *Vitex negundo* L.'nin metanollü ekstresinden agnusit miktarının belirlenebilmesi için HPLC yöntemi araştırmak amacıyla bir çalışma yapmışlardır [119]. Çalışmada ayrıca geri akış (reflux), ultrasonikasyon, maserasyon ve mikrodalga destekli ekstraksiyon tekniklerinin verimlilikleri de karşılaştırılmıştır. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen yaprak ekstresi metanol ile çözündürüldükten sonra HPLC ile analizi gerçekleştirilmiştir. Kromatografik ayırma, asetonytril ve %0,5 orto-ftalaldehit (OPA) içeren su (18:82) mobil fazı ile, 1,0 mL/dk akış hızında ve 254 nm'de gerçekleştirilmiştir. Optimum ayırma 30°C'de elde edilmiştir. Agnusit için en yüksek verim mikrodalga destekli ekstraksiyon tekniği ile elde edilmiştir. Kullanılan HPLC yöntemine göre agnusit için tespit limiti 2,085 µg/mL, tayin sınırı ise 6,138 µg/mL olmak üzere hassas düzeyde sonuçlar elde edilmiştir. Geliştirilen yöntem agnusitin bitki ekstrelerinden ve formülasyonlardan kantitatif analizi için doğrulanmıştır.

Högner ve ark., *Vitex agnus-castus* L. meyvelerinde ve bu bitkiden elde edilen bitkisel tıbbi ürünlerde bulunan uçucu olmayan fitokimyasalların (iridoitler, flavonoidler, diterpenler) eşzamanlı analizi için yeni bir ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi / Diod Array Dedektör (UHPLC-DAD) yöntemi geliştirmişlerdir [120]. Referans madde olarak kullanılacak 7 bileşik (3,4-dihidroksibenzoik asit, p-hidroksibenzoik asit, agnusit, 5-hidroksikaempferol-3,6,7,4'-tetrametileter, 1,2-dibenzoik asit glukoz, metoksi-viteksilakton ve vitetrifolin D) *Vitex agnus-castus* L. metanollü ekstresinden izole edilmiştir. Kromatografik ayırma, 20 dakika içinde 1,8 µm partikül boyutuna sahip C18 (50 mm x 2,1 mm) UHPLC kolonu ile gerçekleştirilmiştir. 0,6 mL/dk akış hızında, mobil faz olarak %0,5 asetik asit (v/v) ve asetonytril kullanılarak gradient elüsyon modu ile çalışılmıştır. Analitlerin tespiti 210

nm ve 260 nm'de gerçekleştirilmiştir. Bileşiklerin tespit limitleri 0,1-1,4 µg/mL aralığında, tayin sınırları ise 0,7-12,4 µg/mL aralığında bulunmuştur.

## 2.6 Farmakokinetik Çalışmalar

Farmakokinetik, kısaca vücudun ilaca ne yaptığı olarak bilinmektedir. Farmakokinetik bilim dalı, bir ilacın canlıya uygulanmasını takiben ilacın vücutta absorpsiyonu, dağılımı, metabolizması ve atılımı gibi parametreleri incelemektedir [121, 122]. Farmakokinetik çalışmalar her ilaç için bu parametrelerin belirlenmesini sağlayarak ilacın dozu, uygulama yolu, kullanım şekli, kullanım süresi gibi ilacın pozolojisi hakkında bilgi elde edilmesini sağlamaktadır [122]. İlacın kullanım koşullarını belirleyen farmakokinetik özelliklere ruhsatlandırma öncesi yapılan prelinik ve klinik araştırmalarla erişilmektedir [123].

Bir ilaçtan istenen etkinin elde edilebilmesi için öncelikle ilacın uygulama yerinden yeterli miktarda emilmesi ve etki yerine ulaşması gerekmektedir. Uygulama yerinin kan akım hızı, yüzey geçirgenliği gibi uygulama yerine ait özellikler ve ilacın lipofilikliği, molekül büyüklüğü, iyonizasyonu, farmasötik şekli gibi ilaca ait özellikler ilacın absorpsiyonunu ve biyoyararlanımını etkilemektedir [124, 125]. Uygulama yerinden emilen ilaç, vücutta dağılmakta ve plazma proteinlerine bağlanmaktadır. Ardından ilaç karaciğer ya da diğer dokulardaki enzimler tarafından biyotransformasyona uğratarak metabolitlerine dönüştürülmektedir. Son olarak da ilaç veya metaboliti vücuttan idrar, ter, tükürük, akciğerler, safra, feçes gibi atılım yoluyla uzaklaştırılmaktadır [123].

Chen ve ark., *Vitex trifolia* L.'nin kurutulmuş olgun meyve ekstraktlarının (su ve etanol ekstresi) oral yoldan uygulanmasından sonra sıçan plazmasında agnusit, 10-O-vanillo okubin, luteolin ve kistininin eş zamanlı tespiti için ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi (UHPLC-MS/MS) yöntemi geliştirmişlerdir [126]. Geliştirilen yöntem ardından farmakokinetik çalışmaya uygulanmıştır. Yöntemde kromatografik ayırma, C18 kolonu (2,1 x 50 mm, 1,7 µm) kullanılarak, 0,3 mL/dk akış hızında, % 0,1 formik asit-su:asetonitril mobil fazı ile gradient elüsyon modunda gerçekleştirilmiştir. Yönteme göre etanollü ekstrede 10-O-vanillo okubin tespit edilememiştir, onun dışındaki diğer bileşenler plazmada her iki ekstrede tespit edilmiştir. Farmakokinetik çalışma için 250 g ağırlığında 12 adet erkek sıçan rastgele 2 gruba ayrılmış; bir gruba oral yoldan 2,5 g/kg sulu ekstre uygulanmış,

diğer gruba ise 0,58 g/kg dozunda etanolik ekstre verilmiştir. Belirli aralıklarla kan örneği alınmış ve kan örnekleri santrifüj edilerek plazmaları ayrılmıştır. Sulu ekstreden elde edilen agnusitin plazmadaki maksimum konsantrasyonu ( $C_{max}$ )  $79,1 \pm 24,0$  ng/mL olarak bulunmuş, plazmada maksimum agnusit konsantrasyonuna  $0,88 \pm 0,19$  saatte ulaşılmıştır. Etanollü ekstreden elde edilen agnusitin  $C_{max}$  değeri ise  $5,03 \pm 0,94$  ng/mL olarak tespit edilmiş, plazmada maksimum agnusit konsantrasyonuna  $1,63 \pm 1,38$  saatte ulaşılmıştır.

Ramakrishna ve ark., Vitex cinsinin kemotaksonomik belirteci olan agnusitin fare plazmasında ve çeşitli dokularda (karaciğer, bağırsak, dalak, böbrek, kalp, akciğerler ve beyin) tayini ve farmakokinetiği için sıvı kromatografisi / tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) yöntemi geliştirmişlerdir [59]. Kromatografik ayırma, C18 kolonunda (100 x 2,1 mm, 5  $\mu$ m), %0,1 formik asit-asetonitril:%0,1 formik asit-su (92:8) mobil fazı ile, 0,7 mL/dk akış hızında ve izokratik elüsyon modunda gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen yöntem, farelere intravenöz ve oral uygulamayı takiben plazma ve dokulardaki agnusit konsantrasyonlarını ölçmek için kullanılmıştır. Plazma ve dokulardaki maksimum agnusit konsantrasyonu 139,2-62582,3 ng/g olarak bulunmuş ve maksimum agnusit konsantrasyonuna 30-45 dakikada ulaşılmıştır. Oral ve intravenöz uygulamadan elde edilen verilere göre agnusitin mutlak biyoyararlanımı % 0,7 olarak hesaplanmıştır.

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler, Cihazlar ve Ekipman**

##### **3.1.1 Kimyasal maddeler ve çözücüler**

Çalışmada aşağıdaki kimyasal maddeler ve çözücüler kullanılmıştır:

Castonex® Kapsül (Anti Naturel Besin ve Bitkisel Destek Ürünleri Sanayi ve Ticaret A.Ş.)

Agnusit (Merck, USP Reference Standard CAS No: 11027-63-7)

Metanol (HPLC saflığında) (Merck, Darmstadt, Almanya)

Hekzan (HPLC saflığında) (Merck, Darmstadt, Almanya)

Asetonitril (HPLC saflığında) (Merck, Darmstadt, Almanya)

Ortofosforik asit (%85, ağ./ağ.) (Analitik saflıkta) (Merck, Darmstadt, Almanya)

Trifloroasetik asit (HPLC saflığında) (Merck, Darmstadt, Almanya)

Formik asit (%96-98 ağ./ağ.) (Analitik saflıkta) (Merck, Darmstadt, Almanya)

Diklorometan (HPLC saflığında) (Merck, Darmstadt, Almanya)

Sodyum hidroksit (HPLC saflığında) (Merck, Darmstadt, Almanya)

Ultra saf su (HPLC saflığında)

##### **3.1.2 Çözeltiler**

###### **3.1.2.1 Hareketli faz çözeltisi**

Agnusitin analizi için kullanılan hareketli faz çözeltisi 350 mL metanol üzerine 650 mL % 0,1 oranında formik asit içeren ultra saf su ilave edilerek, son hacim 1000 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Degaze edildikten sonra 5 µm filtreden süzüldü. Metanol:su (% 0,1 formik asit) (35:65) (h/h) karışımı izokratik elüsyonda kullanılmıştır.

### 3.1.2.2 Standart çözeltiler

*Agnusit stok çözeltisi:*

1 mg agnusit tam olarak tartılıp, 10 mL'lik balonjojeye aktarıldı, yaklaşık 5 mL metanol eklenerek 10 dakika ultrasonik banyo yardımıyla çözüldürüldü ve metanol ile hacmine tamamlandı (0,1 mg/mL agnusit'e eşdeğer). Agnusit stok çözeltisi +4 °C' de yaklaşık 1 ay boyunca dayanıklıdır.

*Agnusit stok çözeltisinin seyreltilmesi ile hazırlanan standart çözeltiler:*

Doğrusallık çalışması için 6 farklı konsantrasyonda standart çözeltiler hazırlandı. Bu çözeltiler agnusitin stok çözeltisinden metanol ile uygun miktarlarda seyreltilmeler ile 5-125 µg/mL aralığında olacak şekilde hazırlandı.

### 3.1.3 Aletler ve diğer gereçler

- Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazı (Shimadzu Corporations-Japonya)
- İnertsil® ODS-3 C18 kolon (150 mm × 4,6 mm × 5 µm) (Shim-Pack, Shimadzu Corporations-Japonya)
- İnertsil® ODS-3 C18 kolon (250 mm × 4,6 mm × 5µm) (Shim-Pack, Shimadzu Corporations-Japonya)
- UV-görünür bölge spektrofotometre (Hitachi-Japonya)
- Santrifüj cihazı (Nüve-Türkiye)
- Terazî (Shimadzu Corporations-Japonya)
- Vorteks karıştırıcı (Velp Scientifica-İtalya)
- Ultrasonik banyo (VBR-Kanada)
- Ultra saf su cihazı (Younglin Instruments-Kore)
- Otomatik pipetler (10 µL-100 µL ve 100 µL-1000 µL'lik) (Eppendorf-Almanya)
- Hareketli faz süzme ünitesi (Milipor, 5µm)
- Enjektör (2 mL, 5 mL)
- HPLC enjeksiyon öncesi filtreleri (0,45 µm)
- Balon jojeler (5 mL, 10 mL, 50 mL ve 100 mL'lik) (Isolab-Almanya)
- Reaksiyon tüpleri (Vidalı, kapaklı 10 mL'lik) (Isolab-Almanya)
- Dereceli ve transfer pipetler (Isolab-Almanya)

- Preparatif yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazı (Waters-ABD)
- NMR Spektrometresi 500 MHz Avance NEO (Bruker-Fällanden)
- Yazılımlar; LC Solution Programı, MS Office Word Programı ve MS Office Excel Programı

### 3.2 Plazmadan Analitin Ekstre Edilmesi İşlemi

Plazma örneklerinden yapılan ilaç analizlerinde maddenin yüksek verimle ekstre edilmesi ve plazma proteinlerinden ve girişim yapabilecek diğer maddelerden uzaklaştırılması için sıvı-sıvı ekstraksiyonu tekniği kullanılmıştır. Öncesinde plazma proteinlerinden gelebilecek girişimleri en aza indirmek amacıyla asetonitril, metanol ve NaOH ile plazma proteinlerini çöktürme yöntemi denenmiştir. Ardından en yüksek verimle ekstre elde edebilmek için çeşitli çözücüler ve çözücü hacimleri ile sıvı-sıvı ekstraksiyon tekniği denenmiştir. Tüm denemeler sonucunda, sıvı-sıvı ekstraksiyon tekniğinde diklorometan ile ekstraksiyonun en verimli olacağı saptanmıştır. Aşağıda denen çözücüler ve çözücü hacimleri listelenmiştir.

**Tablo 3.1 :** Plazmadan analitlerin ekstraksiyonu için denen çözücüler ve çözücü hacimleri.

Ekstraksiyon Çözücüsü	Ekstraksiyon Sayısı
Kloroform (5 mL)	1 kere (5 mL)
Diklorometan (5 mL)	1 kere (5 mL)
Hekzan (5 mL)	1 kere (5 mL)
Hekzan:izoamil alkol (10:1)	1 kere (5 mL)
Kloroform (5 mL)	2 kere (2,5'ar mL)
Diklorometan (5 mL)	2 kere (2,5'ar mL)
Hekzan (5 mL)	2 kere (2,5'ar mL)
Hekzan:izoamil alkol (10:1)	2 kere (2,5'ar mL)

#### *Sıvı-sıvı ekstraksiyonu:*

500 µL plazma örneğine standart agnusit çözeltisinden katım yapıldı. Vorteks karıştırıcı ile bir dakika karıştırıldıktan sonra 5 mL diklorometan çözeltisinden ilave edildi. Bir dakika daha vorteks ile karıştırıldıktan sonra 15 dakika (x1) 4000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası diklorometanlı faz alınarak azot akımında uçuruldu.

Kalıntı 1 mL metanol çözeltisinde çözündürüldükten sonra filtreden süzüldü ve HPLC sistemine enjekte edildi. Sonuç Bölüm 4.1.1’de verilmiştir.

### **3.3 Agnusitin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Analizi**

Agnusitin HPLC ile analizi için UV-görünür bölge spektrometrik dedektör ile maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyu belirlenmiştir. Daha sonra kromatografik koşullar optimize edilmiştir. Kolon özellikleri (yapısı, boyu, iç çapı, partikül boyutu), kolon sıcaklığı, hareketli faz içeriği ve oranları, akış hızı, akış profili, enjeksiyon hacmi gibi kromatografik koşullar belirlenmiştir. Akabinde geliştirilen yöntem valide edilmiştir.

#### **3.3.1 Kromatografik koşulların belirlenmesi**

İlk olarak agnusitin metanoldeki çözeltilerinin spektrofotometre ile UV-görünür bölgede maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyu belirlendi. Belirlenen maksimum dalga boyu kullanılarak HPLC cihazında, farklı uzunlukta (15 ve 25 cm) ve yarı çapta (2,1 ve 4,6 mm) ve farklı partikül boyutu (1-5 µm) olan kolonlar ve çeşitli hareketli fazlar (% 0,1 formik asit-asetonitril:% 0,1 formik asit-su, metanol: %0,1 formik asit-su, metanol: % 0,4 trifloroasetik asit-su, asetonitril: % 0,5 ortofosforik asit-su) farklı oranlarda kullanılarak ön denemeler yapıldı. Farklı enjeksiyon hacimleri, farklı kolon sıcaklıkları, değişik akış hızları ve profilleri için de denemeler yapıldı. Uygun kromatografik koşullar belirlendikten sonra validasyon işlemleri için çalışıldı. Geliştirilen yöntem hayıt ekstraktları ve preparatları ile katılmış ve içilmiş plazma numunelerinde agnusitin kantitatif analizi için kullanıldı. Elde edilen veriler Bölüm 4.2’ de yer almaktadır.

### **3.4. Yöntem Validasyonu**

Yöntem geliştirme işlemi tamamlandıktan sonra analitik yöntemin validasyonu ICH kılavuzu Q2 (R1)’e göre yapıldı [127].

#### **3.4.1 Seçicilik**

Boş plazmadan ve hareketli faz çözeltisinden kaynaklanan herhangi bir girişim olup olmadığını incelemek amacıyla seçicilik çalışması yapıldı. Elde edilen verilere göre pikin saflık değeri ve buna ait kromatogramlar Bölüm 4.3.1’de gösterilmiştir.

### 3.4.2 Tayin ve gözlenebilme sınırı

Geliştirilen yöntemin hassasiyetini tayin etmek için kalibrasyon eğrisinin eğimi (m) ve y eksenini kestiği nokta verilerinden yararlanarak gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) değerleri aşağıdaki formüller yardımıyla hesaplandı. Hesaplanan değerler Bölüm 4.3.2’de verilmiştir.

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

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

SD: Kalibrasyon doğrusunun y kesişiminin standart sapması

m: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

### 3.4.3 Doğrusallık

ICH’ye göre doğrusallık aralığı en az 5 nokta ile belirlenmelidir [127].

Doğrusallık aralığının görülebilmesi için agnusitin 6 farklı konsantrasyonunu içeren çözeltiler hazırlandı ve analizleri yapıldı. Kromatogramlardan elde edilen pik alanlarından konsantrasyona karşılık doğrusallık grafikleri çizildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3.3’te gösterilmiştir.

### 3.4.4 Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik

Agnusit stok çözeltisinden hareketle metanol kullanılarak üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek) agnusit (10, 50 ve 75 µg/mL) içeren kalite kontrol çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltiler ile çalışıldı. Analizler aynı gün (gün içi) ve 3 farklı günde (günler arası) 3 tekrar olacak şekilde yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3.4’te gösterilmiştir.

### 3.4.5 Doğruluk

Geliştirilen yöntemin doğruluğu standart katma yöntemi kullanılarak saptandı. Bunun için 25 µg/mL konsantrasyonlardaki agnusit numune çözeltileri üzerine 5, 50, 75 µg/mL konsantrasyonunda (kalite kontrol çözeltileri adı verilen ve düşük, orta, yüksek konsantrasyonlar olarak nitelendirilen) agnusit standart çözeltilerinden ilave edildi. Elde edilen alan değerleri daha önceden hazırlanan ölçü eğrisi denkleminde yerine konularak konsantrasyonlar hesaplandı. Geri kazanım değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3.5’te verilmiştir.

$$\% \text{ Geri kazanım} = [(C_t - C_u)] / C_a] \times 100$$

C<sub>t</sub>: bulunan toplam analit konsantrasyonu

C<sub>u</sub>: numunede standart katmadan önce bulunan analit konsantrasyonu

C<sub>a</sub>: ilave edilen analit konsantrasyonu

### **3.4.6 Sağlamlık**

Sağlamlık testi ile yöntemin küçük modifikasyonlardan etkilenip etkilenmediği test edilmiştir. Yöntemin sağlamlık testi için 3 parametresi belirlendi. Bunlar; kolon sıcaklığı değişikliği ( $\pm 3$  °C), akış hızı değişikliği ( $\pm 0.2$  mL/dk) ve hareketli faz oranlarıdır. Her konsantrasyon için analizler 3 kez tekrarlandı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3.6'da verilmiştir.

### **3.4.7 Çözelti stabilitesi**

Agnusit çözeltilerinin stabilitesinin belirlenmesi için standart çözeltiler ve plazma numune çözeltileri, karanlıkta 24 saat, otomatik numune örnekleyicisinde 24 saat ve +4 °C'de 1 ay süreyle bekletildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3.7'de gösterilmiştir.

## **3.5 Kromatogram Üzerinde Belirlenen Agnusit Maddesinin Yapısının**

### **Aydınlatılması**

Agnusit bileşiğine ait olan pike ait fraksiyonu toplamak için geliştirilen ve valide edilen yöntem koşulları preparatif HPLC'ye uyarlanmıştır. Analitin yapı tayini için retansiyon zamanında gelen fraksiyonlar toplanarak başlıca nükleer manyetik rezonans (NMR) deneyleri (<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-APT NMR, HSQC ve HMBC) yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.4'te gösterilmiştir.

## **3.6 Agnusitin Farmasötik Preparatta Analizi**

### **3.6.1 Geliştirilen yöntem ile analizi**

10 adet Castonex® kapsül toz halinde tartılıp, ortalama bir kapsül ağırlığı bulundu. 1 kapsül ağırlığına (1 kapsül: 425,7 mg) eşdeğer miktarda kapsül tozu tartılarak, 100 mL'lik balon jöjeye aktarıldı. 50 mL metanol eklenerek 30 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Metanol ile hacmine tamamlandı (4,257 mg/mL) ve 0,45 µm filtreden süzüldü. Süzüntüden 100 µL balon jöjeye alınıp balon jöjede 100 mL'ye metanolla seyreltildi

(4,257 µg/mL). Analiz işlemi 3 kez tekrarlandı. Kapsüllerdeki agnusit miktarı daha önceden hazırlanan ölçü eğrisine ait doğru denkleminde hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.5.1’de verilmiştir.

### 3.6.2 Kıyas yöntemi ile analizi

Kıyas yöntemi olarak ‘Validated HPLC method for identification and quantification of p-hydroxy benzoic acid and agnuside in *Vitex negundo* and *Vitex trifolia*’ (ref no: [118]) yayın metodu belirlendi.

10 adet Castonex® kapsül toz halinde tartılıp, ortalama bir kapsül ağırlığı bulundu. 1 kapsül ağırlığına (1 kapsül: 425,7 mg) eşdeğer miktarda kapsül tozu tartılarak, 100 mL’lik balon jøjeye aktarıldı. 50 mL metanol eklenerek 30 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Metanol ile hacmine tamamlandı (4,257 mg/mL) ve 0,45 µm filtreden süzöldü. Süzöntüden 100 µL balon jøjeye alınıp balon jøjede 100 mL’ye metanolla seyreltildi (4,257 µg/mL). Analiz işlemi 3 kez tekrarlandı. Kapsüllerdeki agnusit miktarı bu metotla daha önceden hazırlanan ölçü eğrisine ait doğru denkleminde hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.5.2’de verilmiştir.

### 3.7 Biyoyararlanım ve Farmakokinetik Çalışmalar

*Vitex agnus-castus* L. bitkisinde bulunan agnusit bileşığının insan plazmasında sıvı kromatografik analizi ve biyoyararlanımının incelenmesi için öncelikle Bezmialem Vakıf Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onay alındı (No: 17/9). 26 yaşındaki sağlıklı bir kadın gönöüllüye, 750 mg tek bir oral doz Castonex® kapsül oral yolla verildi. Analizler için kan örnekleri (5 mL) kapsül verilmeden önce (0. saat, kontrol) ve verildikten 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 saatlerde alınarak EDTA’lı tüplere aktarıldı. Plazmanın ayrılmasını sağlamak amacıyla 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Plazma örnekleri analiz edilinceye kadar -20 °C’de saklandı.

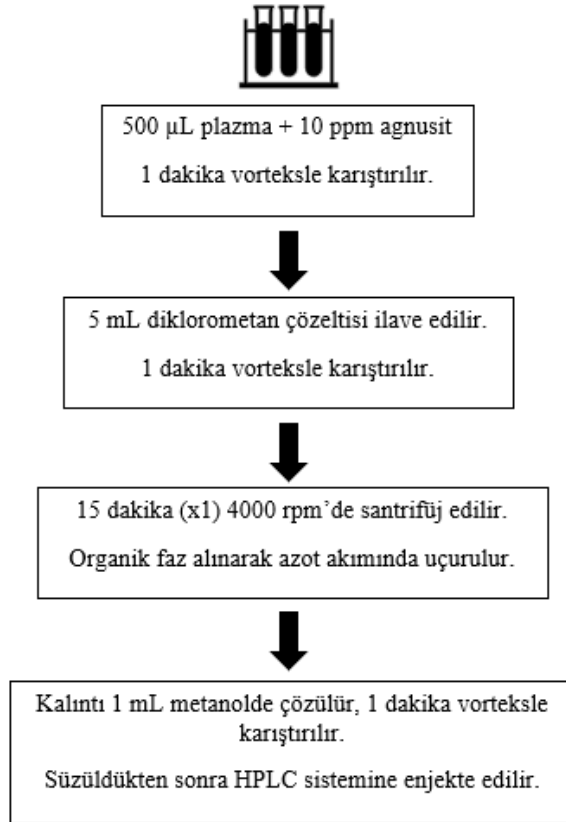
## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1 Agnusitin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Analiz

#### Sonuçları

##### 4.1.1 Plazmadan ekstraksiyon işlemi

Bölüm 3.2’de anlatıldığı şekilde, farklı organik çözücülerle (hekzan, hekzan:izoamil alkol (10:1), diklorometan, kloroform) sıvı-sıvı ekstraksiyonu denemeleri yapıldı. Yapılan denemeler sonucunda agnusitin plazmadan ekstraksiyonu için en yüksek verimi sağlayan diklorometan kullanılmasına karar verildi. Geliştirilen örnek hazırlama metodu Şekil 4.1’de verilmiştir.

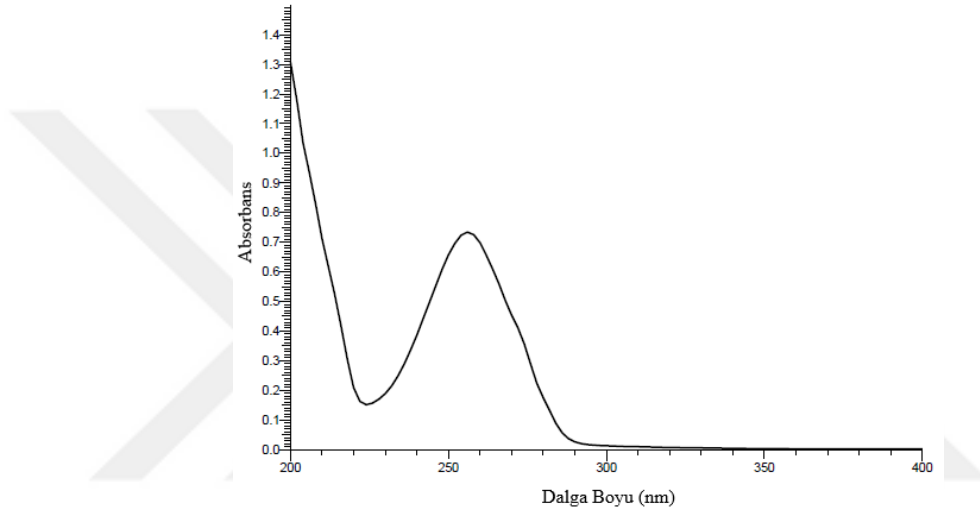


Şekil 4.1 : Plazmadan ekstraksiyon işlemi.

## 4.2 Kromatografik Koşulların Belirlenmesi

### 4.2.1 Dedeksiyonun belirlenmesi

Kromatografik ayırma ve koşulların belirlenmesinden önce uv-vis. spektrofotometrede 200-600 nm dalga boyunda agnusitin metanoldeki maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyu (258 nm) belirlenmiştir. 258 nm’de yapılan ölçümlerde yüksek seçicilik elde edilmesi sebebiyle bu dalga boyunda çalışılmıştır. Agnusitin spektrumu Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.2 : Agnusitin metanol çözeltisinin UV-görünür bölgede gözlenen absorpsiyon spektrumu.

### 4.2.2 Kromatografik ayırma koşullarının belirlenmesi

Agnusitin HPLC ile analizinin yapılabilmesi için, dedektör dalga boyu belirlenmesinin ardından, optimum ayırma gücü ve en verimli ayırmayı sağlayacak durgun ve hareketli fazın seçimi, kolon özellikleri (yapısı, boyu, iç çapı, partikül boyutu), hareketli faz içeriği, hareketli faz oranları, akış profili, akış hızı, kolon sıcaklığı, enjeksiyon hacmi gibi kromatografik koşullar aşağıdaki gibi belirlenmiştir.

Agnusit analizi için HPLC sistem parametreleri:

- Durgun faz (Kolon): C18 (150 mm × 4,6 mm × 5 µm)
- Mobil faz: metanol:su (% 0,1 formik asit) (35:65, h/h izokratik akış)
- Akış hızı: 0,6 mL/dk
- Enjeksiyon hacmi: 20 µL

- Fırın sıcaklığı: 25 °C
- Akış profili: izokratik akış

10 µg/mL standart agnusit çözeltisine ait kromatogram Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Alıkonma (Retansiyon) zamanı  $9.7 \pm 0,01$  dakikadır.

#### 4.2.3 Kromatografik sistem parametreleri

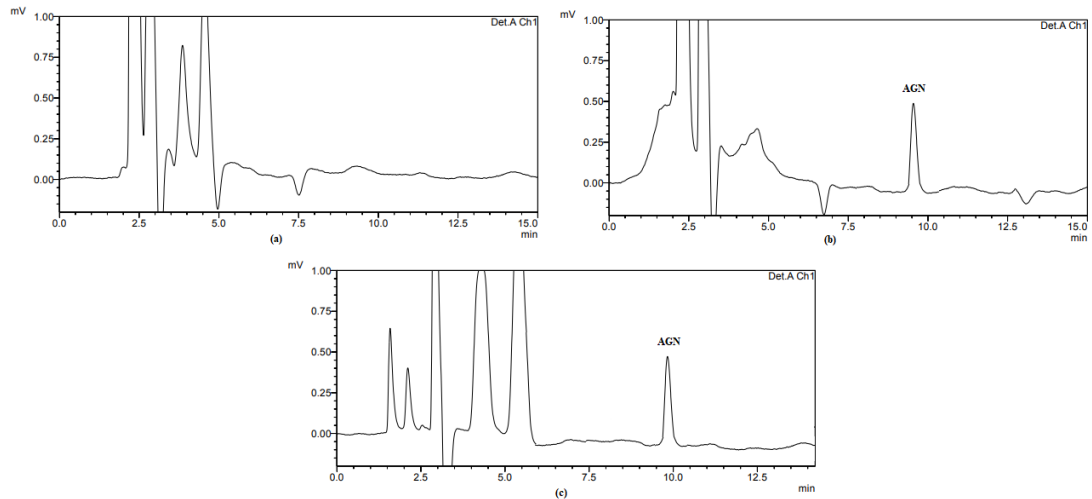
Parametre*	kapasite faktörü	resolüsyon	HETP	kuyruklanma faktörü	asimetri faktörü
Agnusit analizi için değerler	2,4	2,62	55,73	1,15	1,6

\* kalibrasyon eğrisine ait tüm noktalara ait verilerin ortalama değeridir.

#### 4.3 Yöntem Validasyonu

##### 4.3.1 Seçicilik

Şekil 4.3'te (a): boş plazma numunesi, (b): 100 µg/mL agnusit eklenmiş plazma, (c): *Vitex agnus-castus* L. ekstresinin gönüllüye oral uygulanmasının 1 saat ardından alınan plazma numunesine ait kromatogramlar belirtilmiştir. Alıkonma zamanı  $9,7 \pm 0,01$  dakikadır.



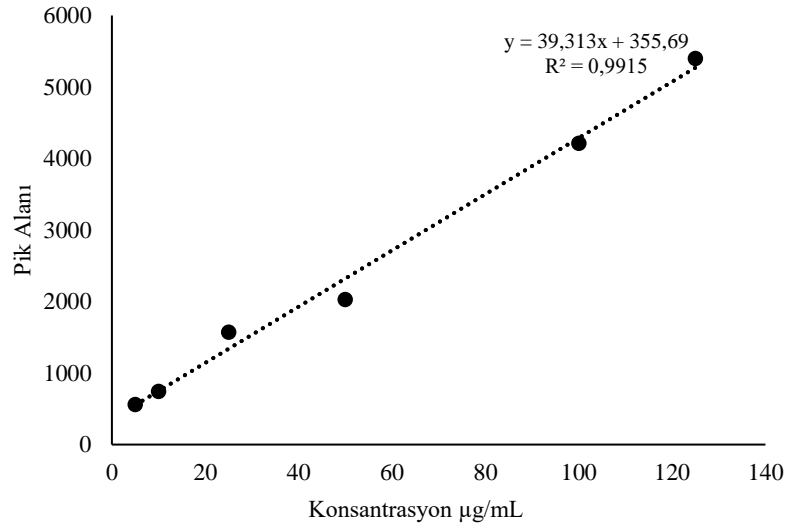
**Şekil 4.3 :** (a): Boş plazma numunesi, (b): 100 µg/mL agnusit eklenmiş plazma ve (c): *Vitex agnus-castus* L. ekstresinin gönüllüye oral uygulanmasının 1 saat ardından alınan plazma numunesine ait kromatogramlar.

### 4.3.2 Tayin sınırı (LOQ) ve gözlenebilme sınırı (LOD)

Bölüm 3.4.2’de verilen denklemlere göre agnusit için hesaplanan LOD değeri 1,17 µg/mL ve LOQ değeri ise 3,91 µg/mL olarak bulunmuştur.

### 4.3.3 Doğrusallık

Agnusit stok çözeltisinden uygun metanol miktarıyla seyreltilerek hazırlanan 6 farklı konsantrasyondaki standart çözeltiler, 5-125 µg/mL konsantrasyon aralığında olacak şekilde çalışıldı. Her konsantrasyona karşı elde edilen ortalama pik alan değerleri yardımı ile belirtilen konsantrasyon değerleri arasında çizilen ölçü eğrisi Şekil 4.4’te gösterilmiştir.



**Şekil 4.4 :** Agnusitin 5-125 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi.

Tablo 4.1’de pik alanları (A), SD ve RSD değerleri, en küçük kareler yöntemi uygulanarak hesaplanan doğru denklemi ( $A = mC + b$  [m = eğim, b = kesim noktası, C = konsantrasyon]) ve korelasyon katsayısı (r) verilmiştir. Tablo 4.2’de ise 6 tekrarlı çalışma sonucu elde edilen her bir ölçü eğrisinin regresyon analizine ait parametreler yer almaktadır.

**Tablo 4.1 :** Agnusitin 5-125 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alanı değerleri ve istatistik veriler.

A \ C	5	10	25	50	100	125
1	553	752	1497	2133	4293	5476
2	535	753	1771	2015	4421	5459
3	583	738	1501	1979	3917	5267
4	553	703	1698	1956	4503	5344
5	577	772	1399	2062	3922	5457
<b>Ortalama</b>	560,2	743,6	1573,2	2029	4211,2	5400,6
<b>SD</b>	19,62	25,71	154,97	70,58	276,6	91,28
<b>% RSD</b>	3,50	3,46	9,85	3,48	6,57	1,69

Ortalama alan (A) değerlerinden hesaplanan doğru denklemi:

$$A = 39,313C + 355,69 \quad (r= 0,9915)$$

**Tablo 4.2 :** Ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler.

	1	2	3	4	5	Ortalama	SD	RSD
<b>Eğim</b>	40,219	40,091	37,498	40,008	38,75	39,313	1,175	2,988
<b>Kesim noktası</b>	339,18	387,57	362,18	359,06	330,44	355,69	22,25	6,255
<b>R değeri</b>	0,9956	0,9853	0,989	0,985	0,9883	0,9915		

#### 4.3.4 Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik

Plazma örneklerinin çözeltileri 10, 50 ve 75 µg/mL agnusit miktarı Bölüm 4.1.1’de anlatıldığı gibi çalışıldı.

Aynı gün içinde yapılan analizlere ait bağıl standart sapma değerleri % 0,12 – 4,2 arasında hesaplandı (Tablo 4.3).

Farklı günlerde yapılan analizler sonucunda elde edilen bağıl standart sapma değerleri ise % 2,91 – 6,35 arasında bulundu (Tablo 4.3).

**Tablo 4.3 :** Aynı gün içinde ve farklı günlerde yapılan analizlerin tekrarlanabilirliği.

Gün içi (n=3)			Günler arası* (n=3)		
Alınan Konsantrasyon (µg/mL)	Bulunan Konsantrasyon (µg/mL)	RSD (%)	Alınan Konsantrasyon (µg/mL)	Bulunan Konsantrasyon (µg/mL)	RSD (%)
10	11,33	4,2	10	12,69	6,35
50	53,88	1,14	50	46,15	3,76
75	78,4	0,12	75	77,02	2,91

\*Üç farklı günde elde edilen sonuçlar

#### 4.3.5 Doğruluk

Geliştirilen yöntemin doğruluğunu saptamak için standart katma yöntemi uygulandı. Bunun için Bölüm 3.4.5'te anlatıldığı gibi çalışıldı.

Sonuçların geri kazanım yüzdeleri  $(C_t - C_u) \times 100 / C_a$  formülünden hesaplandı. Burada;

C<sub>t</sub>: Bulunan toplam agnusit konsantrasyonu,

C<sub>u</sub>: Plazma numunesinden alınan analit konsantrasyonu,

C<sub>a</sub>: İlave edilen standart çözeltisinin konsantrasyonudur.

Geri kazanım değerleri % aralığında ve %RSD değerleri ile bulundu (Tablo 4.4).

**Tablo 4.4 :** Standart katma yöntemine ait analiz sonuçları.

<b>Alınan Konsantrasyon (µg / mL)</b>	<b>İlave edilen Konsantrasyon (µg / mL)</b>	<b>Bulunan Konsantrasyon (µg / mL) (Ortalama ± SD)</b>	<b>Geri Kazanım (%)</b>	<b>RSD (%)</b>
25	5	32,09 ± 1,63	106,96	1,005
	50	74,4 ± 1,10	99,2	3,26
	75	98,09 ± 2,64	98,09	6,26

*n*=3

#### 4.3.6 Sağlamlık

Yöntemin sağlamlığını belirlemek için metanol:su (% 0,1 formik asit) (35:65, h/h) olan mobil faz oranı 37:63 ve 33:67 olarak, 0,6 mL/dk olan akış hızı 0,5 mL/dk ve 0,8 mL/dk olarak ve 25 °C olan kolon sıcaklığı 22 °C ve 28 °C olarak değiştirilerek standart çözeltileriyle her konsantrasyon için analizler 3 kez tekrarlandı. Pik alanlarında ve agnusit piklerinin resolüsyon değerlerinde anlamlı bir fark görülmedi ve tüm koşullar arasında en yüksek % RSD değeri 6,57 olarak bulundu (Tablo 4.5).

**Tablo 4.5 :** Sağlamlık çalışması sonuçları.

<b>Koşul</b>	<b>Oran</b>	<b>Geri Kazanım (%)</b>	<b>RSD (%)</b>
<b>Akış hızı (mL/dk)</b>	0,5	95,98	5,26
	0,8	95,3	5,20
<b>Mobil faz bileşimi (metanol: %0.1 formik asit-su)</b>	37:63	86,85	5,39
	33:67	97,12	1,21
<b>Kolon sıcaklığı (°C)</b>	22	87,03	4,03
	28	98,25	6,57

*n*=3

#### 4.3.7 Çözelti stabilitesi

Agnusitin laboratuvar numunesi olarak metanoldeki kalite kontrol çözeltilerinin, oda sıcaklığında karanlıkta 24 saat, otomatik numune örnekleyicisinde 24 saat ve +4 °C'de

1 ay stabil kaldığı saptanmıştır. Agnusitin test edilen tüm koşullar altında kararlı olduğu bulunmuştur.

**Tablo 4.6 :** Agnusit standart çözeltilerine ait stabilite sonuçları.

Uygulama	Geri kazanım (ortalama±SD) (%)	RSD (%)
Oda sıcaklığında, karanlıkta 24 saat bekleme	93,28	1,02
Buzdolabında +4°C de 1 ay bekleme	96,85	1,59
Otomatik numune örnekleyicisinde 24 saat bekleme	92,58	1,83

*n=3*

#### 4.4 Kromatogram Üzerinde Belirlenen Agnusit Maddesinin Yapısının Aydınlatılması

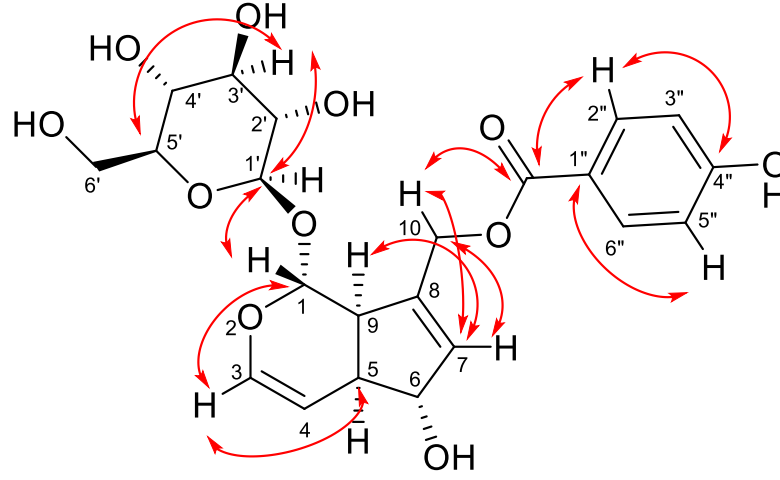
Analitin yapısının aydınlatılması amacıyla retansiyon zamanında toplanan fraksiyonların <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-APT NMR, HSQC NMR ve HMBC NMR spektrumları sırasıyla Ek A'da verilmiştir. Analite ait <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-APT NMR analizine ait parametreler Tablo 4.7'de; HSQC NMR ve HMBC NMR analizine ait parametreler Tablo 4.8'de yer almaktadır. Analite ait HMBC korelasyonları Şekil 4.5'te gösterilmiştir.

**Tablo 4.7 :** Agnusit bileşiminin <sup>1</sup>H-NMR ve <sup>13</sup>C-APT NMR analizine ait parametreler.

Pozisyon	<sup>1</sup> H NMR (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) δ ppm	Sinyal Yarılması ve Etkileşim Sabitleri	<sup>13</sup> C NMR (125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) δ ppm
1	4.98	d, <i>J</i> = 7.3 Hz	96.55
3	6.33	dd, <i>J</i> = 6.1, 2.0 Hz	140.38
4	5.11	dd, <i>J</i> = 6.1, 3.9 Hz	104.14
5	2.69	dddd, <i>J</i> = 7.7, 5.8, 3.9, 2.0 Hz	45.02
6	4.46	dt, <i>J</i> = 5.6, 1.9 Hz	81.57
7	5.84 - 5.77	m	131.07
8	-	-	141.51
9	3.00 - 2.96	m	47.15
10a	5.08	d, <i>J</i> = 15.10 Hz	62.30
10b	4.91	d, <i>J</i> = 15.10 Hz	62.30
1'	4.69	d, <i>J</i> = 7.9 Hz	98.87
2'	3.27	3.36-3.23 m, 4H (çözücü sinyalinin altında kaldığı için HSQC ve HMBC den tespit edildi.)	76.98
3'	3.23		73.55
4'	3.29		69.93
5'	3.36		76.62
6'a	3.84	dd, <i>J</i> = 12.0, 2.1 Hz	61.39
6'b	3.64	dd, <i>J</i> = 12.0, 5.4 Hz	61.39
1''	-	-	120.72
2''	7.91	d, <i>J</i> = 8.8 Hz	131.57
3''	6.84	d, <i>J</i> = 8.8 Hz	114.87
4''	-	-	162.31
5''	6.84	d, <i>J</i> = 8.8 Hz	114.87
6''	7.91	d, <i>J</i> = 8.8 Hz	131.57
Karbonil	-	-	166.42

**Tablo 4.8** : Agnusit bileşiminin HSQC NMR ve HMBC NMR analizine ait parametreler.

Pozisyon	<sup>1</sup> H NMR	<sup>13</sup> C NMR	HSQC korelasyonları <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C NMR δ ppm	HMBC korelasyonları <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C NMR δ ppm
1	4.98	96.55	4.98-96.39	H1-C1' = 4.98-98.87 H1-C9 = 4.85-47.71
3	6.33	140.38	6.33-140.38	H3-C5 = 6.33-45.02 H3-C1 = 6.33-96.39 H3-C4 = 6.33-104.14
4	5.11	104.14	5.11-104.14	-
5	2.69	45.02	2.72-45.02	-
6	4.46	81.57	4.46-81.57	-
7	5.84 - 5.77	131.07	5.84-131.07	H7-C9 = 5.82-47.15 H7-C5 = 5.82-45.02 H7-C10 = 5.82-62.30 H7-C6 = 5.82-81.57
8	-	141.51	-	-
9	3.00 - 2.96	47.15	2.98-47.15	H9-C7 = 2.98-131.07 H9-C8 = 2.98-141.51 H9-C1 = 2.98-96.39 H9-C6 = 2.98-81.57
10a	5.08	62.30	5.08-62.30	H10a-C8 = 5.08-141.51 H10a-C <sub>karbonil</sub> = 5.08-166.42
10b	4.91	62.30	4.91-62.30	H10b-C7 = 4.91-131.07 H10b-C8 = 4.91-141.51 H10b-C <sub>karbonil</sub> = 4.91-166.42
1'	4.69	98.87	4.69-98.87	H1'-C1 = 4.69-96.39
2'	3.27	76.98	3.27-76.98	-
3'	3.23	73.55	3.23-73.55	H3'-C5' = 3.23-76.62 H3'-C1' = 3.23-98.87
4'	3.29	69.93	3.29-69.93	H4'-C5' = 3.29-76.62
5'	3.36	76.62	3.36-76.62	H5'-C4' = 3.36-69.93
6'a	3.84	61.39	3.84-61.39	-
6'b	3.64	61.39	3.64-61.30	-
1''	-	120.72	-	-
2''	7.91	131.57	7.91-131.57	H2''-C3'' = 7.91-114.80 H2''-C4'' = 7.91- 162.38 H2''-C <sub>karbonil</sub> = 7.91- 166.12
3''	6.84	114.87	6.84-114.87	H3''-C3'' = 6.84-114.80 H3''-C1'' = 6.84-120.72 H3''-C4'' = 6.84-162.38
4''	-	162.31	-	-
5''	6.84	114.87	6.87-114.87	-
6''	7.91	131.57	7.91-131.57	-
Karbonil	-	166.42	-	-



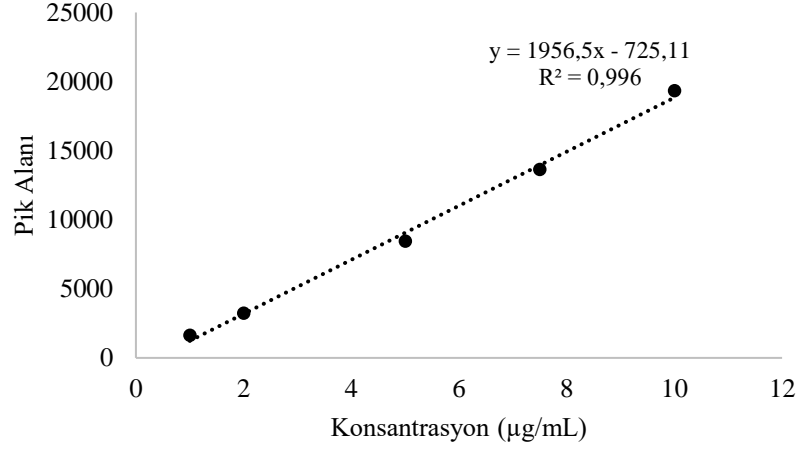
**Şekil 4.5 :** Agnusit bileşiğinin HMBC korelasyonları.

Analitin retansiyon zamanlarında toplanan fraksiyonlarının NMR analiz sonuçları yapının agnusit olduğunu doğrulamaktadır. [128] ve [129] kaynakları referans alınarak yapılan değerlendirmeler sonucunda NMR spektrumları ve analiz sonucu elde edilen değerler yapı ile uyum içersindedir.

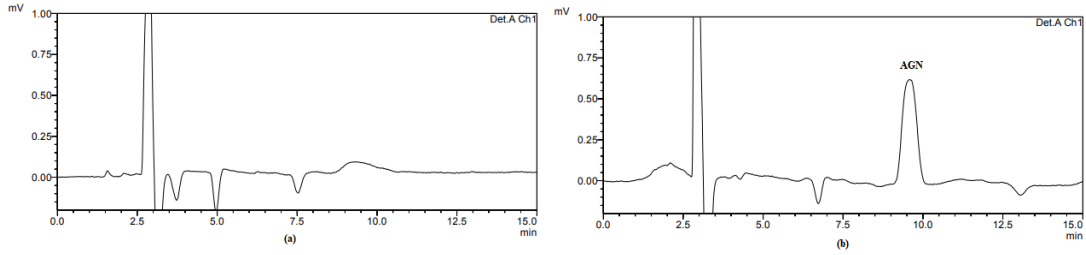
#### **4.5 Agnusitin Farmasötik Preparatta Analizi**

##### **4.5.1 Geliştirilen yöntem ile analizi**

Agnusit stok çözeltisinden metanolle seyreltilerek hazırlanan 5 farklı konsantrasyondaki standart çözeltiler, 1-10 µg/mL konsantrasyon aralığında olacak şekilde çalışıldı. Her konsantrasyona karşı elde edilen ortalama pik alan değerleri yardımı ile belirtilen konsantrasyon değerleri arasında çizilen ölçü eğrisi Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Şekil 4.7'de (a): sulu ortam boş denemesine, (b): 10 µg/mL standart (sulu) agnusit çözeltisine ait kromatogramlar belirtilmiştir.



**Şekil 4.6 :** Agnusitin 1-10 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi.



**Şekil 4.7 :** (a): sulu ortam boş denemesine, (b): 10 µg/mL standart (sulu) agnusit çözeltisine ait kromatogramlar

Tablo 4.9’de pik alanları (A), SD ve RSD değerleri, en küçük kareler yöntemi uygulanarak hesaplanan doğru denklemi ( $A = mC + b$  [ $m =$  eğim,  $b =$  kesim noktası,  $C =$  konsantrasyon]) ve korelasyon katsayısı ( $r$ ) verilmiştir. Tablo 4.10’da ise 6 tekrarlı çalışma sonucu elde edilen her bir ölçü eğrisinin regresyon analizine ait parametreler yer almaktadır.

**Tablo 4.9 :** Agnusitin 1-10 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alanı değerleri ve istatistik veriler.

A \ C	1	2	5	7,5	10
1	1568	3279	8375	13221	19274
2	1599	3233	8446	13158	19243
3	1626	2898	8552	13763	19315
4	1624	3283	8356	13614	19232
5	1699	3247	8563	14103	19600
6	1642	3398	8361	14005	19309
<b>Ortalama</b>	1626,3	3223	8442,2	13644	19328,8
<b>SD</b>	44,0	169,51	95,08	392,73	137,02
<b>% RSD</b>	2,71	5,26	1,13	2,88	0,71

Ortalama alan (A) değerlerinden hesaplanan doğru denklemi:

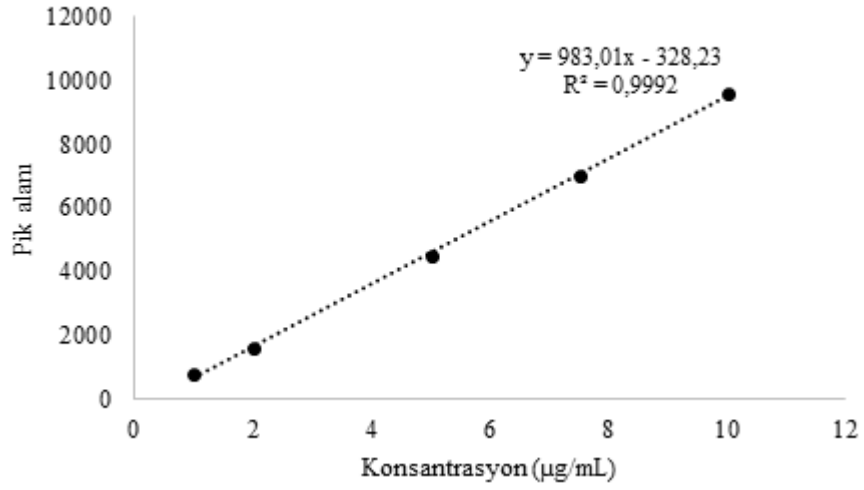
$$A = 1956,5C - 725,11 \quad (r= 0,996)$$

**Tablo 4.10 :** Ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler.

	1	2	3	4	5	6	Ortalama	SD	RSD
<b>Eğim</b>	1934,9	1929,7	1978,1	1943,8	1992,9	1959,5	1956,5	25,08	1,28
<b>Kesim noktası</b>	724,63	705,48	757,5	691,36	721,24	750,46	725,11	25,42	3,51
<b>R değeri</b>	0,9942	0,9943	0,9967	0,9957	0,9964	0,9959	0,996		

#### 4.5.2 Kıyas yöntemi ile analizi

Agnusit stok çözeltisinden uygun metanolla seyreltilerek hazırlanan 5 farklı konsantrasyondaki standart çözeltiler, 1-10 µg/mL konsantrasyon aralığında olacak şekilde Bölüm 3.6.2 de anlatıldığı şekilde çalışıldı. Her konsantrasyona karşı elde edilen ortalama pik alan değerleri yardımı ile belirtilen konsantrasyon değerleri arasında çizilen ölçü eğrisi Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.8 :** Agnusitin 1-10 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi.

Tablo 4.11’de pik alanları (A), SD ve RSD değerleri, en küçük kareler yöntemi uygulanarak hesaplanan doğru denklemi ( $A = mC + b$  [ $m =$  eğim,  $b =$  kesim noktası,  $C =$  konsantrasyon]) ve korelasyon katsayısı ( $r$ ) verilmiştir. Tablo 4.12’de ise 6 tekrarlı çalışma sonucu elde edilen her bir ölçü eğrisinin regresyon analizine ait parametreler yer almaktadır.

**Tablo 4.11 :** Agnusitin 1-10 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alanı değerleri ve istatistik veriler.

A \ C	1	2	5	7,5	10
1	642	1448	4414	7164	9455
2	795	1623	4435	7039	9676
3	801	1545	4441	7052	9428
4	801	1532	4490	6992	9671
5	852	1681	4485	6979	9575
6	814	1601	4517	6993	9613
<b>Ortalama</b>	784,2	1571,7	4463,7	7036,5	9569,7
<b>SD</b>	72,65	81,27	39,49	68,82	106,49
<b>% RSD</b>	9,26	5,17	0,88	0,98	1,11

Ortalama alan (A) değerlerinden hesaplanan doğru denklemi:

$$A = 983,01C + 328,23 \quad (r= 0,9992)$$

**Tablo 4.12 :** Ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler.

	1	2	3	4	5	6	Ortalama	SD	RSD
<b>Eğim</b>	995,74	988,82	971,61	990,86	970,01	981,04	983,01	10,58	1,07
<b>Kesim noktası</b>	353,68	329,38	301,79	356,19	332,63	295,73	328,23	23,32	7,71
<b>R değeri</b>	0,999	0,9988	0,9992	0,9987	0,9991	0,9992	0,9992		

#### 4.5.3 Geliştirilen yöntemin kapsüllerde agnusit tayinine uygulanması ve sonuçların kıyas yöntemi ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması

375 mg hayıt ekstresi içeren Castonex ® kapsüller Bölüm 3.6.1’de anlatıldığı şekilde hazırlanarak yeni geliştirilen HPLC yöntemiyle analiz edildi. Sonuçları kıyaslamak amacıyla kapsüller Bölüm 3.6.2’de 117 ref no’lu yayın yöntemiyle de analiz edildi.

Her iki yöntemle elde edilen sonuçlar ve 6 analiz üzerinden hesaplanan ortalamalar (A), standart sapmalar, % RSD ve güven aralığı değerleri Tablo 4.13'te verilmiştir.

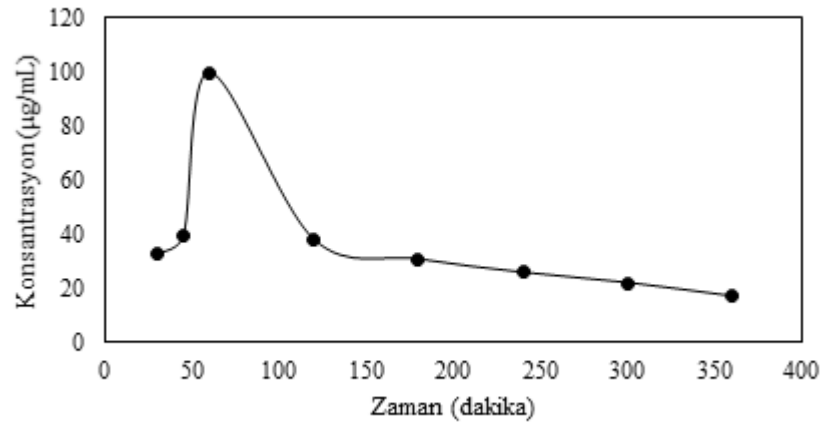
Geliştirilen yöntem ve kıyas yöntemi ile elde edilen sonuçların ortalamalar yönünden karşılaştırılması student (t) testi, standart sapmalar yönünden karşılaştırılması ise Fischer (F) testi uygulanarak yapıldı. Tablo 4.13'teki sonuçlar incelendiğinde hesaplanan t ve F değerleri, ilgili istatistiksel cetvellerde bildirilen kritik değerlerden daha küçük olduğu için geliştirilen HPLC yöntemi ile kıyas yöntemi arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlendi.

**Tablo 4.73 :** Agnusit içeren kapsüllerin analiz sonuçları ve sonuçların istatistiki olarak değerlendirilmesi.

n	Geliştirilen Yöntem	Varolan Yöntem [117]
	$\mu\text{g/kapsül}$	$\mu\text{g/kapsül}$
1	3,64	3,53
2	3,66	3,53
3	3,67	3,68
4	3,85	3,51
5	3,74	3,61
6	3,75	3,71
Ortalama	3,72	3,60
Standart sapma	0,078	0,085
% RSD	2,10	2,37
Güven aralığı	$\pm 0,06$	$\pm 0,07$
Güven sınırları	3,66-3,78	3,53-3,67
t = 0,75		$t_{\text{tablo}} = 2,228$
F = 1,187		$F_{\text{tablo}} = 4,28$

#### 4.6 Farmakokinetik Çalışma Sonuçları

Bölüm 3.7'de anlatıldığı şekilde elde edilen sağlıklı gönüllüye ait plazma örnekleri TOPFİT 2.0 farmakokinetik ve farmakodinamik veri analiz programı kullanılarak hesaplanan hayıt ekstresine ait farmakokinetik parametre sonuçları Tablo 4.14'te verilmiştir. Plazmada agnusit konsantrasyonunun zamana karşı değişimi ise Şekil 4.9'da verilmiştir.



**Şekil 4.9 :** Plazmada agnusit konsantrasyonunun zamana karşı değişimi.

**Tablo 4.84 :** 750 mg hayıt ekstresinin uygulanmasından sonra agnusitin farmakokinetik parametreleri.

Parametre	Bulunan değer
$t_{maks}^a$ (h)	1
$C_{maks}^b$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	99,64
$t_{1/2}^c$ (h)	4,2
$AUC^{d}_{0-6}$ ( $\mu\text{g h mL}^{-1}$ )	12411,7
$AUC^{d}_{0-\infty}$ ( $\mu\text{g h mL}^{-1}$ )	12624

<sup>a</sup>Maksimum konsantrasyona ulaşma süresi

<sup>b</sup>Maksimum konsantrasyon

<sup>c</sup>Eliminasyon yarı ömrü

<sup>d</sup>Konsantrasyon-zaman eğrisinin altındaki alan

Agnusitin maksimum konsantrasyona ulaşma süresi ( $t_{maks}$ ) 1. saat, maksimum konsantrasyonu ( $C_{maks}$ ) 99,64  $\mu\text{g/mL}$ , eliminasyon yarı ömrü ( $t_{1/2}$ ) 4,2. saat, dozlama zamanından gözlenen son konsantrasyona kadar eğri altında kalan alan ( $AUC_{0-\infty}$ ) 12624  $\mu\text{g h/mL}$  bulunmuştur.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde bitkisel içeriğe sahip birçok ürün hastalıklardan korunmak, hastalıkları tedavi etmek ya da tedaviyi desteklemek gibi çeşitli amaçlarla yaygın olarak kullanılmaktadır. T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığında ruhsatlı bitkisel ekstre içeren bu ürünler takviye edici gıda adı altında piyasada bulunmaktadır. Bakanlık tarafından takviye edici gıdaların ithalatı, üretimi, işlenmesi ve piyasaya arzına ilişkin usul ve esasları belirlemek amacıyla 'Takviye Edici Gıdaların İthalatı, Üretimi, İşlenmesi ve Piyasaya Arzına İlişkin Uygulama Talimatı' yayımlanmıştır. Bu ürünler ilaç adı altında değerlendirilmediği için, preklinik ve klinik faz çalışmaları gibi süreçler yürütülmemektedir ve üretim ve pazara sunulma süreci daha hızlı olmaktadır. Bununla birlikte takviye edici gıdalar, bitki ekstraları ve formülasyonlar ilaç geliştirme prosedürlerinden geçmediği için birçoğunun farmakokinetik özellikleri ve biyoyararlanımları bilinmemektedir. Bu eksiklik bitki ekstraları ve bitkilerin içerdiği sekonder metabolitlerden kaynaklı olarak meydana gelebilecek advers etkiler, ilaç veya diğer takviye edici gıdalar ile etkileşimleri konusunda da bir belirsizliğe sebep olmaktadır.

Bu tez çalışmasında hayıt bitkisinde bulunan ve birçok farmakolojik aktivitesi olduğuna dair bilimsel çalışmalar olan agnusit isimli iridoit glikozit bileşiğinin farmasötik preparatlarda ve insan plazmasında  $\mu\text{g/mL}$  düzeyinde analizini sağlayan yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirdik. Geliştirilen yöntemi seçicilik, doğrusalık, tekrarlanabilirlik, doğruluk, tayin ve gözlenebilme sınırı, sağlamlık ve dayanıklılık açısından ICH kriterlerine göre valide ettik. Bunu takiben geliştirilen yöntemi kullanarak agnusite ait daha önce insanda hiç sunulmamış olan farmakokinetik verileri tespit ettik. Bunu yaparken Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayını alarak 26 yaşındaki sağlıklı gönüllüye Castonex® kapsülü oral yoldan tek doz uyguladık. Gönüllüden belirli aralıklarla alınan kan örneklerinden elde edilen plazmalarla yapılan analizler ile farmakokinetik verileri ortaya çıkardık. Ardından hayıt ekstresi içeren Castonex® kapsüldeki agnusit miktarını tayin edebileceğimiz bir HPLC yöntemi daha geliştirerek bu yöntemin de preparat analizlerinde

kullanılabilirliğini referans bir metotla yeni method sonuçlarını istatistiksel testlerden yararlanarak ispat ettik.

Hayıt bitkisi ve agnusit bileşiğinin seçilmesinin nedeni premenstrual ve menstrual problemlerde yaygın olarak kullanımının olması ve [60]-[114] literatürlerinde ortaya konan tıbbi etkilerini gösteren makaleler ve literatürde agnusite ait farmakokinetik verilerin bulunmamasıydı. [59] ve [126] no'lu referanslara baktığımızda hayvan modellerinde yapılmış farmakokinetik çalışmaya rastlamak mümkündür. Ancak insanlarda yapılan farmakokinetik çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışması agnusit için insana dair farmakokinetik verileri hesaplayan ilk çalışmadır.

Bununla birlikte literatürde agnusitin analizini yapan sıvı kromatografisi ve ince tabaka kromatografisi yöntemleri mevcuttur ancak bu yöntemler bitki ekstraktları içinde miktar tayini yapan yöntemlerdir. Bu çalışmalar plazmada analiz sağlamamaktadır. Bir çalışmada HPLC-DAD ile analiz yapılmış ve analiz 23 dakika içinde gradient elüsyon modu ile gerçekleştirilmiştir [116]. Analiz sunulan yöntemine göre uzun sürede gerçekleşmiştir. Bir başka HPLC analiz yönteminde ise komplike numune hazırlama süreci vardır ve tayin ve tespit limitleri için sunulan yöntemine göre daha düşük hassasiyette sonuçlar elde edilmiştir [119].

Varolan sıvı kromatografisi ve ince tabaka kromatografisi yöntemlerinde hassas analizlere rastlanmakta ancak sadece ekstraktlarda uygulanabilecek analiz imkanı sağlamaktadırlar [87, 115-120]. Literatürde bulunan bu yöntemler insan plazmasında analiz imkanı sağlamamakta farklı amaçlara imkan tanımaktadır. Bu çalışmada ise, insan plazmasında  $\mu\text{g/mL}$  düzeyinde analizler yapılmıştır ve yöntem bitki ekstraktını içeren preparatlarda da analiz imkanı sağlamaktadır. Ayrıca validasyon çalışmalarında yüksek seçicilik, düşük tayin ve tespit limitleri, yüksek kesinlik ve doğruluk, sağlamlık gözlenmektedir.

Bu çalışmada kullanılan yöntem MS-MS gibi pahalı, her laboratuvarında ekipmanı bulunamayan, sofistike operatör gerektiren bir analiz yöntemi olmayıp, bulunabilecek en basit ve ekonomik dedeksiyon sistemi olan UV-görünür bölge absorpsiyon spektrometrik dedektörle çalışmaktadır. Bununla birlikte kullanılan numune hazırlama yöntemi olan sıvı-sıvı ekstraksiyon tekniği oldukça basit, hızlı bir prosedür ve yüksek verim sağlamaktadır. Agnusitin alıkonma zamanı  $9.7 \pm 0,01$  dakika gibi kısa bir

süredir. Ayrıca, yöntemin resolüsyonu ve diğer kromatografik ayırma kalitesini gösteren sistem parametreleri referans aralıklarına uygundur.

Sonuç olarak, sunulan bu çalışma farmakolojik etkilerine dair çok fazla araştırma ve kullanım alanı olan agnusit bileşiminin insan plazmasında hassas ve kaliteli analizi için imkan sağlamaktadır. Geliştirilen bu yöntemle bu analite dair farmakokinetik, biyoyararlanım, biyoeşdeğerlik ve toksikolojik analizleri yapmak mümkündür. Yapılan bu prototip biyoyararlanım ve farmakokinetik çalışma bu maddeyi içeren preparat ve ekstrelerin kullanımında kan konsantrasyonları (doz çalışmaları için), sistemik dolaşıma geçme, etki süresi, yarılanma ömrü ve güvenilirlik profillerine ait verileri ilk kez ortaya koymuştur.



## KAYNAKLAR

1. **Hobbs C.** (1991) The chaste tree: *Vitex agnus castus*. *Pharmacy in history*, 33(1):19-24.
2. **Meyer EA.** (1993) Monkspepper: Mönchspfeffer: Im Mittelalter Beliebt, Jetzt Erforscht. *Pharmazie*, 26(138):24-26.
3. **Blumenthal M, Goldberg A, Brinckmann J.** (2000) Herbal medicine. Expanded commission E monographs. Integrative Medicine Communications.
4. **European Scientific Cooperative on Phytotherapy.** (2003). ESCOP Monographs: The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products. Thieme.
5. **Halaska M, Beles P, Gorkow C, Sieder C.** (1999) Treatment of cyclical mastalgia with a solution containing a *Vitex agnus castus* extract: results of a placebo-controlled double-blind study. *The Breast*, 8(4):175-181.
6. **Benedict RG, Brady LR.** (1972) Antimicrobial activity of mushroom metabolites. *Journal of pharmaceutical sciences*, 61(11):1820-1822.
7. **Berger D, Schaffner W, Schrader E, Meier B, Brattström A.** (2000) Efficacy of *Vitex agnus castus* L. extract Ze 440 in patients with pre-menstrual syndrome (PMS). *Archives of gynecology and obstetrics*, 264(3):150-153.
8. **Berrani A, Lrhorfi LA, Larbi OM, El Hessni A, Zouarhi M, Erahali D, Bengueddour R.** (2018) Hypoglycemic effect of *Vitex agnus castus* extract in diabetic rats induced by streptozotocin. *Phytothérapie*, 16(S1):S40-S47.
9. **Chen SN, Friesen JB, Webster D, Nikolic D, van Breemen RB, Wang ZJ, et al.** (2011) Phytoconstituents from *Vitex agnus-castus* fruits. *Fitoterapia*, 82(4):528-533.
10. **Okuyama E, Fujimori S, Yamazaki M, Deyama T.** (1998) Pharmacologically active components of viticis fructus (*Vitex rotundifolia*). II. The component having analgesic effects. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 46(4):655-662.
11. **Hu Y, Hou TT, Zhang QY, Xin HL, Zheng HC, Qin LP, et al.** (2007) Evaluation of the estrogenic activity of the constituents in the fruits of *Vitex rotundifolia* L. for the potential treatment of premenstrual syndrome. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 59(9):1307-12.
12. **Pandey A, Bani S, Satti NK, Gupta BD, Suri KA.** (2012) Anti-arthritis activity of agnuside mediated through the down-regulation of inflammatory mediators and cytokines. *Inflammation Research*, 61(4):293-304.
13. **Özkan A.** (2010) Antik Çağlardan Günümüze *Vitex agnus-castus* (HAYIT). *Modern Fitofarmakoterapi ve Doğal Farmasötikler*, 1:56-58.
14. **Hobbs C.** (1996) *Vitex: The Women's Herb*. Santa Cruz: Botanica Press.
15. **Schellenberg R.** (2001) Treatment for the premenstrual syndrome with agnus castus fruit extract: prospective, randomised, placebo controlled study. *Bmj*, 322(7279):134-137.
16. **Townsend CC.** (1982) *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*: Edinburgh University Press.

17. **Baytop T.** (1999) Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, 2. baskı:İstanbul.
18. **Ganapaty S, Vidyadhar KN.** (2005) Phytoconstituents and biological activities of Vitex-a review. *Journal of natural remedies*, 5(2):75-95.
19. **Dutta AC, Dutta TC.** (1964) Botany for degree students. London: Oxford university press.
20. **Ono M, Yamasaki T, Konoshita M, Ikeda T, Okawa M, Kinjo J, et al.** (2008) Five New Diterpenoids, viteagnusins A—E, from the fruit of Vitex agnus-castus. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 56(11):1621-4.
21. **Malik A, Anis I, Khan SB, Ahmed E, Ahmed Z, Nawaz SA, et al.** (2004) Enzymes inhibiting lignans from Vitex negundo. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 52(11):1269-1272.
22. **Güner A, Özhatay N, Ekim T, Başer KHC.** (2000) Flora of Turkey and the east Aegean Islands. *Supplement*, 2:28.
23. **Kuruüzüm-Uz A, Güvenalp Z, Ströch K, Demirezer LÖ, Zeeck A.** (2008) Antioxidant potency of flavonoids from Vitex agnus-castus L. growing in Turkey. *Fabad J Pharm Sci*, 33:11-16.
24. **Honda G, Yeşilada E, Tabata M, Sezik E, Fujita T, Takeda Y, et al.** (1996) Traditional medicine in Turkey VI. Folk medicine in West Anatolia: Afyon, Kütahya, Denizli, Muğla, Aydın provinces. *Journal of Ethnopharmacology*, 53(2):75-87.
25. **Novak J, Draxler L, Göhler I, Franz CM.** (2005) Essential oil composition of Vitex agnus-castus—comparison of accessions and different plant organs. *Flavour and fragrance journal*, 20(2):186-92.
26. **Ekundayo O, Laakso I, Holopainen M, Hiltunen R, Oguntimein B, Kauppinen V.** (1990) The chemical composition and antimicrobial activity of the leaf oil of Vitex agnus-castus L. *Journal of Essential Oil Research*, 2(3):115-9.
27. **Özkök G.** (2011) *Vitex agnus castus L. preparatı ile retrospektif bir çalışma* (Master’s thesis). Ulusal Tez Merkezi veritabanından (Tez no: 294371) edinilebilir.
28. **Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG.** (2000) Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*, 24:1250-319.
29. **Pagare S, Bhatia M, Tripathi N, Pagare S, Bansal YK.** (2015) Secondary metabolites of plants and their role: Overview. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 9(3):293-304.
30. **Hoberg E, Orjala J, Meier B, Sticher O.** (1999) Diterpenoids from the fruits of Vitex agnus-castus. *Phytochemistry*, 52(8):1555-8.
31. **Belic I, Bergant-Dolar J, Morton RA.** (1961) Constituents of Vitex agnus-castus seeds Part I. *Casticin. J. Chem. Soc*, 55:2523-2525.
32. **Gomaa CS, Elmoghazy MA, Halim FA, Elsayyad AE.** (1978) Flavonoids and iridoids from Vitex agnus castus [drug plant]. *Planta Medica*.
33. **Baytop T.** (1972) Farmakognozi. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayınları.
34. **Kuruüzüm-Uz A, Ströch K, Demirezer LÖ, Zeeck A.** (2003) Glucosides from Vitex agnus-castus. *Phytochemistry*, 63(8):959-64.
35. **Yaşar S, Ceviz AU, Karatepe Y.** (2016) Laurus nobilis, Vitex agnus-castus ve Tamarix parviflora türlerinin kimyasal içeriği ve fenolik ekstraktiflerinin incelenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 20(2).
36. **Senatore F, Della Porta G, Reverchon E.** (1996) Constituents of Vitex agnus-castus L. Essential Oil. *Flavour and fragrance journal*, 11(3):179-82.

37. **Kustrak D, Kuftinec J, Blazević N.** (1994) Composition of the Essential Oil of *Vitex agnus-castus* L. *Journal of Essential Oil Research*, 6(4):341-4.
38. **Tiring G, Satar S, Özkaya O.** (2020) Sekonder Metabolitler. *Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 35(1):203-15.
39. **Waser M, Rinner U.** (2016) Monoterpenes and Iridoids. *From Biosynthesis to Total Synthesis: Strategies and Tactics for Natural Products*, 196.
40. **Viljoen A, Mncwangi N, Vermaak I.** (2012) Anti-inflammatory iridoids of botanical origin. *Current medicinal chemistry*, 19(14):2104-27.
41. **Oszmiański J, Kucharska AZ.** (2018) Effect of pre-treatment of blue honeysuckle berries on bioactive iridoid content. *Food Chemistry*, 240:1087-91.
42. **Nagatoshi M, Terasaka K, Nagatsu A, Mizukami H.** (2011) Iridoid-specific glucosyltransferase from *Gardenia jasminoides*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(37):32866-74.
43. **Tanker M, Tanker N.** (2003) Farmakognozi cilt 1. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi.
44. **Ghisalberti EL.** (1998) Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. *Phytomedicine*, 5(2):147-63.
45. **Dobler S, Petschenka G, Pankoke H.** (2011) Coping with toxic plant compounds—the insect’s perspective on iridoid glycosides and cardenolides. *Phytochemistry*, 72(13):1593-1604.
46. **Kim MB, Kim C, Chung WS, Cho JH, Nam D, Kim SH, et al.** (2015) The Hydrolysed Products of Iridoid Glycosides Can Enhance Imatinib Mesylate-Induced Apoptosis in Human Myeloid Leukaemia Cells. *Phytotherapy Research*, 29(3):434-43.
47. **Pankoke H, Bowers MD, Dobler S.** (2012) The interplay between toxin-releasing  $\beta$ -glucosidase and plant iridoid glycosides impairs larval development in a generalist caterpillar, *Grammia incorrupta* (Arctiidae). *Insect biochemistry and molecular biology*, 42(6):426-34.
48. **Wink M.** (2015) Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. *Medicines*, 2(3):251-86.
49. **Skim F, Kaaya A, Jaouhari J, Lazrek H, Jana M, El Amri H.** (1999) Hypoglycaemic activity of *Globularia alypum* leaves in rats. *Fitoterapia*, 70(4):382-9.
50. **Skim F, Lazrek H, Kaaya A, El Amri H, Jana M.** (1999) Pharmacological studies of two antidiabetic plants: *Globularia alypum* and *Zygophyllum gaetulum*. *Therapie*, 54(6):711-5.
51. **Jouad H, Maghrani M, Eddouks M.** (2002) Hypoglycaemic effect of *Rubus fruticosus* L. and *Globularia alypum* L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 81(3):351-6.
52. **Bello R, Moreno L, Primo-Yúfera E, Esplugues J.** (2002) *Globularia alypum* L. extracts reduced histamine and serotonin contraction in vitro. *Phytotherapy Research*, 16(4):389-92.
53. **Sesterhenn K, Distl M, Wink M.** (2007) Occurrence of iridoid glycosides in in vitro cultures and intact plants of *Scrophularia nodosa* L. *Plant Cell Reports*, 26(3):365-71.
54. **Yang KH, Kwon T, Choe S, Yun H, Chang IM.** (1983) Protective effect of *Aucuba japonica* against carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 6(5):429-41.

55. **Miyagoshi M, Amagaya S, Ogihara Y.** (1988) Choleric actions of iridoid compounds. *Journal of pharmacobio-Dynamics*, 11(3):186-90.
56. **Circosta C, Occhiuto F, Ragusa S, Trovato A, Tumino G, Briguglio F,** et al. (1984) A drug used in traditional medicine: *Harpagophytum procumbens* DC II. Cardiovascular activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 11(3):259-74.
57. **Fleer H, Verspohl EJ.** (2007) Antispasmodic activity of an extract from *Plantago lanceolata* L. and some isolated compounds. *Phytomedicine*, 14(6):409-15.
58. **Kupeli E, Tatli II, Akdemir ZS, Yesilada E.** (2007) Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory and antinociceptive glycosides from the flowers of *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. *Journal of ethnopharmacology*, 110(3):444-50.
59. **Ramakrishna R, Bhateria M, Singh R, Puttrevu SK, Bhatta RS.** (2016) Plasma pharmacokinetics, bioavailability and tissue distribution of agnuside following peroral and intravenous administration in mice using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 125:154-64.
60. **O'Brien S, Rapkin A, Dennerstein L, Nevatte T.** (2011) Diagnosis and management of premenstrual disorders. *Bmj*, 342.
61. **Lucks BC, Sørensen J, Veal L.** (2002) Vitex agnus-castus essential oil and menopausal balance: a self-care survey. *Complementary Therapies in Nursing and Midwifery*, 8(3):148-54.
62. **Verkaik S, Kamperman AM, van Westrhenen R, Schulte PF.** (2017) The treatment of premenstrual syndrome with preparations of Vitex agnus castus: a systematic review and meta-analysis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 217(2):150-66.
63. **Lauritzen CH, Reuter HD, Repges R, Böhnert K-J, Schmidt U.** (1997) Treatment of premenstrual tension syndrome with Vitex agnus castus controlled, double-blind study versus pyridoxine. *Phytomedicine*, 4(3):183-9.
64. **Liu J, Burdette JE, Xu H, Gu C, Van Breemen RB, Bhat KP, et al.** (2001) Evaluation of estrogenic activity of plant extracts for the potential treatment of menopausal symptoms. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(5):2472-9.
65. **Loch EG, Selle H, Boblitz N.** (2000) Treatment of premenstrual syndrome with a phytopharmaceutical formulation containing Vitex agnus castus. *Journal of women's health & gender-based medicine*, 9(3):315-20.
66. **Wuttke W, Jarry H, Christoffel V, Spengler B, Seidlova-Wuttke D.** (2003) Chaste tree (*Vitex agnus-castus*)—pharmacology and clinical indications. *Phytomedicine*, 10(4):348-57.
67. **Mills S, Bone K.** (2000) Principles and practice of phytotherapy. Modern herbal medicine: Churchill Livingstone.
68. **Sliutz G, Speiser P, Schultz A, Spona J, Zeillinger R.** (1993) Agnus castus extracts inhibit prolactin secretion of rat pituitary cells. *Hormone and metabolic research*, 25(05):253-5.
69. **Momoeda M, Sasaki H, Tagashira E, Ogishima M, Takano Y, Ochiai K.** (2014) Efficacy and safety of Vitex agnus-castus extract for treatment of premenstrual syndrome in Japanese patients: a prospective, open-label study. *Advances in therapy*, 31(3):362-73.

70. **Ma L, Lin S, Chen R, Wang X.** (2010) Treatment of moderate to severe premenstrual syndrome with Vitex agnus castus (BNO 1095) in Chinese women. *Gynecological Endocrinology*, 26(8):612-6.
71. **Atmaca M, Kumru S, Tezcan E.** (2003) Fluoxetine versus Vitex agnus castus extract in the treatment of premenstrual dysphoric disorder. *Human Psychopharmacology: Clinical and experimental*, 18(3):191-5.
72. **Ader D, South-Paul J, Adera T, Deuster PA.** (2001) Cyclical mastalgia: prevalence and associated health and behavioral factors. *Journal of Psychosomatic Obstetrics & Gynecology*, 22(2):71-6.
73. **Diñç T, Coşkun F.** (2014) Comparison of fructus agni casti and flurbiprofen in the treatment of cyclic mastalgia in premenopausal women. *Turkish Journal of Surgery/Ulusal cerrahi dergisi*, 30(1):34.
74. **Aydın İ, Baltacı D, Trkylmaz S, NC M.** (2012) Comparison of Vitex Agnus Castus with Meloxicam and Placebo in Treatment of Patients with Cyclical Mastalgia. *Duzce Medical Journal*, 14(1).
75. **van Die MD, Burger HG, Teede HJ, Bone KM.** (2013) Vitex agnus-castus extracts for female reproductive disorders: a systematic review of clinical trials. *Planta medica*, 79(07):562-75.
76. **Dülger B, Uğurlu E, Gücin F.** (2002) Vitex agnus-castus L.(Hayıt)un Antimikrobiyal Aktivitesi. *Çev-Kor*, 11(45):1-5.
77. **Arokiyaraj S, Perinbam K, Agastian P, Kumar RM.** (2009) Phytochemical analysis and antibacterial activity of Vitex agnus-castus. *International Journal of Green Pharmacy (IJGP)*, 3(2).
78. **Ghannadi A, Bagherinejad M, Abedi D, Jalali M, Absalan B, Sadeghi N.** (2012) Antibacterial activity and composition of essential oils from Pelargonium graveolens L'Her and Vitex agnus-castus L. *Iranian journal of microbiology*, 4(4):171.
79. **Senatore F, Napolitano F, Dung MO.** (2003) Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from fruits of Vitex agnus-castus L.(Verbenaceae) growing in Turkey. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 6(3):185-90.
80. **Parlak B.** (2017). *Hayıt (Vitex agnus-castus L.) bitkisinin sıçanlarda diyabetik yaraları iyileştirmeye olan etkisi ve antibakteriyal özelliklerinin araştırılması* (Master's thesis, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
81. **Mittler R.** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9):405-10.
82. **Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan R.** (2009) Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current neuropharmacology*, 7(1):65-74.
83. **Sağlam H, Pabuçcuoğlu A, Kivçak B.** (2007) Antioxidant activity of Vitex agnus-castus L. extracts. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 21(11):1059-60.
84. **Gökbulut A, Özhan O, Karacaoğlu M, Şarer E.** (2010) Radical scavenging activity and vitexin content of Vitex agnus castus leaves and fruits FABAD. *J Pharm Sci*, 12(35):85-9.
85. **Sarikurcu C, Arisoy K, Tepe B, Cakir A, Abali G, Mete E.** (2009) Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of Vitex

- agnus castus L. fruits from Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 47(10):2479-83.
86. **Sehgal C, Taneja SC, Dhar KL, Atal CK.** (1983) 6'-p-hydroxybenzoylmussaenosidic acid-an iridoid glucoside from *Vitex negundo*. *Phytochemistry*, 22(4):1036-8.
  87. **Tiwari N, Luqman S, Masood N, Gupta MM.** (2012) Validated high performance thin layer chromatographic method for simultaneous quantification of major iridoids in *Vitex trifolia* and their antioxidant studies. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 61:207-14.
  88. **Sa A, Kb P, Pa V, NK U.** (2012) Free radical scavenging and in vitro cytotoxicity activity of agnuside from *Vitex agnus castus* (Verbenaceae). *J. Pharm. Res*, 5:2548-52.
  89. **Chhabra G, Kulkarni S.** (2014) Evaluation of anti-inflammatory activity of *Vitex agnus castus* leaves. Quantitative analysis of flavonoids as possible active constituents. *J. Pharmacogn. Phytochem*, 3(1):183-9.
  90. **Choudhary MI, Jalil S, Nawaz SA, Khan KM, Tareen RB.** (2009) Antiinflammatory and lipoxygenase inhibitory compounds from *vitex agnus-castus*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 23(9):1336-9.
  91. **Suksamrarn A, Kumpun S, Kirtikara K, Yingyongnarongkul B, Suksamrarn S.** (2002) Iridoids with anti-inflammatory activity from *Vitex peduncularis*. *Planta Medica*, 68(01):72-3.
  92. **Hirobe C, Qiao Z-S, Takeya K, Itokawa H.** (1997) Cytotoxic flavonoids from *Vitex agnus-castus*. *Phytochemistry*, 46(3):521-4.
  93. **Hirobe C, Ohyama K.** (2000) Cytotoxic Effect of *Vitex agnus-castus* Extract on Human Cultured Uterine Cervical Fibroblasts and, Breast and Ovarian Cancer Cells. *ACTA Obstetrica Et Gynaecologica Japonica-Japanese Edition-* 52(10):1449-56.
  94. **Hernandez M, Heraso C, Villarreal M, Vargas-Arispuro I, Aranda E.** (1999) Biological activities of crude plant extracts from *Vitex trifolia* L.(Verbenaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 67(1):37-44.
  95. **Imai M, Kikuchi H, Denda T, Ohyama K, Hirobe C, Toyoda H.** (2009) Cytotoxic effects of flavonoids against a human colon cancer derived cell line, COLO 201: a potential natural anti-cancer substance. *Cancer Letters*, 276(1):74-80.
  96. **Ohyama K, Akaike T, Hirobe C, Yamakawa T.** (2003) Cytotoxicity and apoptotic inducibility of *Vitex agnus-castus* fruit extract in cultured human normal and cancer cells and effect on growth. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26(1):10-8.
  97. **Weisskopf M, Schaffner W, Jundt G, Sulser T, Wyler S, Tullberg-Reinert H.** (2005) A *Vitex agnus-castus* extract inhibits cell growth and induces apoptosis in prostate epithelial cell lines. *Planta medica*, 71(10):910-6.
  98. **Sultan Aslantürk Ö, Aşkın Çelik T.** (2013) Cytosystematics, Cytogenetics. Antioxidant activity and anticancer effect of *Vitex agnus-castus* L.(Verbenaceae) seed extracts on MCF-7 breast cancer cells. *Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics*, 66(3):257-67.
  99. **Ohyama K, Akaike T, Imai M, Toyoda H, Hirobe C, Bessho T.** (2005) Human gastric signet ring carcinoma (KATO-III) cell apoptosis induced by

- Vitex agnus-castus fruit extract through intracellular oxidative stress. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(7):1496-510.
100. **Ibrahim AY, El-Newary SA, Youness ER, Ibrahim AM, El Kashak WA.** (2017) Protective and therapeutic effect of Vitex agnus-castus against prostate cancer in rat. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7:133-43.
  101. **Duymuş H, Çiftçi GA, Yıldırım ŞU, Demirci B, Kırimer N.** (2014) The cytotoxic activity of Vitex agnus castus L. essential oils and their biochemical mechanisms. *Industrial Crops and Products*, 55:33-42.
  102. **Ahangarpour A, Oroojan AA, Khorsandi L, Najimi SA.** (2017) Pancreatic protective and hypoglycemic effects of Vitex agnus-castus L. fruit hydroalcoholic extract in D-galactose-induced aging mouse model. *Research in pharmaceutical sciences*, 12(2):137.
  103. **Berrani A, Marmouzi I, Bouyahya A, Kharbach M, El Hamdani M, El Jemli M, et al.** (2021) Phenolic Compound Analysis and Pharmacological Screening of Vitex agnus-castus Functional Parts. *BioMed Research International*, 2021.
  104. **Gezici S, Koçum D.** (2021) Nörodejeneratif Hastalıkların Tedavisinde Nöroprotektif Ajan Olarak Tıbbi Bitkiler ve Fitokimyasallar. *Türk Doğa ve Fen Dergisi*, 10(2):325-37.
  105. **Hamood HM, Al-Zubaidy AA.** (2020) Neuroprotective effects of Vitex agnus castus extract in rats' model of Alzheimer's disease. *EurAsian Journal of Biosciences*, 14(2):4165-9.
  106. **Alimohamadi R, Fatemi I, Naderi S, Hakimizadeh E, Rahmani M-R, Allahtavakoli M.** (2019) Protective effects of Vitex agnus-castus in ovariectomy mice following permanent middle cerebral artery occlusion. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 22(9):1097.
  107. **Marotta F, Mao G, Liu T, Chui D, Lorenzetti A, Xiao Y, et al.** (2006) Anti-inflammatory and neuroprotective effect of a phytoestrogen compound on rat microglia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1089(1):276-81.
  108. **Azarnia M, Ansari A, Ejtemaei Ms, Shakour A.** (2007) Effects of vitex agnus castus on mice fetus development.
  109. **Šaden-Krehula M, Kuštrak D, Blažević N.** (1990)  $\Delta^4$ -3-Ketosteroids in flowers and leaves of Vitex agnus-castus. *Planta Medica*, 56(06):547-547.
  110. **Şarer E, Gökbulut A.** (2008) Determination of caffeic and chlorogenic acids in the leaves and fruits of Vitex agnus-castus. *Turk J. Pharm. Sci*, 5(3):167-74.
  111. **Yalçınkaya U, Aykut S, Akgöz S, Özkan Y, Yanık K.** (2008) The effects of phytoestrogens on fracture healing: experimental research in New Zealand white rabbits. *Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery*, 14(1):21-7.
  112. **Li S, Qiu S, Yao P, Sun H, Fong HH, Zhang HJE-BC, et al.** (2013) Compounds from the fruits of the popular European medicinal plant Vitex agnus-castus in chemoprevention via NADP (H): Quinone oxidoreductase type 1 induction. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
  113. **Sehmisch S, Boeckhoff J, Wille J, Seidlova-Wuttke D, Rack T, Tezval M, et al.** (2009) Vitex agnus castus as prophylaxis for osteopenia after orchidectomy in rats compared with estradiol and testosterone supplementation. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 23(6):851-8.

114. **Mehlhorn H, Schmahl G, Schmidt J.** (2005) Extract of the seeds of the plant *Vitex agnus castus* proven to be highly efficacious as a repellent against ticks, fleas, mosquitoes and biting flies. *Parasitology research*, 95(5):363-5.
115. **Hänsel R, Leuckert C, Rimpler H, Schaaf KD.** (1965) Chemotaxonomische untersuchungen in der gattung *Vitex* L. *Phytochemistry*, 4(1):19-27.
116. **Hoberg E, Meier B, Sticher O.** (2000) An analytical high performance liquid chromatographic method for the determination of agnuside and p-hydroxybenzoic acid contents in *Agni-casti fructus*. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 11(5):327-9.
117. **Dhanani T, Shah S, Kumar S.** (2015) A validated high performance liquid chromatography method for determination of three bioactive compounds p-hydroxy benzoic acid, negundoside and agnuside in *Vitex* species. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 34(2):321-31.
118. **Shah S, Dhanani T, Kumar S.** (2013) Validated HPLC method for identification and quantification of p-hydroxy benzoic acid and agnuside in *Vitex negundo* and *Vitex trifolia*. *Journal of pharmaceutical analysis*, 3(6):500-8.
119. **Patil S, Laddha KS.** (2018) Extraction efficiency of agnuside from *Vitex negundo* leaves using different techniques and its quantitative determination by HPLC. *Int J Health Sci Res*, 8(8):129-35.
120. **Högner C, Sturm S, Seger C, Stuppner H.** (2013) Development and validation of a rapid ultra-high performance liquid chromatography diode array detector method for *Vitex agnus-castus*. *Journal of Chromatography B*, 927:181-90.
121. **Costantine MM.** (2014) Physiologic and pharmacokinetic changes in pregnancy. *Frontiers in pharmacology*, 5:65.
122. **Dawes M, Chowienczyk PJ.** (2001) Pharmacokinetics in pregnancy. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*, 15(6):819-26.
123. **Akici A, Tamirci M, Gören M.** (2017) The Impacts of the Physiological Changes Occurring During Pregnancy on Pharmacokinetic Mechanisms. *Clinical and Experimental Health Sciences*, 7(2).
124. **Koren G.** (1987) Special aspects of perinatal & pediatric pharmacology. *Basic and clinical pharmacology*, 997.
125. **Kayaalp SO.** (2012) Akılcı tedavi yönünden tıbbi farmakoloji: Pelikan Yayıncılık.
126. **Chen X, Wang X, Ma L, Fang S, Li J, Boadi EO, et al.** (2021) The network pharmacology integrated with pharmacokinetics to clarify the pharmacological mechanism of absorbed components from *Vitex fructus* extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 278:114336.
127. **The International Conference on Harmonisation (ICH).** (2005) *ICH Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use on validation of analytical procedures Q2A*. IFPM, Geneva.
128. **Dutta PK, Chowdhury US, Chakravarty AK, Achari B, Pakrashi SC.** (1983) Studies on Indian medicinal plants-part LXXV: Nishindaside, a novel iridoid glycoside from *Vitex negundo*. *Tetrahedron*, 39(19):3067-72.
129. **Nagarajan A.** (2018) Wound healing activity of the ethanolic extract and agnuside isolated from *Vitex negundo* L. Leaves. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(5):1823-32.

## **EKLER**

**Ek A1** : Agnusit bileşığının <sup>1</sup>H-NMR spektrumu (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD).

**Ek A2** : Agnusit bileşığının genişletilmiş <sup>1</sup>H-NMR spektrumu (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD).

**Ek A3** : Agnusit bileşığının genişletilmiş <sup>1</sup>H-NMR spektrumu (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD).

**Ek A4** : Agnusit bileşığının <sup>13</sup>C-APT NMR spektrumu (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD).

**Ek A5** : Agnusit bileşığının genişletilmiş <sup>13</sup>C-APT NMR spektrumu (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD).

**Ek A6** : Agnusit bileşığının genişletilmiş <sup>13</sup>C-APT NMR spektrumu (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD).

**Ek A7** : Agnusit bileşığının HSQC NMR spektrumu (CD<sub>3</sub>OD).

**Ek A8** : Agnusit bileşığının genişletilmiş HSQC NMR spektrumu (CD<sub>3</sub>OD).

**Ek A9** : Agnusit bileşığının genişletilmiş HSQC NMR spektrumu (CD<sub>3</sub>OD).

**Ek A10** : Agnusit bileşığının genişletilmiş HSQC NMR spektrumu (CD<sub>3</sub>OD).

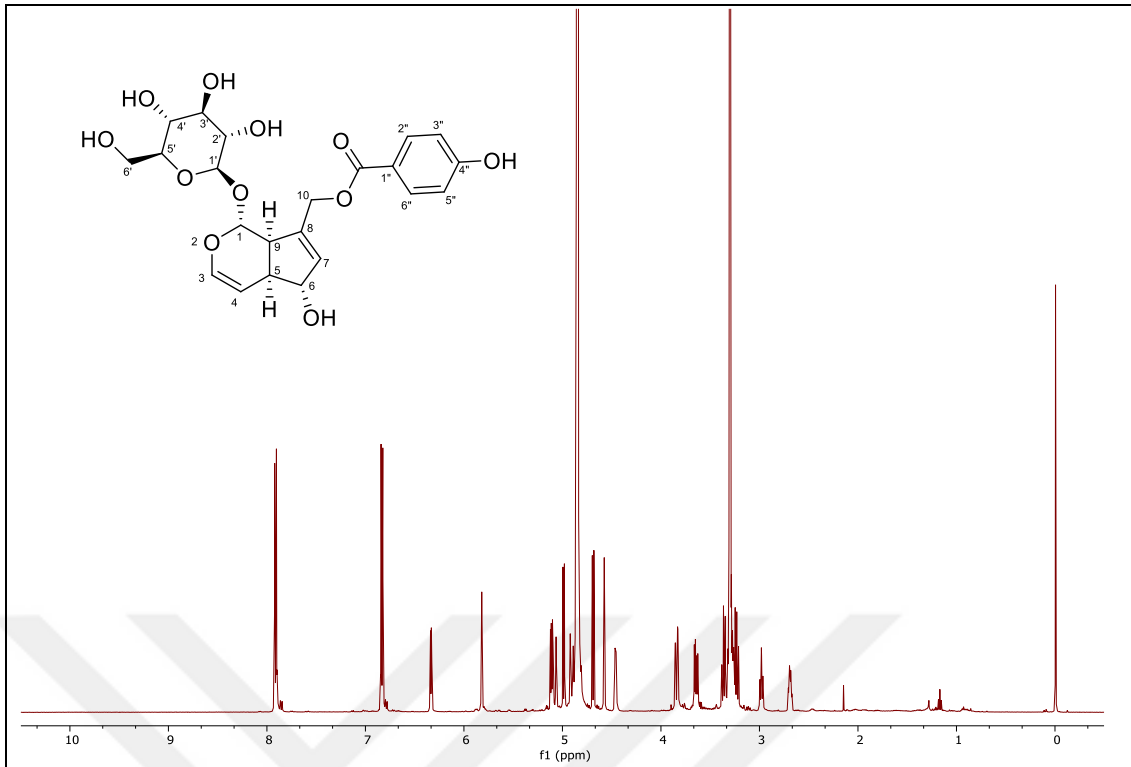
**Ek A11** : Agnusit bileşığının genişletilmiş HSQC NMR spektrumu (CD<sub>3</sub>OD).

**Ek A12** : Agnusit bileşığının HMBC NMR spektrumu (CD<sub>3</sub>OD).

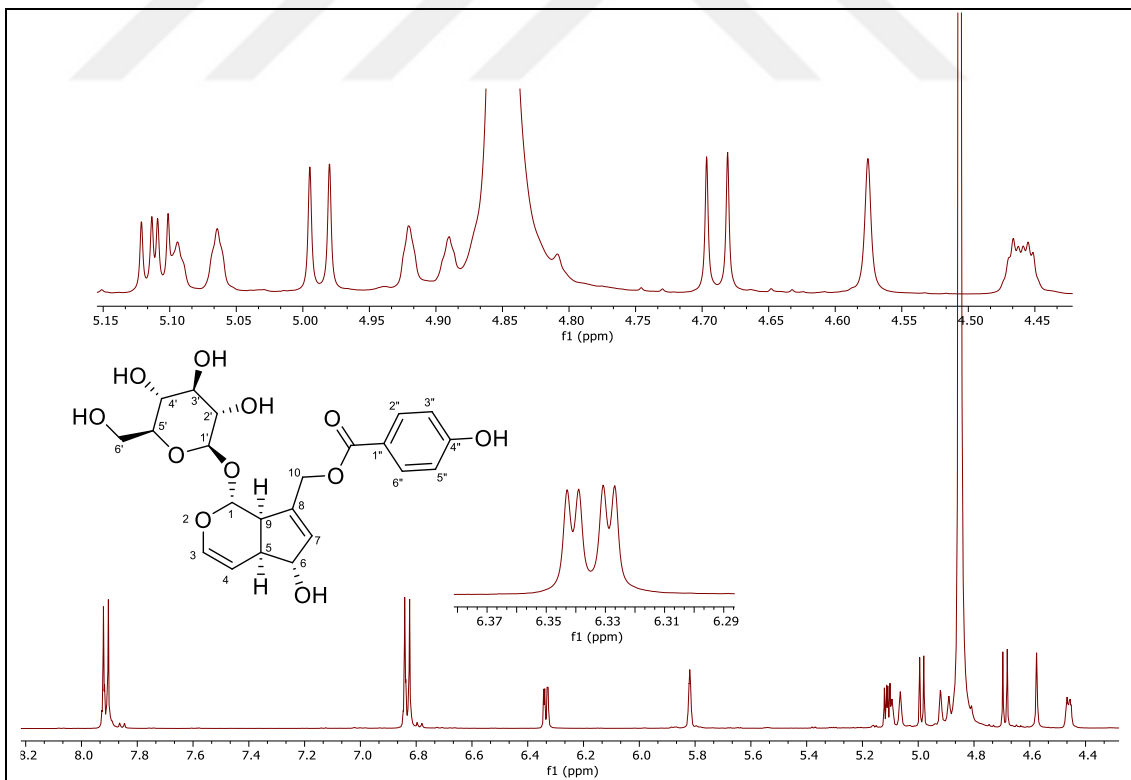
**Ek A13** : Agnusit bileşığının genişletilmiş HMBC NMR spektrumu (CD<sub>3</sub>OD).

**Ek A14** : Agnusit bileşığının genişletilmiş HMBC NMR spektrumu (CD<sub>3</sub>OD).

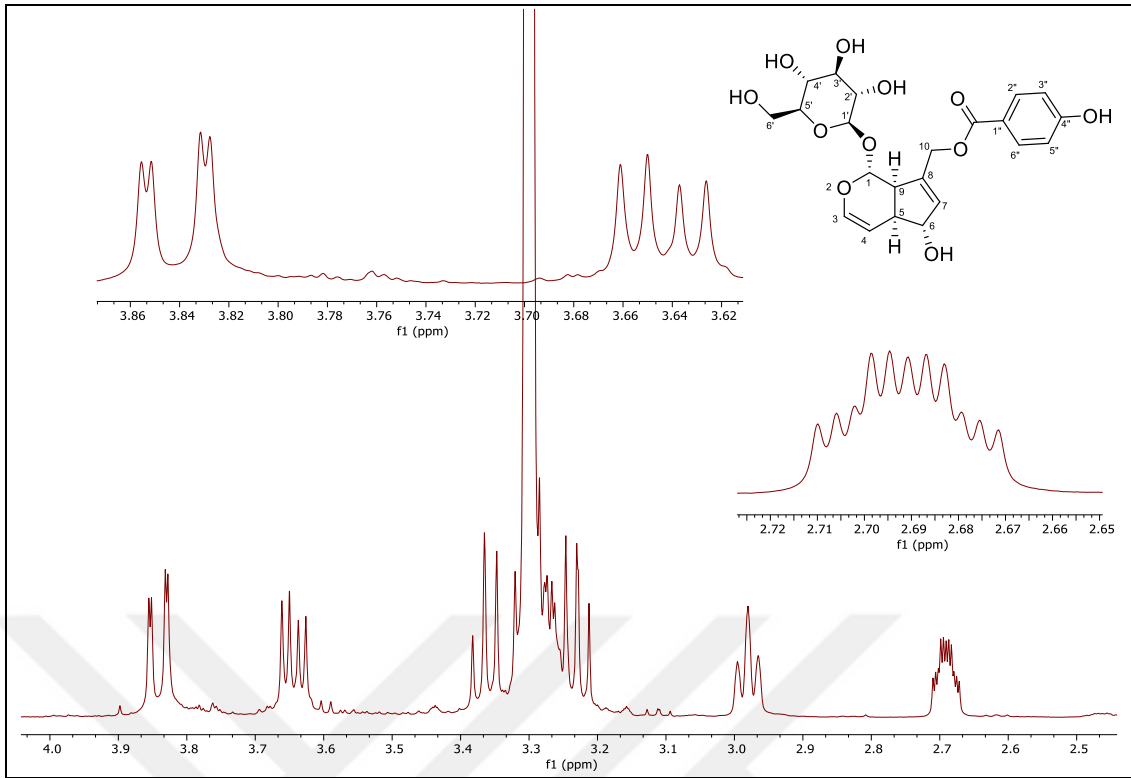
**Ek B1** : Etik Kurul Onayı



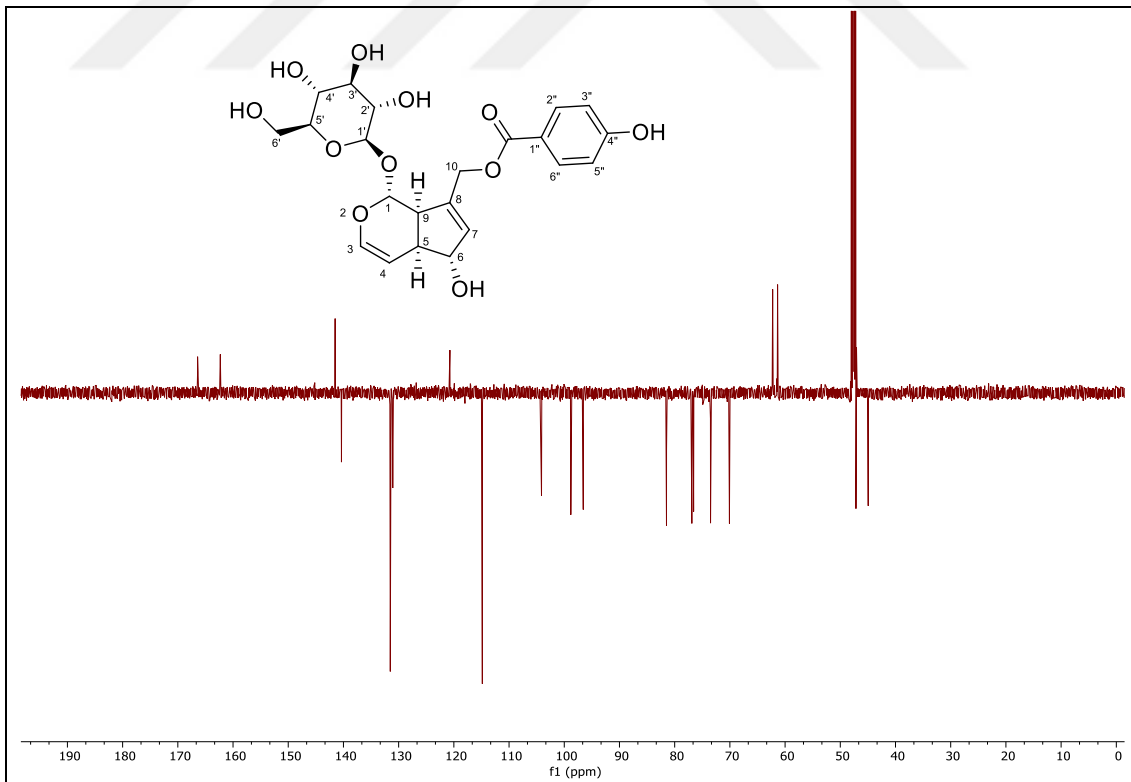
**Ek A1 :** Agnusit bileşiminin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



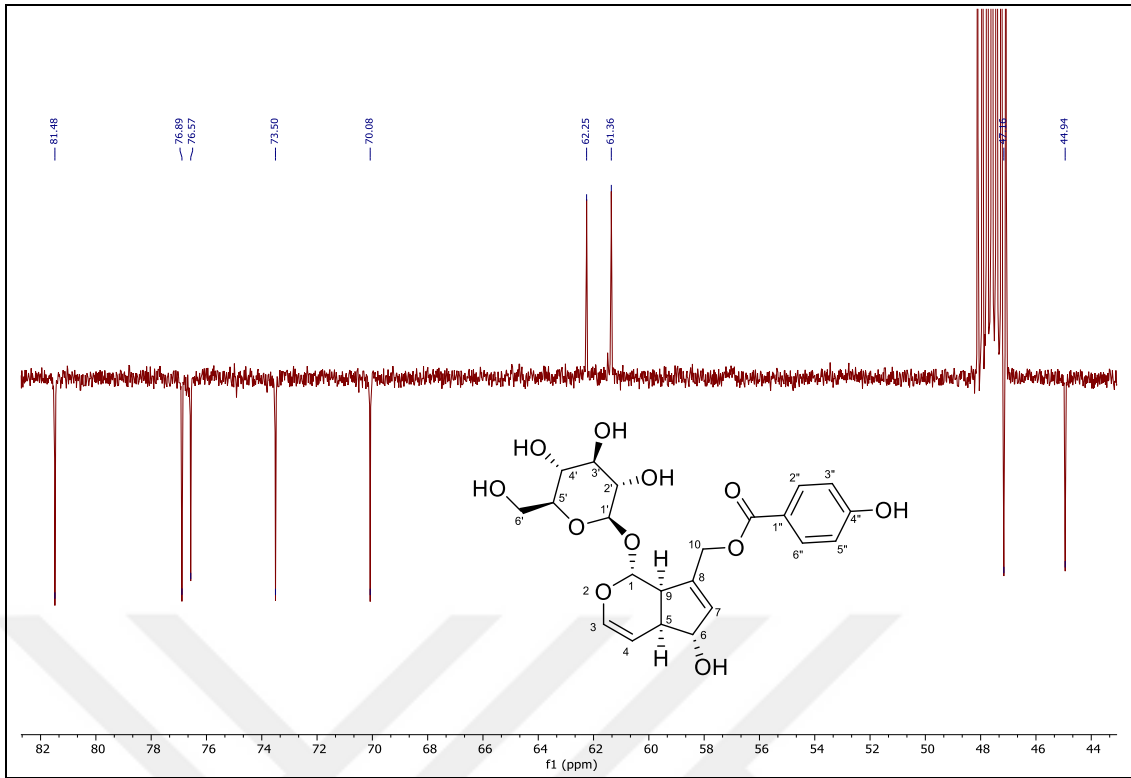
**Ek A2 :** Agnusit bileşiminin genişletilmiş  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



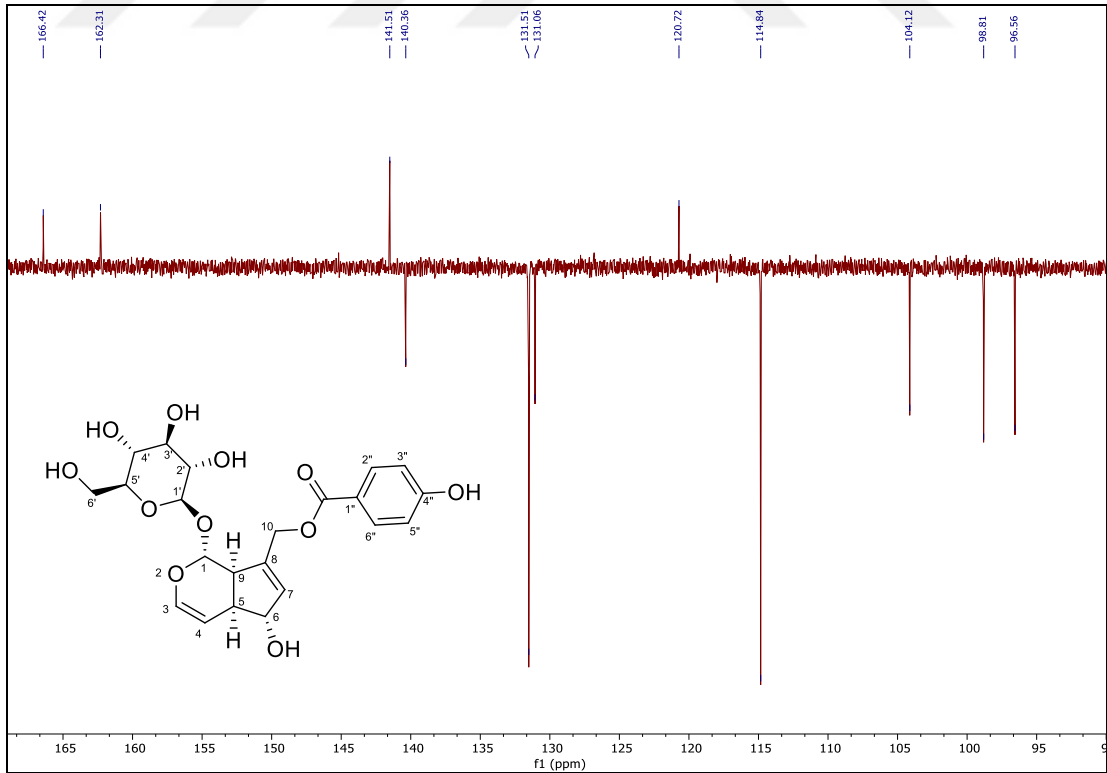
**Ek A3 :** Agnusit bileşğinin genişletilmiş  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



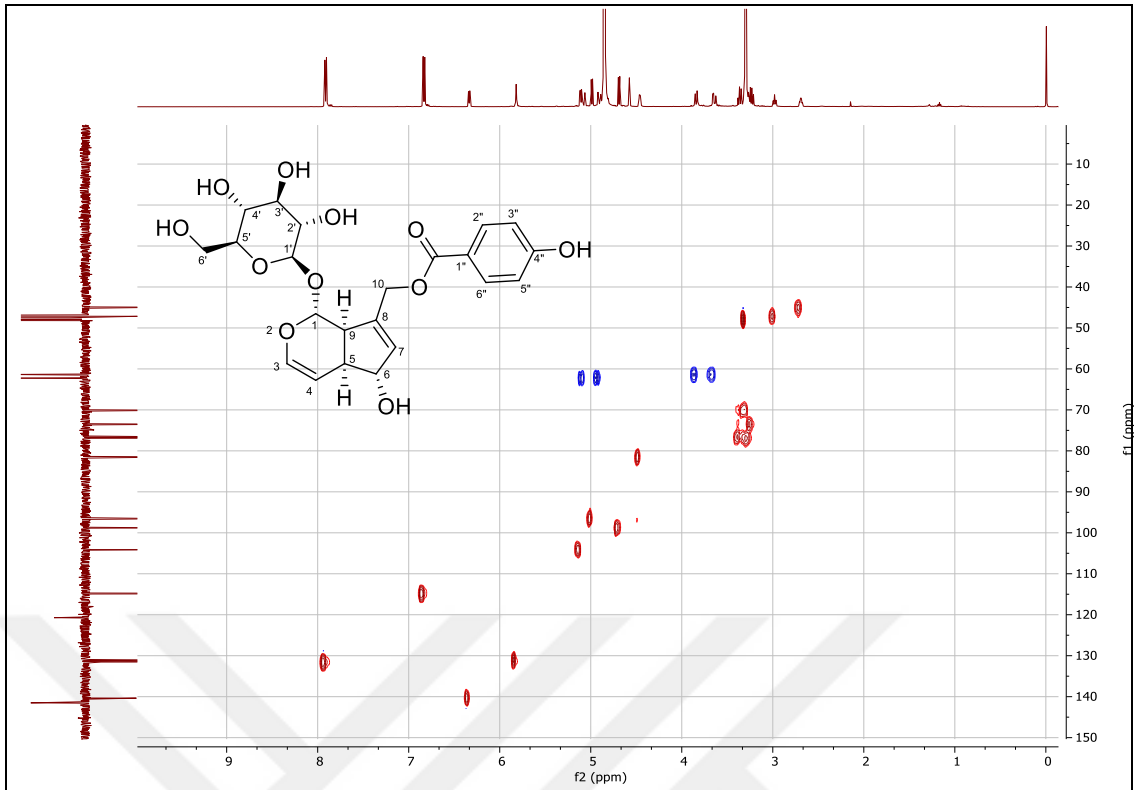
**Ek A4 :** Agnusit bileşğinin  $^{13}\text{C-APT}$  NMR spektrumu (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



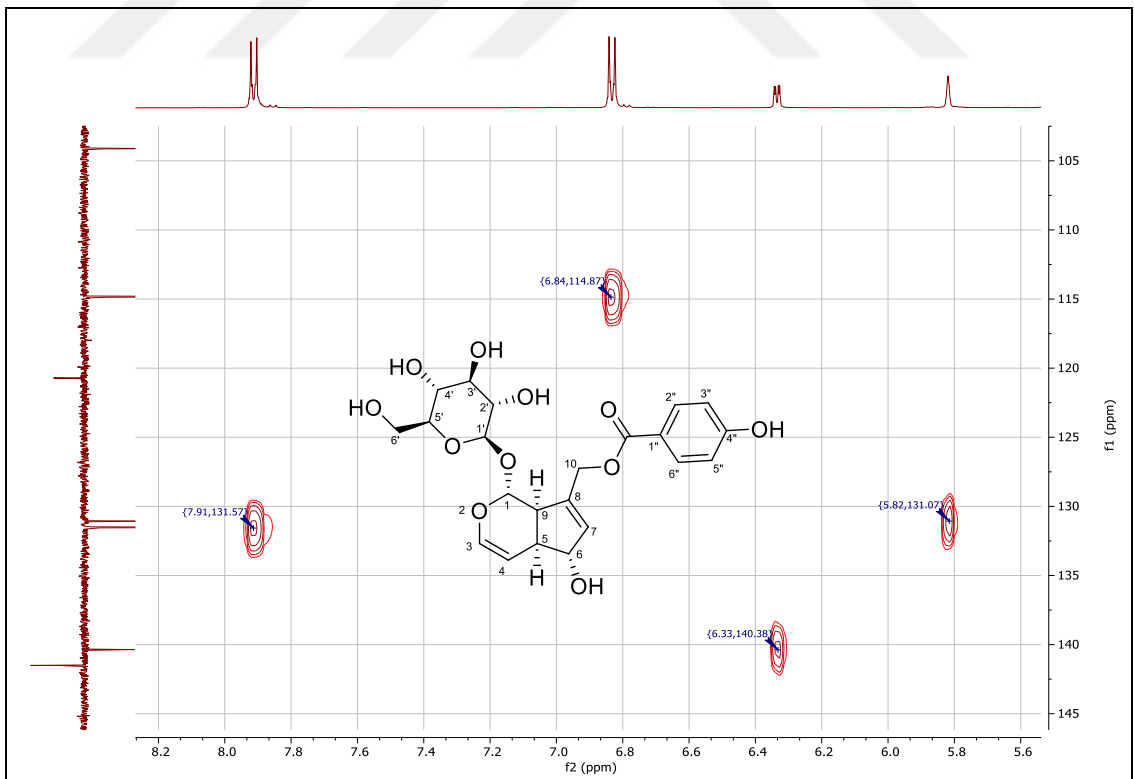
**Ek A5 :** Agnusit bileşğinin genişletilmiş  $^{13}\text{C}$ -APT NMR spektrumu (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



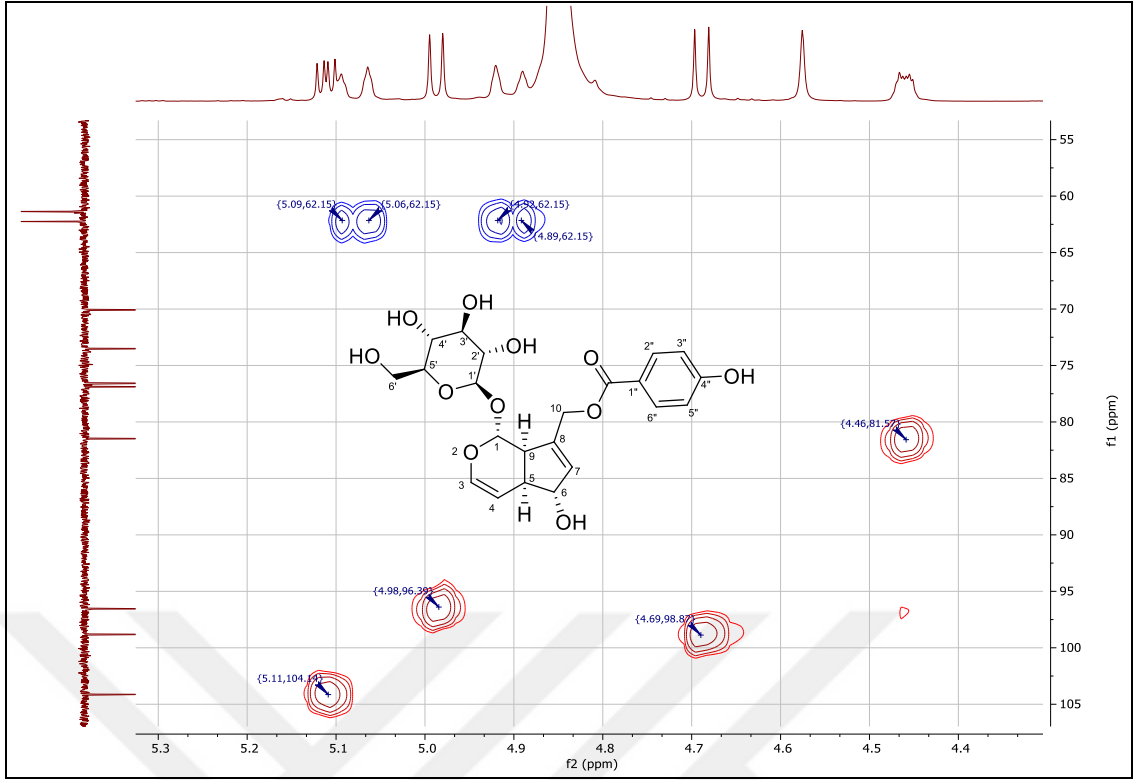
**Ek A6 :** Agnusit bileşğinin genişletilmiş  $^{13}\text{C}$ -APT NMR spektrumu (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



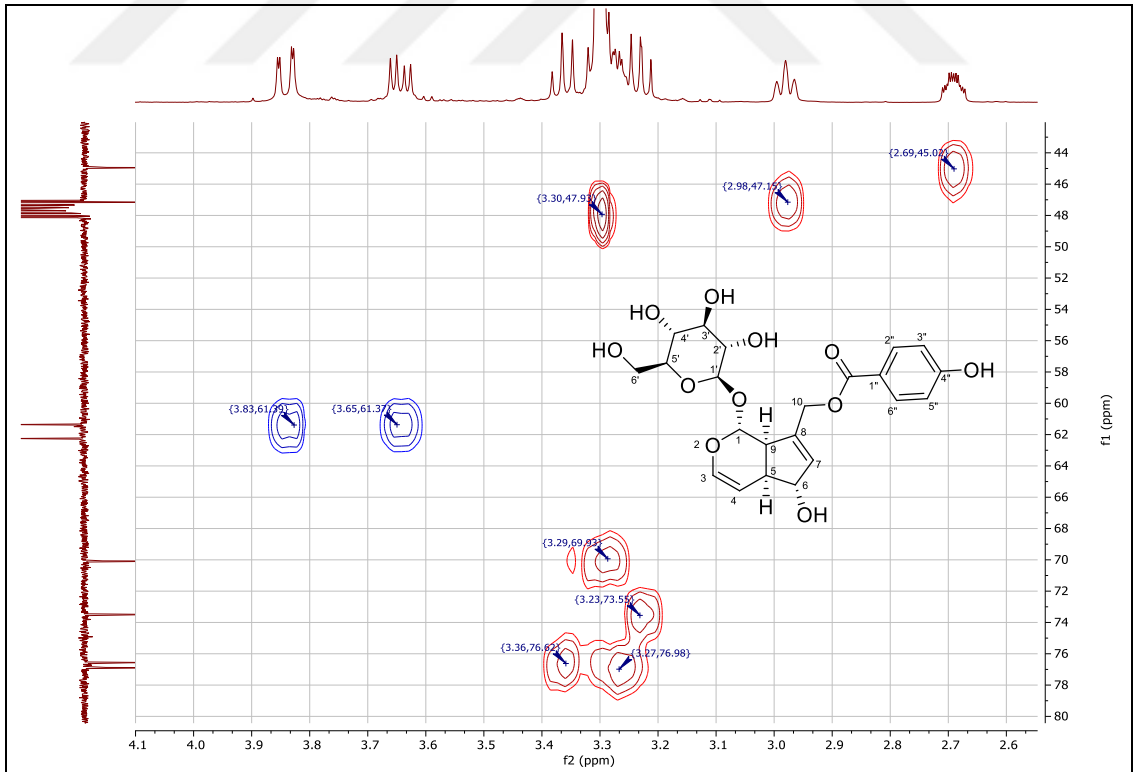
Ek A7 : Agnusit bileşğinin HSQC NMR spektrumu (CD<sub>3</sub>OD).



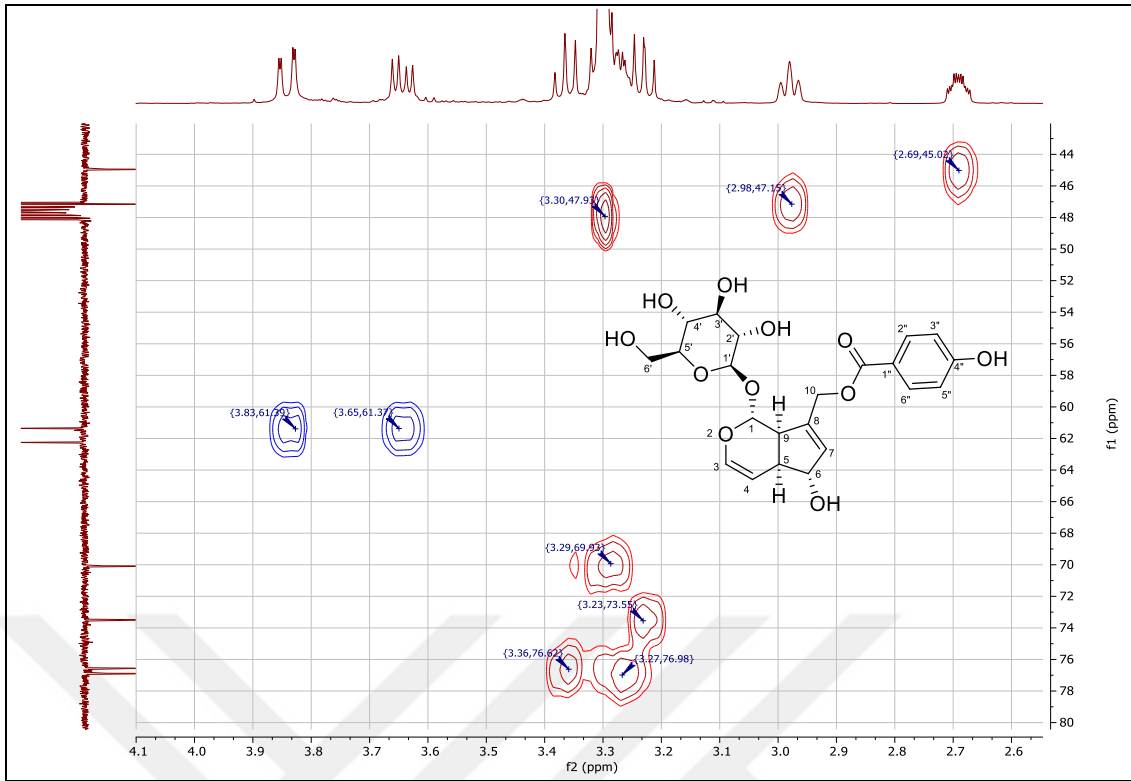
Ek A8 : Agnusit bileşğinin genişletilmiş HSQC NMR spektrumu (CD<sub>3</sub>OD).



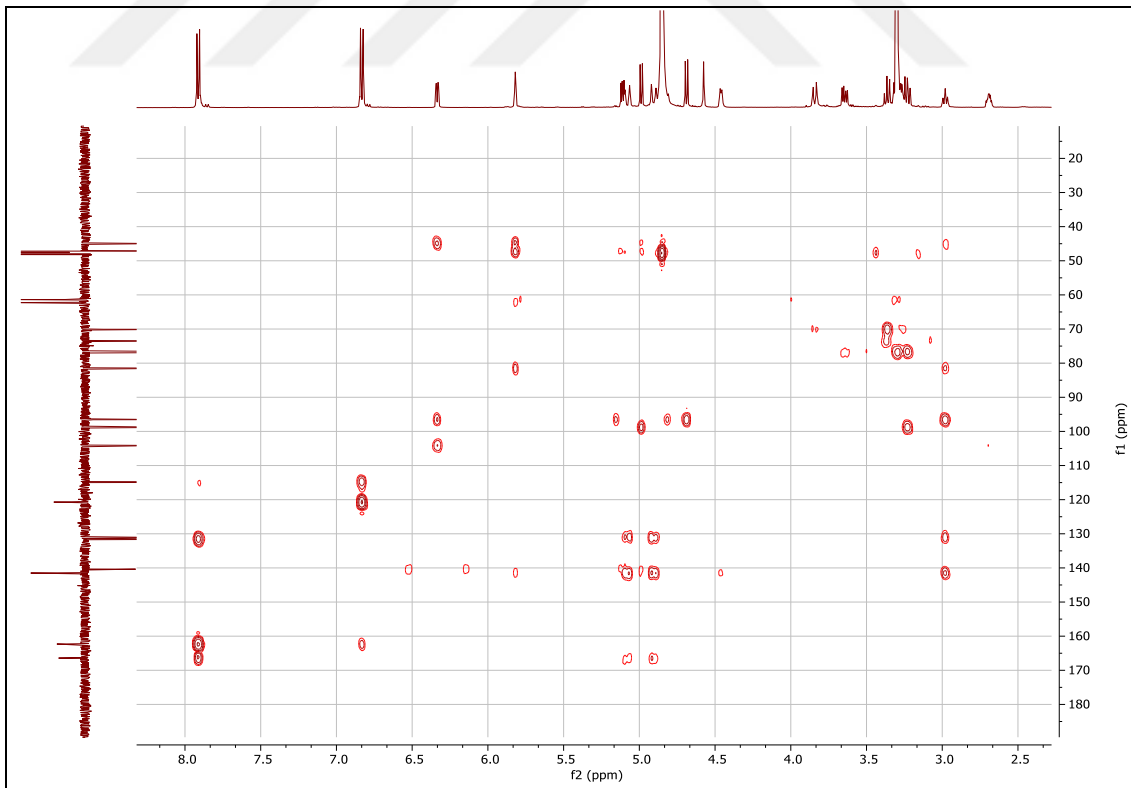
Ek A9 : Agnusit bileşğinin genişletilmiş HSQC NMR spektrumu (CD<sub>3</sub>OD).



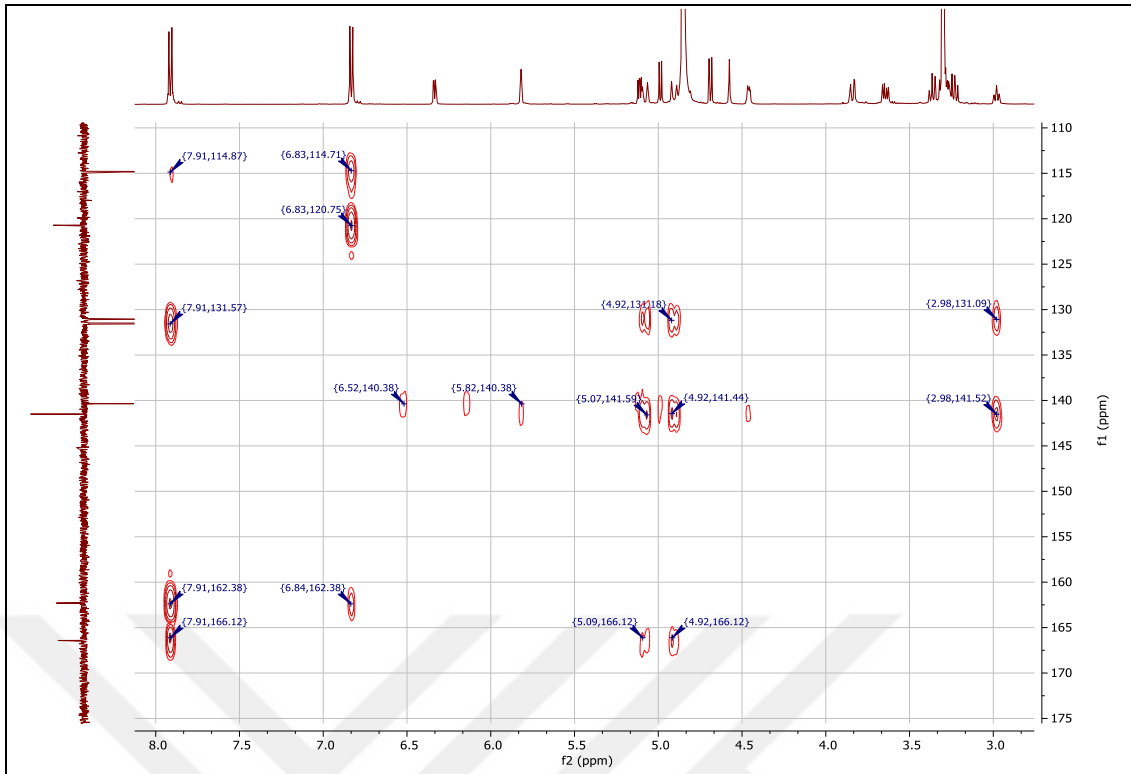
Ek A10 : Agnusit bileşğinin genişletilmiş HSQC NMR spektrumu (CD<sub>3</sub>OD).



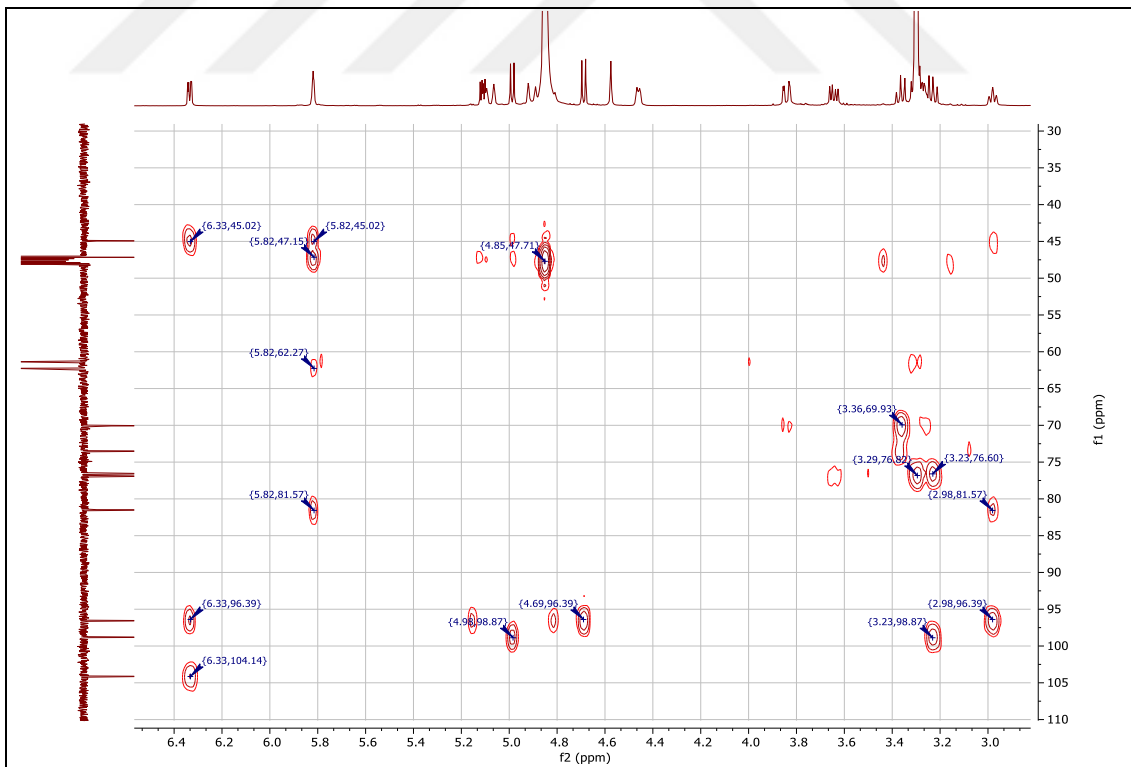
**Ek A11 : Agnusit bileşiginin genişletilmiş HSQC NMR spektrumu (CD<sub>3</sub>OD).**



**Ek A12 : Agnusit bileşiginin HMBC NMR spektrumu (CD<sub>3</sub>OD).**



**Ek A13 :** Agnusit bileşığının genişletilmiş HMBC NMR spektrumu (CD<sub>3</sub>OD).



**Ek A14 :** Agnusit bileşığının genişletilmiş HMBC NMR spektrumu (CD<sub>3</sub>OD).

## Ek B1

Klinik Araştırmalar Etik Kurul Onayı/Tarih ve Sayı: 17.11.2021-E.40177

### BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU (2011-KAEK-42) KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Vitex Agnus -Castus Bitkisinde Bulunan Agnusit Bileşiginin Plazmada Sıvı Kromatografik Analizi Ve Biyoyararlanımının İncelenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Adnan Menderes Bulvarı Vatan Caddesi 34093 Fatih/İstanbul
	TELEFON	(0212) 523 22 88 - 3238
	FAKS	(0212) 533 23 26
	E-POSTA	<a href="mailto:etikkurul@bezmialem.edu.tr">etikkurul@bezmialem.edu.tr</a>

BAŐYURU BİLGİLERİ	KOORDİNATOR/SORUMLU ARAŐTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Ő .Evrım Tekkeli							
	KOORDİNATOR/SORUMLU ARAŐTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Analitik Kimya							
	KOORDİNATOR/SORUMLU ARAŐTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakóltesi							
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	-							
	DESTEKLEYİCİ								
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)	-							
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ								
	ARAŞTIRMANIN FAZI VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>						
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>						
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>						
FAZ 4		<input type="checkbox"/>							
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>							
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>							
In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>							
İlaç dışı klinik araştırma		<input checked="" type="checkbox"/>							
Diğer ise belirtiniz									
ARAŐTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ	<input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ	<input type="checkbox"/>	ULUSAL	<input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI	<input type="checkbox"/>	
	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili					
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	-	-	Türkçe	<input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce	<input type="checkbox"/>	Diğer	<input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŐ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	-	-	Türkçe	<input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce	<input type="checkbox"/>	Diğer	<input type="checkbox"/>
OLGU RAPOR FORMU			Türkçe	<input type="checkbox"/>	İngilizce	<input type="checkbox"/>	Diğer	<input type="checkbox"/>	
ARAŞTIRMA BROŐÜRÜ			Türkçe	<input type="checkbox"/>	İngilizce	<input type="checkbox"/>	Diğer	<input type="checkbox"/>	

Sayfa 1 / 3

Etik Kurul Başkanı  
Prof. Dr. Özcan KARAMAN

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.Evrak sorgulaması  
<https://turkiye.gov.tr/ebd?eK=5394&eD=BSD4KSFAS3&eS=40177> adresinden yapılabilir.

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU (2011-KAEK-42) KARAR FORMU**

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Vitex Agnus -Castus Bitkisinde Bulunan Agnusit Bileşinin Plazmada Sıvı Kromatografik Analizi Ve Biyoyararlanımının İncelenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

	Belge Adı		Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	SİGORTA	<input type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>	01.12.2019 tarihli, 13.10.2021 imza tarihli
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>	
	ILAN	<input type="checkbox"/>	
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>	
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>	
	DİĞER:	<input checked="" type="checkbox"/>	<p>Klinik Araştırma Başvuru Formu (01.12.2019)</p> <p>-Sorumlu araştırmacı ve yardımcı araştırmacılara ait özgeçmiş formları</p> <p>- Çalışmanın Helsinki Bildirgesi, İKU/İLU' ya uygun yürütüleceğine dair taahhütname</p> <p>- Araştırma ile ilgili yayınlar</p>
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 17/9	Tarih: 06.10.2021	
	<p>Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.</p> <p>İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.</p>		

Klinik Araştırmalar Etik Kurul Onayı/Tarih ve Sayı: 17.11.2021-E.40177

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU (2011-KAEK-42) KARAR FORMU**

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Vitex Agnus -Castus Bitkisinde Bulunan Agnusit Bileşinin Plazmada Sıvı Kromatografik Analizi Ve Biyoyararlanımının İncelenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

<b>BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU</b>	
<b>ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI</b>	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
<b>BAŐKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:</b>	Prof. Dr. Özcan KARAMAN

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile iliŐki		Katılım *		İmza
			E	K	E	H	E	H	
Prof. Dr. Özcan KARAMAN	İç Hastalıkları	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Selahattin TUĞRUL	Kulak Burun ve Boğaz Hastalıkları	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Arzu ŞAKUL	Tıbbi Farmakoloji	Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Emel TORUN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ali Akçahan GEPDIREMEN	Tıbbi Farmakoloji	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ümmihan İŐOĐLU	Fizyoloji	İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Ebru HACIOSMANOĞLU	Biyofizik	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Meltem BAKKAL	Pedodonti	Bezmialem Vakıf Üniversitesi DiŐ Hekimliği Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Alper YENİGÜN	Kulak Burun ve Boğaz Hastalıkları	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Ömer UYSAL	Bioistatistik ve Tıp Bilişimi	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Tülin KUZU	Sivil Üye	-	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Avukat Şevkiye KARAHAN	Hukuk	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

\* :Toplantıda Bulunma

**Karar:**  Onaylandı  Reddedildi

Sayfa 3 / 3

Etik Kurul Başkanı  
Prof. Dr. Özcan KARAMAN

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.Evrak sorgulaması  
<https://turkiye.gov.tr/ebd?eK=5394&eD=BSD4KSFAS3&eS=40177> adresinden yapılabilir.

## **ÖZGEÇMİŞ**

**Ad-Soyad** : Derya EGELİ  
**Doğum Tarihi ve Yeri** :  
**E-posta** :

### **ÖĞRENİM DURUMU:**

- **Lisans** : 2018, Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi

### **MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:**

- 2019-2022 Fitofarmasi Uzmanlık Öğrencisi, Bezmialem Vakıf Üniversitesi

### **DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:**

-