

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SAMBUCUS NIGRA L. (KARA MÜRVER) BİTKİSİNİN ÇİÇEK VE
MEYVELERİNDEN STANDARDİZE EKSTRELERİN HAZIRLANMASI VE
BİYOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Şeyma ULUSOY

Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Anabilim Dalı
Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Doktora Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Murat KARTAL

Haziran 2024

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***SAMBUCUS NIGRA* L. (KARA MÜRVER) BİTKİSİNİN ÇİÇEK VE
MEYVELERİNDEN STANDARDİZE EKSTRELERİN HAZIRLANMASI VE
BİYOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

**Şeyma ULUSOY
205312001**

**Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Anabilim Dalı
Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Doktora Programı**

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Murat KARTAL

Haziran 2024

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 205312001 numaralı Doktora Öğrencisi Şeyma ULUSOY, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “*SAMBUCUS NIGRA* L. (KARA MÜRVER) BİTKİSİNİN ÇİÇEK VE MEYVELERİNDEN STANDARDİZE EKSTRELERİN HAZIRLANMASI VE BİYOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Murat KARTAL**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Prof. Dr. Aydan DAĞ
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Prof. Dr. Hülya YILMAZ AYDOĞAN
İstanbul Üniversitesi

Doç. Dr. Çağla KIZILARSLAN HANÇER
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Tuba KUŞMAN SAYGI
Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Teslim Tarihi : 12 Temmuz 2024
Savunma Tarihi : 24 Haziran 2024



Biricik aileme,

ÖNSÖZ

Doktora eğitimimin her aşamasında bana destek olan, bilgi ve değerli tecrübelerini paylaşan, sürekli ilham ve motivasyon kaynağı olan değerli hocam, akademik hayatımdaki rehberim, tez danışmanım sayın Prof. Dr. Murat KARTAL'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Daimî öğrenme ve öğretme isteğiyle bana ve birçok akademisyene örnek teşkil eden, tez izleme jürimde yer almasıyla tecrübelerinden faydalandığım Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Anabilim Dalı başkanı saygıdeğer hocam sayın Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU'ya teşekkür ederim.

Tez izleme jürimde yer alıp deneyimleriyle bana yol gösteren sayın Prof. Dr. Aydan DAĞ'a teşekkür ederim.

In vivo biyolojik aktivite çalışmalarındaki büyük katkıları, muazzam desteği ve rehberliği için sayın Prof. Dr. Esra AKKOL KÜPELİ'ye yürekten teşekkürlerimi sunuyorum.

In vitro sitotoksosite çalışmam için bana yardımcı olan sayın Doç. Dr. Mahmut Fırat KENANOĞLU'na teşekkür ederim.

T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne ve sayın Doç. Dr. Ünal KARIK'a, Türkiye'nin farklı lokasyonlarından "Mürver (*Sambucus nigra*) Seleksiyon Islahı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü Projesi" kapsamında bana 120'nin üzerinde kara mürver örneği sağladıkları için teşekkür ederim.

Balıkesir Büyükşehir Belediyesi Çiftçi Eğitim Merkezi'ne ve merkezin şube müdürü sayın Nazım TANRIKULU'na bitki materyalimi toplamam konusunda verdikleri destekten ötürü teşekkür ederim.

Manevi desteklerinden dolayı sevgili çalışma arkadaşlarım Hatice AKBAL İNAN, Büşra BAYRAK ve Ebrar İNAL'a teşekkür ederim.

Beni bugünlere getiren, her daim desteklerini arkamda hissettiğim, benimle birlikte Balıkesir'e gelip tez bitkimi toplamama olanak sağlayan biricik annem ve babam Hanife ve Mahmut ULUSOY'a, kız kardeşlerim Duygu Erva ve Eda Naz ULUSOY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. İyi ki varsınız.

Bu tez, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 20220211 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Mayıs 2024

Ecz. Şeyma ULUSOY

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.

Şeyma ULUSOY

İmza

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	iv
BEYAN	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	ix
SEMBOLLER	xi
TABLO LİSTESİ	xii
ŞEKİL LİSTESİ	xiv
ÖZET	xvi
SUMMARY	xvii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. <i>Sambucus nigra</i> L. TÜRÜNE AİT BOTANİK BİLGİLER	3
2.1 <i>Sambucus nigra</i> Türünün Sistematikteki Yeri	3
2.2 Viburnaceae Familyasının Özellikleri.....	3
2.3 <i>Sambucus</i> L. Cinsi.....	3
2.4 <i>Sambucus nigra</i> Türünün Özellikleri ve Yayılışı	5
3. GENEL BİLGİLER.....	7
3.1 <i>Sambucus nigra</i> 'nın Besin Değeri ve Fitokimyasal İçeriği	7
3.1.1 Karbonhidratlar	8
3.1.2 Aminoasitler ve proteinler.....	8
3.1.2.1 Ribozomu inaktive eden proteinler ve lektinler	8
3.1.3 Sabit yağ.....	9
3.1.4 Uçucu yağ.....	9
3.1.5 Organik asitler	9
3.1.6 Mineraller	10
3.1.7 Vitaminler	10
3.1.8 Polifenoller.....	11
3.1.9 Siyanogenetik heterozitler.....	21
4. <i>Sambucus nigra</i> TÜRÜNÜN KULLANIM ALANLARI VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ.....	22
4.1 <i>Sambucus nigra</i> Türünün Kullanım Alanları	22
4.2 Antioksidan Aktivite	24
4.3 Antibakteriyel Aktivite.....	24
4.4 Antienflamatuvar Aktivite	25
4.5 Anti-influenza Aktivite	26
4.6 Antidiyabetik/Anti-obezite Aktivite	27
5. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
5.1 Kimyasal Maddeler ve Çözücüler.....	30
5.2 Mürver (<i>Sambucus nigra</i>) Seleksiyon Islahı TAGEM (Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü) Projesi İçin Kullanılan Gereç ve Yöntemler.....	31

5.2.1 Bitkisel materyaller	31
5.2.2 Spektrofotometrik toplam antosiyanin analiz yöntemi	33
5.3 <i>In vitro</i> sitotoksosite testleri için kullanılan gereç ve yöntemler	34
5.3.1 Bitkisel materyal	34
5.3.2 Kara mürver çiçek, meyve ve yaprak ekstralarının hazırlanması	35
5.3.3 Ekstrelerin sıvı kromatografisi ve yüksek rezolüsyonlu kütle spektrometresi (LC-HRMS) ile fenolik bileşen tayini yöntemi.....	35
5.3.4 <i>In vitro</i> sitotoksosite test protokolü.....	36
5.4 <i>In Vivo</i> Biyolojik Aktivite Testleri İçin Kullanılan Gereç ve Yöntemler	36
5.4.1 Bitkisel materyal	36
5.4.2 Kara mürver meyvelerinde nem tayini.....	37
5.4.3 Kara mürver çiçek, meyve ve yaprak ekstralarının hazırlanması	37
5.4.4 Total fenolik madde miktar tayini yöntemi.....	37
5.4.5 Total flavonoit madde miktar tayini yöntemi.....	38
5.4.6 Kara mürver çiçek, meyve ve yaprak ekstralarında rutin ve izokersitrin miktarının yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile analizi ve yöntem validasyonu	38
5.4.6.1 Sistem tekrarlanabilirliği.....	39
5.4.6.2 Sistem uygunluğu.....	39
5.4.6.3 Seçicilik.....	39
5.4.6.4 Doğrusallık.....	39
5.4.6.5 Uygulama aralığı.....	40
5.4.6.6 Doğruluk	40
5.4.6.7 Kesinlik	40
5.4.6.8 Sağlamlık	41
5.4.6.9 Stabilite	41
5.4.6.10 Tayin sınırı (LOQ) ve gözlenebilirlik sınırı (LOD).....	41
5.4.7 Kara mürver meyve ekstralarında siyanidin-3-glukozit ve siyanidin-3-sambubiozit miktar tayini için kullanılan HPLC-PDA metodu	42
5.4.7.1 Standart siyanidin-3-glikozit ve siyanidin-3-sambubiozit çözeltilerinin hazırlanması	42
5.4.7.2 Kromatografik koşullar	42
5.4.7.3 Ekstrelerin nicel analizi.....	43
5.4.8 Ekstrelerin LC-HRMS ile fenolik bileşen tayini yöntemi.....	43
5.4.9 <i>In vivo</i> anti-obeze aktivite çalışmaları	43
5.4.9.1 Deney hayvanları	43
5.4.9.2 Deney protokolü.....	43
5.4.9.3 Biyokimyasal analizler.....	44
5.5 Kara Mürver ve Ekinezya Ekstreleri İçeren Formülasyon Oluşturulması	47
5.5.1 Formülasyonun hazırlanması	47
5.5.2 Formülasyonun askorbik asit miktarının HPLC-PDA ile takip edilmesi..	48
5.5.2.1 Standart L-askorbik asit çözeltilerinin hazırlanması.....	48
5.5.2.2 Kromatografik koşullar	48
5.5.2.3 Örneklerin nicel analizi.....	48
5.5.3 Formülasyonun toplam fenolik ve flavonoit madde miktarlarının takip edilmesi	48
5.5.4 Formülasyonun toplam antosiyanin miktarlarının takip edilmesi.....	49
6. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	50

6.1 Mürver (<i>Sambucus nigra</i>) Seleksiyon Islahı TAGEM Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü Projesi Kapsamındaki Kara Mürver Örneklerinin Toplam Antosiyanin Miktarları	50
6.2 <i>In Vitro</i> Sitotoksosite Testi İçin Hazırlanan Ekstrelerle İlgili Bulgular.....	53
6.2.1 Ekstrelerin verimleri.....	53
6.2.2 Ekstrelerin LC-HRMS bulguları	53
6.2.3 Ekstrelerin <i>in vitro</i> sitotoksosite testi bulguları	57
6.3 <i>In Vivo</i> Biyolojik Aktivite Testleri İçin Hazırlanan Ekstrelerle İlgili Bulgular.....	59
6.3.1 Kullanılan yaş mürver meyvelerindeki nem tayinine ait bulgular	59
6.3.2 Ekstrelerin verimleri.....	60
6.3.3 Ekstrelerin spektrofotometrik yöntemle tayin edilen toplam fenolik madde miktarları	60
6.3.4 Ekstrelerin spektrofotometrik yöntemle tayin edilen toplam flavonoit madde miktarları	61
6.3.5 Kara mürver çiçek, meyve ve yaprak ekstrelerindeki rutin ve izokersitrin miktarının yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile analizi ve yöntem validasyonu	62
6.3.5.1 Sistem tekrarlanabilirliği.....	62
6.3.5.2 Sistem uygunluğu.....	62
6.3.5.3 Seçicilik.....	63
6.3.5.4 Doğrusallık.....	64
6.3.5.5 Uygulama aralığı.....	67
6.3.5.6 Doğruluk	68
6.3.5.7 Kesinlik	69
6.3.5.8 Sağlamlık	72
6.3.5.9 Stabilite	75
6.3.5.10 LOQ ve LOD.....	77
6.3.5.11 Tüm kuru ekstrelerin valide edilen HPLC-PDA metoduyla elde edilen rutin ve izokersitrin analiz sonuçları	78
6.3.6 Ekstrelerin siyanidin-3-glukozit ve siyanidin-3-sambubiozit miktarlarının HPLC-PDA ile analizinin sonuçları.....	79
6.3.7 Ekstrelerin LC-HRMS bulguları	82
6.3.8 Standardize ekstrelerin spesifikasyon parametreleri.....	91
6.3.9 <i>In vivo</i> anti-obezite aktivite çalışma bulguları	93
6.4 Kara Mürver ve Ekinezya Ekstreleri İçeren Formülasyonla İlgili Bulgular ..	100
6.4.1 Formülasyonun zaman içinde L-askorbik asit miktarlarının değişimini gösteren HPLC-PDA bulguları	100
6.4.2 Formülasyonun zaman içinde toplam fenolik ve flavonoit miktarlarının değişimini gösteren spektrofotometrik bulgular	103
6.4.3 Formülasyonun zaman içinde toplam antosiyanin miktarlarının değişimini gösteren spektrofotometrik bulgular	105
7. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	106
KAYNAKLAR	110
EKLER	120
ÖZGEÇMİŞ.....	122

KISALTMALAR

A549	: İnsan alveoler adenokarsinom hücresi
ATP	: Adenozin Trifosfat
BAÇEM	: Balıkesir Büyükşehir Belediyesi Çiftçi Eğitim Merkezi
BHT	: Bütil hidroksi toluen
CMC	: Karboksimetil selüloz
CMC	: Karboksimetil selüloz
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DSBmT	: N, N-bis (4-sulfobütil)-m-toluidin-disodyum
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
EMA	: Avrupa İlaç Ajansı
EtOH	: Etanol
FBS	: Fetal sığır serumu
FCR	: Folin-Ciocalteu reaktifi
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
IC₅₀	: Yarı maksimum inhibisyon konsantrasyonu
IL	: İnterlökin
INF-γ	: İnterferon gama
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
MCF-7	: İnsan meme adenokarsinomu hücresi
MÇE	: Mürver çiçek %50 etanol ekstresi
MÇS	: Mürver çiçek su ekstresi
MeOH	: Metanol
MME	: Mürver meyve %50 etanol ekstresi
MMS	: Mürver meyve su ekstresi
MYE	: Mürver yaprak %50 etanol ekstresi
MYS	: Mürver yaprak su ekstresi
Neu5Ac	: N-Asetilnöraminik asit
Nm	: Nanometre
RIP	: Ribozom inaktive eden proteinler
Rs	: Rezolüsyon
RSD	: Bağlı standart sapma
<i>S. nigra</i>	: <i>Sambucus nigra</i> L.
SAα2,6Gal	: Sialik asit- α -2,6-galaktoz
Sin.	: Sinonim, eş ad
SNA	: Sambucus nigra aglütinin
T₃	: Triiyodotironin
T₄	: Tiroksin
TAGEM	: Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü
TNF-α	: Tümör nekroz faktör alfa

U118 MG	: İnsan beyni glioma kanser hücresi
UV-Vis	: Ultraviyole – Görünür ışık bölgesi
İLMER	: Bezmialem Vakıf Üniversitesi İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezi
LC-HRMS	: Sıvı kromatografi - yüksek rezolüsyonlu kütle spektrometresi
ADP	: Adenozin difosfat
USP	: Amerikan Farmakopesi
mL	: Mililitre
L	: Litre
g	: Gram
mg	: Miligram
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür



SEMBOLLER

%U	: Rölatif belirsizlik
N	: Teorik plaka sayısı
°C	: Santigrat derece
T	: Kuyruklanma faktörü
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama
μ	: Mikro



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: Kabul edilen <i>Sambucus</i> türleri [13].	4
Tablo 3.1: 100 gram <i>Sambucus nigra</i> meyvesinin besin içeriği [20].	7
Tablo 5.1: “Mürver (<i>Sambucus nigra</i>) Seleksiyon Islahı TAGEM Projesi” kapsamında analiz edilen <i>S. nigra</i> örneklerine dair bilgiler.	31
Tablo 5.2: Deney grupları	44
Tablo 6.1: Mürver (<i>Sambucus nigra</i>) Seleksiyon Islahı TAGEM Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü projesi kapsamındaki kara mürver örneklerinin toplam antosiyanin miktarları.	50
Tablo 6.2: Toplam antosiyanin miktarı en fazla olan 5 örnek.	53
Tablo 6.3: LC-HRMS bulgularına göre mürver meyve, yaprak ve çiçeklerindeki fenolik bileşiklerin miktarları.	54
Tablo 6.4: Mürver ekstrelerinin farklı hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi.	58
Tablo 6.5: <i>Sambucus nigra</i> ekstrelerinin toplam fenolik madde miktarları.	61
Tablo 6.6: <i>Sambucus nigra</i> ekstrelerinin toplam flavonoit madde miktarları.	61
Tablo 6.7: Sistem tekrarlanabilirliği.	62
Tablo 6.8: Sistem uygunluğu.	63
Tablo 6.9: Rutin standardının doğrusalılığı.	65
Tablo 6.10: İzokersitrin standardının doğrusalılığı.	66
Tablo 6.11: Uygulama aralığı.	67
Tablo 6.12: Rutin standardı için doğruluk analizi.	68
Tablo 6.13: İzokersitrin standardı için doğruluk analizi.	68
Tablo 6.14: MMS ve MÇE ekstrelerinin rutin içeriğinin tekrarlanabilirlik parametrelerinin sonuçları.	69
Tablo 6.15: MMS ve MÇE ekstrelerinin rutin içeriğinin tekrarlanabilirlik parametrelerinin sonuçları.	70
Tablo 6.16: Farklı kişiler tarafından hazırlanan numunelerin rutin miktar analizi.	71
Tablo 6.17: Farklı kişiler tarafından hazırlanan numunelerin rutin miktarının ikili karşılaştırması.	71
Tablo 6.18: Farklı kişiler tarafından hazırlanan numunelerin izokersitrin miktar analizi.	71
Tablo 6.19: Farklı kişiler tarafından hazırlanan numunelerin izokersitrin miktarının ikili karşılaştırması.	72
Tablo 6.20: Metot parametreleri değiştirilmeden sisteme verilen standart ve numunelerin alanları.	72
Tablo 6.21: Kolon sıcaklığı değişiminin alanlara etkisi.	73
Tablo 6.22: Mobil faz pH değişiminin alanlara etkisi.	73
Tablo 6.23: Mobil faz gradyan akışının değişiminin alanlara etkisi.	74
Tablo 6.24: Mobil faz akış hızı değişiminin alanlara etkisi.	75
Tablo 6.25: Standart ve numunelerdeki rutin stabilitesi.	75
Tablo 6.26: Standart ve numunelerdeki izokersitrin stabilitesi.	75
Tablo 6.27: Kuru ekstrelerin belirli konsantrasyonlarının rutin ve izokersitrin miktarları.	78

Tablo 6.28: Ekstrelerin siyanidin-3-glukozit ve siyanidin-3-sambubiozit miktarları.	81
Tablo 6.29: LC-HRMS bulgularına göre mürver kuru ekstrelerindeki fenolik bileşiklerin miktarları.	82
Tablo 6.30: Mürver yaprak %50 etanol ekstresinin kimyasal analizi.	91
Tablo 6.31: Mürver yaprak %50 etanol ekstresinin fiziksel özellikleri.	91
Tablo 6.32: Mürver yaprak su ekstresinin kimyasal analizi.	91
Tablo 6.33: Mürver yaprak su ekstresinin fiziksel özellikleri.	92
Tablo 6.34: Mürver çiçek %50 etanol ekstresinin kimyasal analizi.	92
Tablo 6.35: Mürver çiçek %50 etanol ekstresinin fiziksel özellikleri.	92
Tablo 6.36: Mürver çiçek su ekstresinin kimyasal analizi.	92
Tablo 6.37: Mürver çiçek su ekstresinin fiziksel özellikleri.	92
Tablo 6.38: Mürver meyve %50 etanol ekstresinin kimyasal analizi.	92
Tablo 6.39: Mürver meyve %50 etanol ekstresinin fiziksel özellikleri.	93
Tablo 6.40: Mürver meyve su ekstresinin kimyasal analizi.	93
Tablo 6.41: Mürver meyve su ekstresinin fiziksel özellikleri.	93
Tablo 6.42: Deney grupların haftalara göre ağırlık ortalamaları.	96
Tablo 6.43: Çalışma materyallerinin HDL-C, LDL-C, trigliserit, adinopektin, leptin, T3 ve T4 seviyeleri üzerindeki etkileri.	97
Tablo 6.44: Çalışma materyallerinin sıçanlarda oluşturulan obezite modelinde serumdaki sitokin seviyeleri.	98
Tablo 6.45: Çalışma materyallerinin kan glukoz ve serum insülin düzeyleri üzerine etkisi.	99
Tablo 6.46: Çalışma materyallerinin sıçanlarda serum lipaz ve lipaz enzimi üzerine belirlenen IC ₅₀ düzeyleri üzerine etkisi.	99
Tablo 6.47: Numunelerin 0-1-3. aylarda tayin edilen L-askorbik asit miktarları.	102
Tablo 6.48: Numunelerin 0-1-3. aylarda tayin edilen toplam fenolik madde miktarları.	103
Tablo 6.49: Numunelerin 0-1-3. aylarda tayin edilen toplam flavonoit madde miktarları.	104
Tablo 6.50: Numunelerin 0-1-3. aylarda tayin edilen toplam antosiyanin madde miktarları.	105

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: <i>Sambucus nigra</i> çiçek, yaprak ve meyveleri.....	5
Şekil 2.2: <i>Sambucus nigra</i> L. türünün dünya üzerindeki yayılışı [17]......	6
Şekil 2.3: <i>Sambucus nigra</i> türünün Türkiye’de yayılışı [18].	6
Şekil 3.1: Rutin [38].	11
Şekil 3.2: İzokersitrin [39]......	11
Şekil 3.3: Kersetin [40]......	12
Şekil 3.4: Kemferol-3-rutinozit [41]......	12
Şekil 3.5: Astragalin [42]......	12
Şekil 3.6: İzoramnetin-3-rutinozit [43]......	13
Şekil 3.7: İzoramnetin-3-glukozit [44]	13
Şekil 3.8: Hiperozit [45].	14
Şekil 3.9: Naringenin [48].	14
Şekil 3.10: Luteolin [49]......	14
Şekil 3.11: Apigenin [50].	15
Şekil 3.12: Epikateşin [51].	15
Şekil 3.13: Kateşin [52].	15
Şekil 3.14: Klorojenik asit [53].	15
Şekil 3.15: Neoklorojenik asit [54]......	16
Şekil 3.16: Kafeik asit [55]......	16
Şekil 3.17: Kinik asit [56]......	16
Şekil 3.18: Siyanidin-3-glukozit [57].	16
Şekil 3.19: Siyanidin-3-sambubiozit [58]......	17
Şekil 3.20: Siyanidin-3,5-diglukozit [59].	17
Şekil 3.21: Siyanidin-3-sambubiozit-5-glukozit [60]......	17
Şekil 3.22: Siyanidin-3-rutinozit [61]......	18
Şekil 3.23: Siyanidin-3-glukozidin sıcaklık artışının etkisiyle parçalanması [63]....	18
Şekil 3.24: Farklı pH değerlerinde antosiyaninler [62].	20
Şekil 3.25: Sambunigrin’in hidroliz yolağı [66]......	21
Şekil 5.1: Kuru meyvelerin toplam antosiyanin miktarının analizi için örnek hazırlanış metodu	34
Şekil 6.1: Siyanidin-3-glukozit klorürün UV-Vis mikropilaka spektrofotometresi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.	50
Şekil 6.2: <i>In vitro</i> sitotoksisite testi için hazırlanan mürver meyve ekstresinin LC- HRMS kromatogramları	55
Şekil 6.3: <i>In vitro</i> sitotoksisite testi için hazırlanan mürver yaprak ekstresinin LC- HRMS kromatogramları	56
Şekil 6.4: <i>In vitro</i> sitotoksisite testi için hazırlanan mürver çiçek ekstresinin LC- HRMS kromatogramları	57
Şekil 6.5: Kara mürver meyvelerinde nem tayininin yapılması.	59
Şekil 6.6: Gallik asidin UV-Vis mikropilaka spektrofotometresi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.	60

Şekil 6.7: Kersetinin UV-Vis mikrolpaka spektrofotometresi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.	61
Şekil 6.8: Boş çözücü kromatogramı.	63
Şekil 6.9: Rutin standardı kromatogramı.	63
Şekil 6.10: İzokersitrin standardı kromatogramı	64
Şekil 6.11: MMS kromatogramı.	64
Şekil 6.12: MÇE kromatogramı.	64
Şekil 6.13: Rutin standardının kalibrasyon eğrisi, denklemleri ve R^2 değeri.	65
Şekil 6.14: İzokersitrin standardının kalibrasyon eğrisi, denklemleri ve R^2 değeri.	67
Şekil 6.15: 2 hafta arayla analiz edilen rutin standardının kromatogramlarının karşılaştırılmış hali.	76
Şekil 6.16: 2 hafta arayla analiz edilen izokersitrin standardının kromatogramlarının karşılaştırılmış hali.	76
Şekil 6.17: 2 hafta arayla analiz edilen MMS kromatogramlarının karşılaştırılmış hali.	76
Şekil 6.18: 2 hafta arayla analiz edilen MÇE kromatogramlarının karşılaştırılmış hali.	76
Şekil 6.19: MMS ekstresinin kromatogramı.	79
Şekil 6.20: MÇE ekstresinin kromatogramı.	79
Şekil 6.21: Siyanidin-3-glukozit bileşiğinin hazırlanan kalibrasyon eğrisi.	79
Şekil 6.22: Siyanidin-3-sambubiozid bileşiğinin hazırlanan kalibrasyon eğrisi.	80
Şekil 6.23: Siyanidin-3-sambubiozid standart piki.	80
Şekil 6.24: Siyanidin-3-glukozit standart piki.	80
Şekil 6.25: Mürver meyve %50 etanol ekstresinin siyanidin-3-sambubiozid ve siyanidin-3-glukozit piklerini gösteren kromatogram.	81
Şekil 6.26: Mürver meyve %50 etanol ekstresinin siyanidin-3-sambubiozid ve siyanidin-3-glukozit piklerini gösteren kromatogram.	81
Şekil 6.27: Mürver yaprak %50 etanol ekstresinin LC-HRMS kromatogramları.	83
Şekil 6.28: Mürver yaprak su ekstresinin LC-HRMS kromatogramları.	84
Şekil 6.29: Mürver çiçek %50 etanol ekstresinin LC-HRMS kromatogramları.	86
Şekil 6.30: Mürver çiçek su ekstresinin LC-HRMS kromatogramları.	87
Şekil 6.31: Mürver meyve %50 etanol ekstresinin LC-HRMS kromatogramları.	88
Şekil 6.32: Mürver meyve su ekstresinin LC-HRMS kromatogramları.	90
Şekil 6.33: L-askorbik asit standardının kalibrasyon eğrisi.	101
Şekil 6.34: L-askorbik asit standart piki.	101
Şekil 6.35: 3 ay sonunda 7 kodlu numunedeki L-askorbik asit piki.	101

SAMBUCUS NIGRA L. (KARA MÜRVER) BİTKİSİNİN ÇİÇEK VE MEYVELERİNDEN STANDARDİZE EKSTRELERİN HAZIRLANMASI VE BİYOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Bu çalışmada T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü ile çalışılarak, Türkiye’de doğal olarak yetişen *Sambucus nigra* L. bitkisinin 121 farklı bölgeden alınan örnekleri toplam antosiyanin içeriği bakımından değerlendirilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, yerli ve antosiyanince zengin bir *S. nigra* kültür çeşidi geliştirilecektir.

Tez kapsamında, Balıkesir Büyükşehir Belediyesi Çiftçi Eğitim Merkezi’nde (BAÇEM) kültüre alınan *S. nigra* bitkilerinin çiçek, meyve ve yapraklarından toplanmıştır. Bu bitkisel materyallerden meyve %96 etanol ekstresi, çiçek %70 etanol ekstresi, yaprak %70 etanol ekstresi hazırlanmış ve bu ekstrelerin A549, MCF-7 ve U-118 MG hücre hatlarındaki sitotoksitesi çalışılmış, ekstrelerin bu hücre hatlarında önemli sitotoksite sergilemediği tespit edilmiştir.

Kara mürver ekstrelerindeki rutin ve izokersitrin flavonoidlerini PDA dedektörlü HPLC cihazında kantitatif olarak tayin edebilmek için metot geliştirilmiştir. Geliştirilen metot doğruluk, kesinlik, seçicilik, tayin sınır, gözlenebilme limiti, doğrusalık, uygulama aralığı ve sağlamlık açısından USP kriterlerine göre valide edilmiştir.

BAÇEM’den toplanan *S. nigra* çiçek, meyve ve yapraklarından standardize %50 etanol ekstreleri ve %100 su ekstreleri elde edilmiş ve her birinin spesifikasyonu oluşturulmuştur. Spesifikasyonlarda kimyasal içerik bakımından fenolik madde miktarı, flavonoid madde miktarı, rutin miktarı ve izokersitrin miktarına yer verilmiştir. Elde edilen standardize ekstrelerin her biri, yüksek yağlı diyetle indüklenmiş obeziteye sahip erkek Wistar albino sıçan gruplarının diyetlerine dahil edilerek test edilmiştir. Obezitede etkili parametreler olan HDL, LDL, trigliserit, adinopektin, leptin, T₃, T₄, TNF- α , IL-1 β , kan glukozu seviyesi, serum insülin seviyesi, lipaz enzim inhibisyonu ve serum lipaz seviyesi değişimleri 7 hafta boyunca takip edilmiştir. *In vivo* olarak test edilen ekstrelerin obezite parametrelerinde kayda değer değişiklikler meydana getirmediği saptanmıştır.

Ek olarak, kara mürver, ekinezya ekstreleri ile C vitamini ve çinko içeren, bağışıklık güçlendirmek için, soğuk algınlığına karşı kullanılacak damla formunda bir formülasyon hazırlanmıştır. Formülasyonun L-askorbik asit, toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde ve toplam antosiyanin madde miktarlarının stabilitesi başlangıçtan itibaren 3 ay boyunca 3 farklı ortamda takip edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kara mürver, *Sambucus nigra* L., obezite, sitotoksite, metot validasyonu

PREPARATION OF STANDARDIZED EXTRACTS FROM FLOWERS AND FRUITS OF *SAMBUCUS NIGRA* L. (BLACK ELDERBERRY) AND INVESTIGATION OF BIOLOGICAL EFFECTS

SUMMARY

In this study, working with the Republic of Türkiye Ministry of Agriculture and Forestry Aegean Agricultural Research Institute samples of the *Sambucus nigra* L. plant, which grows naturally in Türkiye, taken from 121 different regions were evaluated in terms of total anthocyanin content. In line with these results, a native and anthocyanin-rich *S. nigra* cultivar will be developed.

Within the scope of the dissertation, flowers, fruits and leaves of *S. nigra* plants cultivated at Balıkesir Metropolitan Municipality Farmer Training Center (BAÇEM) were collected. Fruit 96% ethanol extract, flower 70% ethanol extract, leaf 70% ethanol extract were prepared from these plant materials, and the cytotoxicity of these extracts on A549, MCF-7 and U-118 MG cell lines was studied, and it was determined that the extracts did not exhibit significant cytotoxicity in these cell lines.

A method was developed to quantitatively determine the rutin and isoquercitrin flavonoids in black elderberry extracts on an HPLC device equipped with a PDA detector. The developed method has been validated according to USP criteria in terms of accuracy, precision, selectivity, detection limit, detection limit, linearity, application range and robustness.

Standardized 50% ethanol extracts and 100% water extracts were obtained from *S. nigra* flowers, fruits and leaves collected from BAÇEM, and the specifications of each were created. In terms of chemical content, the specifications include the amount of phenolic substance, the amount of flavonoid substance, the amount of rutin and isoquercitrin. Each of the resulting standardized extracts was tested by inclusion in the diets of groups of male Wistar albino rats with high-fat diet-induced obesity. Changes in HDL, LDL, triglyceride, adiponectin, leptin, T₃, T₄, TNF- α , IL-1 β , blood glucose level, serum insulin level, lipase enzyme inhibition and serum lipase level, which are effective parameters in obesity, were monitored for 7 weeks. It was determined that the extracts tested *in vivo* did not cause significant changes in obesity parameters.

In addition, a formulation in the form of drops containing black elderberry and echinacea extracts, vitamin C and zinc has been prepared to strengthen immunity and be used against common cold. The stability of the L-ascorbic acid, total phenolic substance, total flavonoid substance and total anthocyanin substance amounts of the formulation was monitored in 3 different environments for 3 months from the beginning.

Keywords: Black elderberry, *Sambucus nigra* L., obesity, cytotoxicity, method validation

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Sambucus nigra L. (Viburnaceae) Avrupa ve Güneybatı Asya’da doğal olarak yetişen, daha sonra dünyanın birçok yerinde kültüre alınmış, meyve veren, çalı veya küçük ağaç formunda bir bitkidir. Ülkemizde de doğal olarak yetişmekte olan bitki “kara mürver”, “ağaç mürver” ve “Avrupa mürveri” isimleriyle anılmaktadır. *S. nigra* yapısındaki fenolik bileşikler nedeniyle oldukça değerlidir. Flavonoitler bitkinin her kısmında vardır. Rutin ile izokersitrin her bir kısımda ana flavonol olarak bulunur. Bitki kersetin, kemferol-3-rutinozit, astragalın, izoramnetin-3-rutinozit, izoramnetin-3-glukozit ve hiperozit gibi bazı flavonoitleri de içermektedir. Kara mürver, fenolik asitlerden klorojenik asit, neoklorojenik asit, kafeik asit, kinik asit ve türevlerince zengindir. Bitkinin meyveleri aynı zamanda antosiyaninler içermektedir. Siyanidin-3-glukozit ve siyanidin-3-sambubiozit kara mürver meyvelerinin majör antosiyaninleridir. Kara mürver meyvesi ve çiçekleri geleneksel olarak çeşitli şekillerde hazırlanarak (çay, tentür, sıvı ekstre, şurup vb.) özellikle ateş ve öksürükle seyreden üst solunum yolu rahatsızlıklarının tedavisinde, buna ek olarak zaman zaman laksatif veya diüretik amaçlı kullanılmıştır. Bitkinin yapraklarından ise ülkemiz ve Balkanlar’da halk arasında yara ve yanık tedavisinde yararlanılmıştır. *S. nigra* meyvelerinin antiviral –özellikle anti-influenza– etkisi yapılan *in vitro*, *in vivo* ve klinik çalışmalarca kanıtlanmıştır ve hem ülkemizde hem de dünya pazarında kara mürver meyve ekstrelerinden elde edilen gıda takviyeleri geniş bir yer tutmaktadır [1-3].

T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü ile çalışılarak Türkiye’de doğal olarak yetişen *S. nigra* bitkisinin 121 farklı bölgeden alınan örnekleri antosiyanin bakımından analiz edilerek ülkemizde antosiyanin açısından zengin bir çeşit geliştirilmesine katkı sağlanması amaçlanmıştır.

Bu çalışma kapsamında, Balıkesir Büyükşehir Belediyesi Çiftçi Eğitim Merkezi’nde (BAÇEM) kültüre alınan *S. nigra* bitkisinin çiçek, meyve ve yaprak kısımlarından toplandıktan sonra bu materyallerle elde edilen ekstrelerin insan alveoler adenokarsinom hücresi (A549), insan meme adenokarsinomu hücresi (MCF-7) ve

insan beyni glioma kanser hücresi (U-118 MG) hatlarında sitotoksitesinin araştırılması hedeflenmiştir. Aynı zamanda, toplanan materyallerden toplam fenolik madde, toplam flavonoit madde, rutin ve izokersitrin miktarlarına göre standardize edilmiş ekstreler elde edilmesi hedeflenmiştir. Ekstrelerin rutin ve izokersitrin miktarlarının doğru, kesin ve tekrarlanabilir olarak analiz edilebilmesi için fotodiyot dizisi detektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisinde metot geliştirilip ve metodun valide edilmesi amacı güdülmüştür. Standardize edilen ekstrelerin anti-obezite aktivitesinin *in vivo* olarak, diyetle indüklenmiş obeziteye sahip Wistar albino sıçanlar üzerinde incelenmesi hedeflenmiştir.

Dünya pazarında kara mürver meyve ekstresi, ekinezya çiçek ekstresi, askorbik asit (C vitamini) ve çinko içeren sıvı formda gıda takviyeleri bulunmaktadır [4-7]. Bunlara alternatif olarak, yurdumuzda yetişen bitkilerden hazırlanan ekstrelerle (kara mürver meyve ekstresi, ekinezya çiçek ekstresi) elde edilmiş, C vitamini ve çinko içeren sıvı formda ürün geliştirilme çalışmalarına başlanması; C vitamini, toplam fenolik madde, toplam flavonoit madde ve toplam antosiyanin madde miktarlarının zamanla değişiminin takip edilmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışma ile *S. nigra* bitkisinin çiçek, meyve ve yapraklarından hazırlanan ekstrelerin içerdiği sekonder metabolitler sayesinde meydana getireceği biyolojik aktiviteler araştırılarak yeni kullanım alanlarının, yeni potansiyel ürünlerin oluşturulması, böylece *S. nigra*'nın ticari katma değerlerinin artırılmasına yönelik bulguların ortaya çıkarılarak kırsal kalkınma için yeni ürün ve üretim modelleri ile fitoterapötik ürünlerin geliştirilmesine bilimsel temel oluşturulması hedeflenmiştir.

2. *Sambucus nigra* L. TÜRÜNE AİT BOTANİK BİLGİLER

2.1 *Sambucus nigra* Türünün Sistematikteki Yeri

Sambucus nigra L., *Sambucus* L. cinsine ait, Dipsacales takımından bir türdür. Dipsacales takımında bulunan *Sambucus* L., *Viburnum* L. ve *Adoxa* L. cinsleri eskiden Caprifoliaceae familyasında yer alıyordu. Ancak daha sonra yapılan moleküler filogenetik çalışmalar bu cinslerin Caprifoliaceae familyasından ayrılması gerektiğini ve bu cinslere yeni familya atanması gerektiğini göstermiştir. *Sambucus*'un da dahil olduğu bu üç cinsin günümüzde Viburnaceae (sin. Adoxaceae) familyası altında yer aldığı kabul edilmektedir [8, 9].

2.2 Viburnaceae Familyasının Özellikleri

Viburnaceae familyası *Adoxa*, *Sambucus* ve *Viburnum* olmak üzere üç cins barındırmaktadır [10]. *Adoxa* cinsi yalnızca otsuyken, *Viburnum* ve *Sambucus* cinsleri hem odunsu hem de otsu olarak bulunabilir. *Viburnum* ve *Sambucus* çoğunlukla kuzey ılıman bölgede bulunur. Ancak *Viburnum* bazı tropikal dağlarda da yetişir [11].

Adoxaceae familyasının üyeleri genellikle etli bakka veya drupa tipi meyveler üreten çok sayıda küçük çiçekten oluşan çiçek durumlarına sahiptir. Bu çiçekler beş petallidir, radyal olarak simetrik [11]. Ovaryum alt durumlu, karpeller kaynaşmıştır. Loküller 1 (*Viburnum*'da) veya 3–5 tanedir. Yapraklar bileşik (2–3 yapraklı, tek veya çift pinnatlı) veya basittir (*Viburnum*'da). Karşılıklı (opposit) veya nadiren vertisillat olarak dizilirler [12].

2.3 *Sambucus* L. Cinsi

Sambucus L. cinsi, morfolojik olarak çeşitli bir bitki grubudur [8]. Çoğunluğu yaprak dökken çalılar, çok yıllık bitkiler veya küçük ağaçlar olan 23 kabul edilen türü, 6 alttürü ve 6 varyeteyi içerir [8, 13]. Bu 23 türün listesi Tablo 2.1'de verilmiştir. Bileşik, pinnat

ila ovat-lanseolat şeklinde veya ovat-eliptik ve serrat kenar yaprakları ile karakterize edilirler. Çiçekler, terminal düz tepeli umbellat şeklinde veya piramidal panikülat olan korimboz talkım çiçek durumları halindedir. Meyveler; küçük, yuvarlak bakka tipindedir (4-7 mm çapında) ve olgunlaştıklarında renkleri değişir. Bu cins, aşırı soğuk bölgeler ve çöl bölgeleri hariç, dünyanın hemen hemen tüm bölgelerinde yaygındır [8]. Cins dünyanın ılıman ve subtropikal bölgelerinin çoğuna dağılmıştır. Her iki yarım kürede de yüksek ve alçak enlem bölgelerinde meydana geldikleri bilinmektedir ve esas olarak kuzey yarım küreye özgüdürler. Dağılım aralıkları Kuzey Amerika, Asya, Avrupa, Kuzey Afrika, Batı Hint Adaları, Avustralya'nın Doğu ve Güneydoğu'su ve Güney Amerika'nın And bölgesini içerir [9]. *Sambucus* cinsinin 2 üyesi -*Sambucus nigra* L. (kara mürver) ve *Sambucus ebulus* L. (cüce mürver)- ülkemizde de yetişmektedir.

Tablo 2.1: Kabul edilen *Sambucus* türleri [13].

Tür ismi ve otörü
<i>Sambucus adnata</i> Wall. ex DC.
<i>Sambucus africana</i> Standl.
<i>Sambucus australasica</i> (Lindl.) Fritsch
<i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltdl.
<i>Sambucus canadensis</i> L.
<i>Sambucus cerulea</i> Raf.
<i>Sambucus ebulus</i> L.
<i>Sambucus gaudichaudiana</i> DC.
<i>Sambucus javanica</i> Reinw. ex Blume
<i>Sambucus kamtschatica</i> E.L.Wolf
<i>Sambucus lanceolata</i> R.Br.
<i>Sambucus mexicana</i> C.Presl ex DC.
<i>Sambucus nigra</i> L.
<i>Sambucus palmensis</i> Link
<i>Sambucus pendula</i> Nakai
<i>Sambucus peruviana</i> Kunth
<i>Sambucus racemosa</i> L.
<i>Sambucus sibirica</i> Nakai
<i>Sambucus sieboldiana</i> (Miq.) Graebn.
<i>Sambucus</i> × <i>strumpfii</i> Gutte
<i>Sambucus tigranii</i> Troitsky
<i>Sambucus wightiana</i> Wall. ex Wight & Arn.
<i>Sambucus williamsii</i> Hance

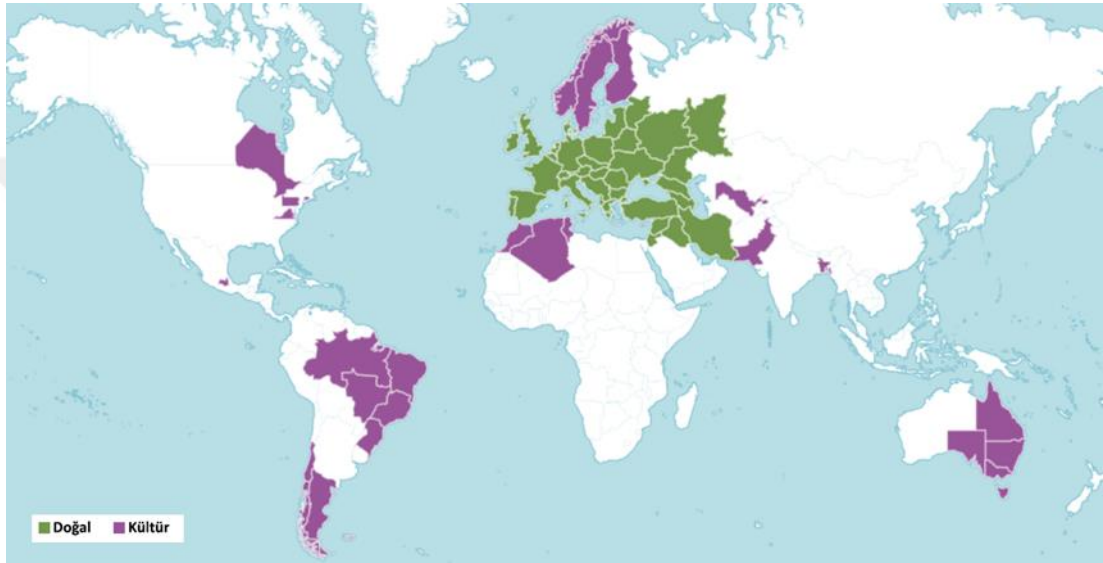
2.4 *Sambucus nigra* Türünün Özellikleri ve Yayılışı

Sambucus nigra L., ülkemizde doğal olarak yetişen 2 *Sambucus* türünden biridir. Kara mürver, ağaç mürver veya Avrupa mürveri isimleriyle bilinir. Bitki 4-10 m boyunda, çalı, yarı çalı veya küçük ağaç formundadır [14]. Genç gövde yeşilken, olgunlaşan gövde gridir. Yaprakları imparipennattır. Yaprak dizilişi opposittir. 3-7 foliole sahiptir. Beyaz-krem rengi çiçeklere sahip olan *S. nigra*'nın çiçek durumu bileşik korimbustur. Çiçekleri 5 petallidir. Sepaller beş parçalı ve miniktir. [15]. Bakka tipinde meyveleri 6-8 mm çapında, küremsidir. Meyveler hamken yeşil, olgunlaştıklarında parlak mor-siyah renktedir (Şekil 2.1) [14]. Bitkinin çiçekleri mayıs ayından haziran ayına kadar çiçek açar ve temmuz ayında meyve vermeye başlar. Meyveler ağustos ayının sonundan eylül ayının başlarına kadar tamamen olgunlaşır [16].



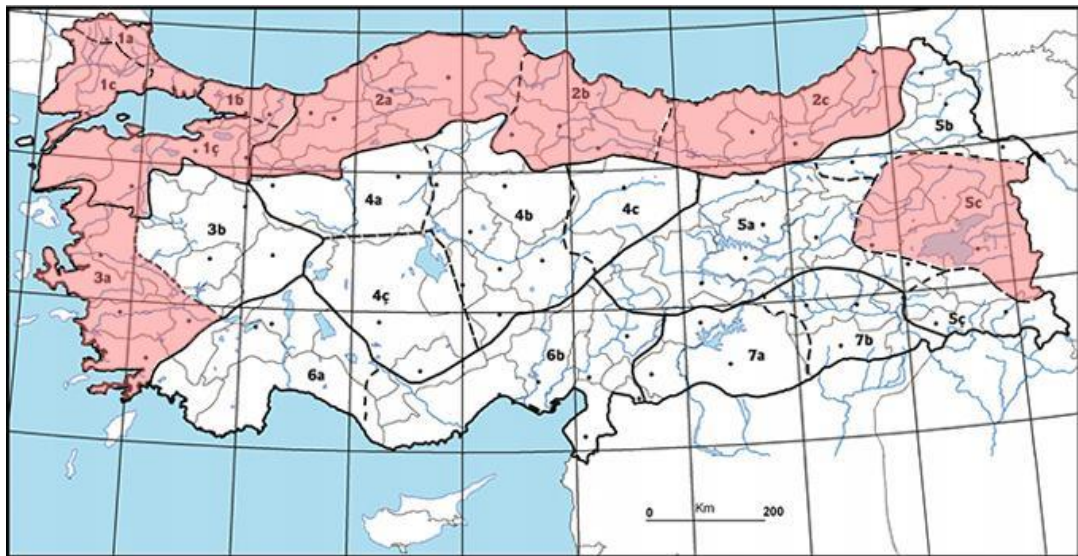
Şekil 2.1: *Sambucus nigra* çiçek, yaprak ve meyveleri.

S. nigra'nın doğal dağılım aralığını takip etmek zordur çünkü eski çağlardan beri yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüzde mürver, İrlanda'nın Atlantik kıyılarından İber Yarımadası'na, Karadeniz'e ve doğuya doğru İran-Turan ve Kafkasya bölgelerinde 55° doğu boylamına kadar Orta Avrupa'da yaygındır. Akdeniz bölgesinde daha az yaygındır. İskandinav ve Baltık ülkelerinin yanı sıra kuzeybatı Afrika (Fas, Cezayir ve Tunus), Azor Adaları, Amerika Birleşik Devletleri, Doğu Asya, Güney Avustralya ve Yeni Zelanda'da da tanıtılmış ve doğallaştırılmıştır (Şekil 2.2) [2, 17].



Şekil 2.2: *Sambucus nigra* L. türünün dünya üzerindeki yayılışı [17].

S. nigra Türkiye'de Ege, Marmara, Karadeniz bölgelerinde ve Yukarı Murat-Van Bölümü'nde yayılış göstermektedir (Şekil 2.3) [18].



Şekil 2.3: *Sambucus nigra* türünün Türkiye'de yayılışı [18].

3. GENEL BİLGİLER

3.1 *Sambucus nigra*'nın Besin Değeri ve Fitokimyasal İçeriği

Sambucus nigra, fitokimyasal içeriği açısından bereketli bir bitkidir. Ancak, her bitki için olduğu gibi *S.nigra*'nın da içerdiği fitokimyasalların oranları bulunduğu lokasyona, iklim koşullarına, hasat zamanına, kültür çeşidine (Haschberg, Korsør, Bohatka, Sambo vb.) ve bunun gibi faktörlere bağlıdır [1, 19]. Kara mürver meyvelerinin besin değerleri Tablo 3.1'de verilmiştir. İçerdiği fitokimyasallar, bu bölümün devamında derlenmiştir.

Tablo 3.1: 100 gram *Sambucus nigra* meyvesinin besin içeriği [20].

Besin içeriği	Miktar
Enerji	73 kcal
Su	79,80 g
Protein	0,66 g
Yağ	0,50 g
Karbonhidrat	18,40 g
Lif	7,00 g
Kalsiyum	38,00 mg
Demir	1,60 mg
Magnezyum	5,00 mg
Fosfor	39,00 mg
Potasyum	280,00 mg
Sodyum	6,00 mg
Çinko	0,11 mg
Bakır	0,06 mg
A vitamini	30,00 µg
Niasin	0,50 mg
B6 vitamini	0,23 mg
Folat	6,00 µg
C vitamini	36,00 mg
Kül	0,64 g

3.1.1 Karbonhidratlar

S. nigra'nın meyveleri çeşitli şekerlere ek olarak, pektin, kalsiyum pektat, selüloz gibi karbonhidratları içermektedir. Bitkinin meyvelerinin %6,8 ile %11,5'inin şekerden meydana geldiği tespit edilmiştir. Kara mürver meyvelerindeki majör şekerlerin ise glikoz ve fruktoz olduğu belirlenmiştir [1, 21, 22].

3.1.2 Aminoasitler ve proteinler

Kara mürver yapraklarında ortalama %3,3; çiçeklerinde %2,5 ve meyvelerinde %2,8 oranında; dokuzu esansiyel aminoasit olmak üzere toplam on altı farklı aminoasitten oluşan protein bulunmaktadır. Alanin, glutamik asit ve asparjik asidin kara mürverin içerdiği ana amino asitler olduğu bildirilmiştir [1].

3.1.2.1 Ribozomu inaktive eden proteinler ve lektinler

Kara mürverin içerdiği lektinler ve ribozomu inaktive eden proteinler (RIP'ler) olan *Sambucus nigra* aglütininler (SNA'lar) fitokimyasal bileşenleri arasında önemli bir grubu oluşturmaktadır [23]. Ribozomu inaktive eden proteinler (RIP'ler), ökaryotların ve prokaryotların büyük rRNA'sında bulunan sarsin-risin döngüsünde yer alan spesifik bir adeninin eliminasyonunu katalize eden, rRNA N-glikozilaz aktivitesine sahip bir protein grubudur. Ribozomlar, bu adeninin kaldırılmasıyla etkisiz hale gelir. Bu da tersinir olmayan bir şekilde protein sentezini inhibe eder ve hücre ölümü gerçekleşir. RIP'ler yapılarına 2 sınıfa ayrılmaktadır. Tip 1 RIP'ler N-glikosilaz aktivitesine sahip bir polipeptit zincirinden oluşurlar. Tip 2 RIP'ler ise iki polipeptit zincirinden oluşup enzimatik aktiviteye sahip aktif bir zincir ve hücrelerin yüzeyindeki reseptörlere bağlanabilen, RIP'nin girişini kolaylaştıran lektin (karbonhidrat bağlayıcı protein) aktivitesine sahip bir bağlanma zinciri taşırlar. RIP'lerin yapısı, aktivitesi ve etki şekli aydınlatılmıştır. Buna rağmen biyolojik işlevleri belirsizdir. RIP'lerin tek başına veya bir konjugatın parçası olarak selektif antiviral ve antikanser ajanların geliştirilmesi için iyi adaylar olduğu düşünülmektedir [24].

Diğer bitkilerde bulunan spesifik olmayan RIP'ler büyük toksisite potansiyeli taşırlar. Ancak, *S. nigra*'da bulunan RIP'ler oldukça spesifiktir. Bu RIP'lerin spesifik hücreleri hedefleme potansiyeli vardır. Bu nedenle sıklıkla terapötik olarak görev yapmak için iyi adaylar oldukları ileri sürülmektedir [23].

S. nigra kabuğu SNA'ları (SNA-I ve SNA-II) incelendiğinde patojenezi başlatmak için birçok patojenin bağlandığı sialik asit- α -2,6-galaktoz (SA α 2,6Gal) ve özellikle N-Asetilnöraminik asit- α -2,6-galaktoza (Neu5Ac α 2,6Gal) yüksek afinite gösterdikleri saptanmıştır [23].

SNA-III ise kara mürverin meyvesinden saflaştırılmıştır. SNA-III, açıkta kalan N-asetilgalaktozamin ve galaktoz kalıntılarını içeren oligosakkaritlere karşı yüksek bir afinite göstermektedir [25].

Yine SNA-IV ve SNA-V de *S. nigra* meyvelerinden izole edilmiştir. SNA-IV, *S. nigra* kabuk lektinlerine benzer şekilde SA α 2,6Gal'e afinite gösterirken; SNA-V, SNA-I ile yüksek homoloji gösterir ve Gal ile NAcGal kalıntılarına afinite sergiler. Yani kabuk SNA'larındaki gibi, bu galaktoz kalıntılarını kullanan patojenleri rekabetçi olarak inhibe etme anlamına gelmektedir. Bu muhtemel inhibisyonun detayları net değildir. Bu mekanizma *S. nigra*'nın antiviral aktivitesine katkı sağlıyor olsa bile, çiçeklerde SNA bulunmamasına rağmen kara mürver çiçekleri de antiviral etki gösterdiğinden, bunun bitkinin içerdiği tek antiviral mekanizma olması olası görülmemektedir [23]. SNA-IV ve SNA-V'in fare ve insan hücre hatlarında toksik olmadığı gösterilmiştir [23, 26, 27].

3.1.3 Sabit yağ

Kara mürverin tohumlarında %20-25 oranında sabit yağ bulunmaktadır. Mürver tohumlarında bulunan yağ asitlerinin yaklaşık %75'ini çoklu doymamış yağ asitleri oluşturur ve bunların da majör olanları oleik, linoleik ve α -linolenik asitlerdir. Tekli doymamış ve doymuş yağ asitleri (sırasıyla %13-16 ve %9-12), çoklu doymamış yağ asitlerine göre *S. nigra* tohumlarında daha az oranda bulunmaktadır [28, 29].

3.1.4 Uçucu yağ

S. nigra meyvelerinde %0,01 oranında ve çiçeklerinde %0,03 oranında uçucu yağ bulunmaktadır [1, 30, 31].

3.1.5 Organik asitler

Kara mürver meyveleri organik asitler de ihtiva etmektedir. 2009 yılında yayınlanan bir çalışmada 2 farklı *S. nigra* kültür çeşidi ve 3 farklı *S. nigra* seleksiyonu incelenmiştir [21]. 2022 yılında yayınlanan başka bir çalışmada ise 6 farklı *S. nigra*

kültür çeşidi ve doğal olarak büyüyen 2 örnek incelenmiştir [32]. Her iki çalışmada da meyvelerde 4 farklı organik asit tanımlanmıştır. Bunlardan kara mürver meyvelerinde en çok bulunanı sitrik asit olurken onu malik, şikimik ve fumarik asitler takip etmiştir [21, 32].

3.1.6 Mineraller

Bir araştırmada *S. nigra*'nın, bazı varyetelerinin ve hibritlerinin; meyvelerinin, meyve sapları, çiçek durumları, yaprakları, bitki sürgünleri, kabukları ve kökleri mineral içerikleri bakımından incelenmiştir. Potasyum (K) bitkinin tüm kısımlarında en yüksek miktarlarda tespit edilen makro mineral olmuştur. En fazla K içeren kısımlar sırayla meyve sapları ve çiçekler olmuştur. Kalsiyum (Ca) bitkinin tüm kısımlarında tespit edilen makro mineraller arasında 2. sıradadır. En fazla Ca içeren kısımlar sırasıyla yapraklar ve kabuklar olmuştur. Yine makro mineraller içinden, bitkinin magnezyumu (Mg) da içerdiği ve miktarının özellikle yapraklarda fazla olduğu araştırmanın bulguları arasındadır. Makro minerallerin bir diğeri fosfor (P) ise araştırmanın sonuçlarına göre meyve saplarında diğer kısımlara oranla daha yüksek miktarlarda bulunmaktadır. Demir (Fe) bitkinin tüm kısımlarında en yüksek miktarlarda tespit edilen mikro mineral olmuştur. Çalışma ekibi, Fe miktarlarının en yüksek köklerde ve en düşük meyvelerde olduğunu belirtirken kara mürverin; kızılıcık, yaban mersini ve ahududuya benzer veya onlardan daha yüksek miktarlarda Fe içerdiğinin altını çizmiştir. Tüm kısımlarda en bol 2. mikro element ise manganez (Mn) olmuştur ve miktarları özellikle yaprak ve kabuklarda fazladır. En çok çinkoya (Zn) yapraklarda ve en çok bakıra (Cu) kabuklarda rastlanmıştır. Toksik olan mikro elementlerden strosinyuma (Sr) en çok yapraklarda ve meyve saplarında rastlanmıştır. Sr minerali diğer kısımlarda da tespit edilse de miktarları bu iki kısma göre oldukça düşüktür. Toksik olan bir diğer mikro element alüminyuma ise (Al) en çok köklerde rastlanmıştır. Kabuklar, yapraklar ve meyve sapları önemli ölçüde daha düşük miktarlarda Al içermektedir. En düşük miktarlarda Al ise meyve ve çiçek durumlarında bulunmaktadır [33].

3.1.7 Vitaminler

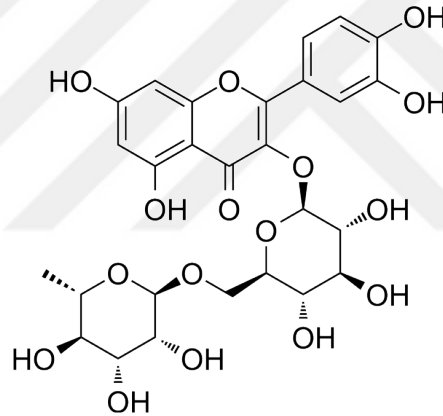
Kara mürver meyvelerinde A, B ve C vitaminleri bulunmaktadır [32]. *S. nigra* meyveleriyle ilgili birçok çalışma askorbik asitten yani C vitamininden söz etmektedir. Ancak, bu konudaki niceliksel bulgular oldukça tutarsızdır. Yapılan literatür

incelemesine göre, *S. nigra* meyvelerinin C vitamini derişimleri 6 ila 45 mg/100 g arasında değişmektedir. Sonuçların bu kadar değişkenlik göstermesinde *S. nigra* kültür çeşitlerinin ve lokasyonların farklılığının etkili olduğu düşünölmektedir [1, 22, 34-36].

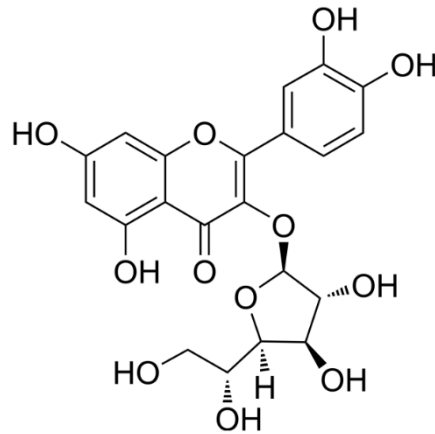
Kara mürver tohumlarından elde edilen yağda µg/g yağ düzeyinde α- ve γ-tokoferol bulunmaktadır [29].

3.1.8 Polifenoller

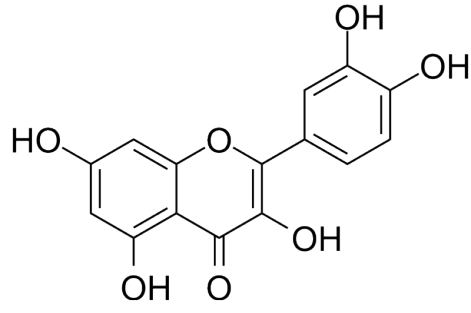
S. nigra fenolik bileşenler açısından zengin bir türdür. *S. nigra*'nın polifenol içerikleri bitkinin olgunlaşma aşamalarına göre değişkenlik gösterir. Süreç boyunca her bir polifenol kendine özgü biçimde değişir [1]. Bitkinin çiçek, meyve ve yapraklarında flavonoller ve ozlarından rutin, izokersitrin, kersetin, kemferol-3-rutinozit, astragalin, izoramnetin-3-rutinozit, izoramnetin-3-glukozit ve hiperozidi içermektedir (Şekil 3.1-Şekil 3.8). Bununla beraber bitkinin ana flavonolleri rutin ve izokersitrindir [37].



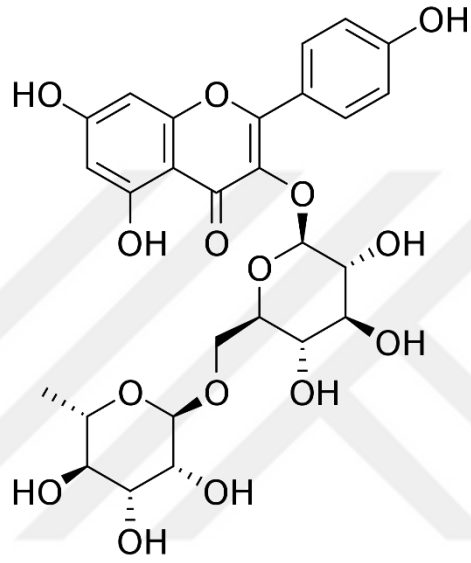
Şekil 3.1: Rutin [38].



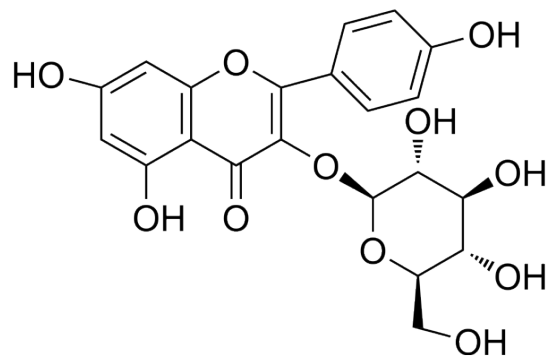
Şekil 3.2: İzokersitrin [39].



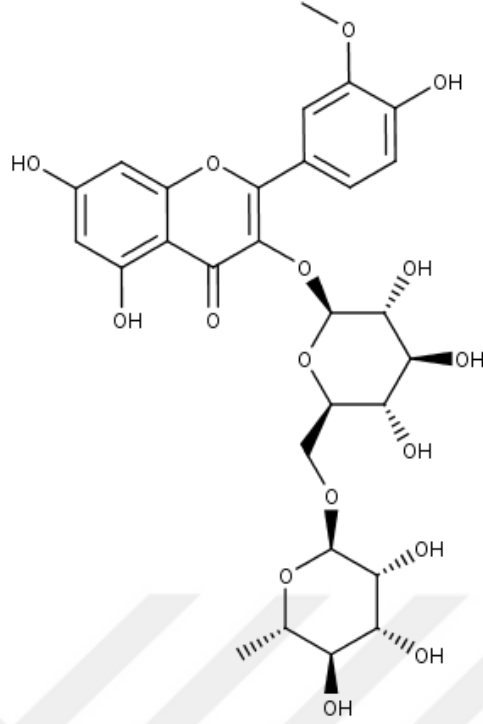
Şekil 3.3: Kersetin [40].



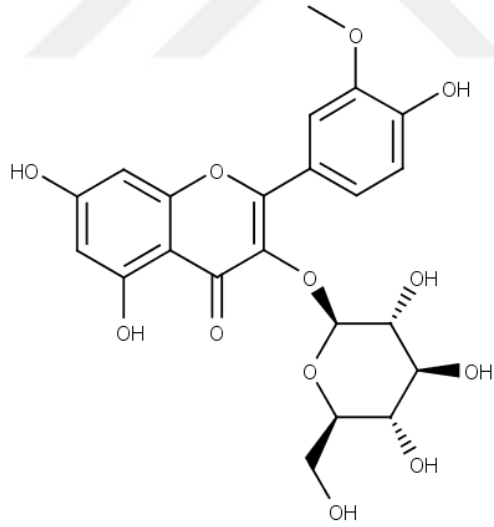
Şekil 3.4: Kemferol-3-rutinozid [41].



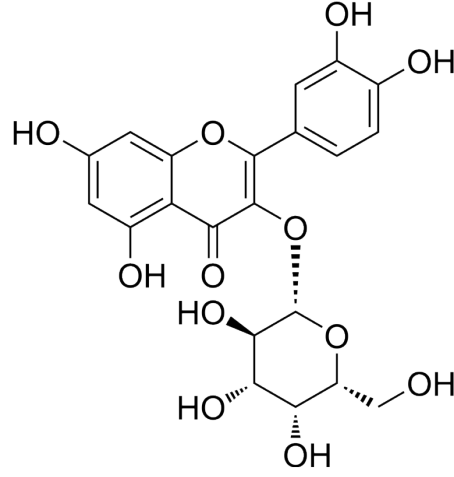
Şekil 3.5: Astragalın [42].



Şekil 3.6: İzoramnetin-3-rutinozit [43].

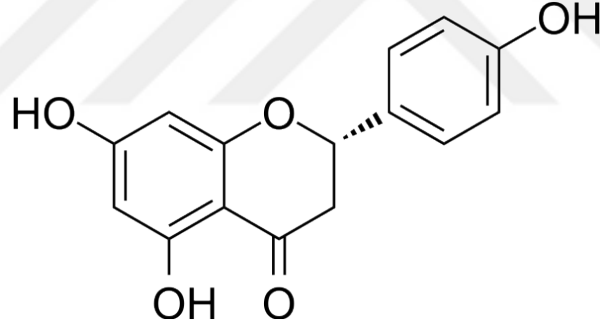


Şekil 3.7: İzoramnetin-3-glukozit [44]

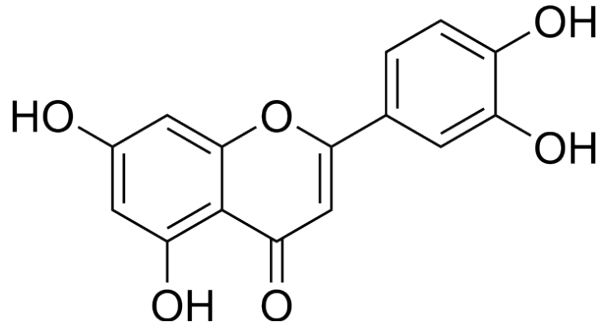


Şekil 3.8: Hiperozit [45].

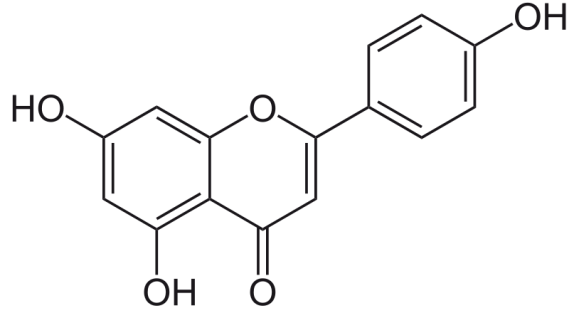
Yine çiçek, meyve ve yapraklarda başlıca flavanon naringeninidir (Şekil 3.9) [1, 23, 46]. Bitkinin ana flavonları luteolin ve apigenindir (Şekil 3.10, Şekil 3.11) [23, 46, 47]. Bitki epikateşin ve kateşin gibi flavanoller (proantosiyanidinler) de içermektedir (Şekil 3.12, Şekil 3.13) [1, 23].



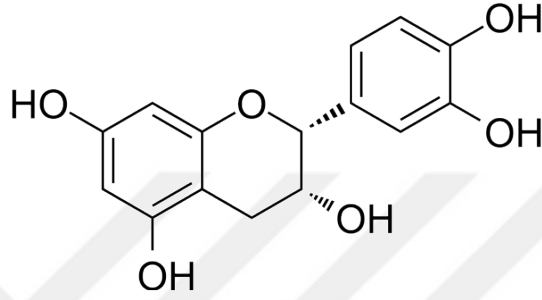
Şekil 3.9: Naringenin [48].



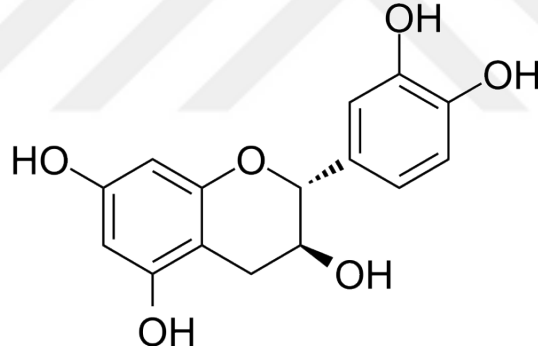
Şekil 3.10: Luteolin [49].



Şekil 3.11: Apigenin [50].

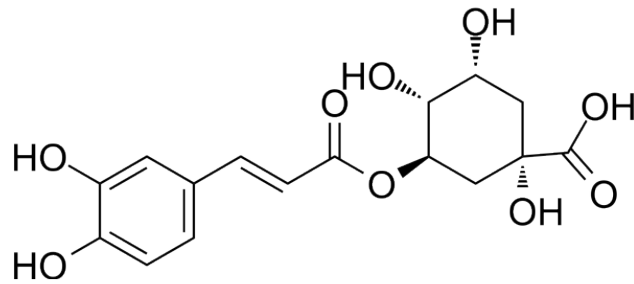


Şekil 3.12: Epikateşin [51].

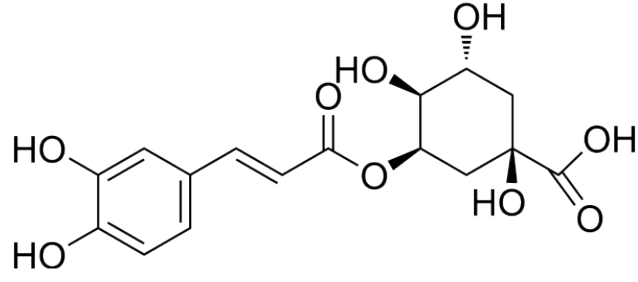


Şekil 3.13: Kateşin [52].

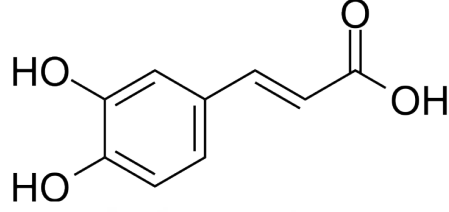
Çiçek meyve ve yaprakları fenolik asitlerden klorojenik asit, neoklorojenik asit, kafeik asit, kinik asit ve türevlerini bulundurmaktadır (Şekil 3.14-Şekil 3.17) [1, 23, 46].



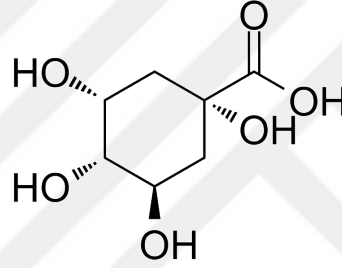
Şekil 3.14: Klorojenik asit [53].



Şekil 3.15: Neoklorojenik asit [54].

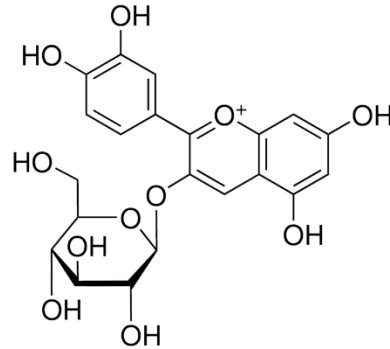


Şekil 3.16: Kafeik asit [55].

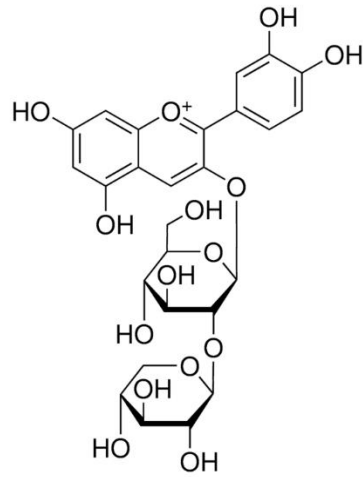


Şekil 3.17: Kinik asit [56].

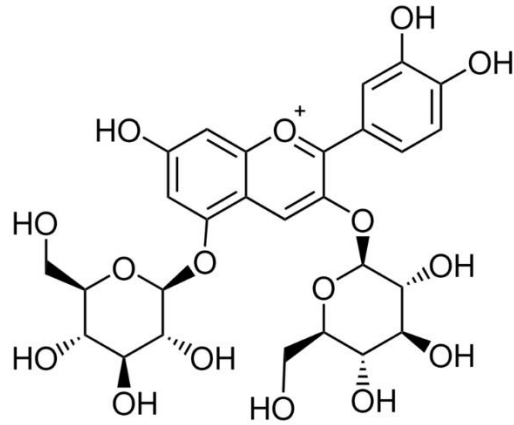
S. nigra meyveleri ve meyve dalları aynı zamanda onlara mor rengini veren antosiyaninleri içermektedirler. Kara mürver antosiyaninlerinden siyanidin-3-sambubiozit ve siyanidin-3-glukozit majör olanlardır. Bunlara ek olarak bitki antosiyaninlerden, siyanidin-3,5-diglukozit, siyanidin-3-sambubiozit-5-glukozit, siyanidin-3-rutinozit de içermektedir (Şekil 3.18-Şekil 3.22) [1, 23].



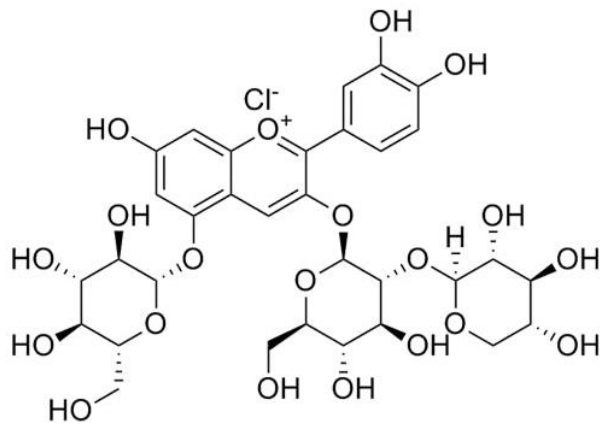
Şekil 3.18: Siyanidin-3-glukozit [57].



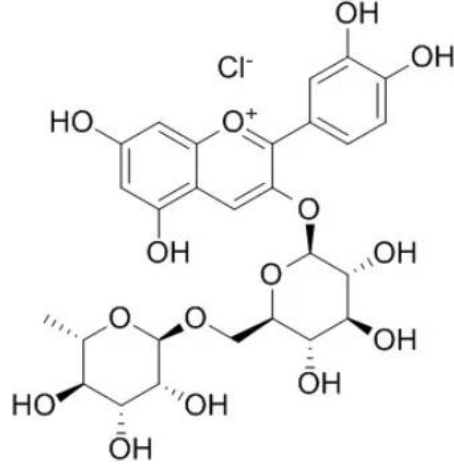
Şekil 3.19: Siyanidin-3-sambubiozit [58].



Şekil 3.20: Siyanidin-3,5-digluko zit [59].

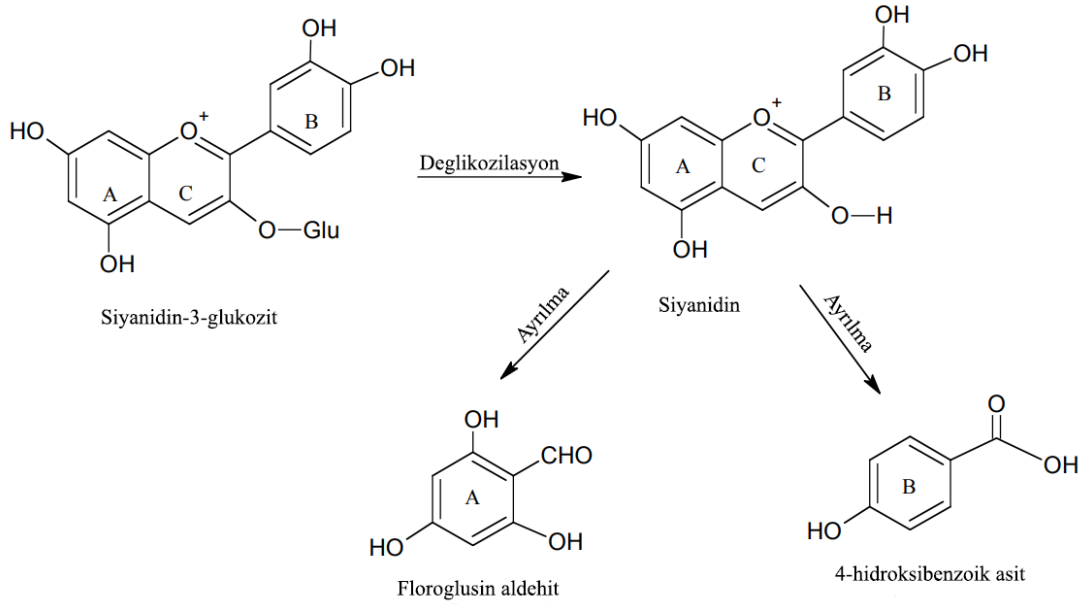


Şekil 3.21: Siyanidin-3-sambubiozit-5-gluko zit [60].



Şekil 3.22: Siyanidin-3-rutinozit [61].

Antosiyaninlerin stabilitesi; pH, depolama süresi, enzimler, oksijen miktarı, metal iyonları, ışık ve sıcaklık gibi faktörlerden etkilenmektedir. [62]. Örnek olarak, siyanidin-3-glukozidin sıcaklık artışının etkisiyle parçalanması Şekil 3.23'te gösterilmiştir [63].



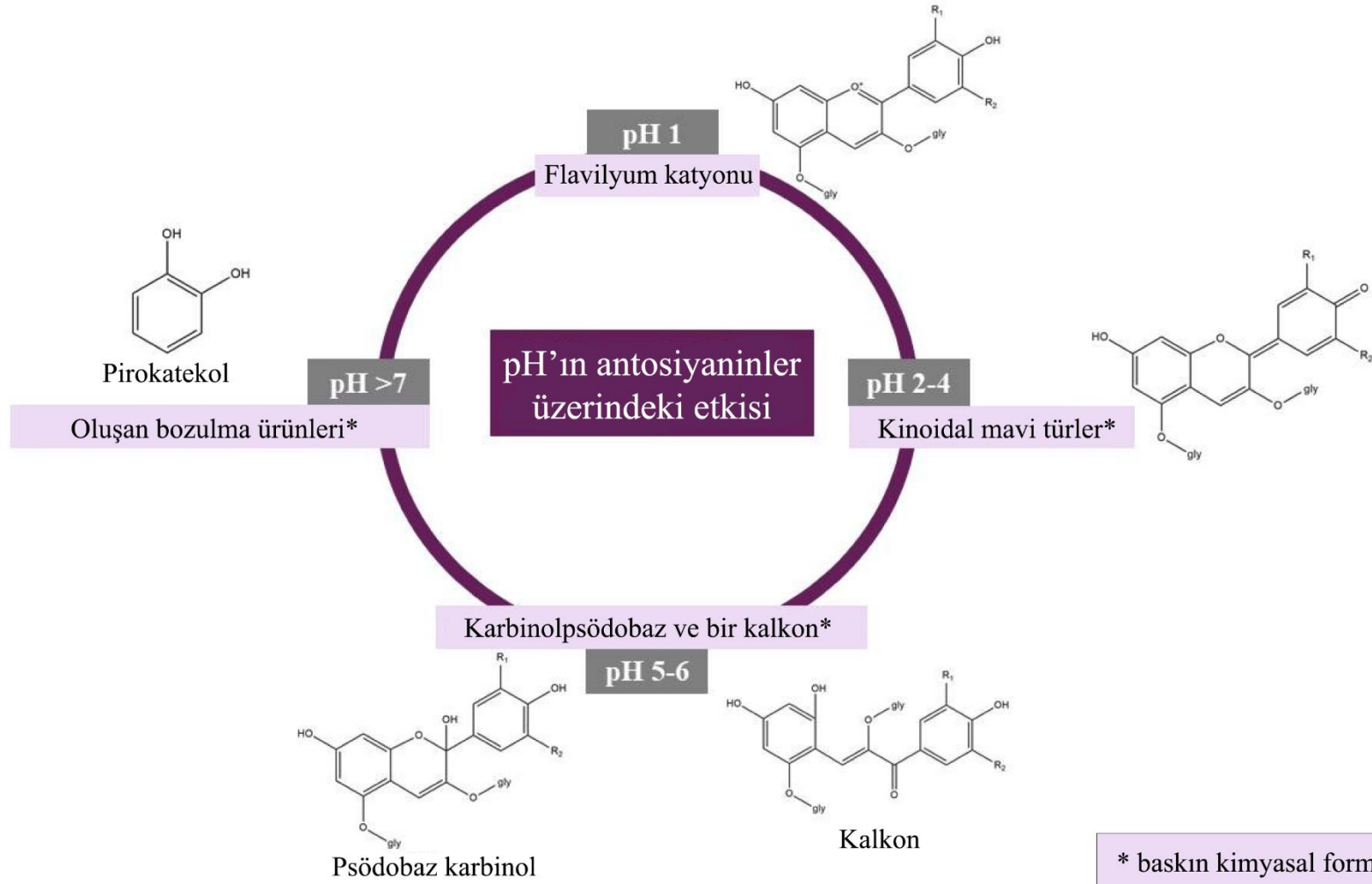
Şekil 3.23: Siyanidin-3-glukozidin sıcaklık artışının etkisiyle parçalanması [63].

S. nigra sulu ekstresinin (pH=5,5) antosiyaninlerinin 70 °C'de 3 saat bekletildikten sonra 535 nm'deki absorbansının yaklaşık %80'ine düştüğü, 90 °C'de 6 saat

bekletildikten sonra 535 nm'deki absorbansının %63,8'ine düştüğü kaydedilmiştir [64].

Moleküler yapılarının iyonik olması sebebiyle antosiyaninlerin rengi, pH'tan etkilenir. Antosiyaninler çözeltilerin pH'ına bağlı olarak dört farklı kimyasal formda bulunur. pH = 1'de antosiyaninler, onları suda çok çözüner kılan flavilyum katyonu (kırmızı renk) formunda bulunur ve bu form aynı zamanda kırmızı ve mor renklerin üretiminden de sorumludur. pH 2-4 arasında arttığında, kinoidal mavi türler bol miktarda bulunurken, 5-6 arasında bir pH'ta, renksiz bileşikler olan karbinol psödobaz ve kalkon ortaya çıkar. 7 ve üzeri bir pH'ta antosiyaninler, sübstitüent gruplarına göre bozunacaktır. (şekil 3.24)[62].

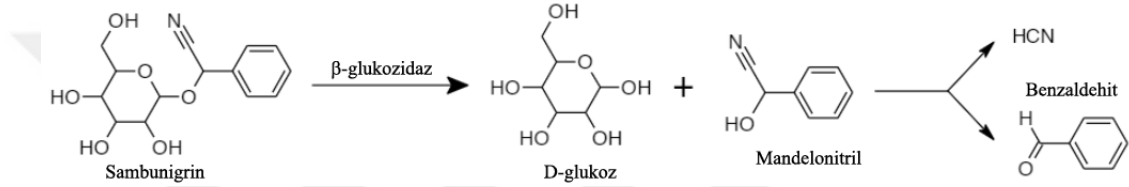
Mürver meyve ekstralarında depolama süresinin uzaması, pH ve depolama sıcaklığının artmasının antosiyanin içeriğinde azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Ortamın asidik olması, oksidasyon enzimlerinin ortamda olmaması, ortamdaki oksijenin giderilmesi, ortamda metal iyonlarının varlığı, ışıksız ve düşük sıcaklıklı ortamda saklama antosiyaninlerin stabilitesi için faydalı olacaktır. Aksi durumlarda antosiyaninler bozulma eğilimine sahiptir [62].



Şekil 3.24: Farklı pH değerlerinde antosiyaninler [62].

3.1.9 Siyanogenetik heterozitler

Siyanogenetik heterozitler, yapısında alfa konumunda bir hidroksil grubu bulunan bir nitril grubu içeren ve şekerin (genellikle bir monosakarit veya disakkarit) bağlı olduğu bir aglikon tarafından oluşturulur. Siyanojenez olarak bilinen süreçte β -glukosidaz ve α -hidroksinitril liyaz enzimlerinin varlığında hidrojen siyanürü (HCN) serbest bırakır (Şekil 3.25). Serbest HCN oldukça toksik bir bileşiktir. Bundan dolayı, siyanogenetik heterozitler, otçulların saldırısına karşı bitkilerin savunma sisteminin bir parçası olarak kabul edilir [65].



Şekil 3.25: Sambunigrin'in hidroliz yolağı [66].

Kara mürver yaprakları (en çok içeren kısmı), sürgünleri, gövde kabuğu, kökleri, olmamış (yeşil renkteki) meyveleri ve olmuş meyvelerdeki tohumlar siyanogenetik heterozitlerden başlıca sambunigrin, prunasin, holokain ve zierini içerir. Bunlar sindirim sırasında HCN'ye dönüştürülürler [67]. Siyanogenetik heterozitler baş dönmesi, bulantı, kusma, diyare, baş ağrısına; hatta çok yüksek dozlarda konvülsiyonlara ve/veya taşikardiye sebep olabilir. Bu sebeple; kırmızı renkli meyveler hafif toksik olabileceğinden yalnızca tamamen olgunlaşmış, mor-siyah renkteki mürver meyveleri kullanılmalıdır. Mor-siyah meyvelerin de pişirilerek/ısı verildikten sonra kullanımı önerilmektedir [67]. Droğun ısıtma işlemi siyanogenetik heterozitlerin bozulmasına yol açar, bu nedenle ısıtma işlemlerine tabi tutulan meyvelerin tüketimi zehirlenme semptomlarına neden olmaz [68].

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA), siyanogenetik heterozitleri dolayısıyla 100 gram taze kara mürver yaprağının 3-17 mg HCN ve 100 gram kara mürver meyvesinin 3 mg HCN içerdiğini belirtmektedir [69]. HCN'nin letal dozunun 0,5-3,5 mg/kg vücut ağırlığı olduğu bildirilmektedir. Tüketilen meyvede 50 mg/kg'dan yüksek miktarda HCN olmamalıdır. [65].

4. *Sambucus nigra* TÜRÜNÜN KULLANIM ALANLARI VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ

4.1 *Sambucus nigra* Türünün Kullanım Alanları

Sambucus nigra, yüzyıllardır halk tarafından geleneksel tedavi amacıyla kullanılması yanı sıra kendine gıda endüstrisi ve farmasötik endüstride genişçe yer bulmuş bir bitkidir.

Mürver çiçeği (Sambuci flos), drog olarak Avrupa İlaç Ajansı'nın (EMA) monografında soğuk algınlığı ve grip tedavisinde kullanımı amacıyla yer almaktadır. Geleneksel tedavide diüretik, diyaforetik ve antipiretik olması ile bilinmektedir [3, 70]. Bitkisel çay, tentür ve sıvı ekstraktları gibi çeşitli mürver çiçeği ürünleri ticari olarak piyasada mevcuttur [71].

Mürver meyvesi (Sambuci fructus) ile hazırlanan çeşitli preparatlar (şuruplar, meyve suları ve bitkisel çaylar vb.) geleneksel olarak soğuk algınlığına karşı, diyaforetik, diüretik, laksatif ve analjezik olarak kullanılmaktadır [72]. 1788 İngiliz Farmakopesi'ne göre olgun mürver meyvelerinden yapılan mürver şurubu öksürük, soğuk algınlığı ve kabızlık tedavisinde endikedir. Almanya'da müşhil olarak kurutulmuş mürver dekoksilyonunun kullanıldığı; Ukrayna, Polonya, Çekya ve Slovakya'da ise taze mürverden yapılan çayın 1887'den beri aynı amaçla kullanıldığı bildirilmektedir [73].

Mürver yaprağı (Sambuci folium), bitkinin diğer kısımlarına oranla daha az bilirse de tıbbi kullanımı vardır. Günümüzde nadiren kullanılmakla beraber, geleneksel tıpta geniş bir kullanım geçmişine sahiptir. Mürver yaprakları, özellikle Türkiye'de ve Balkan Yarımadası'nda geleneksel olarak yaraların iyileştirilmesini hızlandırmak amacıyla, iltihaplı yaralarda, romatizmal rahatsızlıkların tedavisinde haricen kullanılmıştır. Ayrıca apse, ülser ve sivilce durumlarında lezyonun olgunlaşmasını sağlamak, kızarıklık ve şişliği azaltmak için taze ezilmiş mürver yapraklarından elde edilen kompreslerin topikal olarak uygulanmış olduğu rapor edilmektedir [3, 74, 75].

Öğütülmüş yapraklarla hazırlanan merhemler nasırlı yerlere uygulanmıştır [76]. Mürver yaprak infüzyonlarının yanmış cilt üzerinde rahatlatıcı ve yenileyici etkisi sebebiyle de geleneksel olarak kullanıldığı kaydedilmiştir [77].

Bu geleneksel kullanımlara ek olarak mürverin çeşitli kısımları çeşitli şekillerde endüstriyel olarak da pek çok farklı amaçlarla kullanılmaktadır. Soğuk algınlığı, grip ve diğer bulaşıcı hastalıklara karşı destekleyici etkisi olduğundan *S. nigra* meyvesinin ekstreleri günümüzde şurup, damla, tablet, kapsül, efervesan tablet, pastil, aerosol, emülsiyon ve süspansiyon formundaki birçok gıda takviyesinin içeriğinde yer almaktadır. Birçok ülkede profilaktik amaçla satılan gıda takviyesi, Dr. Madeleine Mumcuoglu tarafından patenti alınan, *S. nigra*'nın Haschberg çeşidinden elde edilen standardize kara mürver meyve ekstresi Sambucol® preparatını içermektedir [1].

RxMediaPharma® yazılımı kullanılarak Türkiye'de günümüzde *S. nigra* içerikli 323 adet müstahzarın piyasada olduğu bilgisine ulaşılmıştır. Bunlardan bir kısmı kara mürver meyve ekstresi, bir kısmı ise çiçek ekstresini içermektedir [78].

S. nigra yapraklarının müstahzarı da mevcuttur. Mürver yapraklarının yara iyileştirici merhem ürünü Avustralya'da bulunmaktadır [79].

Mürver meyveleri, antosiyaninleri sebebiyle doğal gıda renklendiricisi ve antioksidan olarak kullanılmaktadır [80]. Mürver meyvesi özellikle gıda renklendirici olarak meyve suları ve konsantrelerde, şuruplarda, reçel ve marmelatlar; dolgu maddesi olarak kek, turta ve diğer bazı tatlılarda; ayrıca şarap gibi alkollü içeceklerin üretiminde kullanılmaktadır. Meyve suyu üretiminin atık bir yan ürünü olan mürver meyve posası, hayvan yemi ve organik gübre olarak da kullanılır [1].

Mürverin meyveleri gibi çiçeklerinin de gıda endüstrisinde kullanımı yaygındır. Alkollü ve alkolsüz içeceklerde, meyve brendilerinde, beyaz şarapta, ve ayrıca çay, yoğurt veya dondurma gibi ürünlerde doğal aroma vericidir [1].

4.2 Antioksidan Aktivite

Kara mürver meyvesi, DPPH radikaline göre %82-90 inhibisyona sahip yüksek antioksidan aktivite ile bilinmektedir. *S. nigra* meyvelerinin antioksidan özellikleri öncelikle polifenolik bileşiklerine bağlanabilir. Antosiyaninler, meyvelerin antioksidan aktivitesini önemli bir pay sahibidir [1].

Duymuş ve arkadaşlarının çalışmasının sonuçları, mürver meyve ekstralarının DPPH'ya karşı antiradikal aktivite gösterdiğini ortaya koymaktadır. IC₅₀ değeri, %70 aseton ekstresi için 117 µg/ml ve su ekstresi için 123 µg/ml iken askorbik asit için 8 µg/ml olarak tespit edilmiştir. TEAC (ABTS radikal temizleme aktivitesi) değerleri ise 0,89-1,96 mmol Trolox eşdeğeri/L olarak değişmekteydi (0,89: asitli metanol ekstresi ve 1,96: %70 aseton ekstresi). En yüksek değer neredeyse askorbik asidinkine (1,97 mM) eşitti. Bulgulara göre, mürver meyveleri ayrıca linoleik asit oksidasyonunu da engelleyebilmektedir. En yüksek inhibisyon oranı (%58) %70 etanol ekstresinde gözlemlenmiştir. Ancak analiz edilen mürver meyve ekstralarından hiçbiri kontrol olarak kullanılan BHT kadar aktif değildi [81].

Kara mürver meyvelerinin antioksidan etki potansiyeli *in vitro* olarak kültüre edilmiş insan kolon mukoza hücrelerinde de araştırılmıştır. 1 mg dondurularak kurutulmuş mürver tozu konsantrasyonunda bir mürver ekstresinin mL'si kolon hücrelerindeki oksidatif DNA hasarını ve aşırı hücre içi reaktif oksijen türlerinin üretimini sırasıyla %46 ve %22 ve oranlarında azaltmıştır. Ayrıca, oksidan kaynaklı mutajenitenin *Salmonella typhimurium* suşunda %26 oranında inhibe edildiği saptanmıştır. Bu sonuçlar, mürver meyvesinin kolon hücrelerini oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı koruyabildiğini göstermektedir [1, 82].

Meyve ve yapraklarla kıyaslandığında *S.nigra* çiçeklerinin daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. Bir çalışmada mürver çiçekleri (%91,95-94,15), meyvelere (%50,25-67,69) ve yapraklara (%16,76-48,52) kıyasla daha güçlü DPPH radikal inhibisyon aktivitesi sergilediği tespit edilmiştir [37]. Bu durum çiçeklerin polifenolik içeriğinin diğer kısımlara kıyasla daha zengin olmasıyla açıklanabilir.

4.3 Antibakteriyel Aktivite

Kara mürver çiçeklerinin, meyvelerinin ve yapraklarının su ekstraları ve etanol ekstralarının antibakteriyel aktivitesi, hastane enfeksiyonlarına neden olan 13 farklı

patojene karşı incelenmiştir. 100 kat seyreltmeye rağmen hem mürver çiçeklerinin hem de meyvelerin etanol ekstralarının hem *Staphylococcus* sp. ve *Bacillus cereus* gibi gram pozitif olan hem de *Salmonella poona* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi gram negatif olan bakterilerin çoğu için inhibitör aktivite sergilediği gözlemlenmiştir. Kara mürver çiçeği ekstralarının, diğer ekstralara göre özellikle metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (17 mm) ve *Pseudomonas aeruginosa* (9 mm) üzerinde olmak üzere geniş bir bakteri yelpazesine karşı daha güçlü bir antimikrobiyal aktivite sergilediği ve daha geniş inhibisyon bölgeleri oluşturduğu saptanmıştır. Mürver yapraklarının on kat seyreltilmiş su ekstresinin, *Bacillus cereus* ve *Serratia marcescens*'in gelişimine karşı orta derecede aktivite göstermiş olduğu, ancak çalışmadaki herhangi bir önemli patojenin büyümesini engelleyemediği belirtilmiştir [83].

Başka bir çalışmada, sıvı bakteriyel kültürlerle %10 konsantrasyonda standardize edilmiş bir sıvı mürver meyve ekstresi olan Rubini® ilavesinin, kontrol örnekleriyle karşılaştırıldığında gram pozitif bakteri suşları olan *Streptococcus pyogenes* ve *Streptococcus* Grup C ve G'ye ek olarak gram negatif bakteri *Branhamella catarrhalis* büyümesini %70'ten daha fazla azalttığı gözlemlenmiştir. %20 derişimdeki mürver meyve ekstresinin bakteri gelişimini %99 oranında engellediği kaydedilmiştir. Sonuçlar, *Sambucus nigra* meyve ekstresinin üst solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan bazı patojenik bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite sergilediğini göstermiştir [84].

4.4 Antienflamatuvar Aktivite

S. nigra meyve ve çiçekleri soğuk algınlığı, grip ve enflamasyonla ilgili durumların tedavisinde geçmişten beri geleneksel olarak dahilen kullanılmaktadır. Aynı zamanda, kara mürverin antienflamatuvar aktivitesiyle ilgili yapılmış ve bu etkiyi kanıtlar nitelikte olan *in vitro*, *in vivo* ve insan çalışmaları da mevcuttur.

Çeşitli çalışmalarla *S. nigra* preparatlarının, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , INF- β ve INF- γ gibi farklı enflamatuvar sitokinleri veya aracıları kontrol ederek antienflamatuvar aktivite sergilediği tespit edilmiştir [85-88].

Bir çalışmada taze ve kurutulmuş mürver meyvelerinden ve taze mürver çiçeklerinden elde edilen 18 farklı ekstrenin antienflamatuvar aktivitesi lipopolisakkarit ile

aktifleştirilen RAW 264.7 makrofajlarında araştırılmıştır. Sonuçlar, ultrasonik ekstraksiyon veya metanol ile hazırlanan taze çiçek ekstralarının daha yüksek *in vitro* antiinflamatuvar aktivite sergilediğini göstermiştir [71].

Wistar sıçanlar ile yapılan bir hayvan çalışmasında cilt yanıklarının tedavi etmek için uygulanan %10 mürver çiçeği ekstresi içeren cold kremin, 7 günün sonunda enflamatuvar reaksiyonu düşürdüğü ve yanma sonrası ödemi azalttığı tespit edilmiştir [89].

Yapılan randomize kontrollü bir klinik çalışmada ise mürverin de dahil olduğu birtakım bağışıklık uyarıcı bileşenin dahilen alımının üst solunum yolunun enflamasyonunu azalttığı ve çocuklardaki orta kulak iltihabını iyileştirmeye katkıda bulunduğu saptanmıştır [90].

Meyve ve çiçeklere ek olarak, kara mürver yapraklarının da antiinflamatuvar aktivitesi mevcuttur. Mürver yaprağı ekstralarıyla yapılan bir çalışmada, ekstraların TNF- α ve reaktif oksijen türleri salımını inhibe ederek nötrofillerin enflamatuvar tepkisini etkilediği gözlemlenmiştir. 50 $\mu\text{g/mL}$ derişimindeki mürver yaprak etanol ve su ekstralarının, TNF- α salgılanmasını sırasıyla yaklaşık %40 ve %10 oranında azalttığı tespit edilmiştir. Reaktif oksijen türü salımının, 5 $\mu\text{g/mL}$ derişimde tüm ekstralar için yaklaşık %50 oranında azaldığı saptanmıştır. Çalışmadaki tüm ekstralar lipoksijenaz aktivitesini inhibe edebilmiştir [3].

4.5 Anti-influenza Aktivite

Kara mürver meyvelerinin anti-influenza aktivite gösterdiği *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla doğrulanmıştır. Bu etkiden antosiyaninler ve asidik polisakkaritlerin sorumlu olduğu öne sürülmektedir. Anti-influenza mekanizmaları; IL-6, IL-8 ve TNF ekspresyonunun artırılması, viral glikoproteinlerin bloke edilmesi ve IgA içeriğinin artırılması gibi farklı yollardan meydana gelmektedir [80].

S. nigra'nın meyvesinin antiviral özellikleri ilk olarak virolog Dr. Madeleine Mumcuoglu tarafından incelenmiştir. Mumcuoglu'nun çalışma sonuçları, mürver meyvesi bileşenlerinin, influenza A ve B ile Herpes virüsü de dahil olmak üzere çeşitli virüslerin yüzeyinde bulunan hemaglütinin spike proteinlerinin aktivitesini nötralize ettiğini göstermiştir. Hemaglütinin spike proteinleri devre dışı bırakıldığında, virüsler artık hücreye girip çoğalamaz [91-93].

S. nigra meyve ekstresinin, insan patojenik H5N1 influenza virüsü ile enfekte olmuş Madin-Darby köpek böbrek hücrelerinde virüsün yayılmasını önlediği ve toplam viral yükü azalttığı saptanmıştır [84].

S. nigra'nın standardize bir ticari ekstresi, 95 mg/mL dozunda *in vitro* H9N2 virüsü ile enfekte edilmiş tavuk embriyolarında anti-influenza aktivitesi göstermiştir [94].

Mürver meyve ekstresinin H1N1 virüsü üzerinde de antiviral etki sergilediği kanıtlanmıştır. Ekstrenin doğrudan antiviral etkilerinin, H1N1 virüsünün glikoproteinlerini bloke etmek yoluyla olduğu belirlenirken, dolaylı antiviral etkilerin, IL-6, IL-8 ve TNF proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunun arttırılmasıyla ilişkili olduğu ortaya tespit edilmiştir. Yine, mürver meyvelerindeki siyanidin-3-glukozit antosiyanininin benzer doğrudan engelleyici mekanizmaya sahip olduğu saptanmıştır [80, 95].

Klinik çalışmaların sonuçları da mürverin anti-influenza destekler niteliktedir. 300 mg mürver ekstresi içeren mürver kapsülleri, uçakla seyahat eden 312 ekonomi sınıfı yolcu ile yapılan randomize, çift kör ve plasebo kontrollü bir klinik çalışmada soğuk algınlığının süresini ve şiddetini istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azalttığı gözlemlenmiştir [80, 96].

Buna ek olarak, randomize, çift kör ve plasebo kontrollü başka bir çalışmada, 14 hafta boyunca mürver (1,5 g) ve reishi (0,5 g) ekstrelerinden meydana gelen oral süspansiyon şaşelerin tüketilmesinin, hastalarda solunum yolu enfeksiyonlarının süresini ve şiddetini anlamlı bir biçimde azalttığı gözlemlenmiştir [80, 97].

4.6 Antidiyabetik/Anti-obeziye Aktivite

Yapılan çalışmalar kara mürverin diyabet tedavisinde diyet takviyesi olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Salvador ve arkadaşlarının yürüttüğü çalışmada, mürver meyvesi polar ve apolar ekstrelerinin yüksek yağlı diyetle beslenen, streptozotosin ile indüklenmiş tip-2 diyabetli sıçanlarda etkisi araştırılmıştır. 4 hafta sonunda polar ekstre açlık kan

şekerinde azalmaya yol açarken, apolar ekstre insülin düzeylerinin düşmesini sağlamıştır. Ayrıca, iki ekstrenin de hematolojik indekslerde, serum lipit düzeyinde, serum ve dokulardaki eser elementlerin (Zn, Fe, Cu) homeostazisinde anlamlı değişiklikler olmaksızın insülin direncini azalttığı gözlemlenmiştir [98].

Yapılan bir çalışmada mürver çiçeklerindeki polar bileşiklerin, glikoz metabolizmasını doğrudan uyarabildiği ve klonal pankreatik β -hücreleri yoluyla insülin salgılanmasını teşvik edebildiği tespit edilmiştir. Mürver çiçeği ekstresi (1g/L), fare karın kasında *in vitro* olarak glikoz alımını, glikoz oksidasyonunu ve glikojenezi istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde artırmıştır [1, 99].

S. nigra ekstrelerinin potansiyel anti-obezojenik kapasiteleri ümit vericidir. Bir çalışmada diyetle indüklenen obeziteye sahip fareler %13 antosiyanin içeren mürver meyve ekstresiyle hazırlanan, diyetle %0,25 mürver meyve ekstresine (%0,034 antosiyanin) veya %1,25 mürver meyve ekstresine (%0,17 antosiyanin) karşılık gelecek yemlerle beraber yüksek yağlı diyetle 16 hafta boyunca beslenmiştir (kontrol grupları: düşük yağlı diyet ve sadece yüksek yağlı diyet). Mürver ekstresi alan her iki fare grubunun da sadece yüksek yağlı diyetle beslenen gruba kıyasla önemli ölçüde daha düşük bir karaciğer ağırlığı, serum trigliserit konsantrasyonu, serum enflamasyon belirteçleri ve insülin direnci olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca %1,25 mürver ekstresi ve yüksek yağlı diyetle beslenen grupta, %0,25 ekstre ve yüksek yağlı diyetle beslenen gruba kıyasla karaciğer kolesterolünün daha düşük olduğu tespit edilmiştir [100]. Daha sonra %1,25 mürver meyve ekstresinin ateroskleroz ve HDL fonksiyon bozuklukları üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla hiperlipidemik fareler üzerinde araştırma yapılmıştır. Ekstre ve kontrol grubu arasında serum lipitleri açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir, fakat ekstre grubu farelerde aspartat transaminaz ve açlık glukozunda azalma görüldüğü kaydedilmiştir. Mürver meyve ekstresiyle beslenen farelerde HDL fonksiyonunda iyileşme, hepatik kolesterol seviyelerinde azalma olduğu da saptanmıştır. Özellikle, ekstre ile beslenen farelerin aortunun toplam kolesterol içeriğindeki istatistiksel olarak anlamlı azalma ve aynı grupta aterosklerozun daha az ilerlediğinin gözlemlenmesi araştırmanın önemli bulguları arasındadır. Bu araştırma, *S. nigra* meyve ekstresinin, kronik inflamasyonla ilişkili HDL fonksiyon bozukluğunu olumlu yönde etkileme potansiyeline sahip olabileceğini göstermiştir [101].

Literatür araştırması, *S. nigra* çiçek ekstrelerinin potansiyel obezite karşıtı etkisine ilişkin yalnızca bir adet *in vivo* çalışma yayınının bulunduğunu göstermektedir.

Çalışmanın sonuçları, bitkinin çiçeklerinden elde edilen polar ve apolar ekstrelerin *Caenorhabditis elegans* türü solucanın vücudundaki yağ birikimini azalttığını göstermektedir [102].

Seksen katılımcının protokolü tamamladığı bir çalışmada, gönüllüler *S.nigra* çiçek ekstresi ile zenginleştirilmiş *S. nigra* meyve suyu ve meyve tozu ile çiçek ekstresi içeren tabletler (günde toplam 1 mg antosiyanin, 370 mg flavonol glikozit ve 150 mg hidroksisinamat); ayrıca *Asparagus officinalis* L. tabletleri (günde 19 mg saponin) ile beslenmiştir. Diyetten sonra vücut kitle indeksi yaklaşık %3, ağırlık ise ortalama 3,2 kg düşmüştür. Sistolik kan basıncında ortalama %5'ten, diyastolik kan basıncında ise %2,5'tan fazla azalma gözlemlenmiştir. Spesifik olarak herhangi bir bileşiğin diyetin etkinliğine katkıda bulunup bulunmadığının belirlenmediği ekip tarafından kaydedilmiştir [103].

Yapılan literatür araştırmasına göre *S. nigra* yaprak ekstrelerinin obezite parametrelerini nasıl etkilediğine dair yayınlanmış *in vivo* veya klinik bir çalışma bulunmamaktadır.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1 Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

- Metanol (suitable for HPLC - 34860; \geq %99,9 – Sigma-Aldrich)
- Etanol (absolute, suitable for HPLC - 34852-M; \geq %99,8 – Sigma-Aldrich)
- Asetonitril (suitable for HPLC, gradient grade-34851; \geq %99.9 – Sigma-Aldrich)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (276855; \geq %99,9 – Sigma-Aldrich)
- Hidroklorik asit (for analysis Emsure® - 100317; % 37 – Merck)
- orto-Fosforik asit (for analysis Emsure® - 100573; %85 – Supelco®)
- Formik asit (for analysis Emsure® - 100264; %98-100 – Merck)
- Siyanidin-3-glukozit klorür (phyproof® Reference Substance - PHL89616; \geq %98,0 – PhytoLab)
- Siyanidin-3-sambubiosit klorür (phyproof® Reference Substance - PHL89617; \geq %95,0 – PhytoLab)
- Rutin (phyproof® Reference Substance - PHL89270; \geq %95,0 – PhytoLab)
- İzokersitrin (phyproof® Reference Substance - PHL89230; \geq %95,0 – PhytoLab)
- Gallik asit (G7384; \geq 97.5% – Sigma-Aldrich)
- Kersetin (Q4951; \geq 95% – Sigma-Aldrich)
- Dihidrokapaisin (M1022; \geq 97% – Sigma-Aldrich)
- L-Askorbik asit (A92902; %99 – Sigma-Aldrich)
- Folin & Ciocalteu fenol reaktifi (FCR) (F9252 – Sigma-Aldrich)
- Alüminyum klorür (206911; %98 – Sigma-Aldrich)
- Sodyum karbonat (223530; %99,5 – Sigma-Aldrich)
- Amonyum asetat (A7262; \geq %98 – Sigma-Aldrich)
- Sodyum benzoat (Emprove® - 106290 – SAFC)
- Potasyum sorbat (Emprove® - 105118 – SAFC)

- Tripsin/EDTA solüsyonu (Wisent Bio Products)
- Fetal sığır serumu ([Fetal bovine serum] FBS) (Wisent Bio Products)
- 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) (475989; $\geq 98\%$ – Sigma-Aldrich)

5.2 Mürver (*Sambucus nigra*) Seleksiyon Islahı TAGEM (Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü) Projesi İçin Kullanılan Gereç ve Yöntemler

5.2.1 Bitkisel materyaller

Bu kısımda kullanılan *S. nigra* örnekleri T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü ile yapılan iş birliği çerçevesinde “Mürver (*Sambucus nigra*) Seleksiyon Islahı TAGEM (Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü) Projesi” kapsamında TAGEM tarafından toplanmıştır. *S. nigra* örneklerine dair bilgiler Tablo 5.1’de verilmiştir.

Tablo 5.1: “Mürver (*Sambucus nigra*) Seleksiyon Islahı TAGEM Projesi” kapsamında analiz edilen *S. nigra* örneklerine dair bilgiler.

Örnek Kodu	Toplanma Yılı	Lokasyon
Afyon 1	2021	Afyon Sinanpaşa Yıldırım Kemal Köyü
Afyon 2	2021	Afyon Sinanpaşa Yıldırım Kemal Köyü
Afyon 3	2021	Afyon Sinanpaşa Yıldırım Kemal Köyü
BAÇEM 1	2021	Balıkesir Burhaniye Borezli Mah.
BAÇEM 2	2021	Balıkesir Burhaniye Borezli Mah.
BAÇEM 3	2021	Balıkesir Burhaniye Borezli Mah.
BAÇEM 4	2021	Balıkesir Burhaniye Borezli Mah.
Balya	2021	Balıkesir Balya Çukurcak Mah.
Bergama 1	2021	İzmir Bergama Çamavlu Mah.
Bergama 2	2021	İzmir Bergama Karaveliler Mah.
Bergama 3	2021	İzmir Bergama Kıranlı Mah.
Bergama 4	2021	İzmir Bergama Çamavlu Mah.
Bergama 5	2021	İzmir Bergama Göbeller Mah.
Bergama 6-1	2021	İzmir Bergama Terzialiler Mah.
Bergama 6-2	2021	İzmir Bergama Hacıaliler Mah.
Bigadiç 1	2021	Balıkesir Bigadiç Akyar Mah.
Bigadiç 2	2021	Balıkesir Bigadiç Akyar Mah.
Bigadiç 3	2021	Balıkesir Bigadiç Akyar Mah.
Bigadiç 4	2021	Balıkesir Bigadiç Akyar Mah.
Bigadiç 5	2021	Balıkesir Bigadiç Akyar Mah.
Bozdağ 1	2021	İzmir Ödemiş Ovacık Mah.
Bozdağ 2	2021	İzmir Ödemiş Ovacık Mah.
Bozdağ 3	2021	İzmir Ödemiş Ovacık Mah.
Bozdağ 4	2021	İzmir Ödemiş Ovacık Mah.
Bozdağ 5	2021	İzmir Ödemiş Ovacık Mah.

Bozdağ 6	2021	İzmir Ödemiş Ovacık Mah.
Bozdağ 7	2021	İzmir Ödemiş Ovacık Mah.
Bozdağ 8	2021	İzmir Ödemiş Ovacık Mah.
Bozdağ 9	2021	İzmir Ödemiş Ovacık Mah.
Bozdağ 10	2021	İzmir Ödemiş Ovacık Mah.
Bozdağ 11	2021	İzmir Ödemiş Ovacık Mah.
Bozdağ 12	2021	İzmir Ödemiş Ovacık Mah.
Bozdağ 13	2021	İzmir Ödemiş Ovacık Mah.
Dursunbey	2021	Balıkesir Dursunbey Bozyaka Mah.
Havran 1	2021	Balıkesir Havran Tekke Mah.
Havran 2	2021	Balıkesir Havran Tekke Mah.
Havran 3	2021	Balıkesir Havran Tekke Mah.
Havran 4	2021	Balıkesir Havran Tekke Mah.
Havran 5	2021	Balıkesir Havran Tekke Mah.
Kütahya 1	2021	Kütahya Dumlupınar Arpalı Köyü
Kütahya 2	2021	Kütahya Dumlupınar Arpalı Köyü
Kütahya 3	2021	Kütahya Dumlupınar Arpalı Köyü
Afyon Sinanpaşa Yıldırım 1-1	2022	Afyon Sinanpaşa Yıldırım Kemal Köyü
Afyon Sinanpaşa Yıldırım 2	2022	Afyon Sinanpaşa Yıldırım Kemal Köyü
Bergama 1	2022	İzmir Bergama Çamavlu Mah.
Bergama 2	2022	İzmir Bergama Karaveliler Mah.
Bergama 3	2022	İzmir Bergama Hacıaliler Mah.
Bergama 4 Yukarıbey Kırnalı Yolu	2022	İzmir Bergama Yukarıbey Mah.
Bergama 5 Tavuk Çiftliği	2022	İzmir Bergama Kıranlı Mah.
Bergama 6 Köyiçi Çamavlu	2022	İzmir Bergama Çamavlu Mah.
Bergama 7 Karaveliler Köyiçi	2022	İzmir Bergama Karaveliler Mah.
Bergama 8 Kırnalı Köyü	2022	İzmir Bergama Kıranlı Mah.
Bergama 8-2 Kırnalı Köyü Girişi	2022	İzmir Bergama Kıranlı Mah.
Bergama 9-1 Yukarıbey	2022	İzmir Bergama Yukarıbey Mah.
Bigadiç Akyar 1	2022	Balıkesir Bigadiç Akyar Mah.
Bigadiç Akyar 2	2022	Balıkesir Bigadiç Akyar Mah.
Bigadiç Akyar 3	2022	Balıkesir Bigadiç Akyar Mah.
Bigadiç Akyar 4	2022	Balıkesir Bigadiç Akyar Mah.
Bigadiç Akyar 5	2022	Balıkesir Bigadiç Akyar Mah.
Bigadiç Akyar 6	2022	Balıkesir Bigadiç Akyar Mah.
Bigadiç Akyar 7	2022	Balıkesir Bigadiç Akyar Mah.
Bigadiç Akyar 8	2022	Balıkesir Bigadiç Akyar Mah.
Bolu 1	2022	Bolu Merkez Gölcük Köyü
Bolu 2	2022	Bolu Merkez Gölcük Köyü
Bolu 3	2022	Bolu Merkez Gölcük Köyü
Bolu 4	2022	Bolu Merkez Gölcük Köyü
Bolu 5	2022	Bolu Merkez Gölcük Köyü
Bolu 6	2022	Bolu Merkez Gölcük Köyü
Bolu 7	2022	Bolu Merkez Kürkçüler Köyü
Bolu 8	2022	Bolu Merkez Kürkçüler Köyü
Bolu 9	2022	Bolu Merkez Kürkçüler Köyü
Bolu 10	2022	Bolu Merkez Kürkçüler Köyü
Bolu 11	2022	Bolu Merkez Kürkçüler Köyü
Bolu 12	2022	Bolu Merkez Kürkçüler Köyü
Bolu 13	2022	Bolu Merkez Gülyüzü Köyü
Bolu 14	2022	Bolu Merkez Gülyüzü Köyü
Bolu 15	2022	Bolu Merkez Gülyüzü Köyü
Bolu 16	2022	Bolu Merkez Gülyüzü Köyü
Bolu 17	2022	Bolu Merkez Gülyüzü Köyü
Bolu 18	2022	Bolu Merkez Gülyüzü Köyü

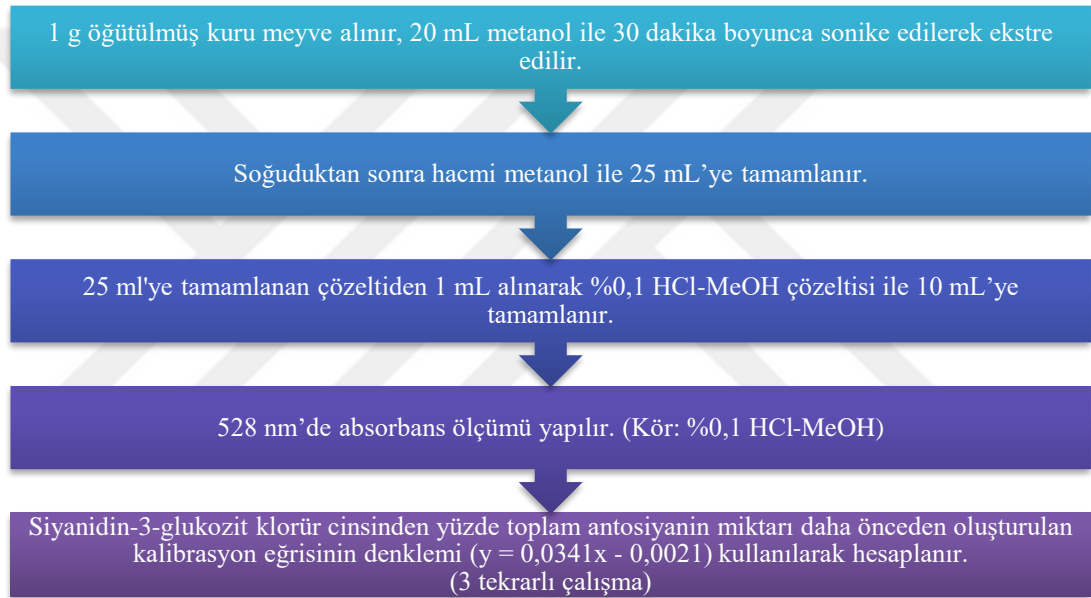
Bolu 19	2022	Bolu Merkez Gülyüzü Köyü
Bolu 20	2022	Bolu Merkez Karamanlar Köyü
Bolu 21	2022	Bolu Merkez Karamanlar Köyü
Bolu 22	2022	Bolu Merkez Karamanlar Köyü
Bolu 23	2022	Bolu Merkez Karamanlar Köyü
Bolu 24	2022	Bolu Merkez Karamanlar Köyü
Bolu 25	2022	Bolu Merkez Ağaççılar Köyü
Bolu 26	2022	Bolu Merkez Ağaççılar Köyü
Bolu 27	2022	Bolu Merkez Ağaççılar Köyü
Bolu 28	2022	Bolu Merkez Ağaççılar Köyü
Bozdağ Üretim	2022	İzmir Ödemiş Bozdağ Mah.
Bozdağ 1	2022	İzmir Ödemiş Bozdağ Mah.
Bozdağ 1-1	2022	İzmir Ödemiş Bozdağ Mah.
Bozdağ 1-2	2022	İzmir Ödemiş Bozdağ Mah.
Bozdağ 2-1-14	2022	İzmir Ödemiş Bozdağ Mah.
Bozdağ 2-14	2022	İzmir Ödemiş Bozdağ Mah.
Bozdağ 3	2022	İzmir Ödemiş Bozdağ Mah.
Bozdağ 4-1	2022	İzmir Ödemiş Bozdağ Mah.
Bozdağ 4-2	2022	İzmir Ödemiş Bozdağ Mah.
Bozdağ 5-1	2022	İzmir Ödemiş Bozdağ Mah.
Bozdağ 5-2	2022	İzmir Ödemiş Bozdağ Mah.
Bozdağ 6	2022	İzmir Ödemiş Bozdağ Mah.
Bozdağ 7	2022	İzmir Ödemiş Bozdağ Mah.
Bozdağ 8	2022	İzmir Ödemiş Bozdağ Mah.
Bozdağ 9	2022	İzmir Ödemiş Bozdağ Mah.
Bozdağ 10	2022	İzmir Ödemiş Bozdağ Mah.
Bozdağ 12	2022	İzmir Ödemiş Bozdağ Mah.
Bozdağ 13	2022	İzmir Ödemiş Bozdağ Mah.
Bozdağ 14-1	2022	İzmir Ödemiş Bozdağ Mah.
Bozdağ 14-2	2022	İzmir Ödemiş Bozdağ Mah.
Bozdağ 15	2022	İzmir Ödemiş Bozdağ Mah.
Bursa 31	2022	Bursa Yenişehir Gündoğan Mah.
Bursa 32 Yenişehir	2022	Bursa Yenişehir Gündoğan Mah.
Kütahya Arpalı 1	2022	Kütahya Dumlupınar Arpalı Köyü
Kütahya Arpalı 2	2022	Kütahya Dumlupınar Arpalı Köyü
Kütahya Arpalı 2-1	2022	Kütahya Dumlupınar Arpalı Köyü
Kütahya Arpalı 3	2022	Kütahya Dumlupınar Arpalı Köyü
Kütahya Arpalı 4	2022	Kütahya Dumlupınar Arpalı Köyü
Kütahya Arpalı 11	2022	Kütahya Dumlupınar Arpalı Köyü
Yalova 1	2022	Yalova Merkez Araştırma Enstitüsü Bahçesi
Yalova 29	2022	Yalova Merkez Araştırma Enstitüsü Bahçesi

5.2.2 Spektrofotometrik toplam antosiyanin analiz yöntemi

Kurutulmuş *S. nigra* meyve örneklerinin toplam antosiyanin miktarı spektrofotometrik olarak Türk Farmakopesi “Çoban Üzümü Meyvesi, Taze” monografındaki metot parametreleri kullanılarak (kullanılan standart madde, çözücüler ve absorbans ölçümü için kullanılan nanometre) analiz edilmiştir. Farmakopede kullanılan yöntem drog

miktarları ve seyreltmeler açısından mürver meyveleri için modifiye edilerek kullanılmıştır. Bahsi geçen metot ile siyanidin-3-glukozit klorür üzerinden toplam antosiyanin miktarı hesaplanmaktadır. Hesaplamalar belirli konsantrasyonlarda siyanidin-3-glukozit klorür standardının metanol içerisindeki (MeOH) %0,1 (v/v) hidroklorik asit çözeltisi içinde çözülmesi ve ultraviyole-görünür bölge (UV-Vis) mikrolaka spektrofotometre cihazında (BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer, ABD) 528 nanometrede (nm) absorbanlarının ölçülmesi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi ile yapılmıştır.

Kuru meyvelerin toplam antosiyanin miktarının analizi için örnek hazırlanış metodu Şekil 5.1’de açıklanmıştır.



Şekil 5.1: Kuru meyvelerin toplam antosiyanin miktarının analizi için örnek hazırlanış metodu

5.3 *In vitro* sitotoksisite testleri için kullanılan gereç ve yöntemler

5.3.1 Bitkisel materyal

Kullanılan bitkisel materyallerden çiçek ve yapraklar Mayıs 2022, meyveler ise Ağustos 2022’de Balıkesir Büyükşehir Belediyesi Çiftçi Eğitim Merkezi’nde *S. nigra* kültürü yapılan alandan toplanmıştır. Bitki materyali Dr. Öğr. Üyesi Ebru Özdemir Nath tarafından Türkiye ve Doğu Ege Adaları Florası (Flora of Turkey and The East Aegean Islands) 4. Cilt kullanılarak tayin edilmiştir [104]. Herbaryum örnekleri HERA1056 koduyla Altınbaş Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu’nda

bulunmaktadır. Toplanan *S. nigra* çiçek ve yaprakları toplandıktan sonra kurutulmuştur. Meyveler ise toplandıktan sonra kullanılacak zamana kadar -18 °C'ye kaldırılmıştır.

5.3.2 Kara mürver çiçek, meyve ve yaprak ekstralarının hazırlanması

Kurutulan *S. nigra* çiçekleri ve yaprakları öğütülmüştür. Dondurulan *S. nigra* meyveleri ise 2 saat boyunca oda sıcaklığından tutularak buzları eritilmiştir. 50 gram yaş kara mürver meyvesi (10:50, %96 etanol), 10 gram kara mürver yaprağı (10:100, %70 etanol) ve 10 gram kara mürver çiçeği (10:150, %70 etanol) tartılmış ve belirtilen çözücülerle, belirtilen oranlarda 24 saat boyunca masere edilmiştir. Whatman® Grade 1 filtre kâğıdı ile filtrelenen ekstraların çözücülerini döner buharlaştırıcı (Heidolph Rotary Evaporator, Germany) ile uzaklaştırılmıştır.

5.3.3 Ekstrelerin sıvı kromatografisi ve yüksek rezolüsyonlu kütle spektrometresi (LC-HRMS) ile fenolik bileşen tayini yöntemi

Kurutulmuş ekstraların her birinden 250 mg alınmış ve 10 mL metanol içerisinde çözülmüştür. Bunlar, berrak çözeltilere dönüşene kadar sonikasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra çözelti 0,45 µm Millipore MillexHV filtre ile filtre edilmiştir. Her ekstre çözeltisinin 970 µL'sine metanol içindeki 1000 ppm stok çözeltisinden 30 µL dahili standart dihidrokapsaisin çözeltisi ilave edilmiştir.

LC-HRMS ölçümleri, Thermo ORBITRAP Q-EXACTIVE (Bremen, Almanya) kütle spektrometresi donanımlı ESI iyon kaynağı ve Dionex sıvı kromatografi (LC) sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Tarama aralığı m/z 100-900 amu olarak ayarlanmış ve diğer kütle parametreleri şu şekilde kullanılmıştır: gaz akış hızı: 45, yardımcı gaz akış hızı: 10, püskürtme voltajı: 3,80 kV, kapiler sıcaklık: 320 °C, yardımcı gaz ısıtıcısı sıcaklık: 320 °C ve S-lens RF 50'dir. Bileşiklerin ayrılması için bir Troyasil C18 kolonu (150 x 3 mm iç çap, 5 µm partikül boyutu, İstanbul, Türkiye) kullanılmıştır. Mobil fazlar A ve B sırasıyla %1 formik asit (EMSURE® Merck, Germany)-su ve %1 formik asit-metanolden (Sigma-Aldrich, Germany) oluşmuştur. Gradyan programı 0-1,00 dk %50 A ve %50 B; 1,01-6,00 dk %100 B ve son olarak 6,01-15 dk %50 A ve %50 B idi. Mobil fazın akış hızı 0,35 mL/dak idi. Kolon sıcaklığı 22°C'dir. Çevre koşulları sıcaklık 22,0 ± 5,0 °C ve bağıl nem (50 ± 15) % bağıl nem olarak ayarlanmıştır. Bezmialem Vakıf Üniversitesi İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezi (İLMER)

Kütüphanesi'nde bulunan bileşiklerin alıkonma süreleri ve hedef iyonları karşılaştırılarak bileşikler tanımlanmıştır.

5.3.4 *In vitro* sitotoksosite test protokolü

İnsan alveoler adenokarsinom hücresi (A549, CCL-185), insan meme adenokarsinomu hücresi (MCF-7, HTB-22) ve insan beyni glioma kanser hücresi (U-118 MG, HTB-15) hatları, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonundan (ATCC) elde edilmiştir. Hücreler, FBS (fetal bovine serum) (%10) ve antibiyotik (%1) ile sağlanan uygun hücre kültürü ortamında tutulmuş ve 37°C, %5 CO₂ ve %90 nem ortamında inkübe edilmiştir. Hücreler 96 kuyucuklu plakalara ekilmiştir ve maruz kalmadan önce bir gece boyunca bağlanmalarına izin verilmiştir. Daha sonra hücreler, farklı konsantrasyonlarda taze DMSO ile çözülmüş *S. nigra* ekstraktlarıyla muamele edilmiştir. Maruz bırakılmayan hücreler büyüme kontrol grupları olarak kabul edilmiş ve %1 DMSO ile muamele edilen hücreler çözücü kontrol grupları olarak kabul edilmiştir. 24 saat sonra her kuyucuğa 20 µL MTT çözeltisi (0,5 mg/mL) ilave edilmiş ve plakalar 3 saat daha inkübe edilmiştir. Daha sonra üst faz atılarak MTT'nin canlı hücreler tarafından metabolize edilmesi sonucu ortaya çıkan formazan kristallerinin çözülmesi için 100 µL DMSO eklenmiştir. Absorbans (OD), bir Thermofisher mikropilaka okuyucusu (Massachusetts, ABD) tarafından 590 nm'de ölçülmüştür. Canlılık ve dolayısıyla ölüm oranı, çözücü gruplarına kıyasla hesaplanmıştır. Sonuçlar, hücrelerin yarısının öldürülmesinden sorumlu olan ortalama IC₅₀ konsantrasyonu veya IC₅₀ hesaplamasının imkânsız olması durumunda bundan sorumlu olan konsantrasyon ile maksimum hücre ölümü oranı olarak ifade edilmiştir.

5.4 *In Vivo* Biyolojik Aktivite Testleri İçin Kullanılan Gereç ve Yöntemler

5.4.1 Bitkisel materyal

Kullanılan bitkisel materyallerden çiçek ve yapraklar Mayıs 2022, meyveler ise Ağustos 2022'de Balıkesir Büyükşehir Belediyesi Çiftçi Eğitim Merkezi'nde *S. nigra* kültürü yapılan alandan toplanmıştır. Bitki materyali Prof. Dr. Murat Kartal tarafından Türkiye ve Doğu Ege Adaları Florası (Flora of Turkey and The East Aegean Islands) 4. Cilt kullanılarak tayin edilmiştir [104]. Herbarium örnekleri HERA1245 ve HERA1246 numaralarıyla Altınbaş Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbariumu'nda bulunmaktadır. Toplanan *S. nigra* çiçek ve yaprakları toplandıktan sonra

kurutulmuştur. Meyveler ise toplandıktan sonra kullanılacak zamana kadar -18 °C'ye kaldırılmıştır.

5.4.2 Kara mürver meyvelerinde nem tayini

Dondurulmuş olan kara mürver meyveleri 2 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilip buzları eritildikten sonra OHAUS MB 35 Nem Tayin Cihazı kullanılarak nem oranları tayin edilmiştir. MB 35, doğru ve güvenilir bir şekilde drogların nem içeriğini kesin olarak tayin edebilen bir nem tayin cihazıdır. MB 35, 0,001g/0,002g okunabilirlik ve %0,02'ye kadar tekrarlanabilirlik ile çalışma kapasitesine sahiptir. Halojen ısı kaynağı kullanarak nem tayini yapar [105].

5.4.3 Kara mürver çiçek, meyve ve yaprak ekstralarının hazırlanması

S. nigra'nın altı farklı ekstresi hazırlanmıştır. Kurutulmuş yapraklar ve çiçekler, mekanik bir öğütücüde öğütülmüştür. Mürver meyveleri oda sıcaklığında 2 saat bekletilerek buzları eritilmiş ve daha sonra havanda ezilmiştir. 100 gram kara mürver meyvesi (1:10, %50 etanol), 100 gram kara mürver meyvesi (1:10, %100 su), 100 gram kara mürver yaprağı (1:10, %50 etanol), 100 gram kara mürver yaprağı (1:10, %100 su), 100 gram kara mürver çiçeği (1:10, %50 etanol) ve 100 gram kara mürver çiçeği (1:10, %100 su) tartılmış ve belirtilen çözücülerle, belirtilen oranlarda, 25°C'de 12 saatlik maserasyondan sonra ekstraktlar Whatman® Grade 1 filtre kağıdından süzölmüştür. Ekstreler daha sonra bir Heidolph Döner Buharlaştırıcıda (Almanya) 50°C'de azaltılmış basınç altında kuruyana kadar birer birer buharlaştırılmıştır.

5.4.4 Total fenolik madde miktar tayini yöntemi

Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri Folin-Ciocalteu yöntemiyle belirlenmiştir [106]. Bir dizi gallik asit seyreltisi hazırlanarak bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Tüm ekstraların ve gallik asit seyreltilerinin test çözeltileri hazırlanmıştır. Test çözeltileri 104 µL distile su, 8 µL numune, 8 µL FCR ve 80 µL %7 Na₂CO₃ ile hazırlanmıştır. Test çözeltileri 90 dakika boyunca karanlıkta tutulduktan sonra 765 nm dalga boyunda absorbansları UV-Vis mikroparka spektrofotometre cihazı (BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer, ABD) ile tespit edilmiştir. Toplam fenolik madde miktarı, gallik asit kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem ile gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak verilmiştir. 3 tekrarlı çalışılmıştır.

5.4.5 Total flavonoit madde miktar tayini yöntemi

Ekstrelerin toplam flavonoit içerikleri alüminyum klorür kolorimetrik yöntemiyle hesaplanmıştır [107]. Bir dizi kersetin seyreltisi hazırlanarak bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Tüm ekstrelerin ve kersetin seyreltilerinin test çözeltileri hazırlanmıştır. Test çözeltileri, 134 µL damıtılmış su, 20 µL numune, 6 µL %10 AlCl₃ ve 40 µL CH₃COONH₄ ile hazırlanmıştır. Test çözeltisi karanlıkta 10 dakika bekletildikten sonra 415 nm dalga boyunda absorbansları UV-Vis mikroparka spektrofotometre cihazı (BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer, ABD) ile tespit edilmiştir. Toplam fenolik madde miktarı, kersetin kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem ile gallik asit eşdeğeri (KE) olarak verilmiştir. 3 tekrarlı çalışılmıştır.

5.4.6 Kara mürver çiçek, meyve ve yaprak ekstrelerindeki rutin ve izokersitrin miktarının yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile analizi ve yöntem validasyonu

Kara mürver bitkisinin majör flavonollerini rutin ve izokersitrinin, fotodiyot dizisi detektörlü (PDA) yüksek performanslı sıvı kromatografisinde (HPLC) miktar tayini için metot geliştirilmiş ve metot valide edilmiştir. Metodun validasyonu USP “(1225) Validation of Compendial Procedure”daki metot validasyonu kriterlerine göre yapılmıştır [108]. Hazırlanan 6 farklı ekstreden en az miktarda bu maddeleri içeren mürver meyve su ekstresi (MMS) ve en fazla miktarda bu maddeleri içeren mürver çiçek etanol ekstresi validasyon aşamasında numune olarak kullanılmıştır.

Cihaz: Shimadzu LC 5020

Dedektör: Photodiode Array Detector (PDA)

Kolon: GL Sciences Inc. InertSustain C-18, Serial No:22E0328078 (5 µm x 250 x 4.6 mm)

Dalga boyu: 350 nm

Enjeksiyon: 10 µL

Fırın sıcaklığı: 30 °C

Mobil faz (A): Asetonitril

Mobil faz (B): %0,3 orto-fosforik asit - su

Akış hızı: 0,4 mL/dk

Akış tipi: gradyan

Akış programı:

Dk 0-5 – Mobil faz B: %100

Dk 5-10 – Mobil faz B: %100 → %70

Dk 10-15 – Mobil faz B: %70

Dk 15-20 – Mobil faz B: %70 → %100

Dk 20-35 – Mobil faz B: %100.

5.4.6.1 Sistem tekrarlanabilirliği

%100'lük standart çözeltisi hazırlanarak 6 kez sisteme enjekte edilir. Bitki ekstresi üzerinde bir standartlaştırma yapılacağından doğrusallık denklemlerinin orta noktaları %100 konsantrasyon olarak belirlenmiştir.

Kabul Kriteri: %RSD (%Bağıl standart sapma) ≤ %2,0

5.4.6.2 Sistem uygunluğu

%100'lük standart çözeltisi hazırlanır, sistem uygunluk parametrelerine bakılır.

Kabul kriteri: %RSD ≤ %2,0

Ardışık iki enjeksiyonda pik alanlarındaki değişim %1'den fazla olmamalıdır.

5.4.6.3 Seçicilik

Boş çözücünden ve mobil faz sisteminden kaynaklanan herhangi bir girişim olup olmadığını incelemek amacıyla yapılır.

5.4.6.4 Doğrusallık

Ekstre analizi için planlanan konsantrasyonun en az beş nokta olacak şekilde %konsantrasyonları hazırlanır. Hazırlanan standart çözeltiler sisteme 3 kez verilir. %100'lük standarttan ise 6 kez verilir. (Bütün konsantrasyonlar 6 kez sisteme verilmiştir). Her konsantrasyonda elde edilen ortalama alanların konsantrasyonlara karşı grafiği çizilerek, doğrusal regresyon analizi ile doğrunun eğimi, çakışma noktası ve korelasyon katsayısı hesaplanır.

Kabul Kriteri: $R^2 > 0,995$

5.4.6.5 Uygulama aralığı

Uygulama aralığındaki en düşük ve en yüksek konsantrasyondaki standart çözeltisi hazırlanır. 3 kez sisteme enjekte edilir.

Kabul Kriteri: Her iki seviye için, %RSD \leq % 2,0.

5.4.6.6 Doğruluk

Standartları en düşük ve en yüksek konsantrasyonda içeren ekstreler tartılarak (MMS ve MÇE), test derişiminin %80, %100 ve %120 oranlarında numune (her bir numuneden 3 hazırlık olacak şekilde) hazırlanır. (MMS kuru ekstresi için %100 derişim 300 mg/10 mL metot çözücüsü -%60 MeOH-, MÇE kuru ekstresi için %100 derişim 150 mg/10 mL metot çözücüsü kabul edilmiştir.)

%Geri kazanım=(Deneysel miktar/Teorik Miktar)*100

Kabul Kriteri: Her bir konsantrasyonda elde edilen %geri kazanım %98-%102 arasında olmalıdır.

%RSD \leq %2,0 olmalıdır.

5.4.6.7 Kesinlik

Kesinlik-tekrarlanabilirlik:

Analitik tekniğin, aynı laboratuvarında, aynı analist ile aynı cihaz ile arka arkaya 6 farklı kez hazırlanan numunenin analitik metoda göre çalışılması ile alınan test sonuçlarının birbirine yakınlık derecesinin ölçülmesidir.

Kabul Kriteri: %RSD \leq % 2,0

Kesinlik-ortam kesinliği:

Analitik tekniğin aynı laboratuvarında, farklı analist, farklı gün, farklı cihaz ve aynı tip farklı bir kolon ile yöntemlerden bir tanesi ya da birkaçı kullanılarak aynı numuneden metoda göre çalışılması ile alınan birden fazla test sonucunun birbirine yakınlık derecesi ölçülür.

Her sete ait %RSD ve 2 sete ait ortalama %RSD değerleri ve ortalamalar arasındaki fark hesaplanır.

Kabul Kriteri:

Ardışık olarak çalışılan örneklerden elde edilen sonuçlar için; %RSD ≤ %2,0

İki farklı analist arasındaki ortalama değer arasındaki % fark ≤ % 2,0

%Fark= ((X Değer - Y Değer) / Y Değer) * 100

5.4.6.8 Sağlamlık

Uygulanan analitik tekniğin çalışma ortamındaki stabilitesinin test edilmesidir. Metodun sistem uygunluk parametrelerinin geçerliliği sağlanarak belirlenir. Metod parametrelerinde (kolon sıcaklığı, mobil faz asit oranı, gradyan değişimi, akış hızı değişimi vb.) farklı varyasyonlarla yapılan değişiklik ile ölçülür.

Kabul Kriteri: Yöntemde kasıtlı yapılan değişikliklerden sonra tayin edilen sonuçlar arasındaki %fark % 2,0'yi geçmemelidir.

5.4.6.9 Stabilité

Hazırlanan numune çözeltisi ve standart çözeltisi belirlenen sıcaklıkta ve sürede bekletilerek tekrar analiz edilir.

Kabul kriteri: %Fark ≤ 2,0

5.4.6.10 Tayin sınırı (LOQ) ve gözlenebilme sınırı (LOD)

Tayin sınırı (limit of quantification, LOQ):

Bir analitik yöntemin nicelik sınırı; örnekteki bileşenin kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikle tayin edilebilen en düşük konsantrasyondur. Hesaplanma denklemi 5.1'de gösterilmiştir.

Kabul Kriteri:

Görsel değerlendirme

Sinyal/gürültü oranı

Doğrusallık çalışması

$$LOQ = \frac{10\sigma}{S}$$

(5.1)

σ : En küçük konsantrasyondaki standart alanlarının standart sapması

S: Regrasyon doğrusunun eğimi

Gözlenebilme sınırı (limit of detection, LOD):

Örnekteki bileşenin belirlenebildiği ancak kantitatif sınırlar içerisinde girmeyen en düşük konsantrasyonudur. Bu miktarın gerçek değer olarak belirlenmesi gerekmez. Hesaplanma denklemi 5.2’de gösterilmiştir

Kabul Kriteri:

Görsel değerlendirme

Sinyal/gürültü oranı

Doğrusallık çalışması

$$LOD = \frac{3,3\sigma}{S}$$

(5.2)

σ : En küçük konsantrasyondaki standart alanlarının standart sapması

S: Regrasyon doğrusunun eğimi

5.4.7 Kara mürver meyve ekstrelerindeki siyanidin-3-glukozit ve siyanidin-3-sambubiozit miktar tayini için kullanılan HPLC-PDA metodu

5.4.7.1 Standart siyanidin-3-glikozit ve siyanidin-3-sambubiozit çözeltilerinin hazırlanması

Kalibrasyon eğrisi için siyanidin-3-glikozit klorürden 0,01% HCl çözeltisi içerisinde 0,2; 0,7; 16,2; 46,3; 116 ve 232 µg/mL’lik konsantrasyonlarda siyanidin-3-glikozide eşdeğer standart çözeltileri hazırlanmıştır. Kalibrasyon eğrisi için siyanidin-3-sambubiozit klorürden 0,01% HCl çözeltisi içerisinde 0,15; 0,75; 1,49; 4,47; 7,45 ve 11,12 µg/mL’lik konsantrasyonlarda siyanidin-3-sambubiozite eşdeğer standart çözeltileri hazırlanmıştır. Standart çözeltileri 0.45 µm filtreden geçirilerek viallere alınmıştır. PDA dedektörlü HPLC cihazında bu standart çözeltileri ile kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

5.4.7.2 Kromatografik koşullar

Analizler PDA dedektörlü HPLC cihazıyla (Shimadzu LC 5020) yapılmıştır. Kolon olarak GL Sciences Inc. InertSustain C-18, Serial No:22E0328078 (5 µm, 250x4.6

mm) kullanılmıştır. Mobil faz olarak ise su, asetonitril, formik asit (81:9:10, v/v/v) (A) izokratik olarak kullanılmıştır. Akış hızı dakikada 1 mL olacak şekilde analizler yapılmıştır. Enjeksiyon hacmi 10 µL olup kolon sıcaklığı 25 °C’de tutulmuştur. 525 nm dalga boyunda elde edilen kromatogramlardan alan hesabı yapılmıştır [109].

5.4.7.3 Ekstrelerin nicel analizi

Analiz örnekleri, ekstrelerden 1,5 g ekstre 0,01% HCl çözeltisi ile çözündürülerek 25 mL’ye tamamlanması sonucu hazırlanmıştır. Örnekler içerisindeki siyanidin-3-glikozit ve siyanidin-3-sambubiozit miktarları kalibrasyon eğrisinden elde edilen formüllerden hesaplanmıştır.

5.4.8 Ekstrelerin LC-HRMS ile fenolik bileşen tayini yöntemi

“5.3.3 Ekstrelerin sıvı kromatografisi ve yüksek rezolüsyonlu kütle spektrometresi (LC-HRMS) ile fenolik bileşen tayini yöntemi” başlığında açıklanan metod kullanılmıştır.

5.4.9 *In vivo* anti-obezite aktivite çalışmaları

5.4.9.1 Deney hayvanları

Deneysel Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı’ndan temin edilen 200-250 g ağırlığında, erkek, Wistar albino ratlar kullanılmıştır. Hayvanlar standart şartlar altında 12 saat aydınlık-12 saat karanlık ışık periyodunda bekletilmiş ve standart pellet yem/su ile beslenmiştir (ad libitum) [110].

5.4.9.2 Deney protokolü

Deneysel çalışmalar gün içerisinde, 10:00-18:00 saatleri arasında gerçekleştirilmiştir. Bütün çalışmalar uluslararası etik kurallar doğrultusunda, hayvan haklarını suistimal etmeksizin yapılmıştır.

Test numunelerinin hazırlanması

Biyolojik aktivite deneylerinde, test numuneleri %0,5’lik sodyum karboksimetil selüloz (CMC) çözeltisi içerisinde, gerekli durumlarda ultrasonik banyo yardımıyla süspanse edilerek, deney hayvanlarına özel mide gavajı vasıtasıyla oral yolla 100 mg/kg dozda uygulanmıştır. Kontrol grubu hayvanlarına ise sadece test numunelerinin

hazırlanmasında kullanılan %0,5'lik CMC verilmiştir. Deneylerde, test numuneleri 7 hafta boyunca sıçanlara uygulanmıştır [110].

Referans madde

Referans madde olarak kullanılan Orlistat 5 mg/kg doz olacak şekilde %0,5'lik karboksimetil selüloz içerisinde süspansiyon edilerek hazırlanmış ve hayvanlara gastrik gavaj yoluyla günde bir kez olmak kaydıyla deney süresi boyunca uygulanmıştır.

Deney grupları

Her grup için minimum 7 rat kullanılmıştır. Deneyler 7 hafta boyunca devam ettirilmiş ve kullanılan sıçanların ağırlık takibi haftalık periyotlar halinde yapılmıştır. Sıçanlar bireysel kafeslerde barındırılmış ve aşağıda belirtildiği gibi 15 gruba ayrılmıştır (Tablo 5.2).

Tablo 5.2: Deney grupları

Gruplar	Uygulama
Kontrol grubu	%0,5'lik CMC süspansiyonu (1mL/kg/p.o.) + Standart pellet yem
Negatif kontrol grubu	%0,5'lik CMC süspansiyonu (1mL/kg/p.o.) + %40 dana eti içeren yüksek yağlı diyet yemi
Test numuneleri grupları (6 adet)	
Mürver yaprakları etanol-su ekstresi	%0,5'lik CMC süspansiyonu içerisinde süspansiyon edilmiş test numuneleri (100 mg/kg, p.o.) + %40 dana eti içeren yüksek yağlı diyet yemi
Mürver yaprakları sulu ekstresi	
Mürver çiçekleri etanol-su ekstresi	
Mürver çiçekleri sulu ekstresi	
Mürver meyveleri etanol-su ekstresi	
Mürver meyveleri sulu ekstresi	
Referans madde grubu	Orlistat (5 mg/kg doz) + %40 dana eti içeren yüksek yağlı diyet yemi

5.4.9.3 Biyokimyasal analizler

Serum parametrelerinin ölçümü

7 haftalık deney süresinin sonunda sıçanlar öldürüldükten sonra göğüs kafesleri açılmış ve kalpten alınan kan örnekleri antikoagülsüz tüpe alınmıştır. Oda sıcaklığında pıhtılaşması beklendikten sonra 1000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları elde edilmiştir. Elde edilen serumlar 1.5 mL'lik ependorf tüplere konularak

ölçümler yapılıncaya kadar -20 °C’de saklanmıştır [110]. Elde edilen serum örneklerinde insülin (Cat. EZRMI-13K), trigliserit, HDL, LDL, adiponektin (Human Diagnostica. GmbH, Germany), leptin (Cat. EZRL-83K), serbest T₃ (DSL-10-41100), serbest T₄ (DSL-10-40100i), TNF- α , IL-1 β ve lipaz düzeyleri ticari kitler kullanılarak ölçülmüştür [111].

HDL-C tayini

Esterleşmemiş kolesterolün N, N-bis (4-sulfobütil)-m-toluidin-disodyum (DSBmT) ile reaksiyonu sonucunda açığa çıkan renksiz ürününün kolesterol esteraz enzimi ile renkli bileşiğe dönüştürülmesi ile oluşan HDL-C miktarının ölçülmesi esasına dayanan bir yöntemdir [110, 112].

Serum HDL-C düzeyleri, Dimension RL Max otoanalizör cihazı kullanılarak mg/dL cinsinden hesaplanmıştır [110].

LDL-C tayini

Çok düşük dansiteli lipoprotein, HDL ve şilomikronların belirli koşullar altında parçalanarak LDL-C’ye dönüştürülmesi ve bundan enzim ve surfaktanlar yardımı ile renkli bileşiklerin oluşturularak absorbansının ölçülmesi esasına dayanan bir yöntemdir [110, 112].

Serum LDL-C düzeyleri, Hitachi Moduler otoanalizör cihazı kullanılarak mg/dL cinsinden ölçülmüştür [110].

Trigliserit tayini

Lipoprotein lipaz enzimi aracılığıyla trigliseritlerden açığa çıkan gliserolün, gliserol kinaz ile fosforilasyonu sonucu oluşan gliserol-3-fosfatın gliserol-3-fosfat oksidaz enzimi ile okside olarak dihidroksiaseton fosfat ve hidrojen peroksit'e dönüşmesi ve bundan 4-klorofenol ile H₂O₂ varlığında kuinoniminin oluşması, oluşan rengin 510 ve 700 nm’de absorbansının ölçülmesi esasına dayanan bir yöntemdir [110, 112].

Serum TG düzeyleri, Dimension RL Max otoanalizör cihazı kullanılarak, bikromatik uç nokta tekniği ile mg/dL cinsinden hesaplanmıştır [110].

Leptin düzeyinin ölçülmesi

Leptin düzeyleri ELISA kit kullanılarak ölçülmüştür. Reajanlar, örnekler ve standartlar üretici talimatlarına göre hazırlanmış ve kuyucuklara 100 μ L ilave edilerek

1 saat inkübe edilmiştir. Kuyucuklar boşaltılarak yıkama çözeltisi ile yıkandıktan sonra kuyucuklara 100 µL biotinle işaretlenmiş antikor çözeltisi eklenmiş ve 1 saat inkübe edilmiştir. Kuyucuklar yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkandıktan sonra üzerine 100 µL streptavidin-HRP konjugatı eklenerek 30 dakika inkübe edilmiş ve yıkanmıştır. Yıkamadan sonra 100 µL substrat çözeltisi ilave edilerek 10 dakika inkübe edilmiş ve son olarak 100 µL durdurma çözeltisi ilave edilerek 450 nm'de okuma yapılmıştır [110].

IL-1β ve TNF-α seviyelerinin ölçümü

IL-1β ve TNF-α seviyeleri ELISA kitler kullanılarak ölçülmüştür. Reajanlar, örnekler ve standartlar üretici talimatlarına göre hazırlanmıştır. 100 µL standart ve test numunesi 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna konulmuş ve 37 °C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra her kuyucuktan sıvılar çıkarılmış ve kuyucuklara 100 µL biotin antikor ilave edilerek 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından kuyucuklar 3 kez yıkama çözeltisi ile yıkandıktan sonra kuyucuklar boşaltılmış ve her kuyucuğa 100 µL yaban turpu peroksidazı (HRP)-avidin ilave edilerek tekrar 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kuyucuklar boşaltılarak 5 kez yıkama çözeltisi ile yıkandıktan sonra 90 µL 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) substratı eklenerek ve 37 °C'de 30 dakika karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Son olarak 50 µL durdurma çözeltisi ilave edilip 450 nm'de ELISA mikrolaka okuyucu ile okuma yapılmıştır [110].

Lipaz enzim inhibisyonu tayini

Test numuneleri 0.1 M Tris-HCl tamponu (pH=8.0) ile mikrolaplardaki son konsantrasyonları 25, 50, 100, 200 ve 400 µg/mL olacak şekilde dilüe edilmiştir. Lipaz inhibisyon düzeyleri, substrat olarak *p*-nitro fenil butirat (*p*-NPB) (CAS:2635-84-9)'ın kullanıldığı modifiye yöntemle gerçekleştirilmiştir [113-115]. Lipaz inhibitör etkiye sahip olan orlistat, referans madde olarak kullanılmıştır. Orlistat, tampon çözelti ile mikrolaptaki son konsantrasyonları 6,25; 12,5; 25; 50 ve 100 µg/mL olacak şekilde dilüe edilmiştir. Örneklerin absorbans ölçümleri 405 nm dalga boyunda 96 kuyucuklu mikrolak kullanılarak, spektrofotometrede gerçekleştirilmiştir. Her bir örneğe ait, her bir konsantrasyon 3 paralel olarak çalışılmıştır [110].

Deney sonucunda belirlenen % enzim inhibisyon değerleri ve ait olduğu konsantrasyonun logaritması (ordinat ve absis) şeklinde grafiğe geçirilmiş ve

oluşturulan grafik denkleminde örneklerin lipaz enzim üzerine olan IC₅₀ değerleri belirlenmiştir. Çalışılan doz aralığı dışında IC₅₀ değerine sahip örnekler, lipaz inhibitör etkili olarak değerlendirilmemiştir [110].

İstatistiksel analiz

Çalışma sonucunda sıçanların haftalık ağırlıkları, haftalar arası ağırlık farkı ve haftalar arası % ağırlık değişimleri, biyokimyasal parametrelere ait veriler istatistiksel ortalama±standart sapma olarak hesaplanmıştır. İstatistiksel analizlerde GraphPad Prism 6.0 (San Diego, CA, ABD) programı kullanılmıştır. Tüm parametrelerde ANOVA testi yapılmış ve ardından Dunnett testi uygulanmıştır [110].

5.5 Kara Mürver ve Ekinezya Ekstreleri İçeren Formülasyon Oluşturulması

5.5.1 Formülasyonun hazırlanması

Mürver ekstresinin hazırlanması:

25 gram kuru mürver (*Sambucus nigra* L. - FİTOMER marka) öğütülmüştür. 125 g su, 125 g gliserin ve 25 mL etanol ile oda sıcaklığında 4 saat boyunca manyetik karıştırıcı aracılığıyla karıştırılmıştır. Oluşan ekstre filtre kağıdıyla süzölmüştür.

Ekinezya ekstresinin hazırlanması:

25 gram ekinezya (*Echinacea purpurea* (L.) Moench - BAÇEM marka) öğütölmüştür. 125 g su, 125 g gliserin ve 25 mL etanol ile oda sıcaklığında 4 saat boyunca manyetik karıştırıcı aracılığıyla karıştırılmıştır. Oluşan ekstre filtre kağıdıyla süzölmüştür.

Daha sonra hazırlanan ekstrelerden ve belirtilen diğere maddelerden aşağıda belirtilen miktarlarda alınmıştır.

- 150 mL mürver ekstresi
- 150 mL ekinezya ekstresi
- 9,9 g L-askorbik asit
- 3 gram çinko (10,071 gram çinko asetat formunda)
- 450 mg potasyum sorbat
- 450 mg sodyum benzoat

Bir araya getirildikten sonra formülasyon oda sıcaklığında 1 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Başlangıç analizi için bir kısmı ayrıldıktan sonra

formülasyon 9 şişeye bölünerek şişelenmiştir. 1, 2 ve 3 kodlu 3 şişe stabilite kabine ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C} / \%60\text{ BN} \pm \%5\text{ BN}$); 4, 5 ve 6 kodlu 3 şişe oda sıcaklığına ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$); 7, 8 ve 9 kodlu 3 şişe de buzdolabına ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) kaldırılmıştır.

5.5.2 Formülasyonun askorbik asit miktarının HPLC-PDA ile takip edilmesi

5.5.2.1 Standart L-askorbik asit çözeltilerinin hazırlanması

Kalibrasyon eğrisi için L-askorbik asitten, metafosforik asit (%15 m/m) çözeltisi içerisinde 0,03; 0,17; 0,62; ve 0,84 mg/mL'lik konsantrasyonların standart çözeltileri hazırlanmıştır. Standart çözeltileri 0.45 µm filtreden geçirilerek viallere alınmıştır. PDA dedektörlü HPLC cihazında bu standart çözeltileri ile kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

5.5.2.2 Kromatografik koşullar

Analizler PDA dedektörlü HPLC cihazıyla (Shimadzu LC 5020) yapılmıştır. Kolon olarak GL Sciences Inc. InertSustain C-18, Serial No:22E0328078 (5 µm, 250x4.6 mm) kullanılmıştır. Mobil faz olarak ise metanol (A) ve pH=3'e fosforik asit ile ayarlanmış H₂O (B), 5:95 oranında izokratik olarak kullanılmıştır. Akış hızı dakikada 1 ml olacak şekilde analizler yapılmıştır. Enjeksiyon hacmi 20 µL olup kolon sıcaklığı 20 °C'de tutulmuştur. 254 nm dalga boyunda elde edilen kromatogramlardan alan hesabı yapılmıştır [116].

5.5.2.3 Örneklerin nicel analizi

Analiz örnekleri formülasyondan 0,5 mL alınarak 25 mL'ye metafosforik asit (%15 m/m) çözeltisi ile tamamlanması sonucu hazırlanmıştır. Örnekler içerisindeki L-askorbik asit miktarı kalibrasyon eğrisinden elde edilen formülden hesaplanmıştır.

5.5.3 Formülasyonun toplam fenolik ve flavonoit madde miktarlarının takip edilmesi

“5.4.4 Total fenolik madde miktar tayini yöntemi” ve “5.4.5 Total flavonoit madde miktar tayini yöntemi” başlıklarında yer alan metotlar kullanılarak fenolik ve flavonoit madde miktarlarının analizi 0-1-3. aylarda yapılmıştır.

5.5.4 Formülasyonun toplam antosiyanin miktarlarının takip edilmesi

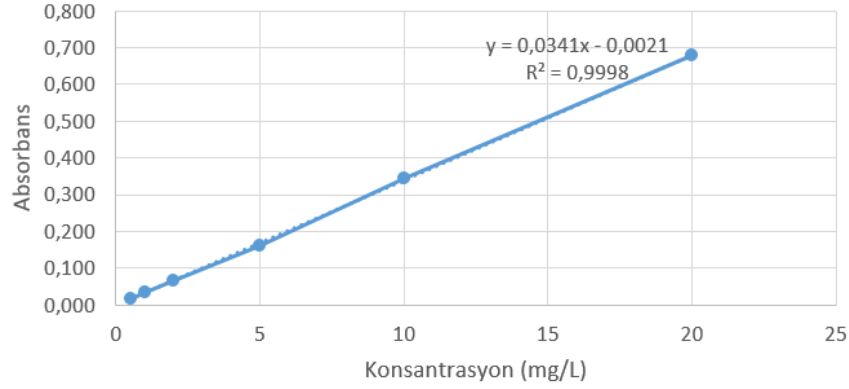
Analiz örnekleri numunelerin 1:10 oranında %0,1 HCl-MeOH çözeltisi ile seyreltilmesi sonucu elde edilmiştir. Absorbans ölçümleri 528 nm’de yapılmış, “5.2.2 Spektrofotometrik toplam antosiyanin analiz yöntemi” başlığında kullanılan yöntemdeki kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır.



6. BULGULAR ve TARTIŞMA

6.1 Mürver (*Sambucus nigra*) Seleksiyon Islahı TAGEM Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü Projesi Kapsamındaki Kara Mürver Örneklerinin Toplam Antosiyanin Miktarları

Toplam antosiyanin miktar tayini için siyanidin-3-glukozit klorür ile spektrofotometre cihazında oluşturulan kalibrasyon eğrisi Şekil 6.1’de verilmiştir.



Şekil 6.1: Siyanidin-3-glukozit klorürün UV-Vis mikropilaka spektrofotometresi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.

TAGEM tarafından gönderilen kurutulmuş 121 farklı kara mürver örneklerinin her birinin 100 gramında bulunan toplam antosiyanin miktarı (gram) Şekil 6.1’de yer alan kalibrasyon eğrisi denklemi sayesinde siyanidin-3-glukozit klorür cinsinden hesaplanmıştır. Sonuçlar aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 6.1).

Tablo 6.1: Mürver (*Sambucus nigra*) Seleksiyon Islahı TAGEM Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü projesi kapsamındaki kara mürver örneklerinin toplam antosiyanin miktarları.

Toplanma yılı	Örnek kodu	Absorbans ortalaması	%Antosiyanin ortalaması	Standart sapma
2021	Afyon 1	0,6855	0,5010	0,0150
2021	Afyon 2	0,4341	0,3167	0,0171
2021	Afyon 3	0,8159	0,5966	0,0287
2021	BAÇEM 1	0,4520	0,3299	0,0086
2021	BAÇEM 2	0,5370	0,3922	0,0183

2021	BAÇEM 3	0,3060	0,4457	0,0230
2021	BAÇEM 4	0,4436	0,3237	0,0102
2021	Balya	0,3625	0,2642	0,0212
2021	Bergama 1	1,5332	1,1225	0,0634
2021	Bergama 2*	1,1646	1,7045	0,0141
2021	Bergama 3	1,4172	1,0374	0,1288
2021	Bergama 4	1,0682	0,7816	0,1076
2021	Bergama 5	1,5805	1,1572	0,0051
2021	Bergama 6-1	0,7568	0,5533	0,0272
2021	Bergama 6-2	0,4097	0,2988	0,0072
2021	Bigadiç 1	0,6620	0,4838	0,0193
2021	Bigadiç 2	0,4475	0,3265	0,0033
2021	Bigadiç 3	0,4761	0,3475	0,0200
2021	Bigadiç 4	0,1670	0,1209	0,0072
2021	Bigadiç 5	0,3530	0,2573	0,0104
2021	Bozdağ 1	1,0008	0,7322	0,1259
2021	Bozdağ 2	1,0434	0,7634	0,0741
2021	Bozdağ 3	0,7184	0,5252	0,0484
2021	Bozdağ 4	1,1896	0,8706	0,1218
2021	Bozdağ 5	0,7220	0,5278	0,0222
2021	Bozdağ 6	1,4932	1,0932	0,1854
2021	Bozdağ 7	1,9114	1,3998	0,2659
2021	Bozdağ 8	1,4426	1,0561	0,1995
2021	Bozdağ 9	1,2659	0,9265	0,0797
2021	Bozdağ 10	1,4740	1,0791	0,1769
2021	Bozdağ 11	0,6681	0,4883	0,0430
2021	Bozdağ 12	0,6714	0,4907	0,0232
2021	Bozdağ 13	0,2680	0,1949	0,0145
2021	Dursunbey	0,1851	0,1342	0,0019
2021	Havran 1	0,6209	0,4537	0,0197
2021	Havran 2	0,4081	0,2977	0,0188
2021	Havran 3	0,7773	0,5683	0,0192
2021	Havran 4	0,6801	0,4971	0,0156
2021	Havran 5	0,4873	0,3557	0,0124
2021	Kütahya 1	0,4921	0,3592	0,0124
2021	Kütahya 2	0,4859	0,3547	0,0098
2021	Kütahya 3	0,3625	0,2642	0,0212
2022	Afyon Sinanpaşa Yıldırım 1-1	0,7113	0,5200	0,0217
2022	Afyon Sinanpaşa Yıldırım 2	0,8487	0,6207	0,0432
2022	Bergama 1	0,6745	0,4929	0,0318
2022	Bergama 2	0,6470	0,4728	0,0044
2022	Bergama 3	0,6453	0,4715	0,0214
2022	Bergama 4 Yukarıbey Kırnalı Yolu	0,7340	0,5366	0,0309
2022	Bergama 5 Tavuk Çiftliği	0,7937	0,5804	0,0259
2022	Bergama 6 Köyiçi Çamavlu	1,5416	1,1287	0,2305
2022	Bergama 7 Karaveliler Köyiçi	1,6082	1,1775	0,1291
2022	Bergama 8 Kırnalı Köyü	1,7667	1,2937	0,0491

2022	Bergama 8-2 Kırnalı Köyü Girişi	0,9056	0,6624	0,0097
2022	Bergama 9-1 Yukarıbey	1,0089	0,7381	0,0877
2022	Bigadiç Akyar 1	0,5161	0,3769	0,0109
2022	Bigadiç Akyar 2	0,8464	0,6190	0,0326
2022	Bigadiç Akyar 3	0,3711	0,2705	0,0289
2022	Bigadiç Akyar 4	0,8687	0,6353	0,1152
2022	Bigadiç Akyar 5	0,5074	0,3705	0,0246
2022	Bigadiç Akyar 6	1,6311	1,1943	0,1125
2022	Bigadiç Akyar 7	0,6495	0,4746	0,0784
2022	Bigadiç Akyar 8	0,6790	0,4963	0,0078
2022	Bolu 1	1,0460	0,7653	0,0818
2022	Bolu 2	1,2420	0,9090	0,0467
2022	Bolu 3	1,4561	1,0660	0,0403
2022	Bolu 4	0,4934	0,3602	0,0049
2022	Bolu 5	0,6451	0,4714	0,0442
2022	Bolu 6	0,4726	0,3449	0,0037
2022	Bolu 7	0,5606	0,4094	0,0368
2022	Bolu 8	0,8959	0,4094	0,0368
2022	Bolu 9	0,9133	0,6680	0,0270
2022	Bolu 10	0,2573	0,1871	0,0109
2022	Bolu 11	0,9666	0,7071	0,0353
2022	Bolu 12	1,4484	1,0604	0,0894
2022	Bolu 13	0,9128	0,6677	0,0256
2022	Bolu 14	0,3876	0,2826	0,0428
2022	Bolu 15	0,3540	0,2580	0,0183
2022	Bolu 16	0,0412	0,0286	0,0001
2022	Bolu 17	1,5163	1,1101	0,0209
2022	Bolu 18	1,1612	0,8498	0,0641
2022	Bolu 19	0,6184	0,4519	0,0242
2022	Bolu 20	1,2184	0,8917	0,0164
2022	Bolu 21	1,7330	1,2690	0,0260
2022	Bolu 22*	1,0193	1,4930	0,0722
2022	Bolu 23	1,7767	1,3011	0,1040
2022	Bolu 24	1,8907	1,3846	0,0834
2022	Bolu 25	0,8131	0,5945	0,0285
2022	Bolu 26	1,8903	1,3843	0,0936
2022	Bolu 27	0,9030	0,6605	0,0124
2022	Bolu 28	0,6589	0,4815	0,0346
2022	Bozdağ Üretim	1,0505	0,7686	0,0352
2022	Bozdağ 1	0,7320	0,5351	0,0108
2022	Bozdağ 1-1	1,1154	0,8162	0,0666
2022	Bozdağ 1-2	1,1077	0,8106	0,0690
2022	Bozdağ 2-1-14	1,1390	0,8335	0,0222
2022	Bozdağ 2-14	1,1019	0,8063	0,0359
2022	Bozdağ 3	1,2416	0,9087	0,0060
2022	Bozdağ 4-1	0,4660	0,3401	0,0235
2022	Bozdağ 4-2	0,9541	0,6980	0,0199
2022	Bozdağ 5-1	0,6476	0,4732	0,0125
2022	Bozdağ 5-2	1,0143	0,7421	0,0149
2022	Bozdağ 6	0,9813	0,7179	0,0499
2022	Bozdağ 7	0,6708	0,4903	0,0254
2022	Bozdağ 8	0,8494	0,6212	0,0514
2022	Bozdağ 9	0,9831	0,7192	0,0513

2022	Bozdağ 10	1,3275	0,9717	0,0370
2022	Bozdağ 12	1,1433	0,8366	0,0090
2022	Bozdağ 13	1,2575	0,9204	0,0526
2022	Bozdağ 14-1	1,5823	1,1585	0,0303
2022	Bozdağ 14-2	1,0804	0,7906	0,0179
2022	Bozdağ 15	0,6408	0,4682	0,0178
2022	Bursa 31	0,7364	0,5383	0,0336
2022	Bursa 32 Yenişehir	0,4811	0,3511	0,0151
2022	Kütahya Arpalı 1	0,6877	0,5026	0,0140
2022	Kütahya Arpalı 2	0,3846	0,2804	0,0049
2022	Kütahya Arpalı 2-1	0,9902	0,7244	0,0124
2022	Kütahya Arpalı 3	0,9773	0,7149	0,0329
2022	Kütahya Arpalı 4	0,6013	0,4393	0,0207
2022	Kütahya Arpalı 11	0,5884	0,4299	0,0203
2022	Yalova 1	1,5999	1,1714	0,0539
2022	Yalova 29	1,4323	1,0486	0,0335

* Absorbans aşımı sebebiyle 2 kat daha seyreltilen örneklerdir.

Çalışma sonucunda toplam antosiyanin miktarının en fazla olduğu tespit edilen 5 örneğe aşağıdaki tabloda yer verilmiştir (Tablo 6.2).

Tablo 6.2: Toplam antosiyanin miktarı en fazla olan 5 örnek.

Toplanma yılı	Numune kodu	%Toplam antosiyanin miktarı (Ortalama ± Standart Sapma)
2021	Bergama 2	1,7045 ± 0,0141
2022	Bolu 22	1,4930 ± 0,0722
2021	Bozdağ 7	1,3998 ± 0,2659
2022	Bolu 24	1,3846 ± 0,0834
2022	Bolu 26	1,3843 ± 0,0936

6.2 *In Vitro* Sitotoksikite Testi İçin Hazırlanan Ekstrelerle İlgili Bulgular

6.2.1 Ekstrelerin verimleri

425,4 mg mürver meyvesi kurutulmuş ekstresi (%0,85 verim), 1,9615 g mürver yaprağı kurutulmuş ekstresi (%19,62 verim) ve 1,9591 g mürver çiçeği kurutulmuş ekstresi (%19,60 verim) elde edilmiştir.

6.2.2 Ekstrelerin LC-HRMS bulguları

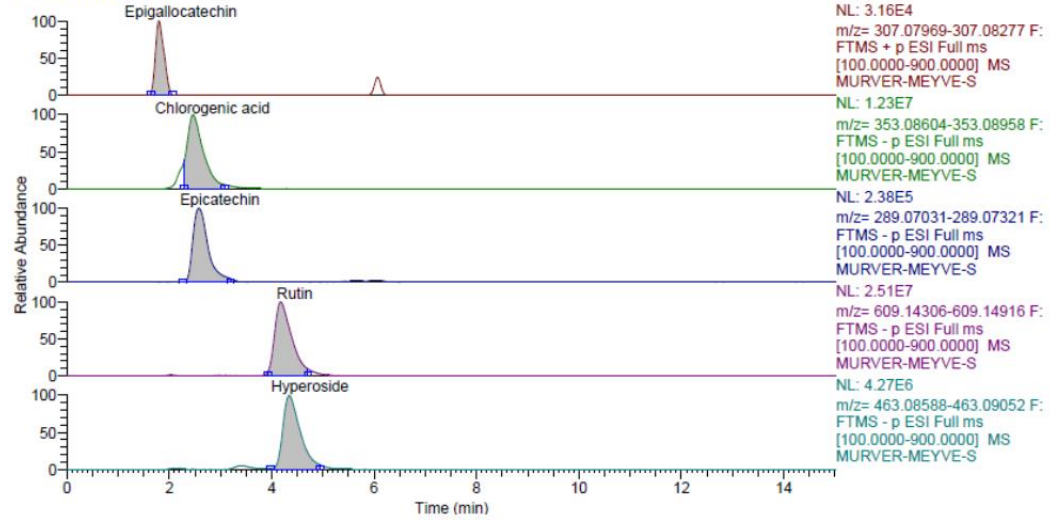
Her üç ekstre de içerikleri açısından LC-HRMS ile analiz edilmiştir. Daha sonra ekstrelerden droglara orantı ile geçiş yapılmış; taze meyve, kurutulmuş yaprak ve kurutulmuş çiçeklerdeki her bileşiğin miktarı hesaplanmıştır. Rutin (78,1890 mg/100 kg taze mürver), klorojenik asit (14,1580 mg/100 kg taze mürver) ve hiperozit (6,0910 mg/100 kg taze mürver) miktarları taze mürver meyvesinde nispeten yüksek

bulunmuştur. Klorojenik asit (105,7338 mg/100 g kuru yaprak), fumarik asit (93,0616 mg/100 g kuru yaprak) ve rutin (73,7087 mg/100 g kuru yaprak) miktarları kurutulmuş mürver yapraklarında nispeten yüksek bulunmuştur. Rutin (231,5114 mg/100 g kuru çiçek), fumarik asit (101,5408 mg/100 g kuru çiçek) ve hiperozit (19,1591 mg/100 g kuru çiçek) miktarları kurutulmuş mürver çiçeklerinde nispeten yüksek bulunmuştur (Tablo 6.2). Her ekstrenin kromatogramına aşağıda yer verilmiştir (Şekil 6.2-6.4).

Tablo 6.3: LC-HRMS bulgularına göre mürver meyve, yaprak ve çiçeklerindeki fenolik bileşiklerin miktarları

Bileşik	Rölatif belirsizlik (%)	mg/100 kg taze meyve	mg/100 g kuru yaprak	mg/100 g kuru çiçek
(-)-Epigallokateşin	3,09	0,0480	-	0,0045
Klorojenik asit	3,58	14,1580	105,7338	58,8815
Fumarik asit	2,88	-	93,0616	101,5408
(-)-Epikateşin	3,17	0,0870	-	0,0081
Kafeik asit	3,74	-	0,4547	1,2641
Rutin	3,07	78,1890	73,7087	231,5114
Hiperozit	3,46	6,0910	2,2531	19,1591
Dihidrokemferol	2,86	0,0070	-	0,1781
Apigenin-7-glukozit	3,59	0,0020	-	-
Kersitrin	3,78	0,0590	0,2274	3,1312
Kersetin	2,95	0,4520	0,0357	0,8843
Naringenin	4,20	0,1350	0,0143	12,1588
Luteolin	3,42	0,0280	-	-
6-OH-Luteolin-7-glukozit	2,99	0,3820	-	-
Kemferol	3,56	-	-	0,2658
3'-O-Metil kersetin	3,58	-	-	0,4159
Apigenin	2,87	-	0,009	0,0063
Krizin	3,24	-	0,0062	-

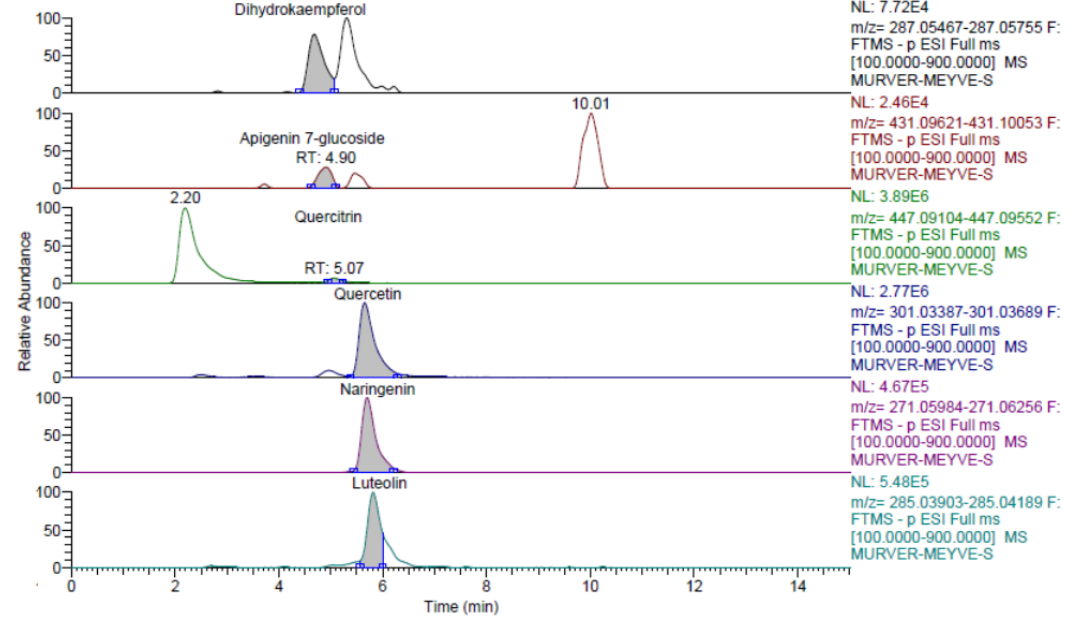
RT: 0.00 - 15.02 SM: 15G



C:\Xcalibur\...MURVER-MEYVE-S

01/24/23 08:08:14

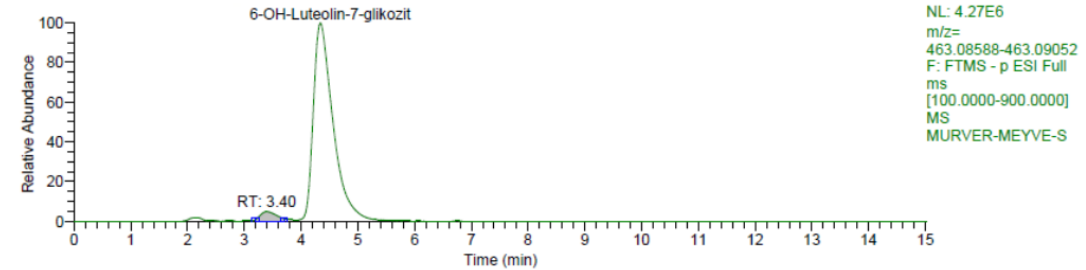
RT: 0.00 - 15.02 SM: 15G



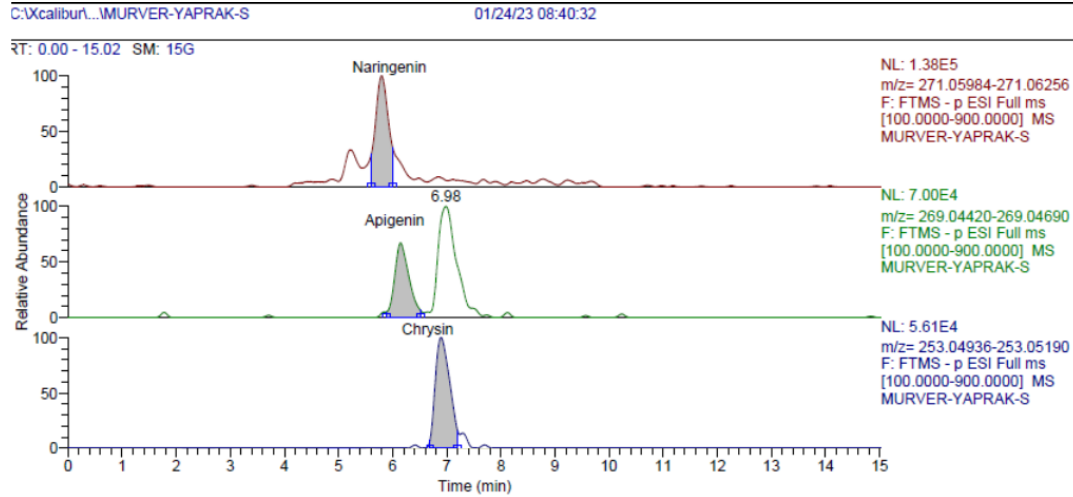
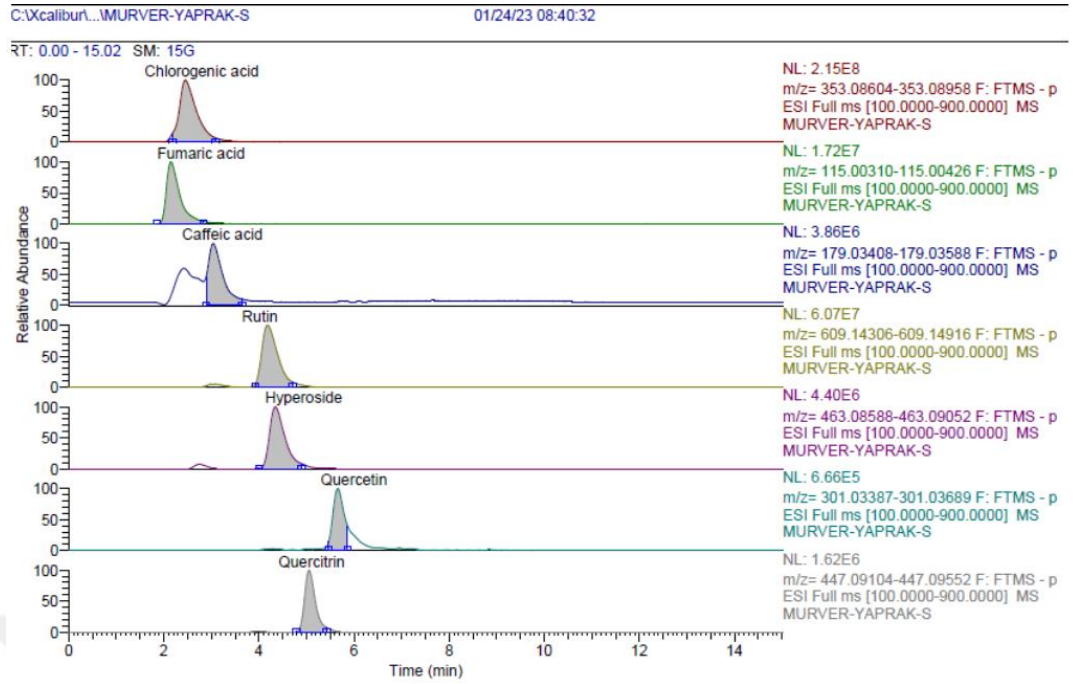
C:\Xcalibur\...MURVER-MEYVE-S

01/24/23 08:08:14

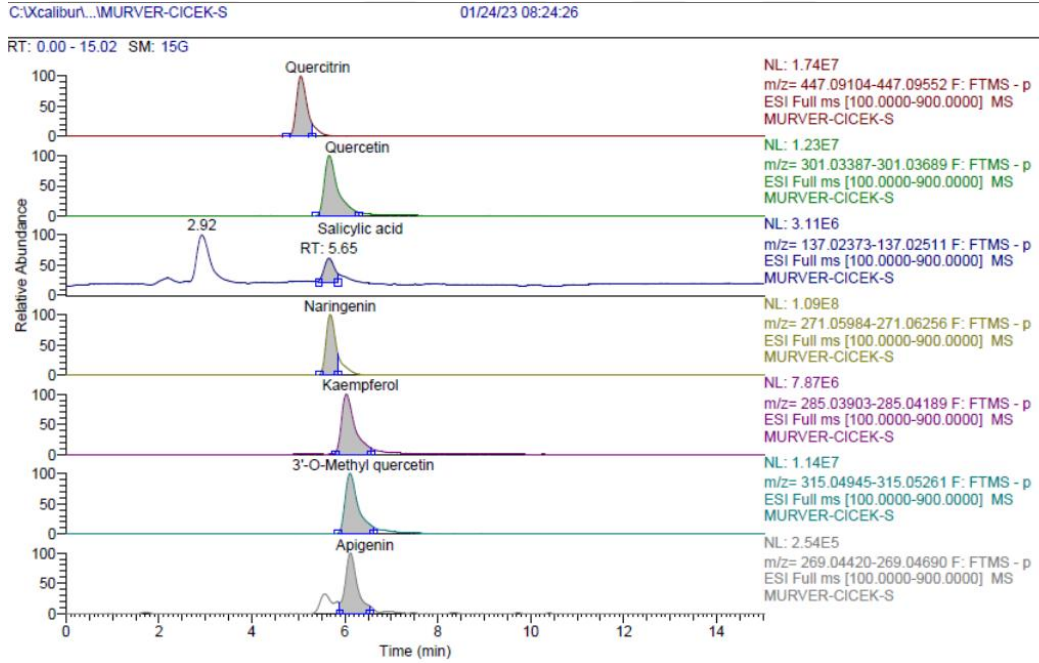
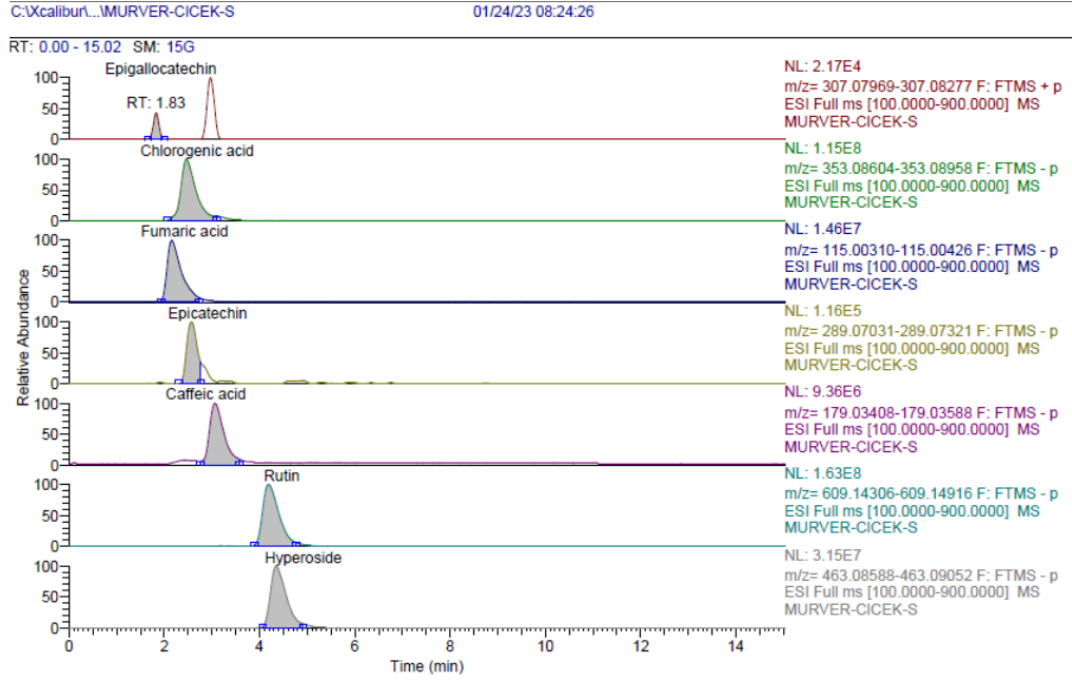
RT: 0.00 - 15.02 SM: 15G



Şekil 6.2: *In vitro* sitotoksosite testi için hazırlanan mürver meyve ekstresinin LC-HRMS kromatogramları



Şekil 6.3: *In vitro* sitotoksisite testi için hazırlanan mürver yaprak ekstresinin LC-HRMS kromatogramları



Şekil 6.4: *In vitro* sitotoksosite testi için hazırlanan mürver çiçek ekstresinin LC-HRMS kromatogramları

6.2.3 Ekstrelerin *in vitro* sitotoksosite testi bulguları

Sonuçlar hücrelerin yarısının öldürülmesinden sorumlu olan ortalama IC₅₀ konsantrasyonu olarak ifade edilmiştir. IC₅₀ hesaplamasının imkânsız olması durumunda bundan sorumlu konsantrasyonla birlikte maksimum hücre ölümü oranı olarak ifade edilmiştir. Test sonuçları U-118 MG hücrelerinin diğer hücre hatlarına göre daha duyarlı olduğunu göstermektedir. U-188 MG hücrelerinde IC₅₀, yapraklar ve çiçekler için sırasıyla 97,06 ve 124,60 µg/mL olarak hesaplanırken maksimum

hücre ölümü, 150 µg/mL meyve ekstralarında %32,9 idi. A549’da maksimum hücre ölümü, 150 µg/mL yaprak ekstresinde %21 idi ve MCF-7 hücre hattında maksimum hücre ölümü oranı, 150 µg/mL yaprak ekstresinde %25,5 idi. Hem A549 hem de MCF-7 hücre hatlarında çiçek ekstraları önemli sitotoksikite göstermezken, meyve ekstresinin sitotoksikitesi bu iki hücre hattında %12,3’ten azdı (Tablo 6.4).

Tablo 6.4: Mürver ekstralarının farklı hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi.

Ekstre	Hücre hattı	Değerlendirme tipi	Sonuç
Meyve	A549	Hücre ölüm oranı	150 µg/mL konsantrasyonda %12,3 ± 4,2
Meyve	MCF-7	Hücre ölüm oranı	150 µg/mL konsantrasyonda %9,8 ± 3,0
Meyve	U-118 MG	Hücre ölüm oranı	150 µg/mL konsantrasyonda %32,9 ± 3,7
Yaprak	A549	Hücre ölüm oranı	150 µg/mL konsantrasyonda %21,0 ± 3,5
Yaprak	MCF-7	Hücre ölüm oranı	150 µg/mL konsantrasyonda %25,5 ± 4,7
Yaprak	U-118 MG	IC ₅₀	97,06 µg/mL
Çiçek	A549	Hücre ölüm oranı	100 µg/mL konsantrasyonda %4,1 ± 3,0
Çiçek	MCF-7	Hücre ölüm oranı	150 µg/mL konsantrasyonda %3,0 ± 2,5
Çiçek	U-118 MG	IC ₅₀	124,60 µg/mL

S. nigra ekstralarının, meyve sularının, ticari ürünlerin vb. sitotoksik aktivitesi farklı çalışmalarca da değerlendirilmiştir. Bunun için farklı hücre tipleri ve farklı testler kullanılmışlardır. Bazı çalışmalarda *S. nigra*’nın sitotoksik etkisinin olmadığı bildirilirken [117, 118], bazı çalışmalarda bazı hücre hatlarında sitotoksikitenin olduğu ancak diğerlerinde olmadığı veya bazı ekstraların/ürünlerin etkisinin olduğu halde diğerlerinin olmadığı rapor edilmiştir [71, 119-121]. Ek olarak, bazı çalışmalar ise, kullanılan tüm hücre hatlarında test edilen tüm ekstraların/ürünlerin sitotoksik etkilerini bildirmiştir [82, 122-126]. Bu sonuçlar, kullanılan hücre hatları, değerlendirilen ekstre/ürünler ve toplanan sonuçlar arasındaki ilişkiyi vurgulamaktadır. Önceki çalışmalar esas olarak çiçekler ile meyvelere ve bunların etanolik, metanolik, su ekstralarına odaklanmıştır. *S. nigra* çiçek ekstraları için hesaplanan IC₅₀ mesane karsinomu hücreleri (T24) hücre hattındaki bütanolik ekstre için 21,57 µg/mL [124] ile insan kolorektal kanser (HCT-116) hücre hattındaki su ekstresi için 3441 ± 230 µg/mL arasında değişmektedir [122]. Ancak IC₅₀’nin hesaplanmadığı, ekstrelerin etkisinin olmadığını bildiren çalışmalar da mevcuttur [71, 120].

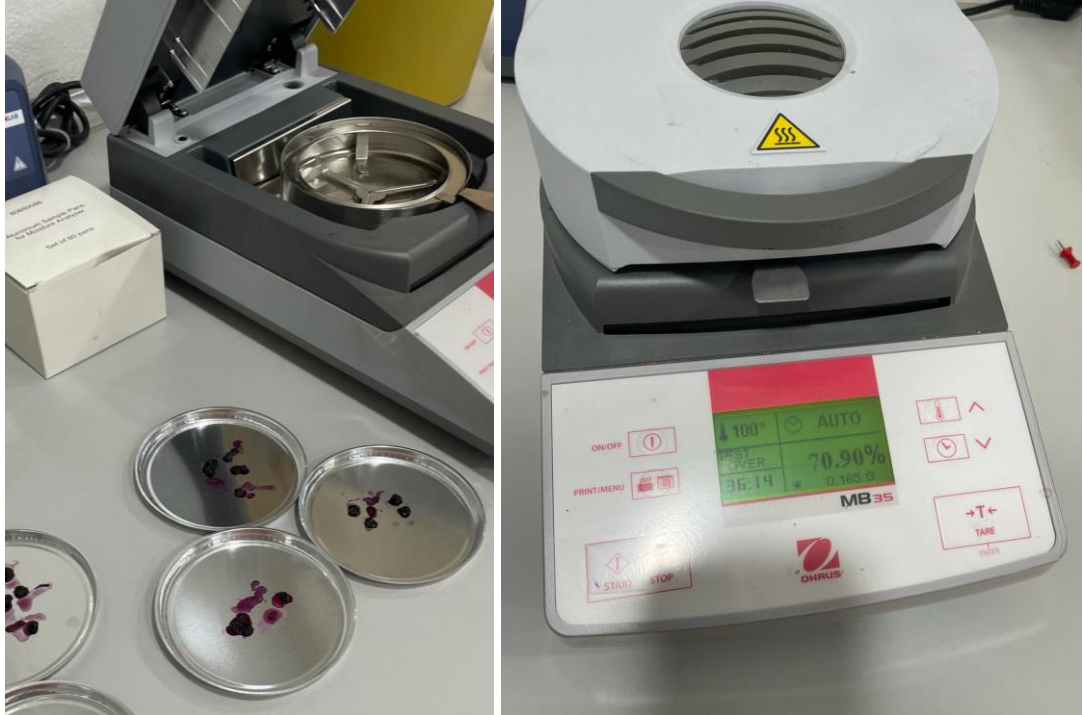
Daha önce, Banach ve arkadaşlarının çalışmasında A549 hücre hattı membran ayırma (B1) veya kolon kromatografisi (B2) kullanılarak yapılan saflaştırma sonrasında donmuş meyve suyunu değerlendirmek için kullanılmıştır. Bu hücre hattında herhangi bir toksisite bildirilmemiştir. Aynı çalışmada MCF-7 hücre hattı da kullanılmış;

sonuçları, 24 saatlik maruz kalma sonrasında hem B1 hem de B2 için IC₅₀'nin hesaplanamayacağını, ancak 72 saat sonra IC₅₀ değerlerinin B1 ve B2 için sırasıyla 268 ve 140 µg/mL olduğunu göstermektedir [119]. MCF-7 hücre hattı ayrıca Ghanbari ve ark. (2022) ve da Silva ve ark. (2019) tarafından da kullanılmıştır. Bildirilen IC₅₀ değerleri sırasıyla 10±2,6 µM (72 saat, kısım ve ekstrakt türünden bahsedilmemiş) ve 58 µg/mL (24 saat, taze meyve suyu) olmuştur [125, 126]. Önceki çalışmalar ve veriler mevcut çalışmamızın sonuçlarını doğrulamaktadır. Test edilen ekstratlar, A549 ve MCF-7 hücre hatlarında sitotoksikite yok ila düşük sitotoksikite gösterirken, U-118 MG hücre hattında çiçek ve yaprak ekstratların sitotoksik etkisi anlamlıydı. Bu, hücre hatları arasındaki farklarla açıklanabilirken, test edilen ekstratlar arasındaki farklar, ekstratların içeriğindeki farklılıklarla açıklanabilir. Sonuçlar, *S. nigra* ekstratlarının ve ürünlerinin belirli sınırlardaki güvenliğini vurgulamaktadır.

6.3 *In Vivo* Biyolojik Aktivite Testleri İçin Hazırlanan Ekstratlarla İlgili Bulgular

6.3.1 Kullanılan yaş mürver meyvelerindeki nem tayinine ait bulgular

Meyve ekstratlarının hazırlanmasında kullanılan mürver meyvelerinin nem oranı %70,886 ± 0,246 olarak tespit edilmiştir (Şekil 6.5).



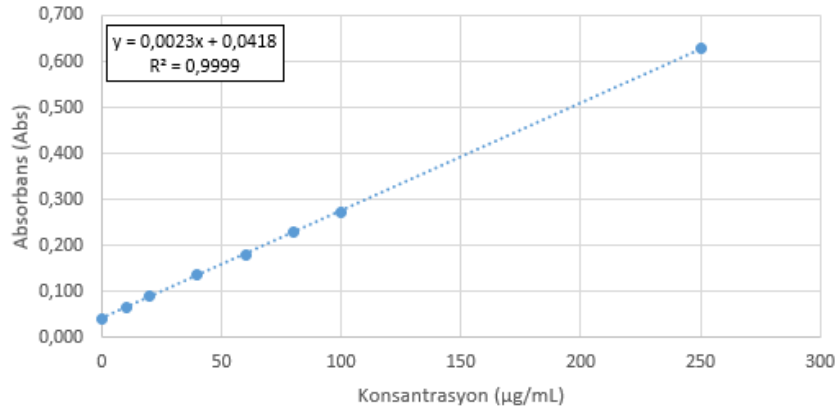
Şekil 6.5: Kara mürver meyvelerinde nem tayininin yapılması.

6.3.2 Ekstrelerin verimleri

100 g drogdan 1:10 DER (drog/ekstre oranı) ile hazırlanan ekstrelerden; mürver yaprak %50 etanol ekstresinden 24,33 g kuru ekstre (%24,33 verim), mürver yaprak su ekstresinden 32,41 g kuru ekstre (%32,41 verim), mürver çiçek %50 etanol ekstresinden 22,40 g kuru ekstre (%22,40 verim), mürver çiçek su ekstresinden 26,29 g kuru ekstre (%26,29 verim), mürver meyve %50 etanol ekstresinden 15,69 g kuru ekstre (%15,69 verim) ve mürver meyve su ekstresinden 17,03 g kuru ekstre (%15,69 verim) elde edilmiştir.

6.3.3 Ekstrelerin spektrofotometrik yöntemle tayin edilen toplam fenolik madde miktarları

Toplam fenolik madde miktar tayini için gallik asit kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi Şekil 6.6'da verilmiştir.



Şekil 6.6: Gallik asidin UV-Vis mikropilaka spektrofotometresi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.

Ekstrelerin spektrofotometrik yöntemle tayin edilen toplam fenolik madde miktarları gallik asit eşdeğeri olarak Tablo 6.5'te gösterilmiştir.

Tablo 6.5: *Sambucus nigra* ekstrelerinin toplam fenolik madde miktarları.

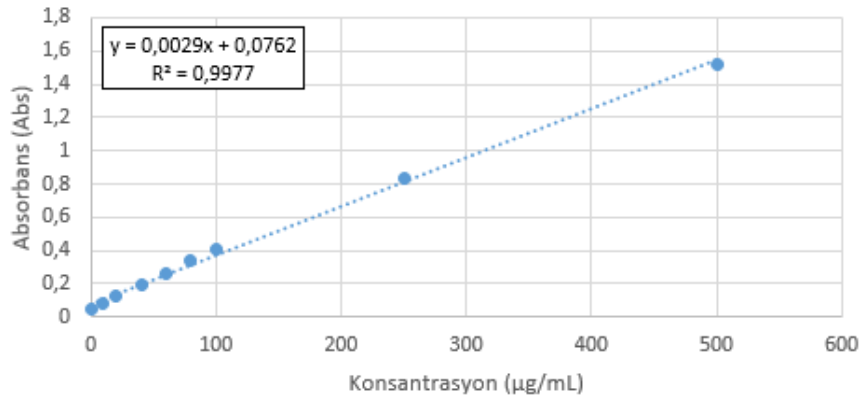
Ekstre	Toplam fenol ^a içeriği \pm S.S. ^b
Mürver yaprak %50 EtOH	49,20 \pm 0,35
Mürver yaprak %100 su	44,86 \pm 0,34
Mürver çiçek %50 EtOH	59,05 \pm 0,21
Mürver çiçek %100 su	49,38 \pm 0,21
Mürver meyve %50 EtOH	35,49 \pm 0,28
Mürver meyve %100 su	36,84 \pm 0,29

^a Veriler, 1 g ekstredeki gallik asit eşdeğerinin mg cinsinden değeridir.

^b Standart sapma (n = 3).

6.3.4 Ekstrelerin spektrofotometrik yöntemle tayin edilen toplam flavonoit madde miktarları

Toplam flavonoit madde miktar tayini için kersetin kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi Şekil 6.7’de verilmiştir.



Şekil 6.7: Kersetinin UV-Vis mikropilaka spektrofotometresi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.

Ekstrelerin spektrofotometrik yöntemle tayin edilen toplam flavonoit madde miktarları kersetin eşdeğeri olarak Tablo 6.6’da gösterilmiştir.

Tablo 6.6: *Sambucus nigra* ekstrelerinin toplam flavonoit madde miktarları.

Ekstre	Toplam flavonoit ^a içeriği \pm S.S. ^b
Mürver yaprak %50 EtOH	23,92 \pm 0,11
Mürver yaprak %100 su	16,89 \pm 0,28
Mürver çiçek %50 EtOH	35,43 \pm 0,23
Mürver çiçek %100 su	23,33 \pm 0,33
Mürver meyve %50 EtOH	5,63 \pm 0,23
Mürver meyve %100 su	6,06 \pm 0,25

^a Veriler, 1 g ekstredeki kersetin eşdeğerinin mg cinsinden değeridir.

^b Standart sapma (n = 3).

6.3.5 Kara mürver çiçek, meyve ve yaprak ekstrelerindeki rutin ve izokersitrin miktarının yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile analizi ve yöntem validasyonu

6.3.5.1 Sistem tekrarlanabilirliği

Rutin ve izokersitrin için %100'lük standart çözeltisi olarak kabul edilen derişimdeki standartlar sisteme 6 kez enjekte edilmiştir Tablo 6.7. Kabul şartı %RSD \leq %2,0'yi sağlamaktadır.

Tablo 6.7: Sistem tekrarlanabilirliği.

Standart ve derişimi (mg/mL)	Enjeksiyon	Alan	Ortalama	%RSD
Rutin 0,132 mg/mL	1	4214620	4219478	0,14
	2	4214421		
	3	4215234		
	4	4226458		
	5	4226996		
	6	4219136		
İzokersitrin, 0,0102 mg/mL	1	452624	452611,8	0,04
	2	452790		
	3	452570		
	4	452666		
	5	452718		
	6	452303		

RSD: Bağıl standart sapma.

6.3.5.2 Sistem uygunluğu

%100'lük kabul edilen standart çözeltileri hazırlanmış ve sistem uygunluk parametrelerine bakılmıştır. Kabul kriteri olan %RSD \leq %2,0'yi sağlamaktadırlar. Ardışık iki enjeksiyonda pik alanlarındaki değişim %1'den fazla değildir (Tablo 6.8).

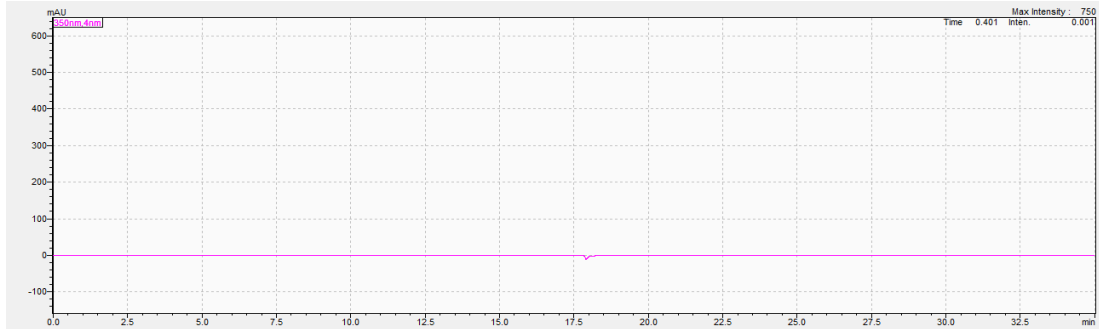
Tablo 6.8: Sistem uygunluğu.

Standart ve derişimi (mg/mL)	Enjeksiyon	Alan	Ortalama	%RSD	N	T	R _s
Rutin 0,132 mg/mL	1	4214620	4219478	0,14	6572	2,28	2,82
	2	4214421					
	3	4215234					
	4	4226458					
	5	4226996					
	6	4219136					
İzokersitrin, 0,0102 mg/mL	1	452624	452611,8	0,04	6428	2,32	2,74
	2	452790					
	3	452570					
	4	452666					
	5	452718					
	6	452303					

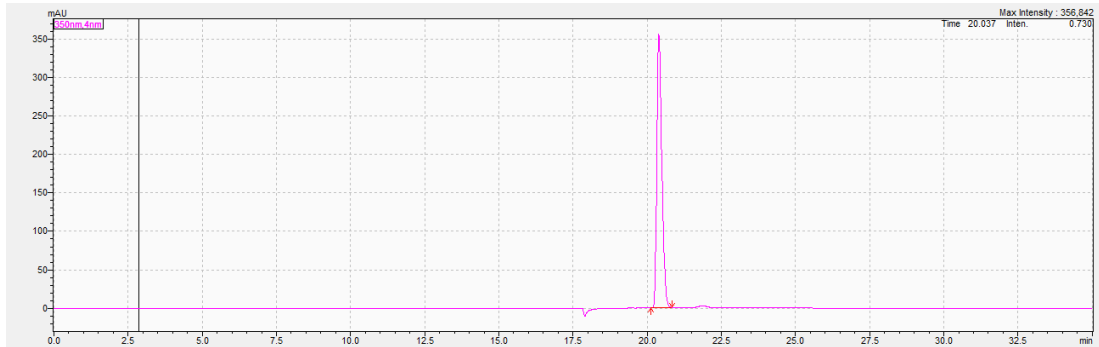
RSD: Bağıl standart sapma; N: Teorik plaka sayısı; T: Kuyruklanma faktörü; R_s: Rezolüsyon

6.3.5.3 Seçicilik

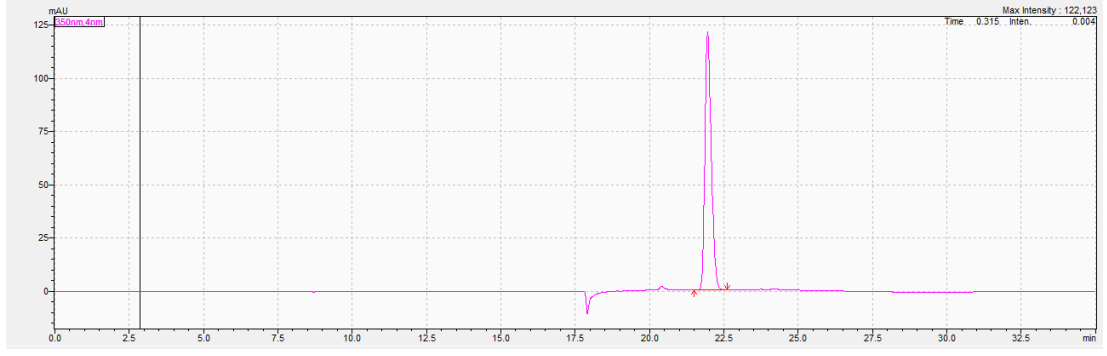
Boş çözücü (%60 MeOH), standart çözeltileri, %100 konsantrasyonda hazırlanan numuneler mürver meyve su (MMS) ve mürver çiçek %50 etanole (MÇE) ait kromatogramlar belirtilmiştir. Boş çözücü veya mobil fazdan kaynaklanan herhangi bir girişim saptanmamıştır (Şekil 6.8-Şekil 6.12).



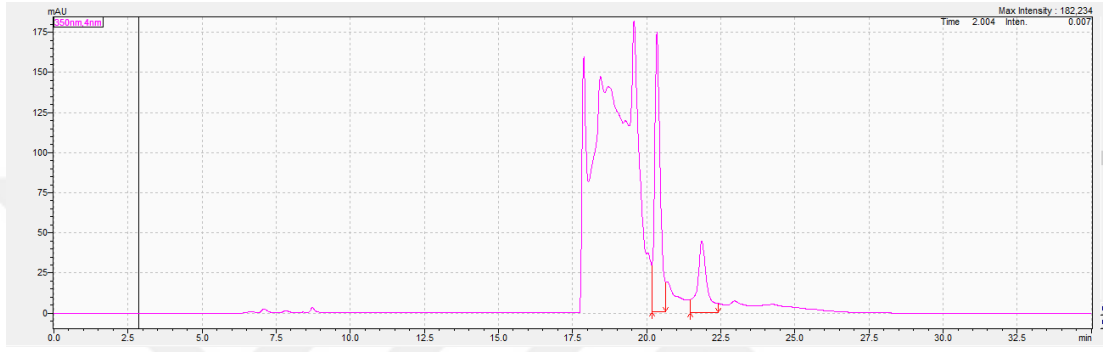
Şekil 6.8: Boş çözücü kromatogramı.



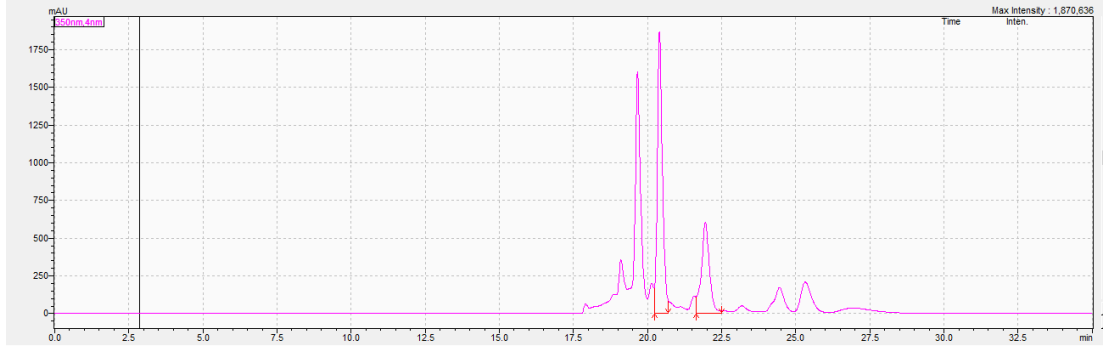
Şekil 6.9: Rutin standardı kromatogramı.



Şekil 6.10: İzokersitrin standardı kromatogramı



Şekil 6.11: MMS kromatogramı.



Şekil 6.12: MÇE kromatogramı.

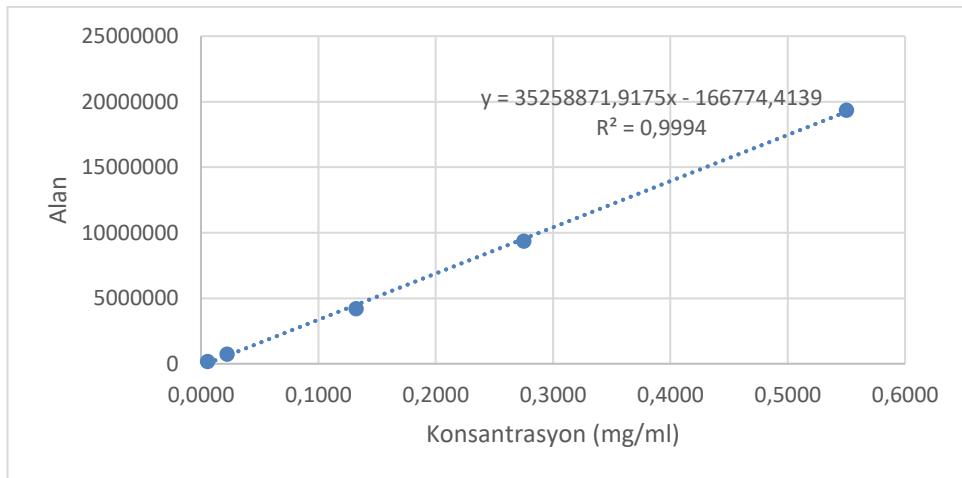
6.3.5.4 Doğrusallık

5 farklı derişimde rutin standardı sisteme 6 kez verilmiştir (Tablo 6.9). Her konsantrasyonda elde edilen ortalama alanların konsantrasyonlara karşı grafiğı çizilerek, doğrusal regresyon analizi ile doğrunun eğimi, çakışma noktası ve korelasyon katsayısı belirlenmiştir. Kabul kriteri olan $R^2 > 0,995$ sağlanmıştır (Şekil 6.13).

Tablo 6.9: Rutin standardının doğrusallığı.

Rutin standardı derişimi (mg/mL)	Enjeksiyon	Alan	Ortalama	%RSD
0,0055	1	182021	182092	0,054
	2	182234		
	3	182010		
	4	182051		
	5	182197		
	6	182037		
0,022	1	745045	745538	0,039
	2	745457		
	3	745433		
	4	745755		
	5	745787		
	6	745748		
0,132	1	4214620	4219478	0,139
	2	4214421		
	3	4215234		
	4	4226458		
	5	4226996		
	6	4219136		
0,275	1	9367850	9367563	0,053
	2	9369127		
	3	9370758		
	4	9360049		
	5	9363823		
	6	9373769		
0,55	1	19360931	19363818	0,062
	2	19369673		
	3	19373814		
	4	19364732		
	5	19341326		
	6	19372432		

RSD: Bağlı standart sapma



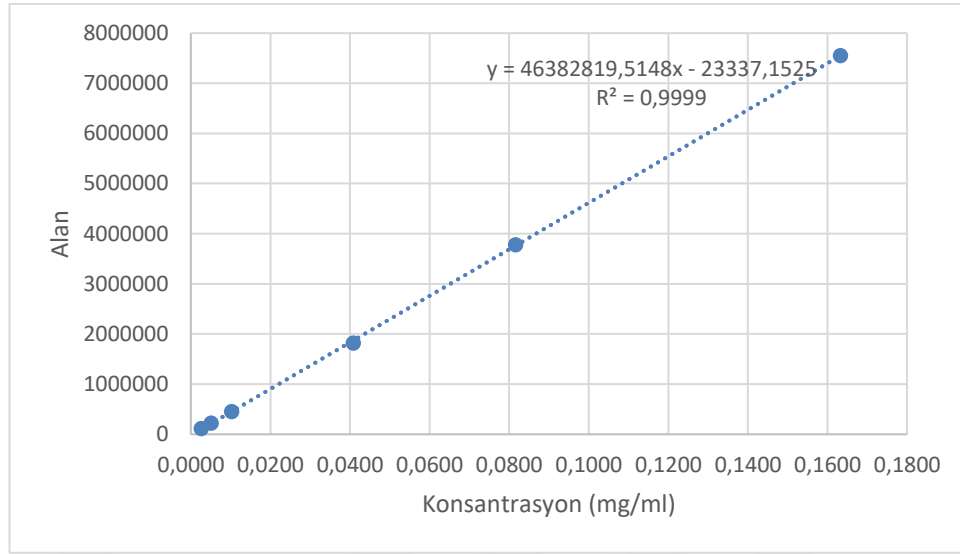
Şekil 6.13: Rutin standardının kalibrasyon eğrisi, denklemi ve R² değeri.

6 farklı derişimde izokersitrin standardı sisteme 6 kez verilmiştir (Tablo 6.10). Her konsantrasyonda elde edilen ortalama alanların konsantrasyonlara karşı grafiği çizilerek, doğrusal regresyon analizi ile doğrunun eğimi, çakışma noktası ve korelasyon katsayısı belirlenmiştir. Kabul kriteri olan $R^2 > 0,995$ sağlanmıştır (Şekil 6.14).

Tablo 6.10: İzokersitrin standardının doğrusallığı.

İzokersitrin standardı derişimi (mg/mL)	Enjeksiyon	Alan	Ortalama	%RSD
0,00255	1	115762	115701	0,076
	2	115735		
	3	115655		
	4	115822		
	5	115581		
	6	115649		
0,0051	1	221666	221954	0,072
	2	221988		
	3	222010		
	4	222143		
	5	221915		
	6	222003		
0,0102	1	452624	452612	0,037
	2	452790		
	3	452570		
	4	452666		
	5	452718		
	6	452303		
0,0408	1	1816398	1817564	0,054
	2	1818647		
	3	1818665		
	4	1816540		
	5	1817446		
	6	1817686		
0,0816	1	3773268	3775639	0,076
	2	3775966		
	3	3776692		
	4	3779060		
	5	3771307		
	6	3777542		
0,1632	1	7542465	7551374	0,075
	2	7548963		
	3	7550238		
	4	7555851		
	5	7558731		
	6	7551997		

RSD: Bağıl standart sapma



Şekil 6.14: İzokersitrin standardının kalibrasyon eğrisi, denklemini ve R^2 değeri.

6.3.5.5 Uygulama aralığı

Uygulama aralığındaki en düşük ve en yüksek derişimdeki standart çözeltileri 3 kez sisteme enjekte edilmiştir. Kabul kriteri olan her iki seviye için $\%RSD \leq \%2$ değeri hem rutin hem izokersitrin standartları için sağlanmıştır (Tablo 6.11).

Tablo 6.11: Uygulama aralığı.

Standart ve derişimi (mg/mL)	Enjeksiyon	Alan	Ortalama	%RSD
Rutin 0,0055 mg/mL	1	182021	182088,3	0,069
	2	182234		
	2	182010		
Rutin 0,55 mg/mL	1	19360931	19368139	0,034
	2	19369673		
	3	19373814		
İzokersitrin 0,00255 mg/mL	1	115762	115717,3	0,048
	2	115735		
	3	115655		
İzokersitrin 0,1632 mg/mL	1	7542465	7547222	0,055
	2	7548963		
	3	7550238		

RSD: Bağlı standart sapma

6.3.5.6 Doğruluk

MMS ve MÇE kuru ekstreleri test derişiminin %80, %100 ve %120 oranlarında numune (her bir numuneden 3 hazırlık olacak şekilde) hazırlanmıştır. (MMS kuru ekstresi için %100 derişim 300 mg/10 mL, MÇE kuru ekstresi için %100 derişim 150 mg/10 mL kabul edilmiştir.) Kabul kriteri olan her bir konsantrasyonda elde edilen %98-%102 arası %geri kazanım sağlanmıştır. Bir diğer kabul kriteri olan %RSD \leq %2,0 değeri de sağlanmıştır (Tablo 6.12, Tablo 6.13).

Tablo 6.12: Rutin standardı için doğruluk analizi.

Ekstre	Alan	mg/mL	%RSD	SF	mg/10 mL	Ortalama	%Geri kazanım
MMS %80	1770521	0,0549		10	0,549		
	1775641	0,0551	0,14	10	0,551	0,550	98,52
	1771137	0,0550		10	0,550		
MMS %100	2296356	0,0699		10	0,699		
	2294138	0,0698	0,12	10	0,698	0,698	100,00
	2290624	0,0697		10	0,697		
MMS %120	2801878	0,0842		10	0,842		
	2817830	0,0846	0,32	10	0,846	0,843	100,71
	2801017	0,0842		10	0,842		
MÇE %80	17647092	0,5052		10	5,052		
	17698075	0,5067	0,25	10	5,067	5,053	98,70
	17607810	0,5041		10	5,041		
MÇE %100	22398668	0,6400		10	6,400		
	22377194	0,6394	0,10	10	6,394	6,400	100,00
	22420953	0,6406		10	6,406		
MÇE %120	27417280	0,7823		10	7,823		
	27474606	0,7840	0,14	10	7,840	7,827	101,92
	27403829	0,7819		10	7,819		

RSD: Bağıl standart sapma; SF: Seyreltme faktörü.

Tablo 6.13: İzokersitrin standardı için doğruluk analizi.

Ekstre	Alan	mg/mL	%RSD	SF	mg/10 mL	Ortalama	%Geri kazanım
MMS %80	788929	0,0175		10	0,175		
	784328	0,0174	0,37	10	0,174	0,175	101,93
	789992	0,0175		10	0,175		
MMS %100	973907	0,0215		10	0,215		
	971959	0,0215	0,29	10	0,215	0,214	100,00
	968198	0,0214		10	0,214		
MMS %120	1150277	0,0253		10	0,253		
	1148995	0,0253	0,10	10	0,253	0,253	98,31
	1151232	0,0253		10	0,253		

	9139807	0,1976		10	1,976		
MÇE %80	9135930	0,1975	0,07	10	1,975	1,976	98,87
	9149225	0,1978		10	1,978		
	11507288	0,2486		10	2,486		
MÇE %100	11589601	0,2504	0,43	10	2,504	2,498	100,00
	11595789	0,2505		10	2,505		
	13671850	0,2953		10	2,953		
MÇE %120	13712025	0,2961	0,31	10	2,961	2,952	98,48
	13626734	0,2943		10	2,943		

RSD: Bağlı standart sapma; SF: Seyreltme faktörü.

6.3.5.7 Kesinlik

Kesinlik-tekrarlanabilirlik:

Aynı laboratuvarında, aynı analist ile, aynı cihaz ile arka arkaya 6 kez %100 konsantrasyonda hazırlanan numuneler (MMS ve MÇE) analitik metotta çalışılmıştır. Alınan test sonuçlarının birbirine yakınlık derecesinin ölçülmüştür. Kabul kriteri olan $\%RSD \leq \% 2,0$ sağlanmıştır (Tablo 6.14, Tablo 6.15).

Tablo 6.14: MMS ve MÇE ekstralarının rutin içeriğinin tekrarlanabilirlik parametrelerinin sonuçları.

	Alan	Ortalama	mg/mL	SF	mg/10 mL	%RSD	Rs	T	N
MMS-1	2261620 2279544	2270582	0,069	10	0,691				
MMS-2	2295648 2295454	2295551	0,070	10	0,698				
MMS-3	2378485 2374752	2376618,5	0,072	10	0,721	1,811	2,74	2,17	6418
MMS-4	2325554 2324654	2325104	0,071	10	0,707				
MMS-5	2248787 2247965	2248376	0,068	10	0,685				
MMS-6	2304748 2307154	2305951	0,070	10	0,701				
MÇE-1	22032577 22094835	22072478	0,631	10	6,307				
MÇE-2	22367128 22374950	22300595	0,637	10	6,372				
MÇE-3	21787925 21777455	22255086	0,636	10	6,359	1,741	2,87	2,28	7561
MÇE-4	22754545 22741564	22710861	0,649	10	6,488				
MÇE-5	22256469 22212558	22692264	0,648	10	6,483				
MÇE-6	23125484 23174545	23150015	0,661	10	6,613				

SF: Seyreltme faktörü; RSD: Bağlı standart sapma; Rs: Rezolüsyon; T: Kuyruklanma faktörü; N: Teorik plaka sayısı.

Tablo 6.15: MMS ve MÇE ekstralarının rutin içeriğinin tekrarlanabilirlik parametrelerinin sonuçları.

	Alan	Ortalama	mg/mL	SF	mg/10 mL	%RSD	R _s	T	N
MMS-1	975222 979722	977472	0,022	10	0,216				
MMS-2	966564 967453	967009	0,021	10	0,214				
MMS-3	985458 981545	983502	0,022	10	0,217				
MMS-4	952257 952143	952200	0,021	10	0,210	1,206	2,61	2,37	6713
MMS-5	977784 975428	976606	0,022	10	0,216				
MMS-6	984723 982454	983589	0,022	10	0,217				
MÇE-1	11609432 11620766	11615099	0,251	10	2,509				
MÇE-2	11712368 11715745	11714057	0,253	10	2,531				
MÇE-3	11476311 11432987	11454649	0,247	10	2,475				
MÇE-4	11774132 11768443	11771288	0,254	10	2,543	1,464	2,73	2,29	7484
MÇE-5	11382346 11365821	11374084	0,246	10	2,457				
MÇE-6	11397842 11394515	11396179	0,246	10	2,462				

SF: Seyreltme faktörü; RSD: Bağlı standart sapma; R_s: Rezolüsyon; T: Kuyruklanma faktörü; N: Teorik plaka sayısı.

Keskinlik-ortam kesinliği:

Aynı konsantrasyonda numuneler (MMS ve MÇE) farklı analistler tarafından hazırlanıp aynı laboratuvarında farklı günlerde analiz edilmiştir. Alınan test sonuçlarının birbirine yakınlık derecesi ölçülmüştür. Her analistin kendi enjeksiyonları arasındaki %RSD ve analistlerin arasındaki %RSD değerleri ve %fark değerleri hem rutin hem izokersitrin miktarları için hesaplanmıştır. Kabul kriteri olan ardışık olarak çalışılan örneklerden elde edilen sonuçlar için $\%RSD \leq \%2,0$ sağlanmıştır. Bir diğer kabuk kriteri olan iki farklı analist arasındaki ortalama değer arasındaki $\%fark \leq \%2,0$ de sağlanmıştır (Tablo 6.16-Tablo 6.19).

Tablo 6.16: Farklı kişiler tarafından hazırlanan numunelerin rutin miktar analizi.

Numune	Enjeksiyon	Alan	mg/mL	mg/10 mL	Ortalama	%RSD
MMS-Ş	1	2295173	0,0698	0,6982	0,698	0,027
	2	2296266	0,0699	0,6986		
	3	2296384	0,0699	0,6986		
MMS-H	1	2252871	0,0686	0,6863	0,687	0,092
	2	2256586	0,0687	0,6873		
	3	2252594	0,0686	0,6862		
MMS-B	1	2289508	0,0697	0,6966	0,695	0,243
	2	2278742	0,0694	0,6936		
	3	2279697	0,0694	0,6939		
MÇE-Ş	1	22322753	0,6378	6,3784	6,384	0,095
	2	22365724	0,6391	6,3906		
	3	22344041	0,6384	6,3844		
MÇE-H	1	22112601	0,6319	6,3188	6,327	0,213
	2	22113586	0,6319	6,3191		
	3	22195523	0,6342	6,3423		
MÇE-B	1	22590693	0,6454	6,4544	6,449	0,115
	2	22583137	0,6452	6,4523		
	3	22542190	0,6441	6,4406		

RSD: Bağıl standart sapma.

Tablo 6.17: Farklı kişiler tarafından hazırlanan numunelerin rutin miktarının ikili karşılaştırması.

Karşılaştırılan ikili	%Fark	%RSD
MMS-Ş ve MMS-H	1,732	0,942
MMS-Ş ve MMS-B	0,543	0,334
MMS-H ve MMS-B	1,169	0,665
MÇE-Ş ve MÇE-H	0,913	0,519
MÇE-Ş ve MÇE-B	1,002	0,560
MÇE-H ve MÇE-B	1,897	1,060

RSD: Bağıl standart sapma.

Tablo 6.18: Farklı kişiler tarafından hazırlanan numunelerin izokersitrin miktar analizi.

Numune	Enjeksiyon	Alan	mg/mL	mg/10 mL	Ortalama	%RSD
MMS-Ş	1	981002	0,0217	0,2165	0,217	0,029
	2	981112	0,0217	0,2166		
	3	980562	0,0216	0,2164		
MMS-H	1	964185	0,0213	0,2129	0,213	0,046
	2	963874	0,0213	0,2128		
	3	964772	0,0213	0,2130		
MMS-B	1	970658	0,0214	0,2143	0,214	0,030
	2	970463	0,0214	0,2143		
	3	971057	0,0214	0,2144		
MÇE-Ş	1	11606464	0,2507	2,5074	2,518	0,362

	2	11666407	0,2520	2,5203		
	3	11688167	0,2525	2,5250		
	1	11512518	0,2487	2,4871		
MÇE-H	2	11575245	0,2501	2,5006	2,493	0,286
	3	11525853	0,2490	2,4900		
	1	11487821	0,2482	2,4818		
MÇE-B	2	11401875	0,2463	2,4632	2,469	0,450
	3	11395454	0,2462	2,4619		

RSD: Bağıl standart sapma.

Tablo 6.19: Farklı kişiler tarafından hazırlanan numunelerin izokersitrin miktarının ikili karşılaştırması.

Karşılaştırılan ikili	%Fark	%RSD
MMS-Ş ve MMS-H	1,682	0,914
MMS-Ş ve MMS-B	1,023	0,558
MMS-H ve MMS-B	0,649	0,358
MÇE-Ş ve MÇE-H	1,002	0,619
MÇE-Ş ve MÇE-B	1,967	1,128
MÇE-H ve MÇE-B	0,956	0,620

RSD: Bağıl standart sapma.

6.3.5.8 Sağlamlık

Önce metot parametreleri değiştirilmeden standart ve numuneler sisteme verilmiştir. Metot parametrelerinde farklı varyasyonlarla yapılan değişiklikler bu enjeksiyonlarla mukayese edilerek ölçülmüştür (Tablo 6.20). Yöntemde kasıtlı yapılan değişikliklerden sonra tayin edilen sonuçlar arasındaki %fark kabul kriterini sağlamış, %2,0'yi geçmemiştir.

Tablo 6.20: Metot parametreleri değiştirilmeden sisteme verilen standart ve numunelerin alanları.

Örnek	Rutin alan	Ortalama	İzokersitrin alan	Ortalama
Rutin standart (0,132 mg/mL)	4260169	4263810	-	-
	4267451		-	
İzokersitrin standart (0,0102 mg/mL)	-	-	454369	454302
	-		454235	
MMS	2299070	2297591	969158	969180
	2296112		969202	
MÇE	22773130	22778648	11678146	11661941
	22784165		11645735	

Kolon sıcaklığı değişimi:

Kolon sıcaklığı 5°C artırılıp eksiltiľmiştir. Sonuçlar orijinal metotla (Tablo 6.20) % farkları alınarak karşılaştırılmıştır (Tablo 6.21).

Tablo 6.21: Kolon sıcaklığı değişiminin alanlara etkisi.

Sıcaklık	Örnek	Rutin alan	Ortalama	%Fark	İzokersitrin alan	Ortalama	%Fark
25°C	Rutin standart (0,132 mg/mL)	4202554	4201486	1,5	-	-	-
		4200417			-		
	İzokersitrin standart (0,0102 mg/mL)	-	-	-	446345	446620	1,7
		-			446895		
	MMS	2281670	2279689	0,8	959897	960007	0,9
		2277708			960117		
ME	22375230	22382469	1,7	11526340	11512084	1,3	
	22389708			11497828			
35°C	Rutin standart (0,132 mg/mL)	4295027	4294605	0,7	-	-	-
		4294183			-		
	İzokersitrin standart (0,0102 mg/mL)	-	-	-	460640	460444	1,4
		-			460247		
	MMS	2283283	2282407	0,7	974514	976559	0,8
		2281530			978604		
ME	22397732	22368798	1,8	11614694	11637576	0,2	
	22339864			11660458			

Mobil faz asit oranı değişimi:

Mobil faz B'de kullanılan fosforik asit miktarı %0,05 artırılıp azaltılmıştır. Sonuçlar orijinal metotla (Tablo 6.20) % farkları alınarak karşılaştırılmıştır (Tablo 6.22).

Tablo 6.22: Mobil faz pH değişiminin alanlara etkisi.

MFB	Örnek	Rutin alan	Ortalama	%Fark	İzokersitrin alan	Ortalama	%Fark
%0,25 H ₃ PO ₄ /H ₂ O	Rutin standart (0,132 mg/mL)	4271749	4273432	0,2	-	-	-
		4275115			-		
	İzokersitrin standart (0,0102 mg/mL)	-	-	-	460795	460304	1,3
		-			459813		
	MMS	2305684	2307123	0,4	979777	979689	1,1
		2308562			979601		
ME	22504255	22513965	1,2	11496217	11497965	1,4	
	22523674			11499713			
%0,35 H ₃ PO ₄ /H ₂ O	Rutin standart (0,132 mg/mL)	4296326	4293508	0,7	-	-	-
		4290690			-		
	İzokersitrin standart (0,0102 mg/mL)	-	-	-	460494	460353	1,3
		-			460212		
	MMS	2319343	2317477	0,9	973118	972804	0,4

	2315610			972489		
MÇE	22832590	22833291	0,2	11594073	11548447	1,0
	22833992			11502820		

MFB: Mobil faz B.

Gradyan değişimi:

Mobil faz gradyan akışındaki 30:70 oranı 20:80 ve 40:60 olarak değiştirilmiştir. Sonuçlar orijinal metotla (Tablo 6.20) %farkları alınarak karşılaştırılmıştır (Tablo 6.23).

Tablo 6.23: Mobil faz gradyan akışının değişiminin alanlara etkisi.

Gradyan	Örnek	Rutin alan	Ortalama	%Fark	İzokersitrin alan	Ortalama	%Fark	
40:60	Rutin standart (0,132 mg/mL)	4203084	4204282	1,4	-	-	-	
		4205479			-			
	İzokersitrin standart (0,0102 mg/mL)	-	-	-	450282	450377	0,9	
		-			450471			
	MMS	2303680	2304131	0,3	960140	960181	0,9	
		2304581			960221			
	MÇE	22433884	22443167	1,5	11539545	11519454	1,2	
		22452449			11499363			
	20:80	Rutin standart (0,132 mg/mL)	4185088	4186569	1,8	-	-	-
			4188050			-		
İzokersitrin standart (0,0102 mg/mL)		-	-	-	445560	445779	1,9	
		-			445998			
MMS		2257831	2258272	1,7	961927	961912	0,7	
		2258713			961897			
MÇE		22399959	22389927	1,7	11532941	11528468	1,1	
		22379895			11523995			

Akış hızı değişimi:

0,4 mL/dk olan akış hızı 0,3 ve 0,5 mL/dk olarak değiştirilmiştir. Sonuçlar orijinal metotla (Tablo 6.20) %farkları alınarak karşılaştırılmıştır (Tablo 6.24).

Tablo 6.24: Mobil faz akış hızı değişiminin alanlara etkisi.

Akış hızı	Örnek	Rutin alan	Ortalama	%Fark	İzokersitrin alan	Ortalama	%Fark
0,3 mL/dk	Rutin standart (0,132 mg/mL)	4281637	4283697	0,5	-	-	-
		4285757			-		
	İzokersitrin standart (0,0102 mg/mL)	-	-	-	456897	456555	0,5
		-			456213		
	MMS	2324680	2325715	1,2	980732	984122	1,5
		2326750			987512		
MÇE	22729226	22725759	0,2	11457395	11466556	1,7	
	22722291			11475717			
0,5 mL/dk	Rutin standart (0,132 mg/mL)	4198467	4198865	1,5	-	-	-
		4199263			-		
	İzokersitrin standart (0,0102 mg/mL)	-	-	-	446646	446466	1,7
		-			446286		
	MMS	2252649	2253752	1,9	969699	969807	0,1
		2254855			969915		
MÇE	22535265	22520617	1,1	11420566	11489045	1,8	
	22505969			11489045			

6.3.5.9 Stabilite

Hazırlanan standart maddeler -18°C’de 2 hafta, kullanılan numuneler olan MMS ve MÇE 25°C’de 2 hafta bekletilerek tekrar analiz edilmiştir (Şekil 6.15 - Şekil 6.18). %Fark kabul kriterinde istendiği gibi %2,0’yi geçmemiştir (Tablo 6.25, 6.26).

Tablo 6.25: Standart ve numunelerdeki rutin stabilitesi.

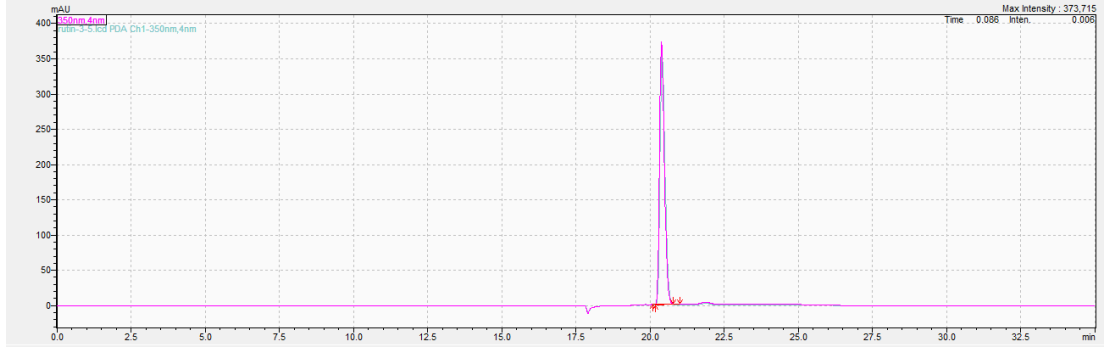
Standart	Zaman	Alan	%Fark
Rutin (0,132 mg/mL)	Başlangıç	4215234	1,07
	2 hafta sonra	4260169	
MMS	Başlangıç	2294138	1,42
	2 hafta sonra	2261620	
MÇE	Başlangıç	22398668	0,63
	2 hafta sonra	22256469	

RSD: Bağıl standart sapma.

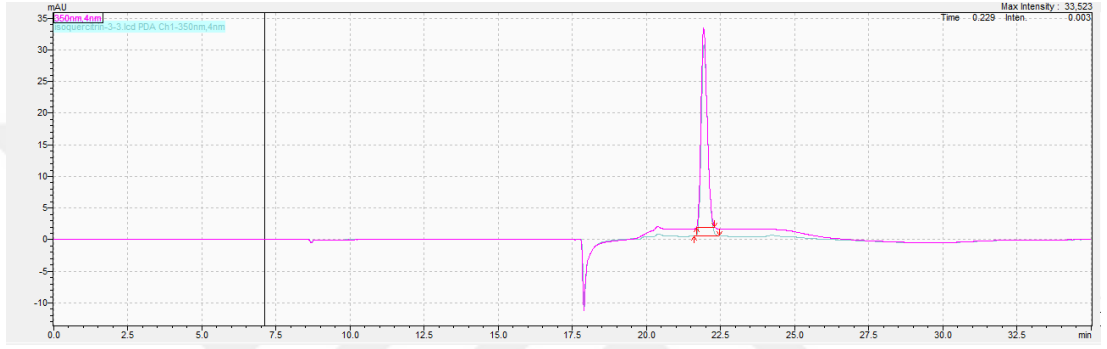
Tablo 6.26: Standart ve numunelerdeki izokersitrin stabilitesi.

Standart	Zaman	Alan	%Fark
İzokersitrin (0,0102 mg/mL)	Başlangıç	454369	0,37
	2 hafta sonra	452666	
MMS	Başlangıç	971959	0,34
	2 hafta sonra	975222	
MÇE	Başlangıç	11507288	0,27
	2 hafta sonra	11476311	

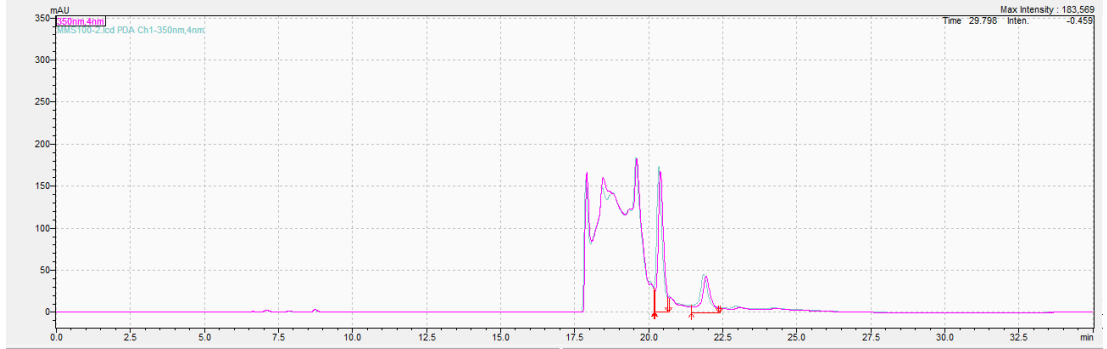
RSD: Bağıl standart sapma.



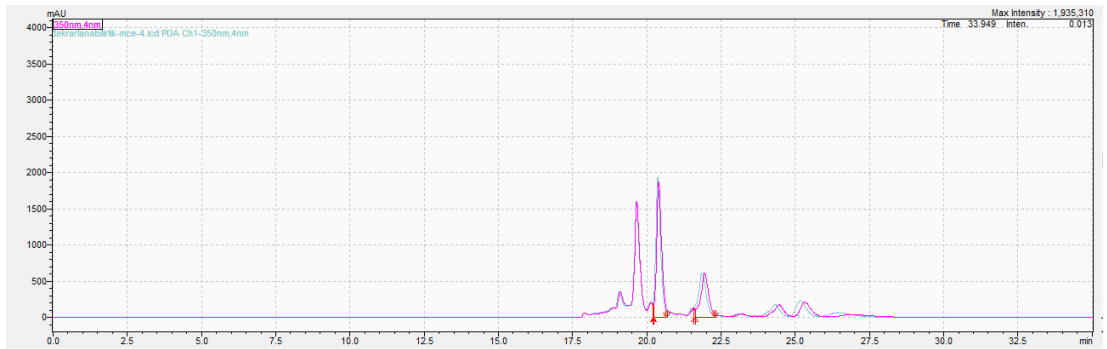
Şekil 6.15: 2 hafta aryla analiz edilen rutin standardının kromatogramlarının karşılaştırılmış hali.



Şekil 6.16: 2 hafta aryla analiz edilen izokersitrin standardının kromatogramlarının karşılaştırılmış hali.



Şekil 6.17: 2 hafta aryla analiz edilen MMS kromatogramlarının karşılaştırılmış hali.



Şekil 6.18: 2 hafta aryla analiz edilen MÇE kromatogramlarının karşılaştırılmış hali.

6.3.5.10 LOQ ve LOD

Denklem 5.1'e göre

Rutin standardının LOQ değeri:

$$(10 \cdot 97,63) / 35258871,92 = 0,000028 \text{ mg/mL}$$

İzokersitrin standardının teorik LOQ değeri:

$$(10 \cdot 88,02) / 46382819,51 = 0,000019 \text{ mg/mL}$$

Gözlenebilme sınırı (limit of detection, LOD):

Denklem 5.2'ye göre

Buna göre, rutin standardının LOD değeri:

$$(3,3 \cdot 97,63) / 35258871,92 = 0,00000914 \text{ mg/mL}$$

İzokersitrin standardının LOD değeri:

$$(3,3 \cdot 88,02) / 46382819,51 = 0,00000626 \text{ mg/mL}$$

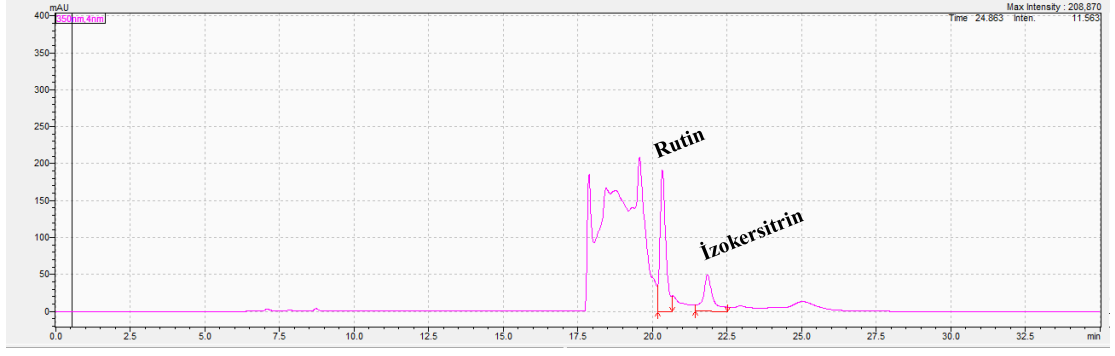
6.3.5.11 Tüm kuru ekstrelerin valide edilen HPLC-PDA metoduyla elde edilen rutin ve izokersitrin analiz sonuçları

Tüm kuru ekstrelerden belirli miktarlarda alınıp metot çözücüsünde çözdürüldükten sonra rutin ve izokersitrin miktarları valide edilen HPLC-PDA metodu ile hesaplanmıştır (Tablo 6.27). En az ve en fazla rutin ve izokersitrin içeren ekstreler olan MMS ve MÇE'nin kromatogramları Şekil 6.19 ve Şekil 6.20'te verilmiştir.

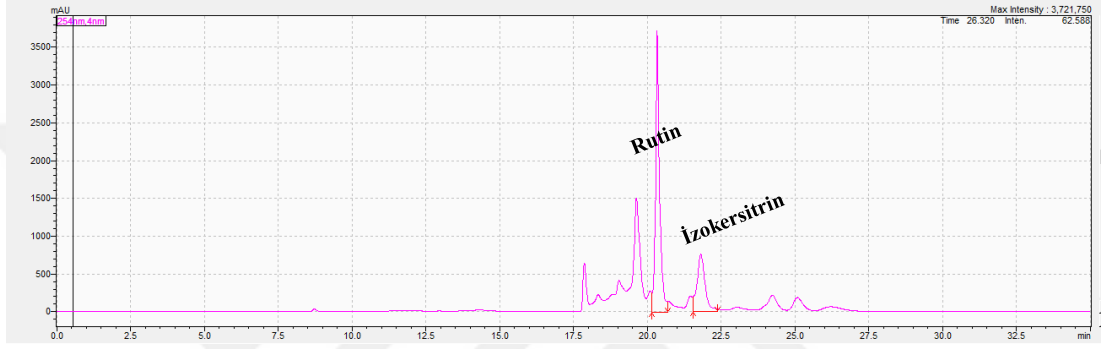
Tablo 6.27: Kuru ekstrelerin belirli konsantrasyonlarının rutin ve izokersitrin miktarları.

	Enjeksiyon	Rutin				İzokersitrin			
		Alan	mg/mL	mg/10 mL	mg/g kuru ekstre	Alan	mg/mL	mg/10 mL	mg/g kuru ekstre
MMS (300 mg/10 mL)	1	2296356	0,070	0,699		973907	0,022	0,215	
	2	2294138	0,070	0,698	2,326 ± 0,003	971959	0,021	0,215	0,717 ± 0,002
	3	2290624	0,070	0,697		968198	0,021	0,214	
MME (300 mg/10 mL)	1	3933765	0,116	1,163		1467425	0,032	0,321	
	2	3932064	0,116	1,162	3,875 ± 0,001	1171256	0,026	0,258	1,071 ± 0,119
	3	3931291	0,116	1,162		1191081	0,026	0,262	
MYS (300 mg/10 mL)	1	9346698	0,270	2,698		1914538	0,042	0,418	
	2	9362285	0,270	2,703	8,999 ± 0,009	1942898	0,042	0,424	1,393 ± 0,010
	3	9346382	0,270	2,698		1931225	0,042	0,421	
MYE (300 mg/10 mL)	1	17914202	0,513	5,128		2635799	0,057	0,573	
	2	18054116	0,517	5,168	17,182 ± 0,077	2624349	0,057	0,571	1,911 ± 0,009
	3	18056520	0,517	5,168		2648017	0,058	0,576	
MÇS (300 mg/10 mL)	1	12172282	0,350	3,500		7457901	0,161	1,613	
	2	12232611	0,352	3,517	11,795 ± 0,177	7520482	0,163	1,626	5,376 ± 0,038
	3	12522912	0,360	3,599		7564241	0,164	1,636	
MÇE (150 mg/10 mL)	1	22398668	22398668	0,640		11507288	0,249	2,486	
	2	22377194	22377194	0,639	42,667 ± 0,041	11589601	0,250	2,504	16,573 ± 0,071
	3	22420953	22420953	0,641		11595789	0,251	2,505	

MMS: mürver meyve su ekstresi, MME: Mürver meyve %50 etanol ekstresi, MYS: Mürver yaprak su ekstresi, MYE: Mürver yaprak %50 etanol ekstresi, MÇS: Mürver çiçek su ekstresi, MÇE: Mürver meyve %50 etanol ekstresi.



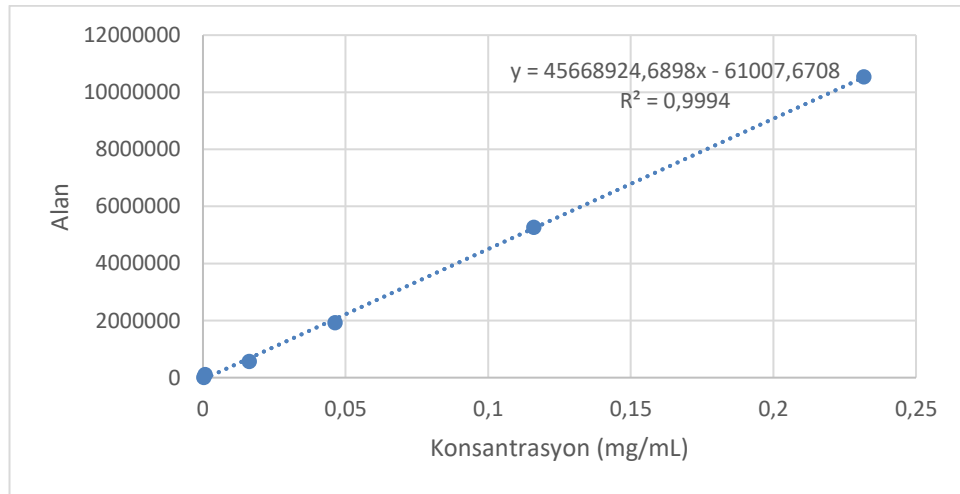
Şekil 6.19: MMS ekstresinin kromatogramı.



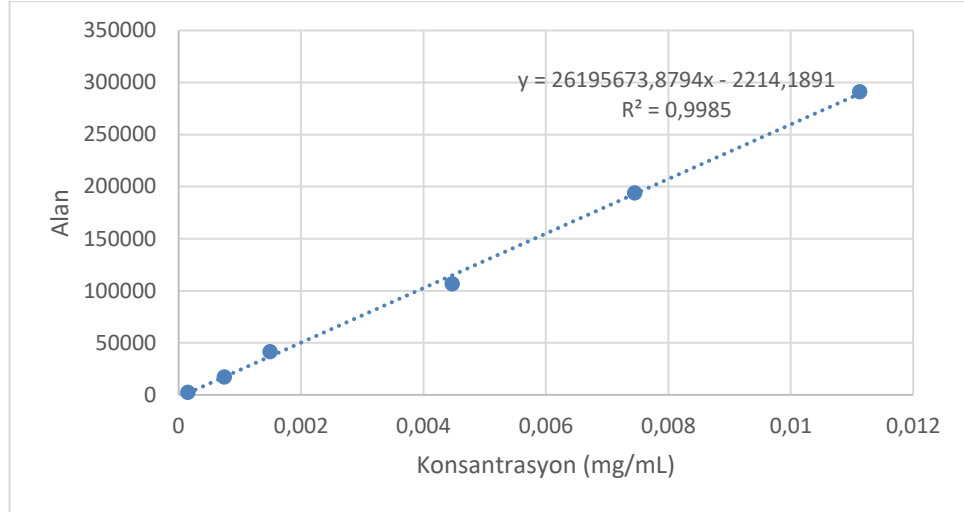
Şekil 6.20: MÇE ekstresinin kromatogramı.

6.3.6 Ekstrelerin siyanidin-3-glukozit ve siyanidin-3-sambubiozit miktarlarının HPLC-PDA ile analizinin sonuçları

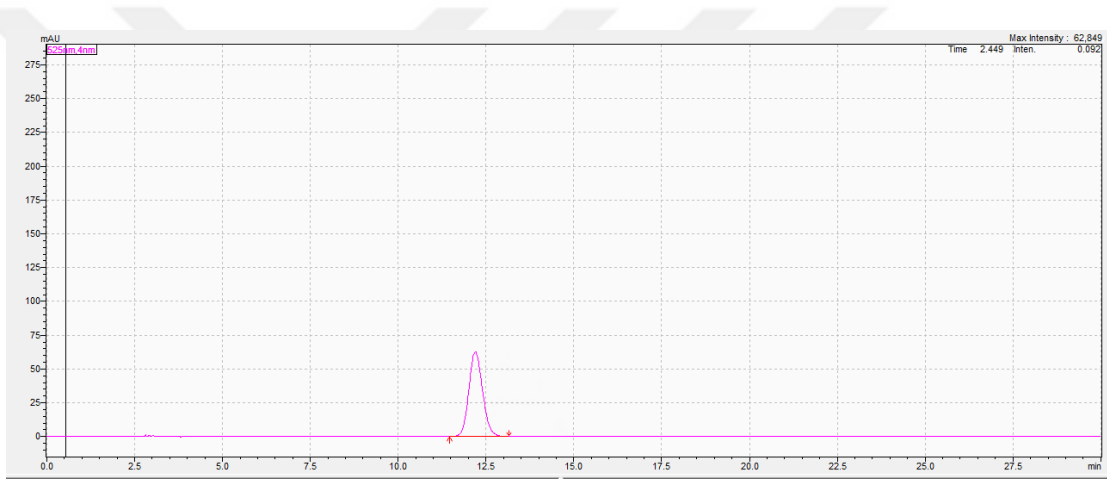
Kalibrasyon pikleri elde edilen her bir standart maddenin kalibrasyon eğrisi çizilerek en küçük kareler denkleminde R^2 değerleri hesaplanmıştır (Şekil 6.21 ve Şekil 6.22). Standartlardan elde edilen pikler Şekil 6.23 ve Şekil 6.24'te verilmiştir.



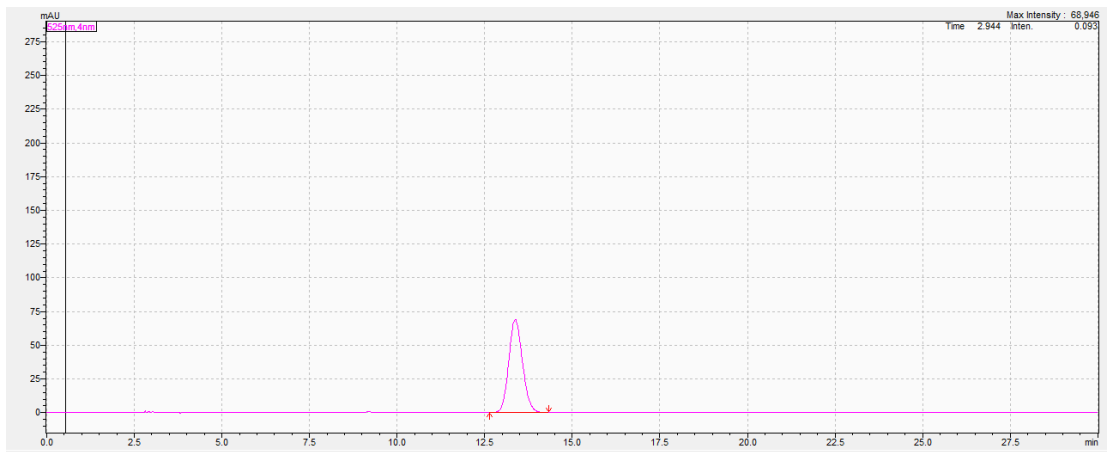
Şekil 6.21: Siyanidin-3-glukozit bileşiğinin hazırlanan kalibrasyon eğrisi.



Şekil 6.22: Siyanidin-3-sambubiozit bileşiğinin hazırlanan kalibrasyon eğrisi.

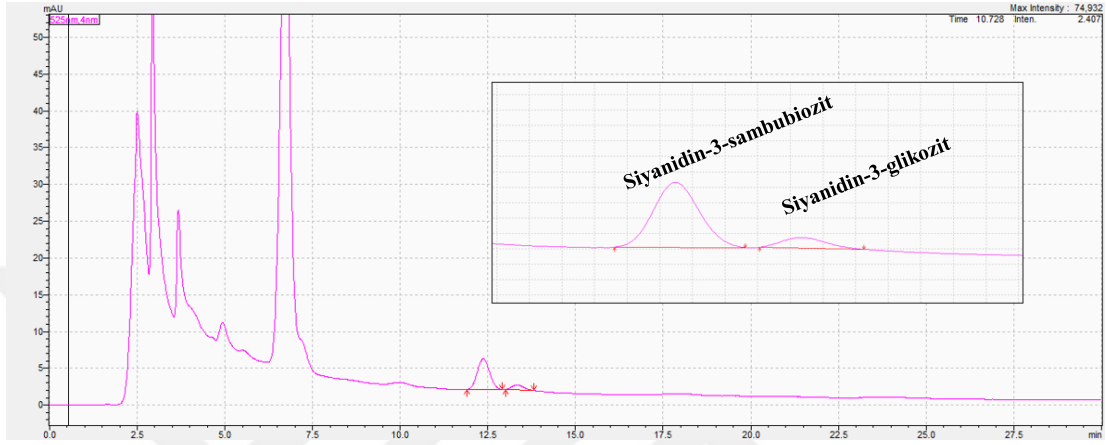


Şekil 6.23: Siyanidin-3-sambubiozit standart pikisi.

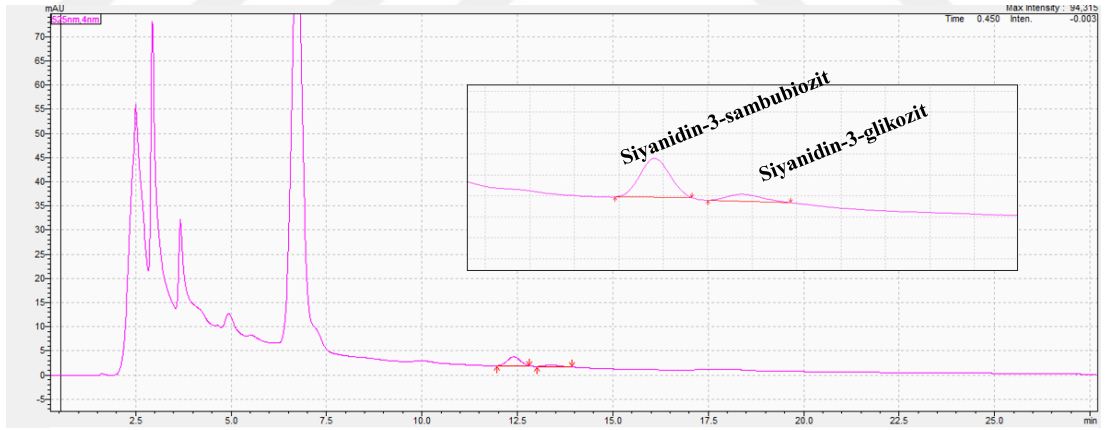


Şekil 6.24: Siyanidin-3-glukozit standart pikisi.

Hem mürver meyve su hem de mürver meyve %50 etanol ekstresinden elde edilen kuru ekstrelerden 1,5 g alınarak metot çözücüsü olan %0,01 hidroklorik asit çözeltisinde çözülmüş ve örnekler 25 mL'ye tamamlanmıştır. Bu örneklerden elde edilen pikler Şekil 6.25 ve Şekil 6.26'da verilmiştir. Bu piklerden yapılan alan hesapları sonucu kuru ekstrelerde bulunan siyanidin-3-glukozit ve siyanidin-3-sambubiozit miktarları Tablo 6.28'de gösterilmiştir.



Şekil 6.25: Mürver meyve %50 etanol ekstresinin siyanidin-3-sambubiozit ve siyanidin-3-glukozit piklerini gösteren kromatogram.



Şekil 6.26: Mürver meyve %50 etanol ekstresinin siyanidin-3-sambubiozit ve siyanidin-3-glukozit piklerini gösteren kromatogram.

Tablo 6.28: Ekstrelerin siyanidin-3-glukozit ve siyanidin-3-sambubiozit miktarları.

Ekstre	Siyanidin-3-glukozit	Siyanidin-3-sambubiozit
Mürver meyve %50 etanol	3,00 ± 0,01 mg/100 g kuru ekstre	6,76 ± 0,03 mg/100 g kuru ekstre
Mürver meyve su	2,61 ± 0,01 mg/100 g kuru ekstre	3,10 ± 0,01 mg/100 g kuru ekstre

6.3.7 Ekstrelerin LC-HRMS bulguları

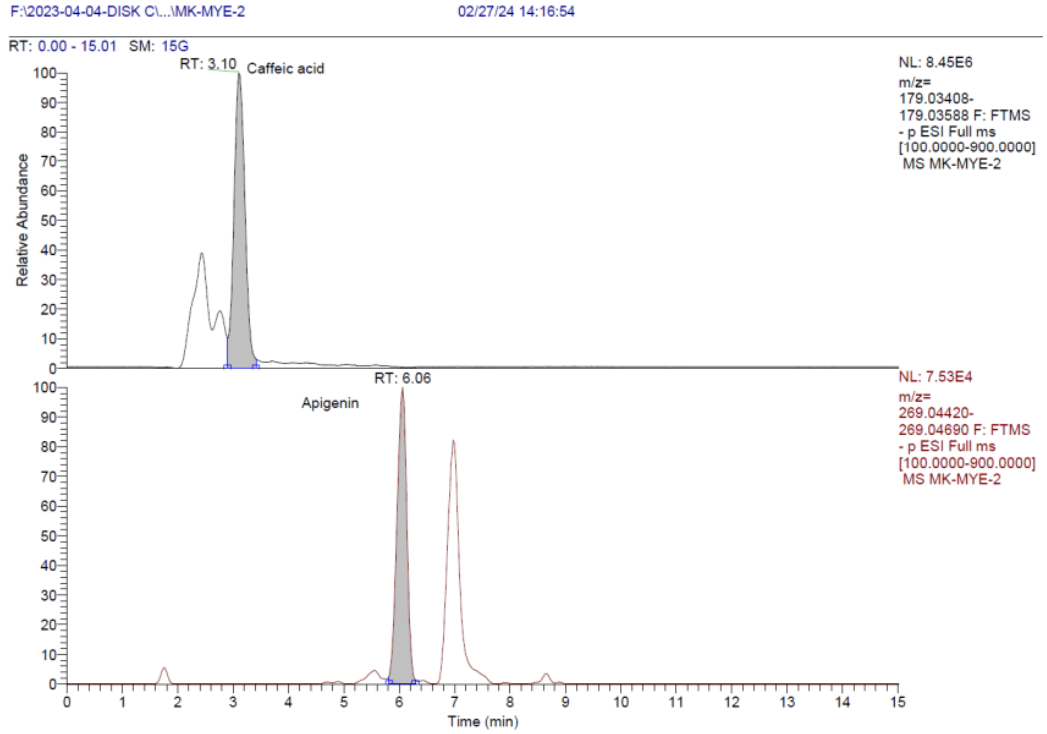
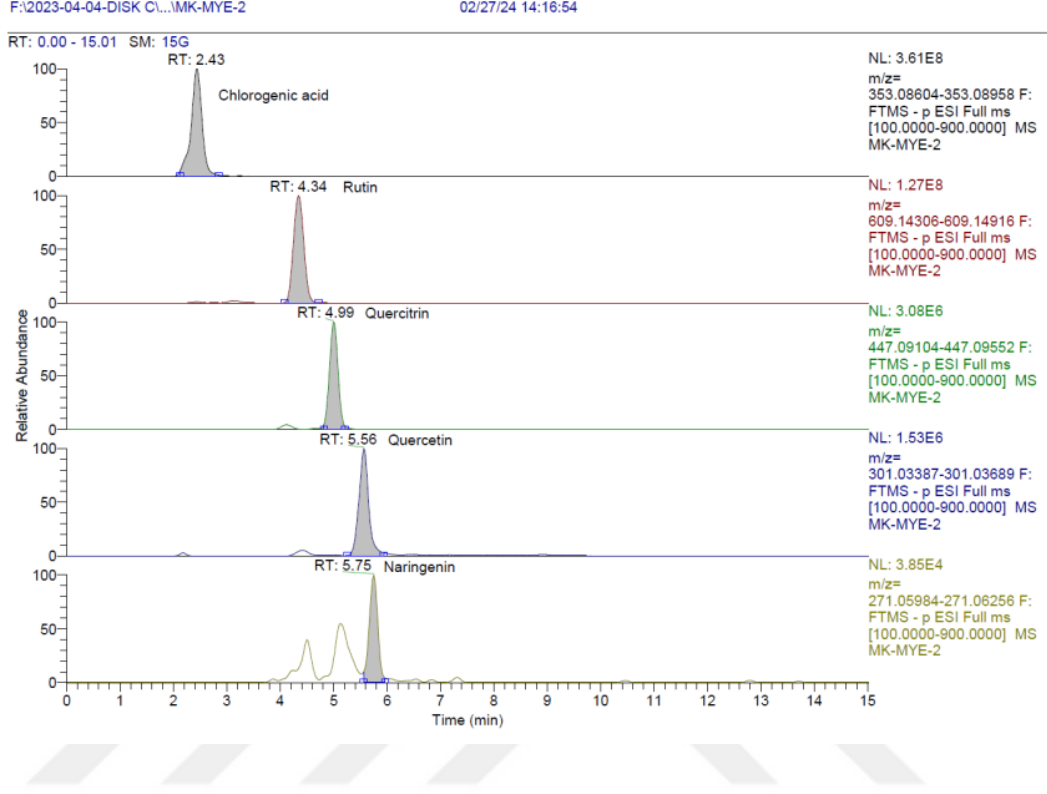
Her ekstre, fenolik madde içerikleri açısından Bezmialem Vakıf Üniversitesi İLMER’de bulunan LC-HRMS cihazı ile analiz edilmiştir. İLMER Kütüphanesi’nde bulunan bileşiklerin alıkonma süreleri ve hedef iyonları karşılaştırılarak bileşikler tanımlanmıştır. Mürver yapraklarının %50 etanol ekstresinin LC-HRMS analizinin sonucunda tanımlanan ana fenolik bileşenler klorojenik asit (3736,26 mg/100 g), rutin (3032,09 mg/100 g) ve hiperozit (188,10 mg/100 g) olmuştur. Mürver yapraklarının su ekstresinin ana fenolik bileşenleri klorojenik asit (897,58 mg/100 g), rutin (506,56 mg/100 g) ve kafeik asit (50,09 mg/100 g) olarak saptanmıştır. Mürver çiçeklerinin %50 etanol ekstresinin majör fenolik bileşenleri rutin (6235,87 mg/100 g), klorojenik asit (3145,95 mg/100 g) ve hiperozit (575,76 mg/100 g) olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde, mürver çiçeği su ekstresinin majör fenolik bileşikleri rutin (1906,35 mg/100 g), klorojenik asit (1267,69 mg/100 g) ve hiperozit (272,67 mg/100 g) olarak tanımlanmıştır. Mürver meyvesi %50 etanol ekstresinin ana fenolik bileşenleri rutin (578,30 mg/100 g), hiperozit (66,40 mg/100 g) ve klorojenik asit (33,42 mg/100 g) olarak belirlenmiştir. Mürver meyvesi su ekstresinin majör fenolik bileşikleri ise rutin (251,37 mg/100 g), hiperozit (46,16 mg/100 g) ve kersetin (41,56 mg/100 g) olarak belirlenmiştir. Analiz sonuçları, *S. nigra*’nın %50 etanol ekstralarında (çiçek, yaprak ve meyve) İLMER LC-HRMS kütüphanesi yoluyla belirlenen ana fenolik bileşiklerin aynı 3 bileşik olduğunu göstermektedir: rutin, klorojenik asit ve hiperozit (Tablo 6.29). Tüm ekstraların LC-HRMS kromatogramları Şekil 6.27- Şekil 6.32’de verilmiştir.

Tablo 6.29: LC-HRMS bulgularına göre mürver kuru ekstralarındaki fenolik bileşiklerin miktarları.

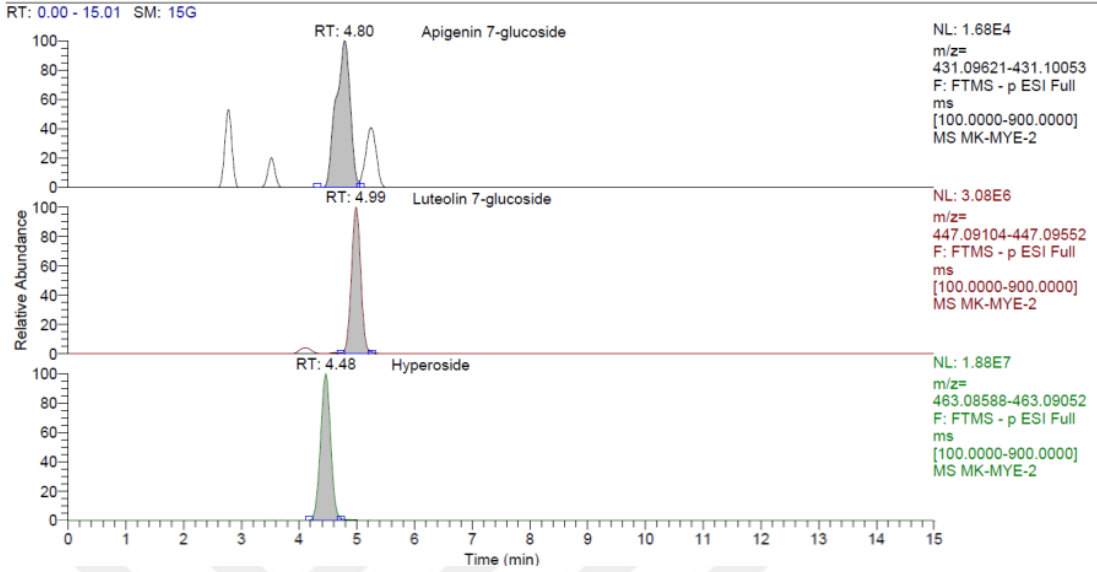
Fenolik bileşikler	%U	m/z	MYE	MYS	MÇE	MÇS	MME	MMS
Apigenin	2,87	269,05	0,05	0,02	0,05	0,03	0,02	0,02
Apigenin-7-glukozit	3,59	431,10	0,07	0,05	0,50	0,18	0,06	0,02
Kafeik asit	3,74	179,04	19,26	50,09	80,06	-	0,19	-
Klorojenik asit	3,58	353,09	3736,26	897,58	3145,95	1267,69	33,42	7,90
Hiperozit	3,46	463,09	188,10	24,86	575,76	272,67	66,40	46,16
Kemferol	3,56	285,04	-	-	3,79	13,09	-	-
Luteolin-7-glukozit	4,14	447,09	0,63	0,04	-	-	0,12	0,05
Naringenin	4,20	271,06	0,08	-	84,29	7,14	0,26	0,24
Kersetin	2,95	301,04	2,20	5,93	24,37	136,58	1,78	41,56
Kersitrin	3,78	447,09	11,38	1,31	67,00	32,56	0,61	0,40

Rutin 3,07 609,15 3032,09 506,56 6235,87 1906,35 578,30 251,37

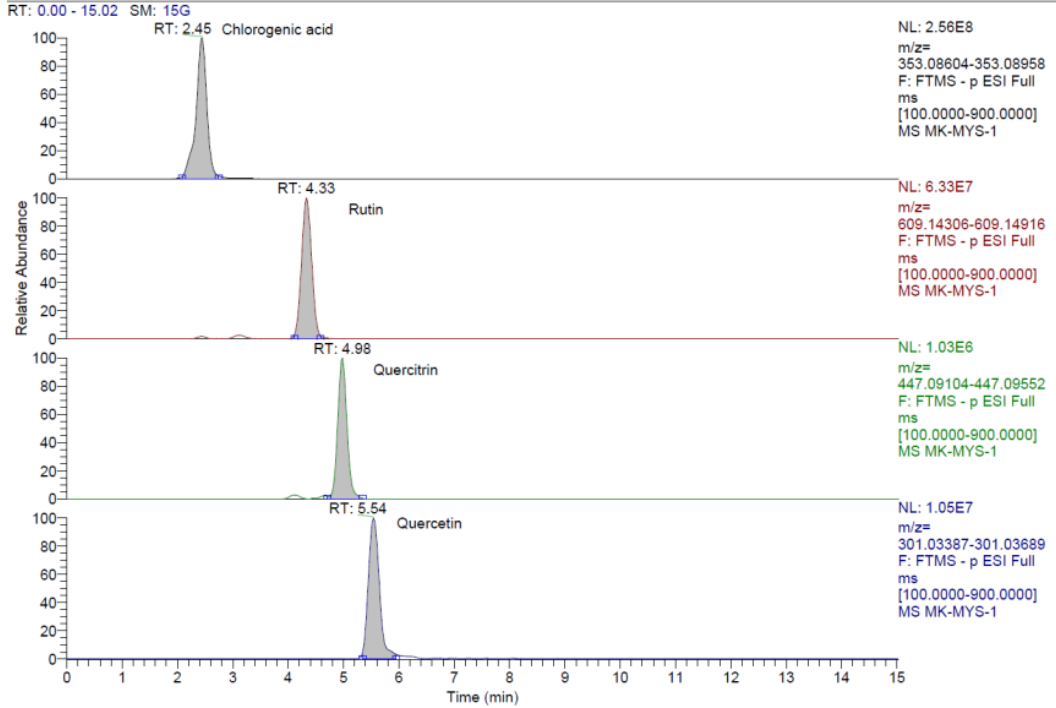
%U: Rölatif belirsizlik; MYE: Mürver yaprak %50 etanol kuru ekstresi; MYS: Mürver yaprak su kuru ekstresi; MÇE: Mürver çiçek %50 etanol kuru ekstresi; MÇS: Mürver çiçek su kuru ekstresi; MME: Mürver meyve %50 etanol kuru ekstresi; MMS: Mürver meyve su kuru ekstresi.



Şekil 6.27: Mürver yaprak %50 etanol ekstresinin LC-HRMS kromatogramları.

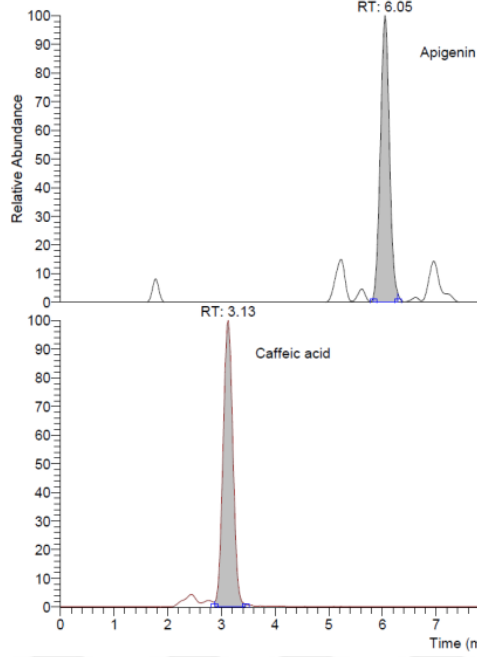


Şekil 6.27 (devamı): Mürver yaprak %50 etanol ekstresinin LC-HRMS kromatogramları (devamı).



Şekil 6.28: Mürver yaprak su ekstresinin LC-HRMS kromatogramları.

RT: 0.00 - 15.02 SM: 15G



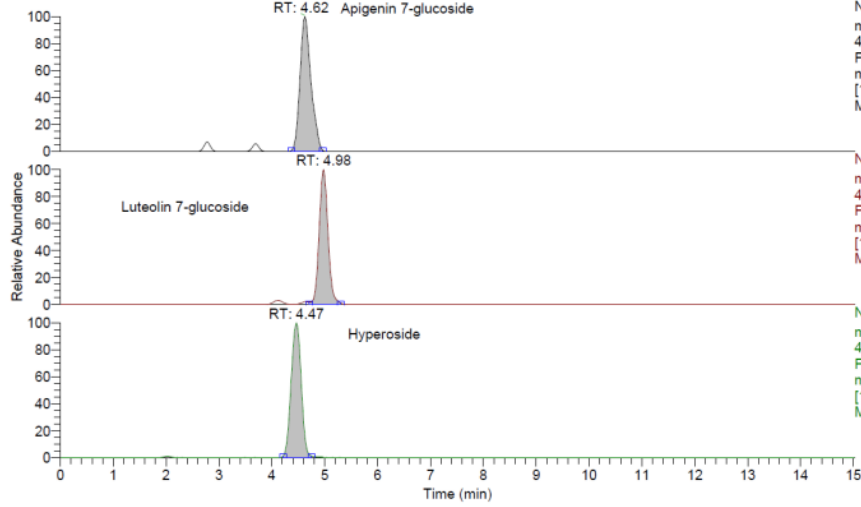
NL: 7.30E4
 m/z=
 289.04420-
 289.04690 F: FTMS
 - p ESI Full ms
 [100.0000-900.0000]
 MS MK-MYS-1

NL: 5.83E7
 m/z=
 179.03408-
 179.03588 F: FTMS
 - p ESI Full ms
 [100.0000-900.0000]
 MS MK-MYS-1

F:\2023-04-04-DISK Cl...MK-MYS-1

02/27/24 14:00:49

RT: 0.00 - 15.02 SM: 15G

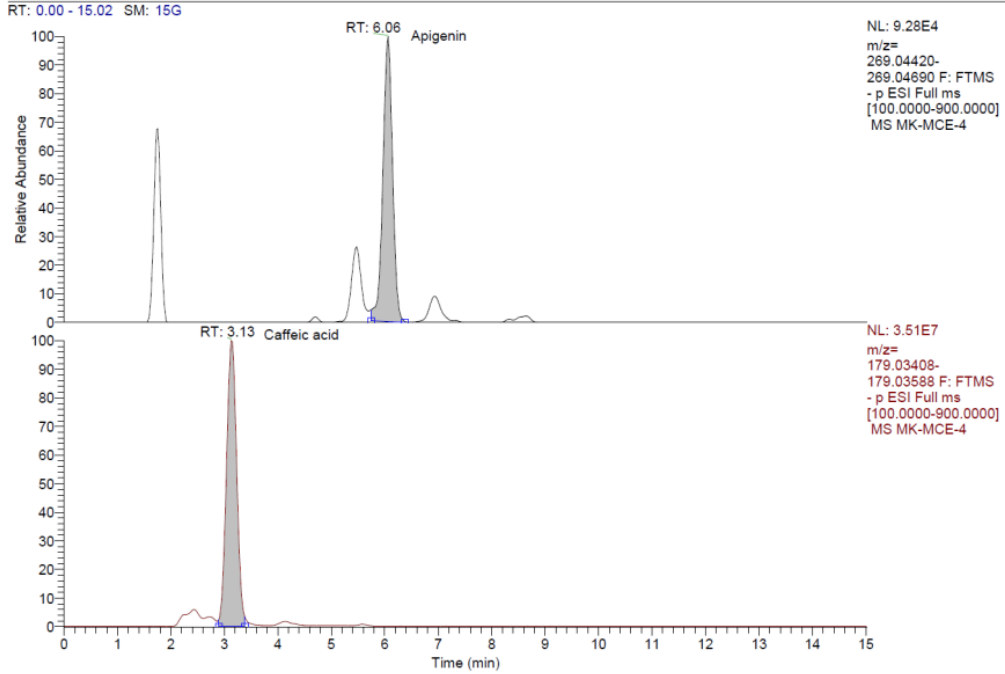
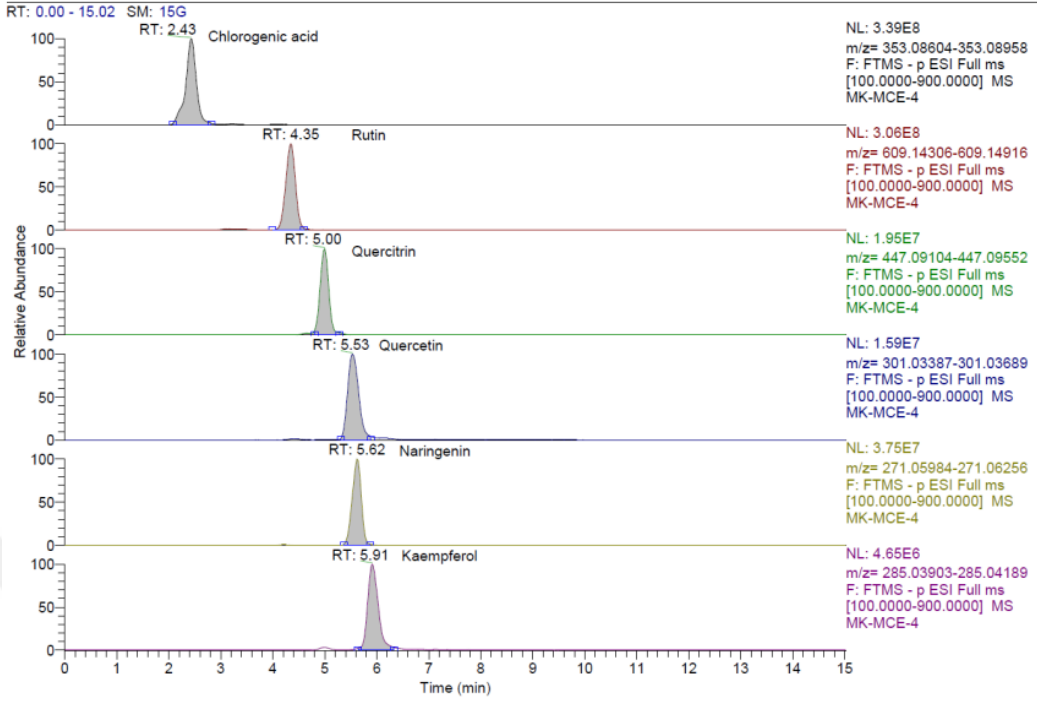


NL: 4.21E4
 m/z=
 431.09621-431.10053
 F: FTMS - p ESI Full
 ms
 [100.0000-900.0000]
 MS MK-MYS-1

NL: 1.03E6
 m/z=
 447.09104-447.09552
 F: FTMS - p ESI Full
 ms
 [100.0000-900.0000]
 MS MK-MYS-1

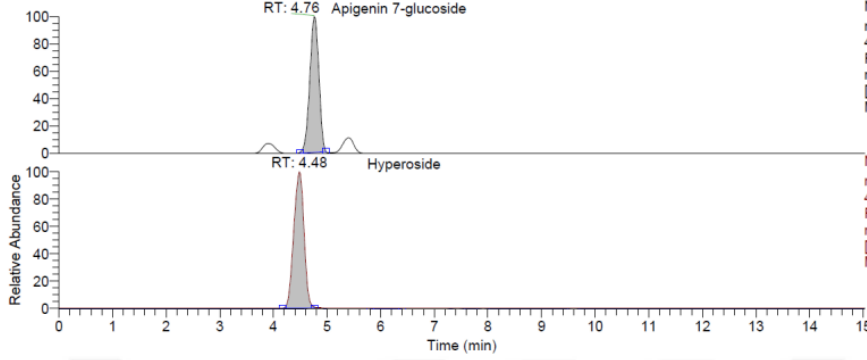
NL: 6.52E6
 m/z=
 463.08588-463.09052
 F: FTMS - p ESI Full
 ms
 [100.0000-900.0000]
 MS MK-MYS-1

Şekil 6.28 (devamı): Mürver yaprak su ekstrelerinin LC-HRMS kromatogramları (devamı).



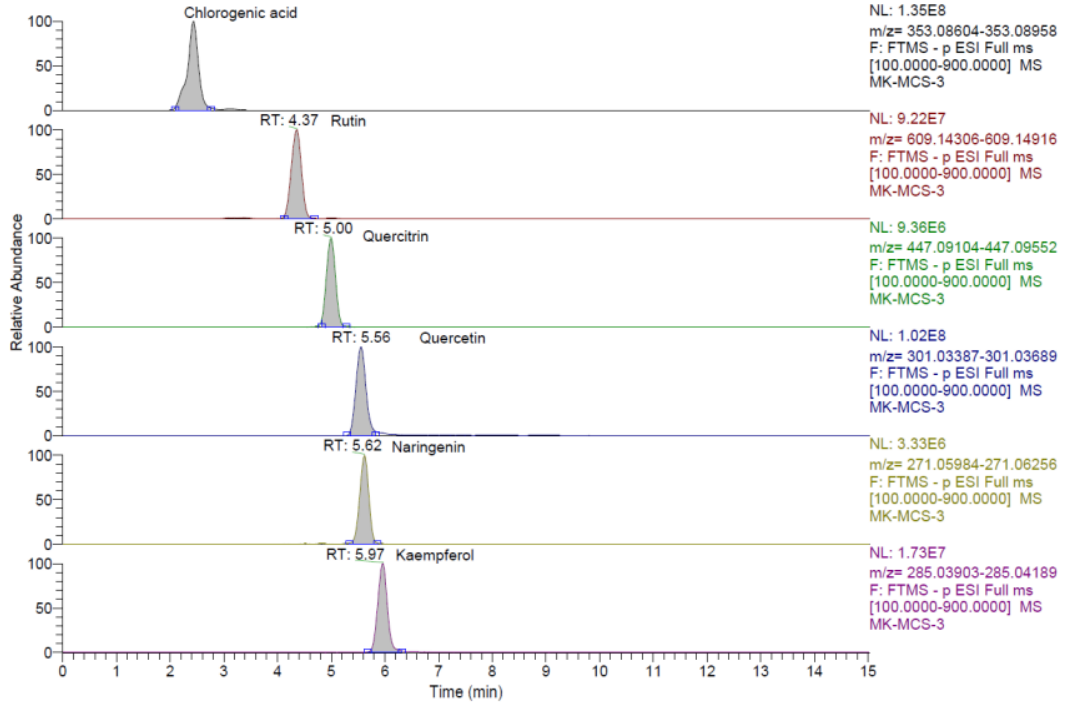
Şekil 6.29: Mürver çiçek %50 etanol ekstresinin LC-HRMS kromatogramları.

RT: 0.00 - 15.02 SM: 15G

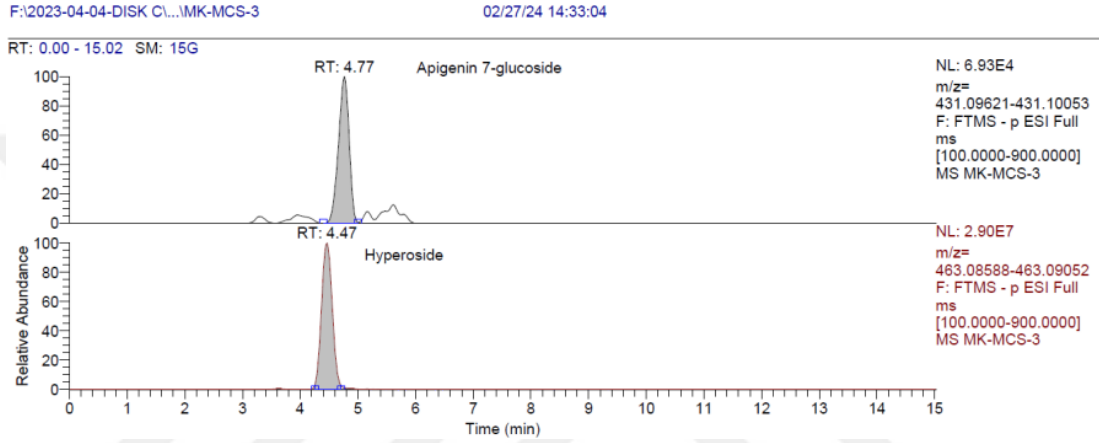
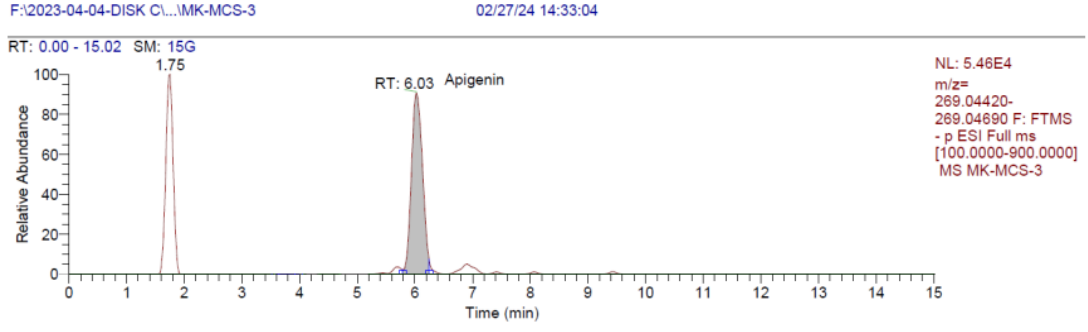


Şekil 6.29 (devam): Mürver çiçek %50 etanol ekstresinin LC-HRMS kromatogramları.

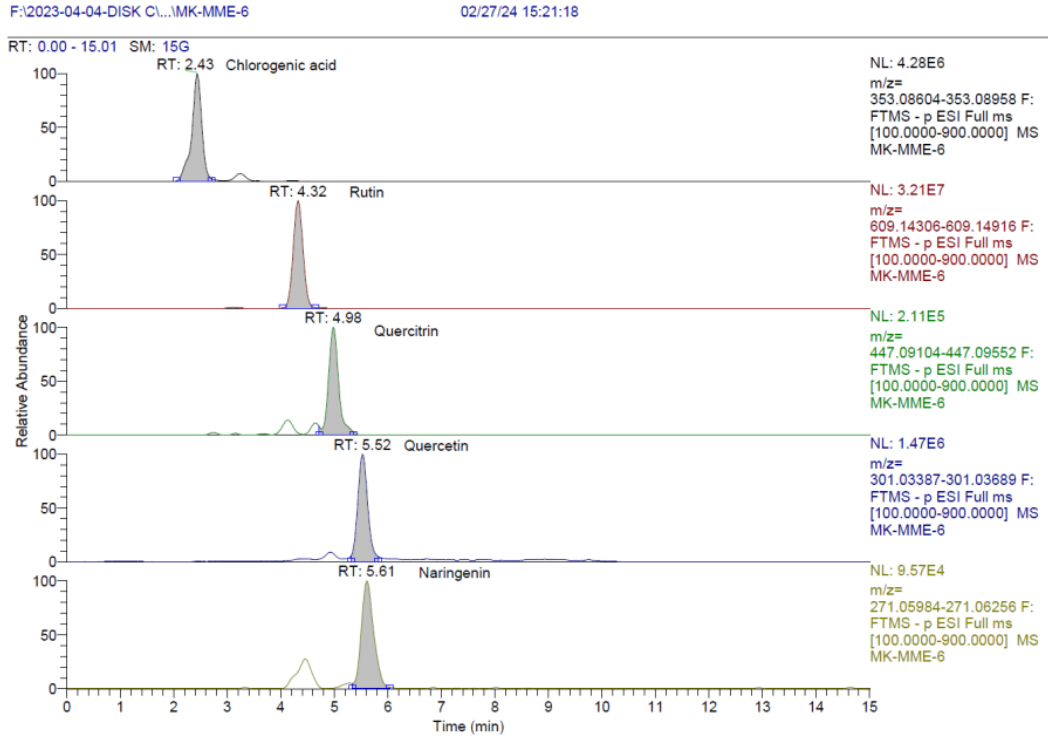
RT: 0.00 - 15.02 SM: 15G



Şekil 6.30: Mürver çiçek su ekstresinin LC-HRMS kromatogramları.

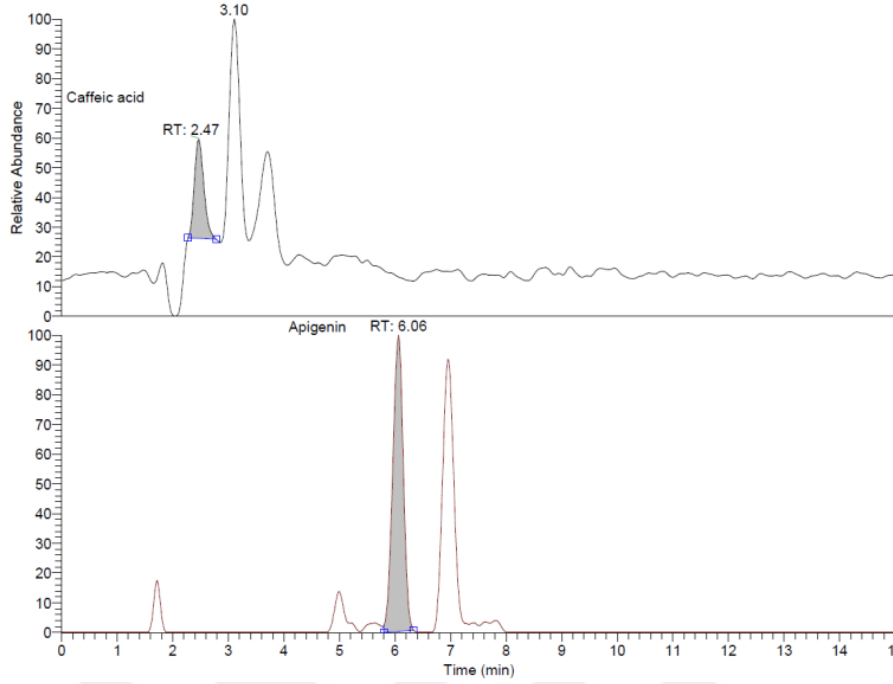


Şekil 6.30 (devamı): Mürver çiçek su ekstresinin LC-HRMS kromatogramları.



Şekil 6.31: Mürver meyve %50 etanol ekstresinin LC-HRMS kromatogramları.

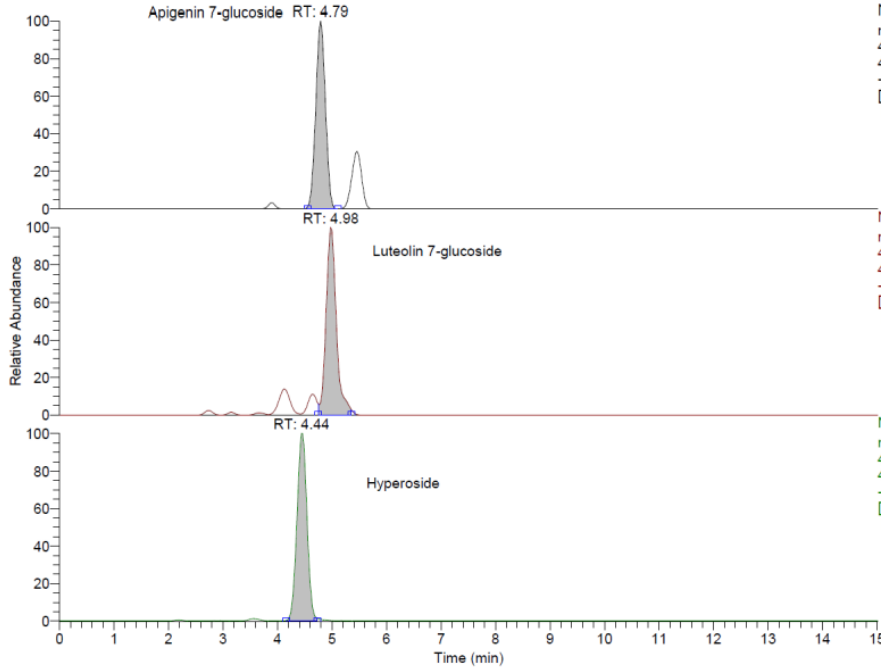
RT: 0.00 - 15.01 SM: 15G



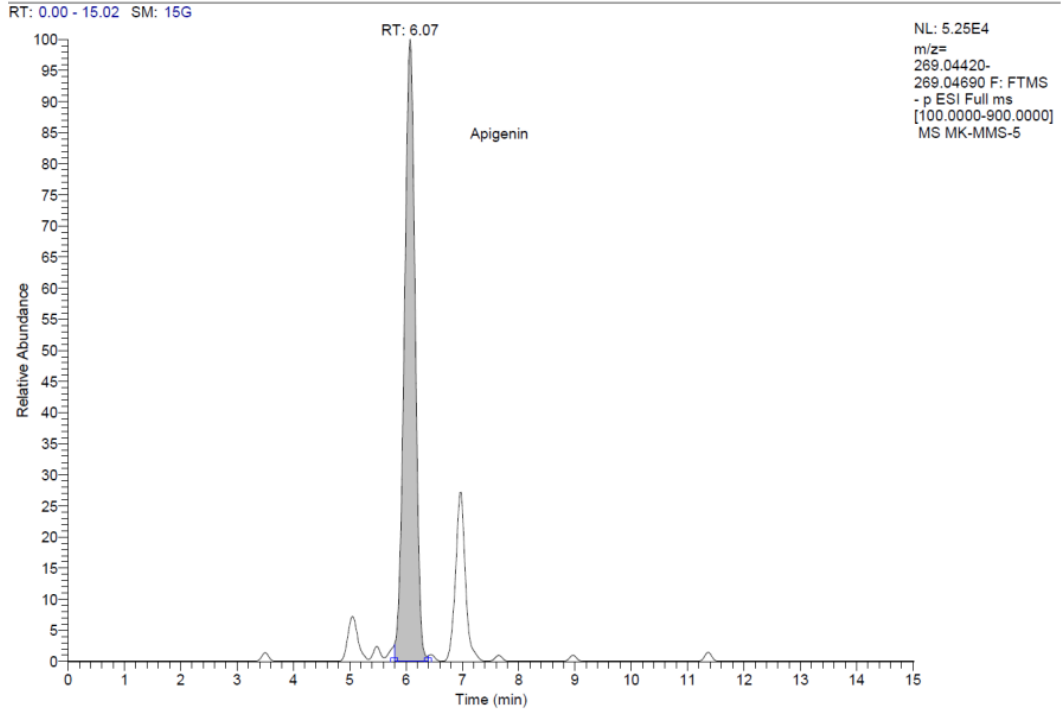
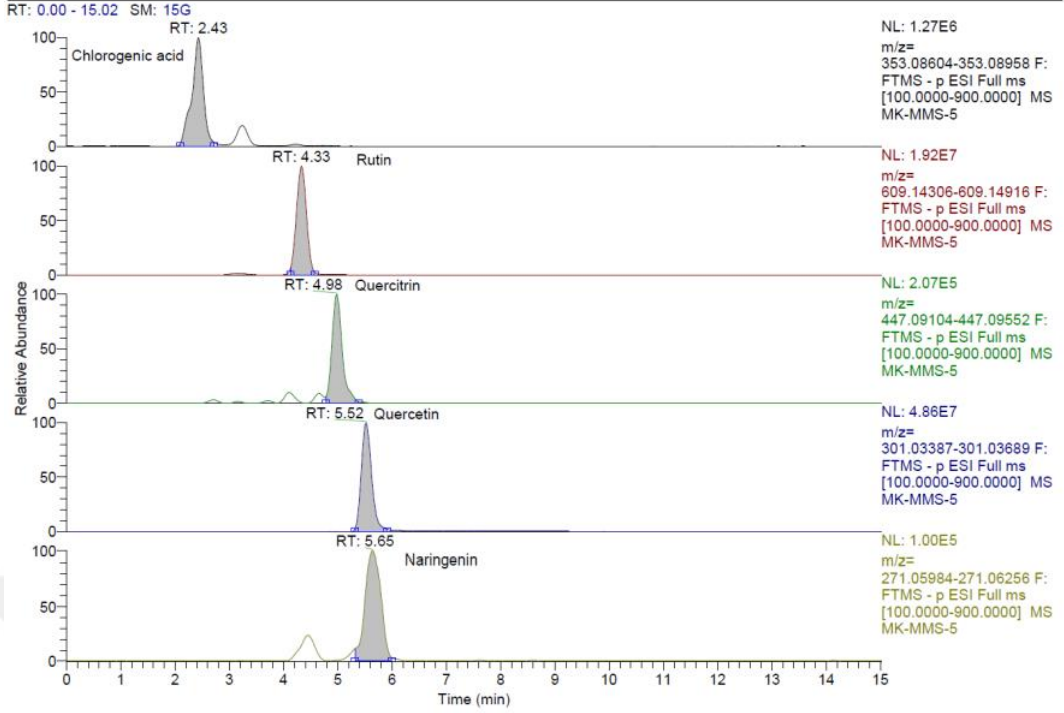
F:\2023-04-04-DISK C\...MK-MME-6

02/27/24 15:21:18

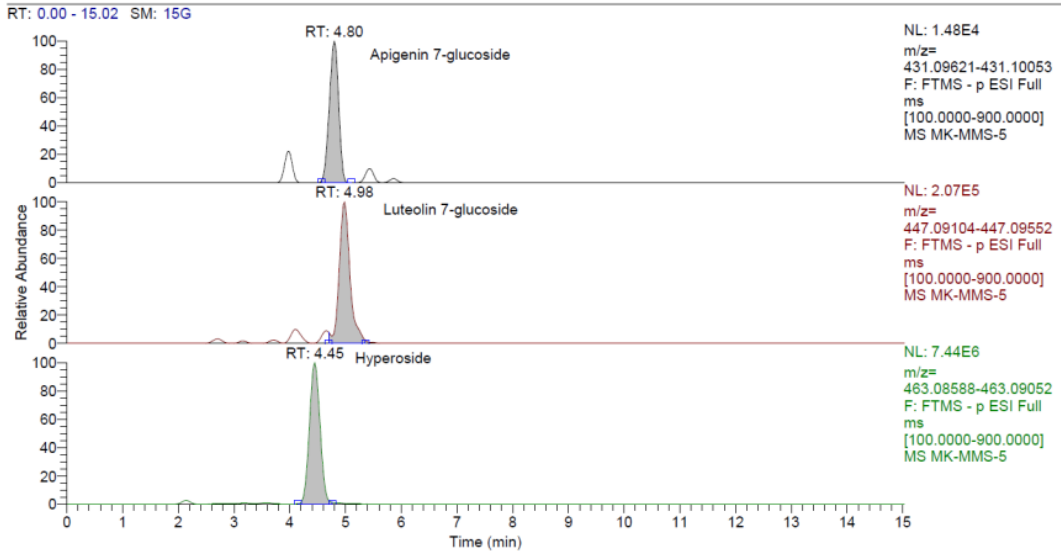
RT: 0.00 - 15.01 SM: 15G



Şekil 6.31 (devamı): Mürver meyve %50 etanol ekstresinin LC-HRMS kromatogramları.



Şekil 6.32: Mürver meyve su ekstresinin LC-HRMS kromatogramları.



Şekil 6.32 (devamı): Mürver meyve su ekstresinin LC-HRMS kromatogramları .

6.3.8 Standardize ekstrelerin spesifikasyon parametreleri

Standardize ekstrelerin spesifikasyon değerleri belirlenmiştir. Her biri için spesifikasyon tabloları hazırlanmıştır (Tablo 6.30 – Tablo 6.41).

Tablo 6.30: Mürver yaprak %50 etanol ekstresinin kimyasal analizi.

Test	Metot	Spesifikasyon	Sonuç
Tayin	HPLC-PDA	Rutin ve izokersitrin varlığına bakılır	Uygun
Kimyasal profil	LC-HRMS	Rutin ve izokersitrin miktarına bakılır	Uygun
Kimyasal profil	HPLC-PDA	Rutin ve izokersitrin miktarına bakılır	Uygun
Toplam fenolik içerik	Folin-Ciocalteu testi	%5,00 ± 0,50	%4,92
Toplam flavonoid içerik	AlCl ₃ testi	%2,50 ± 0,25	%2,39
Rutin	HPLC-PDA	%1,70 ± 0,20	%1,72
İzokersitrin	HPLC-PDA	%0,40 ± 0,04	%0,37

Tablo 6.31: Mürver yaprak %50 etanol ekstresinin fiziksel özellikleri.

Test	Metot	Spesifikasyon	Sonuç
Nem	OHAUS MB 35 nem tayin cihazı ile nem tayini	<%5,00	%1,81
Görünüm	Görsel inceleme	Sarı toz	Uygun
Koku	Organoleptik	Mürver yaprağına özgü koku	Uygun

Tablo 6.32: Mürver yaprak su ekstresinin kimyasal analizi.

Test	Metot	Spesifikasyon	Sonuç
Tayin	HPLC-PDA	Rutin ve izokersitrin varlığına bakılır	Uygun
Kimyasal profil	LC-HRMS	Rutin ve izokersitrin miktarına bakılır	Uygun
Kimyasal profil	HPLC-PDA	Rutin ve izokersitrin miktarına bakılır	Uygun
Toplam fenolik içerik	Folin-Ciocalteu testi	%4,50 ± 0,45	4,49
Toplam flavonoid	AlCl ₃ testi	%1,70 ± 0,17	1,69

Rutin	HPLC-PDA	%0,90 ± 0,09	%0,90
İzokersitrin	HPLC-PDA	%0,18 ± 0,02	%0,17

Tablo 6.33: Mürver yaprak su ekstresinin fiziksel özellikleri.

Test	Metot	Spesifikasyon	Sonuç
Nem	OHAUS MB 35 nem tayin cihazı ile nem tayini	<%5,00	%2,35
Görünüm	Görsel inceleme	Sarı toz	Uygun
Koku	Organoleptik	Mürver yaprağına özgü koku	Uygun

Tablo 6.34: Mürver çiçek %50 etanol ekstresinin kimyasal analizi.

Test	Metot	Spesifikasyon	Sonuç
Tayin	HPLC-PDA	Rutin ve izokersitrin varlığına bakılır	Uygun
Kimyasal profil	LC-HRMS	Rutin ve izokersitrin varlığına bakılır	Uygun
Kimyasal profil	HPLC-PDA	Rutin ve izokersitrin miktarına bakılır	Uygun
Toplam fenolik içerik	Folin-Ciocalteu testi	%6,00 ± 0,60	%5,91
Toplam flavonoid	AlCl ₃ testi	%3,50 ± 0,35	%3,54
Rutin	HPLC-PDA	%4,30 ± 0,43	%4,27
İzokersitrin	HPLC-PDA	%1,70 ± 0,17	%1,67

Tablo 6.35: Mürver çiçek %50 etanol ekstresinin fiziksel özellikleri.

Test	Metot	Spesifikasyon	Sonuç
Nem	OHAUS MB 35 nem tayin cihazı ile nem tayini	<%5	%1,65
Görünüm	Görsel inceleme	Sarı toz	Uygun
Koku	Organoleptik	Mürver çiçeğine özgü koku	Uygun

Tablo 6.36: Mürver çiçek su ekstresinin kimyasal analizi.

Test	Metot	Spesifikasyon	Sonuç
Tayin	HPLC-PDA	Rutin ve izokersitrin varlığına bakılır	Uygun
Kimyasal profil	LC-HRMS	Rutin ve izokersitrin miktarına bakılır	Uygun
Kimyasal profil	HPLC-PDA	Rutin ve izokersitrin miktarına bakılır	Uygun
Toplam fenolik içerik	Folin-Ciocalteu testi	%5,00 ± 0,50	%4,94
Toplam flavonoid	AlCl ₃ testi	%2,30 ± 0,23	%2,33
Rutin	HPLC-PDA	%1,20 ± 0,12	%1,18
İzokersitrin	HPLC-PDA	%1,10 ± 0,11	%1,09

Tablo 6.37: Mürver çiçek su ekstresinin fiziksel özellikleri.

Test	Metot	Spesifikasyon	Sonuç
Nem	OHAUS MB 35 nem tayin cihazı ile nem tayini	<%5	%2,41
Görünüm	Görsel inceleme	Sarı toz	Uygun
Koku	Organoleptik	Mürver çiçeğine özgü koku	Uygun

Tablo 6.38: Mürver meyve %50 etanol ekstresinin kimyasal analizi.

Test	Metot	Spesifikasyon	Sonuç
Tayin	HPLC-PDA	Rutin ve izokersitrin varlığına bakılır	Uygun
Kimyasal profil	LC-HRMS	Rutin ve izokersitrin miktarına bakılır	Uygun
Kimyasal profil	HPLC-PDA	Rutin ve izokersitrin miktarına bakılır	Uygun
Toplam fenolik içerik	Folin-Ciocalteu testi	%3,50 ± 0,35	%3,55
Toplam flavonoid	AlCl ₃ testi	%0,55 ± 0,05	%0,56

Rutin	HPLC-PDA	%0,40 ± 0,04	%0,39
İzokersitrin	HPLC-PDA	%0,12 ± 0,01	%0,12

Tablo 6.39: Mürver meyve %50 etanol ekstresinin fiziksel özellikleri.

Test	Metot	Spesifikasyon	Sonuç
Nem	OHAUS MB 35 nem tayin cihazı ile nem tayini	<%5	%2,14
Görünüm	Görsel inceleme	Bordo toz	Uygun
Koku	Organoleptik	Mürver meyvesine özgü koku	Uygun

Tablo 6.40: Mürver meyve su ekstresinin kimyasal analizi.

Test	Metot	Spesifikasyon	Sonuç
Tayin	HPLC-PDA	Rutin ve izokersitrin varlığına bakılır	Uygun
Kimyasal profil	LC-HRMS	Rutin ve izokersitrin miktarına bakılır	Uygun
Kimyasal profil	HPLC-PDA	Rutin ve izokersitrin miktarına bakılır	Uygun
Toplam fenolik içerik	Folin-Ciocalteu testi	%3,70 ± 0,37	%3,68
Toplam flavonoid	AlCl ₃ testi	%0,60 ± 0,06	%0,60
Rutin	HPLC-PDA	%0,22 ± 0,02	%0,23
İzokersitrin	HPLC-PDA	%0,07 ± 0,01	%0,07

Tablo 6.41: Mürver meyve su ekstresinin fiziksel özellikleri.

Test	Metot	Spesifikasyon	Sonuç
Nem	OHAUS MB 35 nem tayin cihazı ile nem tayini	<%5	%2,88
Görünüm	Görsel inceleme	Bordo toz	Uygun
Koku	Organoleptik	Mürver meyvesine özgü koku	Uygun

6.3.9 *In vivo* anti-obezite aktivite çalışma bulguları

7 hafta süren deney tamamlandığında sıçanların ilk hafta ağırlıklarının ve son hafta ağırlıklarının ortalamasının arasındaki farkın test numuneleri grupları arasında en az olanlarının; 104,20 g fark ile mürver yaprak %50 etanol ekstresi (MYE) grubu, 105,30 g fark ile mürver yaprak su ekstresi (MYS) grubu ve 114,77 fark ile mürver çiçek %50 etanol ekstresi (MÇE) grubu olduğu tespit edilmiştir (Tablo 6.42).

Benzer şekilde deney süresi sonrasında karın içi yağ dokusunun genel görüntüsü değerlendirildiğinde obezite grubunun diğer gruplarla kıyaslandığında daha yüksek oranda karın içi yağı içerdiği gözlemlenmiştir.

Yüksek yağlı diyetin viseral dokularda lipit birikimine yol açtığı ve vücut ağırlığı [127, 128] ile leptin seviyesinde artışı [129] tetiklediği görüşü ile bu çalışmada elde edilen sonuçların uyumlu olduğu görülmüştür. Enerji homeostazı, birbiriyle etkileşime giren karmaşık ve dinamik prosedürlerle sağlanır. Bunlar arasında yer alan leptin, gıda alımı ve enerji homeostazında ana düzenleyici olarak görev yapan ve santral sinir sistemi ile

periferik dokulardaki spesifik reseptörler aracılığıyla metabolik etki gösteren adiposit kaynaklı bir hormondur [130]. Bu hormon aynı zamanda, enerji harcaması için yağ dokusundan gelen sinyalleri uyarır [131]. Plazmadaki kalıntı leptin, kan-beyin bariyerini geçerek, hipotalamik reseptörler vasıtasıyla vücudun iştah kontrol merkezi olarak bilinen yaysı çekirdeğinde nöropeptid Y'nin (NPY) salımını engeller. Böylece iştahta azalma, sempatik sinir sistemi aktivasyonu ve metabolik hız ile enerji harcamalarında artışa neden olur [132].

Obeziteyle birlikte gelişen dislipideminin değerlendirilmesi amacıyla deney gruplarından alınan serumlarda HDL-C, LDL-C ve trigliserit ile yağ dokusundan salgılan ve obeziteyle ilişkili olan adiponektin ve leptin düzeyleri değerlendirilmiştir. Negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MYS ve mürver meyve %50 etanol ekstresi (MME) test grupları ile referans madde grubunda serum LDL, trigliserit, leptin seviyeleri düşüş gösterirken, HDL-C düzeylerinde artış olduğu belirlenmiştir (Tablo 6.43). 2006 yılında Yang ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, 12 hafta boyunca yüksek yağlı diyet ile beslenen farelerde serum LDL-C, TG ve kolesterol düzeylerinde önemli artışın olduğu rapor edilmiştir. Çalışmamızın sonuçları Yang ve ark. tarafından yapılan çalışma ile paralellik göstermiştir [128].

Metabolik olarak aktif olan T_3 asıl olarak T_4 'ün enzimatik 5'-deiodinasyonu ile ekstra tiroidal dokularda üretirken tiroid bezi temel olarak T_4 'ü sentezler [133]. Kandaki tiroid hormonları temel olarak plazma proteinlerine bağlanır; yani albümin, tiroksin bağlayıcı globülin (TBG) ve tiroksin bağlayıcı ön albümin (TBPA) ile hücresel membranları geçebilen ve tiroid hormonlarının aktif formları olarak kabul edilen serbest formlarla dengededirler [134]. Tiroid hormonları (TH), TH'ye bağlı süreçlerde ATP tüketimini artırarak ve ATP sentezinin etkinliğini azaltarak termojenezi uyarır [135]. Tiroid hormonları, mitokondrinin iç zarındaki ayırıcı proteini (UCP) uyararak proton bağlanmasını önler. Böylece ATP sentezi yerine ısı salımı sağlayarak daha fazla enerji tüketimine neden olur [136].

Tarafımızdan yapılan çalışmada, çalışma gruplarında T_3 ve T_4 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik elde edilememiştir (Tablo 6.43). Yüksek yağlı diyet ile artan T_4 deiodinasyonu ve hedef hücreler tarafından artan T_4 alımı ile bağlantılı olduğu [137], yağ asitlerinin hipofiz T_3 ve T_4 alımını farklı şekilde düzenleyebildiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [138]. Bu nedenle, yüksek yağ diyetinden kaynaklanan daha yüksek T_4 alımının, normal serum T_4 konsantrasyonuna,

yüksek serum T₃ seviyelerine ve yüksek tiroid hormon etkisine neden olması mümkündür [139]. Çalışma sonuçlarımız, test numunelerinin T₃ ve T₄ seviyeleri üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını göstermiştir.



Tablo 6.42: Deney grupların haftalara göre ağırlık ortalamaları.

Gruplar	Ortalama ağırlık (g) ± SS							
	0. Hafta	1. Hafta	2. Hafta	3. Hafta	4. Hafta	5. Hafta	6. Hafta	7. Hafta
Kontrol	221,40 ± 10,85	239,95 ± 12,94	249,44 ± 13,26	258,12 ± 14,61	265,34 ± 13,61	278,36 ± 12,54	289,46 ± 10,32	299,31 ± 12,44
Negatif kontrol	234,66 ± 12,08	251,13 ± 14,05	298,51 ± 12,19	319,26 ± 13,04	327,43 ± 11,36	366,55 ± 11,13	378,23 ± 11,01	391,28 ± 10,12
MYE	249,31 ± 10,01	259,81 ± 11,39	265,77 ± 11,23	279,95 ± 13,34	298,36 ± 11,35	310,52 ± 9,71	322,71 ± 8,10	353,51 ± 9,41
MYS	231,75 ± 10,92	243,39 ± 11,34	259,94 ± 14,21	278,45 ± 11,49	292,12 ± 12,29	305,12 ± 14,08	318,51 ± 13,12	347,05 ± 11,78
MÇE	244,06 ± 7,34	261,78 ± 10,61	298,38 ± 9,08	302,45 ± 9,08	317,42 ± 11,46	325,61 ± 11,39	334,17 ± 9,08	358,83 ± 9,85
MÇS	230,95 ± 11,62	241,34 ± 10,06	257,12 ± 9,94	290,62 ± 8,75	311,65 ± 9,26	326,91 ± 9,64	341,57 ± 11,12	372,11 ± 10,03
MME	235,52 ± 10,14	261,30 ± 8,67	279,60 ± 9,56	296,30 ± 12,82	313,76 ± 11,08	337,74 ± 13,12	354,37 ± 12,68	381,17 ± 9,45
MMS	241,11 ± 11,43	259,28 ± 9,25	270,73 ± 10,42	285,53 ± 15,08	301,57 ± 14,12	337,60 ± 12,71	371,08 ± 11,26	390,46 ± 12,67
Referans madde	221,27 ± 6,79	229,50 ± 7,06	237,61 ± 8,01	251,13 ± 8,26	262,13 ± 8,10	284,32 ± 8,02	290,31 ± 9,12	291,12 ± 8,61

MYE: Mürver yaprak %50 etanol ekstresi; MYS: Mürver yaprak su ekstresi; MÇE: Mürver çiçek %50 etanol ekstresi; MÇS: Mürver çiçek su ekstresi; MME: Mürver meyve %50 etanol ekstresi; MMS: Mürver meyve su ekstresi.

Tablo 6.43: Çalışma materyallerinin HDL-C, LDL-C, trigliserit, adinopektin, leptin, T3 ve T4 seviyeleri üzerindeki etkileri

Gruplar	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)	Trigliserit (mg/dL)	Adiponektin (ng/mL)	Leptin (ng/dL)	T ₃ (pg/mL) (%)	T ₄ (ng/mL) (%)
Kontrol	97,34 ± 6,72	37,09 ± 3,81	98,43 ± 5,34	12,03 ± 2,55	1,71 ± 0,83	1,42 ± 0,55	0,54 ± 0,29
Negatif kontrol	62,52 ± 4,17	45,40 ± 3,24	116,27 ± 6,51	9,34 ± 1,42	4,98 ± 1,56	1,30 ± 0,41	0,45 ± 0,34
MYE	61,16 ± 6,05	35,39 ± 5,10	91,45 ± 7,38	8,82 ± 0,67	3,24 ± 1,17	1,53 ± 0,72	0,63 ± 0,09
MYS	70,63 ± 5,12	39,48 ± 3,27	114,75 ± 8,91	7,49 ± 2,13	3,54 ± 0,82	1,24 ± 0,37	0,57 ± 0,11
MÇE	65,51 ± 3,08	41,25 ± 3,86	123,51 ± 5,42	7,78 ± 0,81	3,70 ± 0,51	1,26 ± 0,65	0,59 ± 0,08
MÇS	53,38 ± 6,49	42,05 ± 4,12	131,12 ± 5,08	8,91 ± 1,73	4,08 ± 0,94	1,42 ± 0,53	0,41 ± 0,07
MME	75,92 ± 3,41	43,72 ± 4,06	112,53 ± 5,03	5,65 ± 0,79	4,67 ± 0,89	1,34 ± 0,46	0,55 ± 0,06
MMS	71,73 ± 7,62	45,13 ± 3,90	135,09 ± 7,42	9,25 ± 0,56	4,98 ± 0,43	1,56 ± 0,74	0,42 ± 0,02
Referans madde	95,40 ± 4,19	29,53 ± 3,41	71,65 ± 4,82	13,05 ± 1,63	1,43 ± 0,82	1,31 ± 0,29	0,39 ± 0,08

MYE: Mürver yaprak %50 etanol ekstresi; **MYS:** Mürver yaprak su ekstresi; **MÇE:** Mürver çiçek %50 etanol ekstresi; **MÇS:** Mürver çiçek su ekstresi; **MME:** Mürver meyve %50 etanol ekstresi; **MÇS:** Mürver meyve su ekstresi.

Obeziteyle ilişkili olarak kronik enflamasyonun değerlendirilmesi amacıyla sıçanların serum TNF- α ve IL-1 β düzeyleri de incelenmiştir. MYS, mürver çiçek su ekstresi (MÇS), MME ve mürver meyve su ekstresi (MMS) test numunelerinde serum TNF- α ve IL-1 β düzeylerinin negatif kontrol grubuna kıyasla daha düşük oranda olduğu tespit edilmiştir (Tablo 6.44).

Tablo 6.44: Çalışma materyallerinin sıçanlarda oluşturulan obezite modelinde serumdaki sitokin seviyeleri.

Gruplar	TNF- α seviyesi (pg/mL)	IL-1 β seviyesi (pg/mL)
Kontrol	703,12 \pm 15,84	914,82 \pm 10,67
Negatif kontrol	925,31 \pm 17,06	1271,94 \pm 11,83
MYE	964,27 \pm 11,13	1017,51 \pm 14,06
MYS	917,46 \pm 13,24	965,24 \pm 13,21
MÇE	944,07 \pm 11,45	913,05 \pm 11,72
MÇS	890,14 \pm 10,19	996,22 \pm 12,09
MME	851,82 \pm 12,65	871,24 \pm 11,75
MMS	804,51 \pm 13,73	886,31 \pm 15,49
Referans madde	675,09 \pm 9,82	731,28 \pm 10,04

MYE: Mürver yaprak %50 etanol ekstresi; MYS: Mürver yaprak su ekstresi; MÇE: Mürver çiçek %50 etanol ekstresi; MÇS: Mürver çiçek su ekstresi; MME: Mürver meyve %50 etanol ekstresi; MMS: Mürver meyve su ekstresi.

Plazma insülin seviyesindeki artış karaciğer ve adipoz dokularda lipogenezisin indüklenmesine, plazma leptin ve ob gen mRNA seviyelerinde artışa neden olur [140, 141]. İnsülin hormonu özellikle kalp kası, iskelet kası ve yağ dokularına glukoz girişini ve bu dokuların insüline duyarlılığını arttırmaktadır [142]. Bununla birlikte, serbest yağ asitleri ve amino asitler gibi diğer besinlerin hücreye alımına neden olur. Bu nedenle glikoz, glikolizis sırasında oksitlenir ve sitoplazmada ATP / ADP oranını yükseltir. Yüksek ATP / ADP oranı, insülin içeren granüllerin ekzositozunu tetikler. Yağ asitleri ayrıca yüksek ATP / ADP oranına yol açan yağ asitlerinin β -oksidasyonunu artırarak veya bazı protein kinazları aktive ederek insülin sekresyonunu arttırır. Uzun süreli yüksek yağlı diyet tüketiminde görülen hiperinsülineminin, pankreas hiperplazisi, yağ asitleri alımı ve artmış pankreas β -hücreli glukoz metabolizması sonucu ortaya çıktığı bilinmektedir [141].

Obeziteyle ilişkili insülin direncinin belirlenmesi amacıyla sıçanların kan glukoz düzeyleri ve serum insülin düzeyleri değerlendirilmiştir. Glukoz ölçüm cihazıyla belirlenen kan glukoz seviyelerinin ve serum insülin düzeylerinin, referans madde

grubunda ve MYE, MYS ve MMS kodlu test numuneleri uygulanan gruplarda negatif kontrol grubuna kıyasla daha düşük seviyede olduğu belirlenmiştir (Tablo 6.45).

Tablo 6.45: Çalışma materyallerinin kan glukoz ve serum insülin düzeyleri üzerine etkisi.

Gruplar	Kan glukoz seviyesi (mg/dL)	Serum insülin düzeyi (mIU/l)
Kontrol	122,70 ± 4,18	8,16 ± 1,90
Negatif kontrol	134,03 ± 4,96	11,93 ± 2,24
MYE	129,15 ± 4,04	7,08 ± 1,71
MYS	123,46 ± 5,07	8,08 ± 0,45
MÇE	138,53 ± 3,74	9,46 ± 0,59
MÇS	141,05 ± 4,09	8,92 ± 0,71
MME	137,16 ± 5,12	9,30 ± 1,44
MMS	129,43 ± 5,72	9,61 ± 0,34
Referans madde	125,06 ± 8,25	5,19 ± 0,34

MYE: Mürver yaprak %50 etanol ekstresi; MYS: Mürver yaprak su ekstresi; MÇE: Mürver çiçek %50 etanol ekstresi; MÇS: Mürver çiçek su ekstresi; MME: Mürver meyve %50 etanol ekstresi; MMS: Mürver meyve su ekstresi.

Sıçanların serum lipaz düzeyleri karşılaştırıldığında, orlistat uygulaması gerçekleştirilen grupta çok daha belirgin olmakla birlikte özellikle MMS kodlu test numunesinde negatif kontrol grubuna kıyasla daha düşük oranda olduğu belirlenmiştir ($p<0,01$). *In vitro* lipaz enzim inhibisyon çalışmalarında referans madde olarak kullanılan orlistat gurubunda lipaz enzim inhibitör etki gözlenirken, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber test grupları arasında görülen en iyi IC_{50} değeri yine MMS kodlu numuneye aittir (Tablo 6.46).

Tablo 6.46: Çalışma materyallerinin sıçanlarda serum lipaz ve lipaz enzimi üzerine belirlenen IC_{50} düzeyleri üzerine etkisi.

Gruplar	Serum lipaz düzeyi (U/L)	Lipaz enzim inhibisyonu (IC_{50} (µg/mL) ± SS)
Kontrol	13,06 ± 1,94	-
Negatif kontrol	41,20 ± 5,12	-
MYE	38,19 ± 3,74	287,08 ± 8,51
MYS	35,48 ± 2,95	250,14 ± 6,95
MÇE	27,01 ± 1,87	230,62 ± 8,04
MÇS	31,74 ± 1,76	306,17 ± 8,13
MME	44,51 ± 2,87	298,13 ± 8,07
MMS	19,32 ± 1,31*	149,56 ± 8,11
Referans madde	8,21 ± 0,46	20,53 ± 0,98

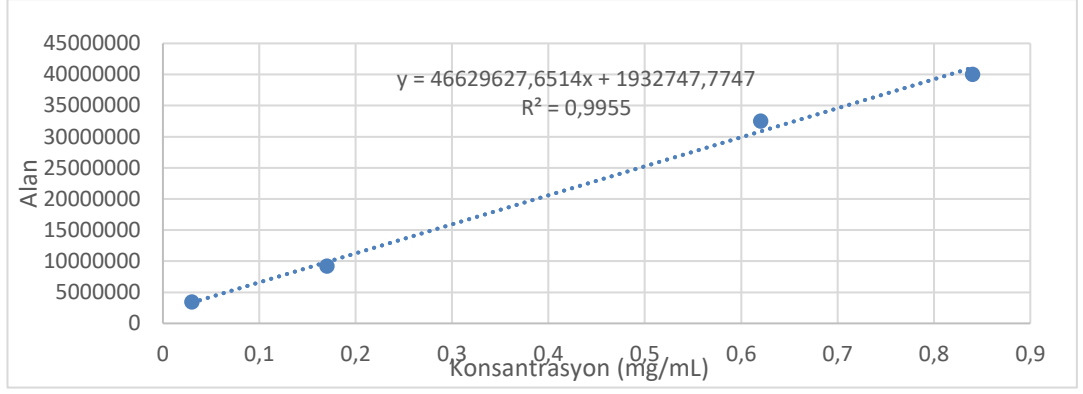
MYE: Mürver yaprak %50 etanol ekstresi; MYS: Mürver yaprak su ekstresi; MÇE: Mürver çiçek %50 etanol ekstresi; MÇS: Mürver çiçek su ekstresi; MME: Mürver meyve %50 etanol ekstresi; MMS: Mürver meyve su ekstresi, *: $p<0,01$.

Sonuç olarak, test edilen standardize ekstreler; HDL, LDL, trigliserit, adinopektin, leptin, T₃, T₄, TNF- α , IL-1 β , kan glukozu seviyesi, serum insülin seviyesi, lipaz enzim inhibisyonu değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmamıştır. Yalnızca mürver meyve su ekstresi serum lipaz seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmuştur ($p < 0,01$). Bölüm 4.6'da *S. nigra* ekstrelerinin kullanıldığı ve obezite parametreleri ile ilgili daha önce yapılan *in vivo* ve klinik çalışmalara yer verilmiştir. Bu çalışmalardan *Caenorhabditis elegans* türü solucan üzerinde yalnızca kara mürver çiçek ekstreleriyle yapılanı hariç tutulursa, obezite parametreleri üzerinde olumlu değişiklik meydana geldiği gözlemlenen çalışmaların hepsinde ortak noktanın, test numunelerinin belirlenmiş miktarlarda antosiyanin içermesi olduğu görülmektedir [100-103]. Bu durumda *S. nigra* bitkisinin ekstrelerinin meydana getirdiği anti-obezite etkileri potansiyel olarak meyvelerindeki antosiyanin içeriği ile ilişkilendirilebilir. Bu tez kapsamında oluşturulan standardize meyve ekstreleri ise oldukça düşük miktarlarda antosiyanin içermektedir. Kara mürver meyvelerinin majör antosiyaninleri siyanidin-3-glukozit ve siyanidin-3-sambubiozittir. Ancak mürver meyve %50 etanol ekstresi (MME) 100 gramda $3,00 \pm 0,01$ mg siyanidin-3-glukozit; $6,76 \pm 0,03$ mg siyanidin-3-sambubiozit içermektedir. Mürver meyve su ekstresi (MMS) 100 gramda $2,61 \pm 0,01$ mg siyanidin-3-glukozit; $3,10 \pm 0,01$ mg siyanidin-3-sambubiozit içermektedir. *In vivo* olarak test edilen numunelerin obezite parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik meydana getirmemesi, bu durumla açıklanabilir.

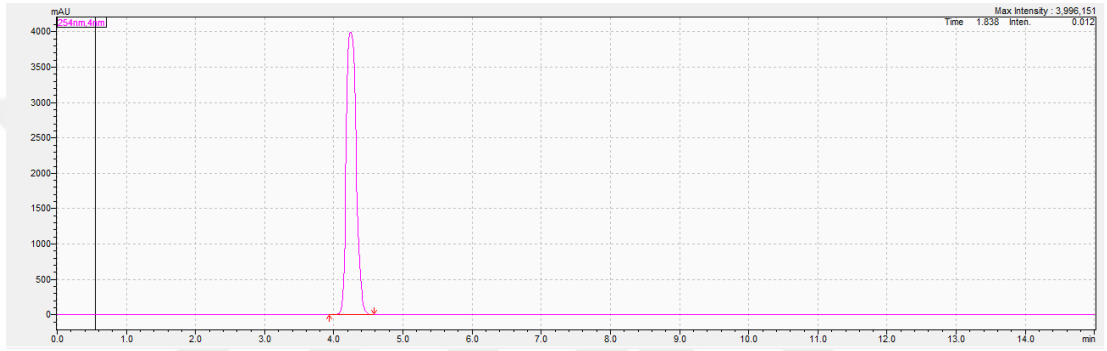
6.4 Kara Mürver ve Ekinezya Ekstreleri İçeren Formülasyonla İlgili Bulgular

6.4.1 Formülasyonun zaman içinde L-askorbik asit miktarlarının değişimini gösteren HPLC-PDA bulguları

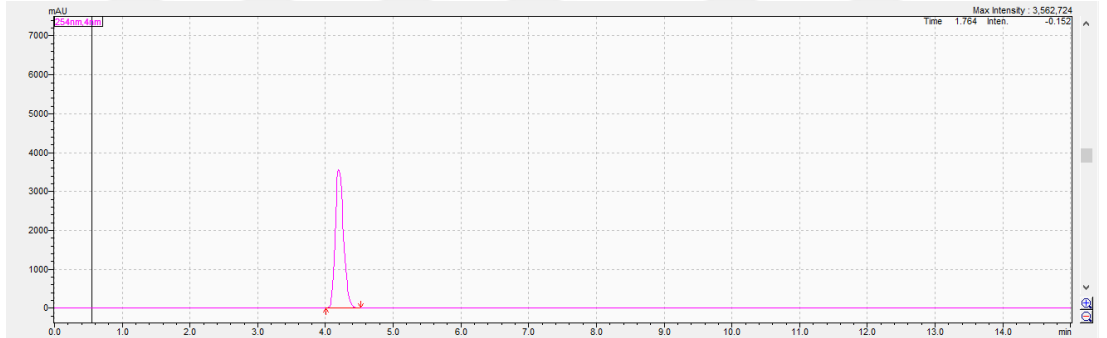
Kalibrasyon pikleri elde edilen standart madde L-askorbik asidin kalibrasyon eğrisi çizilerek en küçük kareler denkleminde R^2 değeri hesaplanmıştır (Şekil 6.33). Standart pik örneği Şekil 6.34'te verilmiştir. Hazırlanan kalibrasyon eğrisinin denkleminde formülasyon numunelerinin mL'sinde bulunan L-askorbik asit miktarları 0, 1 ve 3. aylarda hesaplanmıştır (Tablo 6.47). 3. ayın sonunda analiz edilen 7 kodlu numunede bulunan L-askorbik asidin 254 nm'deki piki örnek teşkil etmesi açısından Şekil 6.35'te verilmiştir.



Şekil 6.33: L-askorbik asit standardının kalibrasyon eğrisi.



Şekil 6.34: L-askorbik asit standart piki.



Şekil 6.35: 3 ay sonunda 7 kodlu numunedeki L-askorbik asit piki.

Başlangıç formülasyonunun 0. aydaki ve her bir numunenin 1 ve 3. aylardaki L-askorbik asit konsantrasyonu Tablo 6.47’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre buzdolabı (4 °C) grubunda olan numuneler (7, 8 ve 9 kodlu numuneler) 3 ayın sonunda hala başlangıçtaki L-askorbik asidin %86,76’sını korumaktadır. Diğer numunelerin ise L-askorbik asit miktarları 3 ayın sonunda %50’nin altına düşmüştür.

Tablo 6.47: Numunelerin 0-1-3. aylarda tayin edilen L-askorbik asit miktarları.

Ortam	Numune kodu	L-askorbik asit konsantrasyonu (Ortalama \pm standart sapma mg/mL)				
		Başlangıç (0. ay)	1. ay	Ortam ortalaması	3. ay	Ortam ortalaması
Stabilite kabini (25 °C \pm 2°C / %60 BN \pm %5 BN)	1		23,855 \pm 0,027		13,078 \pm 0,017	
	2		24,059 \pm 0,167	24,056 \pm 0,194	12,740 \pm 0,008	13,128 \pm 0,359
	3		24,253 \pm 0,047		13,564 \pm 0,037	
	4		25,690 \pm 0,042		14,035 \pm 0,004	
Oda sıcaklığı 25 °C	5	33,638 \pm 0,002	24,404 \pm 0,051	24,943 \pm 0,580	14,113 \pm 0,004	13,970 \pm 0,159
	6		24,734 \pm 0,042		13,763 \pm 0,008	
	7		33,305 \pm 0,013		29,914 \pm 0,211	
Buzdolabı 4 °C	8		33,162 \pm 0,023	32,919 \pm 0,476	29,896 \pm 0,018	29,186 \pm 1,084
	9		32,290 \pm 0,012		27,747 \pm 0,030	

6.4.2 Formülasyonun zaman içinde toplam fenolik ve flavonoit miktarlarının değişimini gösteren spektrofotometrik bulgular

Başlangıç formülasyonunun 0. aydaki ve her bir numunenin 1 ve 3. aylardaki mL başına düşen toplam fenolik madde konsantrasyonları Tablo 6.48’de ve toplam flavonoit konsantrasyonları Tablo 6.49’de μg cinsinden sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre buzdolabı (4 °C) grubunda olan numuneler (7, 8 ve 9 kodlu numuneler) 3 ayın sonunda hala başlangıçtaki toplam fenolik madde miktarının %96,93’ünü, toplam flavonoit madde miktarının %83,05’ini korumaktadır. Oda sıcaklığındaki 25 °C numuneler 3 ayın sonunda başlangıçtaki toplam fenolik madde miktarının %88,94’ünü, toplam flavonoit madde miktarının %82,98’ini korumaktadır. Stabilite kabinindeki (25 °C \pm 2°C / %60 BN \pm %5 BN) numuneler 3 ayın sonunda başlangıçtaki toplam fenolik madde miktarının %87,29’ünü, toplam flavonoit madde miktarının %82,17’sini korumaktadır.

Tablo 6.48: Numunelerin 0-1-3. aylarda tayin edilen toplam fenolik madde miktarları.

Ortam	Numune kodu	Toplam fenolik madde konsantrasyonu (Ortalama \pm standart sapma $\mu\text{g}/\text{mL}$)				
		Başlangıç (0. ay)	1. ay	Ortam ortalaması	3. ay	Ortam ortalaması
Stabilite kabini (25 °C \pm 2°C / %60 BN \pm %5 BN)	1		4979,420 \pm 130,730		4404,058 \pm 39,030	
	2		4880,145 \pm 153,293	4976,763 \pm 132,993	4972,899 \pm 130,024	4792,705 \pm 302,018
	3		5070,725 \pm 153,882		5001,159 \pm 77,299	
Oda sıcaklığı 25 °C	4		4967,826 \pm 135,290		5023,623 \pm 174,081	
	5	5490,783 \pm 6,957	4813,478 \pm 69,870	4955,990 \pm 160,167	4914,928 \pm 85,042	4883,527 \pm 186,681
	6		5086,667 \pm 152,117		4712,029 \pm 163,786	
Buzdolabı 4 °C	7		5424,348 \pm 56,522		5464,203 \pm 129,568	
	8		5331,594 \pm 17,980	5395,845 \pm 82,533	5241,014 \pm 122,828	5322,174 \pm 186,406
	9		5431,594 \pm 28,372		5261,304 \pm 247,826	

Tablo 6.49: Numunelerin 0-1-3. aylarda tayin edilen toplam flavonoit madde miktarları.

Ortam	Numune kodu	Toplam flavonoit madde konsantrasyonu (Ortalama \pm standart sapma $\mu\text{g/mL}$)				
		Başlangıç (0. ay)	1. ay	Ortam ortalaması	3. ay	Ortam ortalaması
Stabilite kabini (25 °C \pm 2°C / %60 BN \pm %5 BN)	1		239,448 \pm 4,778		224,048 \pm 15,259	
	2		252,322 \pm 8,868	240,061 \pm 12,549	211,738 \pm 13,095	223,807 \pm 14,685
	3		228,414 \pm 9,946		235,634 \pm 5,467	
Oda sıcaklığı 25 °C	4		249,563 \pm 18,368		241,655 \pm 12,586	
	5	272,368 \pm 2,871	253,241 \pm 25,283	250,176 \pm 16,749	214,759 \pm 12,585	226,023 \pm 15,896
	6		247,724 \pm 11,034		221,655 \pm 10,414	
Buzdolabı 4 °C	7		258,000 \pm 4,741		224,048 \pm 7,629	
	8		269,379 \pm 3,103	260,069 \pm 7,912	217,531 \pm 8,780	226,221 \pm 11,598
	9		252,828 \pm 1,792		237,083 \pm 10,266	

6.4.3 Formülasyonun zaman içinde toplam antosiyanin miktarlarının değişimini gösteren spektrofotometrik bulgular

Başlangıç formülasyonunun 0. aydaki ve her bir numunenin 1 ve 3. aylardaki mL başına düşen toplam antosiyanin madde konsantrasyonları Tablo 6.50'de μg cinsinden sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre buzdolabı ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) grubunda olan numuneler (7, 8 ve 9 kodlu numuneler) 3 ayın sonunda hala başlangıçtaki toplam antosiyanin madde miktarının %86,32'sini korumaktadır. Oda sıcaklığındaki $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ numuneler 3 ayın sonunda başlangıçtaki toplam antosiyanin madde miktarının %76,59'unu korumaktadır. Stabilitate kabinindeki ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / \%60\text{ BN} \pm \%5\text{ BN}$) numuneler 3 ayın sonunda başlangıçtaki toplam antosiyanin madde miktarının %71,36'sını korumaktadır.

Tablo 6.50: Numunelerin 0-1-3. aylarda tayin edilen toplam antosiyanin madde miktarları.

Ortam	Numune kodu	Toplam antosiyanin madde konsantrasyonu (Ortalama \pm standart sapma $\mu\text{g/mL}$)				
		Başlangıç (0. ay)	1. ay	Ortam ortalaması	3. ay	Ortam ortalaması
Stabilite kabini ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} /$ $\%60\text{ BN} \pm \%5\text{ BN}$)	1		$53,148 \pm 0,738$		$49,922 \pm 1,030$	
	2		$51,681 \pm 0,448$	$53,245 \pm 1,510$	$51,975 \pm 0,448$	$51,160 \pm 1,165$
	3		$54,907 \pm 0,738$		$51,584 \pm 0,776$	
Oda sıcaklığı $25\text{ }^{\circ}\text{C}$	4		$55,753 \pm 1,322$		$55,689 \pm 2,607$	
	5	$71,688 \pm 2,423$	$56,471 \pm 1,185$	$57,058 \pm 1,037$	$54,125 \pm 1,221$	$54,907 \pm 1,652$
	6		$57,449 \pm 0,587$		$54,907 \pm 0,896$	
Buzdolabı $4\text{ }^{\circ}\text{C}$	7		$65,171 \pm 1,615$		$63,118 \pm 3,217$	
	8		$67,224 \pm 1,476$	$66,279 \pm 1,719$	$60,577 \pm 0,610$	$61,880 \pm 2,039$
	9		$66,442 \pm 1,953$		$61,945 \pm 1,030$	

7. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez kapsamında T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü ile çalışılarak, Türkiye’de doğal olarak yetişen *Sambucus nigra* L. bitkisinin 121 farklı bölgeden alınan örnekleri toplam antosiyanin içeriği bakımından değerlendirilmiştir. Buna göre, toplanan örnekler arasında toplam antosiyanin içeriği bakımından en zengin olanları 2021 yılında toplanan Bergama 2, Bozdağ 7 örnekleri ile 2022 yılında toplanan Bolu 22, Bolu 24 ve Bolu 26 olmuştur. Bu örneklerin, sırasıyla siyanidin-3-glukozit klorür üzerinden hesaplanan antosiyanin miktarları $1,7045 \pm 0,0141$; $1,3998 \pm 0,2659$; $1,4930 \pm 0,0722$; $1,3846 \pm 0,0834$ ve $1,3843 \pm 0,0936$ ’dır. Bu sonuçlar doğrultusunda, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü ortaklığında yerli ve antosiyanince zengin bir *S. nigra* kültür çeşidi geliştirilecektir.

Tez kapsamında gerçekleştirilen sitotoksisite çalışmasında insan alveoler adenokarsinom hücresi (A549, CCL-185), insan meme adenokarsinomu hücresi (MCF-7, HTB-22) ve insan beyni glioma kanser hücresi (U-118 MG, HTB-15) hatlarında çalışılmış, *in vitro* olarak test edilen *S. nigra* ekstrelerinin bu hücre hatlarında ancak çok yüksek miktarlarda sitotoksik olabileceği gözlemlenmiştir. Bu sonuç, *S. nigra* ekstrelerinin ve ürünlerinin belirli sınırlardaki güvenliğini vurgulamaktadır.

Yine bu tez kapsamında, kara mürver ekstrelerindeki rutin ve izokersitrin flavonoidlerini PDA dedektörlü HPLC cihazında kantitatif olarak tayin edebilmek için metot geliştirilmiş ve validasyonu yapılmıştır. Geliştirilen metot sistem tekrarlanabilirliği, sistem uygunluğu, seçicilik, doğrusalılık, uygulama aralığı, doğruluk, kesinlik, sağlamlık ve stabilite açısından USP tarafından belirlenen kabul kriterlerini sağlamaktadır.

Tez kapsamında, Balıkesir Büyükşehir Belediyesi Çiftçi Eğitim Merkezi’nin kültür bahçesinden toplanan *S. nigra* bitkisinden standardize ekstreler elde edilmiş (mürver

çiçek %50 etanol ekstresi, mürver çiçek %100 su ekstresi, mürver meyve %50 etanol ekstresi, mürver meyve %100 su ekstresi, mürver yaprak %50 etanol ekstresi ve mürver yaprak %100 su ekstresi) ve her birinin spesifikasyonu oluşturulmuştur. Spesifikasyonlarda kimyasal içerik bakımından fenolik madde miktarı, flavonoit madde miktarı, rutin miktarı ve izokersitrin miktarına yer verilmiştir. Antosiyaninler sıcaklık, ışık, oksijen, pH gibi ortama bağlı faktörler sebebiyle bozunabildiğinden stabil değildirler. Bu sebeple spesifikasyon parametrelerinde antosiyanin miktarına yer verilmemiştir. Flavonoitler daha stabil olduğundan onlarla ilişkili parametrelere yer verilmiştir.

Bu tez kapsamında elde edilen standardize ekstrelerin her biri, yüksek yağlı diyetle indüklenmiş obeziteye sahip erkek Wistar albino sıçan gruplarının diyetlerine dahil edilerek test edilmiştir. Obezitede etkili parametreler olan HDL, LDL, trigliserit, adinopektin, leptin, T₃, T₄, TNF- α , IL-1 β , kan glukozu seviyesi, serum insülin seviyesi, lipaz enzim inhibisyonu ve serum lipaz seviyesi değişimleri 7 hafta boyunca takip edilmiştir. Yalnızca mürver meyve su ekstresi serum lipaz seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmuştur (p<0,01). Diğer parametrelerde 7 hafta sonunda istatistiksel olarak anlamlı farklar oluşmamıştır. Literatüre bakıldığında, *S. nigra* ekstrelerinin test edilip, omurgalı canlıların obezite parametreleri üzerinde olumlu değişiklikler meydana geldiği gözlemlenen çalışmaların hepsinde ortak noktanın, test numunelerinin belirlenmiş miktarlarda antosiyanin içermesi olduğu görülmektedir [100-103]. Bu durum da *S. nigra* bitkisinin ekstrelerinin meydana getirdiği anti-obezite etkilerinin meyvelerindeki antosiyanin içeriği ile ilişkilendirilebileceği yorumuna yol açmaktadır. Bu tez kapsamında oluşturulan standardize meyve ekstreleri ise oldukça düşük miktarlarda antosiyanin içermektedir. *In vivo* olarak test edilen numunelerin obezite parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik meydana getirmemesi, bu durumla açıklanabilir.

Tez kapsamında kara mürver ve ekinezya ekstreleri içeren formülasyon hazırlanmıştır. Hazırlanan bu formülasyon başlangıç aşamasında stabilite incelemeleri için 3 gruba bölünmüştür: 1. stabilite kabini (25 °C \pm 2°C / %60 BN \pm %5 BN); 2. oda sıcaklığı (25 °C); 3 buzdolabı (4 °C). Formülasyonun L-askorbik asit, toplam fenolik madde, toplam flavonoit madde ve toplam antosiyanin madde miktarlarının stabilitesi başlangıçtan itibaren 3 ay boyunca takip edilmiştir. 3 ayın sonunda her 3 gruptaki numuneler de toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarlarının en az %80'ini, toplam

antosiyenin miktarlarının ise en az %70'ini korumuştur. Hazırlanan formülasyonlarda ortamlar arasında en fazla farkın olduğu parametre L-askorbik asit miktarıdır. Elde edilen sonuçlara göre buzdolabı (4 °C) grubunda olan numuneler 3 ayın sonunda hala başlangıçtaki L-askorbik asit miktarının %86,76'sını korumaktadır. Diğer numunelerin L-askorbik asit miktarları ise 3 ayın sonunda başlangıç miktarının %50'sinin altına düşmüştür. Bu formülasyon kullanılacaksa L-askorbik asit miktarında meydana gelecek kayıplar göz önüne alınarak, formülasyona bu maddeden daha yüksek oranda ilave edilmelidir. Veya daha farklı formülasyon denemeleri yapılabilir.

Kara mürver, her geçen gün kullanımı artan önemli bir bitkidir. Soğuk algınlığı ve gribal enfeksiyonlara karşı faydalı olması sebebiyle ekstrelerinden elde edilen şurup, damla, tablet, kapsül, efervesan tablet, pastil, aerosol, emülsiyon ve süspansiyonları gıda takviyesi olarak bütün dünyada yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Future Market Insights tarafından yayınlanan “Kara Mürver Takviyeleri Pazar Analiz Raporu”, mürver gıda takviyelerinin 2022 yılındaki küresel satışlarının 1,1 milyar ABD Doları seviyesinde gerçekleştiğini ortaya koymaktadır. Yine aynı raporda, kara mürver gıda takviyelerinin pazar payının 2023'ten 2033'e kadar %8,9 oranında büyüme göstereceğini öngörülmektedir [143]. Dünya piyasasında durum böyleyken, Türkiye'de 323 farklı kara mürver ürünü satıştayken [78], ve bitki Türkiye'de doğal olarak yetişebiliyorken ülkemizde bu bitkinin yeterince değerlendirilmiyor olması izah edilemez. Türkiye'de kaliteli, istenen antosiyenin ve fenolik bileşenleri gerekli miktarlarda içeren *Sambucus nigra* L. yetiştiriciliğinin yapılması için kara mürver bahçelerinin oluşturulması gerekmektedir. Daha sonra ülkemizde elde edilen kara mürverler işlenerek bunlardan standardize ekstreler elde edilmeli. Bu sayede dünya kara mürver hammadde üretiminde Türkiye söz sahibi olabilir. Ayrıca, üretilmiş yerli hammaddelerden (standardize sıvı, katı ekstrelerden) gıda, gıda takviyesi ve ilaç formunda yeni ve yaratıcı ürünler geliştirilip dünya pazarında satışa sunulmalı, ülke ekonomisine katkıda bulunulmalıdır. Bu tez kapsamında geliştirilen ve spesifikasyonları belirlenen standardize ekstrelerin endüstriyel ölçekte üretilerek ekonomiye katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bu amaçla mürver ve ürünleriyle ilgilenen kurum ve kuruluşlara hazırlanmış olduğumuz tez destek olacak niteliktedir.

Ek olarak, kara mürverin yaprakları yara ve yanık iyi edici etkileriyle geçmişte topraklarımızda geleneksel olarak kullanılmıştır. Literatürde, *S. nigra* yapraklarının

yara-yanık iyileştirici etkisini bilimsel olarak destekleyen bazı çalışmalar da mevcuttur [3, 144]. Bu konudaki biyolojik aktivite çalışmaları artırılıp aktivite bilimsel bir zemini oturtulduktan sonra, yine ülkemizde yetiştirilecek kara mrverlerin yapraklarından oluşturulacak standardize ekstrelerle yerli ürünler oluşturulması hedeflenmelidir.



KAYNAKLAR

- [1] Mlynarczyk, K., Walkowiak-Tomczak, D. ve Łysiak, G. P. (2018). Bioactive properties of *Sambucus nigra* L. as a functional ingredient for food and pharmaceutical industry. *Journal of Functional Foods*, 40, 377-390.
- [2] Sala, G., Pasta, S., Maggio, A. ve La Mantia, T. (2023). *Sambucus nigra* L. (fam. Viburnaceae) in Sicily: Distribution, Ecology, Traditional Use and Therapeutic Properties. *Plants*, 12(19), 3457.
- [3] Skowrońska, W., Granica, S., Czerwińska, M. E., Osińska, E. ve Bazyłko, A. (2022). *Sambucus nigra* L. leaves inhibit TNF- α secretion by LPS-stimulated human neutrophils and strongly scavenge reactive oxygen species. *Journal of Ethnopharmacology*, 290, 115116.
- [4] **Url-1.** <<https://smpnutra.com/product/vegan-4in1-elderberry-echinacea-vitamin-c-zinc-liquid-drops-natural-mixed-berry-flavor-30-servings-2oz-non-gmo-gluten-free>>. (Erişim Tarihi: 07/05/2024).
- [5] **Url-2.** <<https://www.sandersonvitamins.co.nz/products/echinacea-elderberry-drops>>. (Erişim Tarihi: 07/05/2024).
- [6] **Url-3.** <<https://kiwla.com/products/Natures-Way-Sambucus-Immune-Elderberry-Syrup-Herbal-Supplements-with-Echinacea-Zinc-and-Vitamin-C-Gluten-Free-Vegetarian-4-FI-Oz-Packaging-May-Vary>>. (Erişim Tarihi: 07/05/2024).
- [7] **Url-4.** <<https://www.gardenoflife.com/mykind-organics-elderberry-immune-syrup>>. (Erişim Tarihi: 07/05/2024).
- [8] Waswa, E. N., Mutinda, E. S., Mkala, E. M., Katumo, D. M., Oulo, M. A., Odago, W. O., ve ark. (2022). Understanding the Taxonomic Complexes and Species Delimitation within *Sambucus* L. (Viburnaceae). *Diversity*, 14(11), 906.
- [9] Waswa, E. N., Li, J., Mkala, E. M., Wang, V. O., Mutinda, E. S., Nanjala, C., ve ark. (2022). Ethnobotany, phytochemistry, pharmacology, and toxicology of the genus *Sambucus* L. (Viburnaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 292, 115102.
- [10] WFO. **Viburnaceae Raf.** . (2024). 05/05/2024, <https://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-7000000671>
- [11] Britannica. **Dipsacales.** (2019). 05/04/2024, <https://www.britannica.com/plant/Dipsacales#ref276463>
- [12] Eker İ, K. A., Çelik A, Eker N. “İbuflora (Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Kampüs Florası)”. **Adoxaceae.** (2024). 05/04/2024, <http://ibuflora.ibu.edu.tr/en/family/adoxaceae>
- [13] Kew Royal Botanic Gardens Plants of the World Online. ***Sambucus* L.** (2024). 05/04/2024, <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30018446-2>
- [14] İstanbul Üniversitesi Tıbbi Bitkisel Ürünler Araştırma ve Danışma Platformu. ***Sambucus nigra* L.** (2024). 05/04/2024, [https://tibuad.istanbul.edu.tr/tr/content/blog/sambucus-nigra-\(karamurver\)](https://tibuad.istanbul.edu.tr/tr/content/blog/sambucus-nigra-(karamurver))

- [15] Kocaeli Bitkileri. *Sambucus nigra* (Ağaç mürver). (2024). 05/04/2024, <https://kocaelibitkileri.com/sambucus-nigra/>
- [16] Atkinson, M. D. ve Atkinson, E. (2002). *Sambucus nigra* L. *J Ecol*, 90(5), 895-923.
- [17] Kew Royal Botanic Gardens Plants of the World Online. *Sambucus nigra* L. (2024). 04/04/2024, <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30122169-2>
- [18] Bizimbitkiler. *Sambucus nigra*. (2013). 05/04/2024, <http://www.bizimbitkiler.org.tr>
- [19] Horčinová Sedláčková, V., Grygorieva, O., Vergun, O., Vinogradova, Y. ve Brindza, J. (2019). Comparison of selected characteristics of cultivars and wild-growing genotypes of *Sambucus nigra* in Slovakia. *Biosystems Diversity*, 27(1), 56-61.
- [20] NatureClaim. **Elderberry Nutrition Facts**. (2024). 10/05/2024, <https://natureclaim.com/nutrition/info/elderberry/#vitamins>
- [21] Veberic, R., Jakopic, J., Stampar, F. ve Schmitzer, V. (2009). European elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols. *Food Chemistry*, 114(2), 511-515.
- [22] Vulić, J. J., Vračar, L. O. ve Šumić, Z. M. (2008). Chemical characteristics of cultivated elderberry fruit. *Acta periodica technologica*, (39), 85-90.
- [23] Porter, R. S. ve Bode, R. F. (2017). A Review of the Antiviral Properties of Black Elder (*Sambucus nigra* L.) Products. *Phytotherapy Research*, 31(4), 533-554.
- [24] Iglesias, R., Russo, R., Landi, N., Valletta, M., Chambery, A., Di Maro, A., ve ark. (2022). Structure and Biological Properties of Ribosome-Inactivating Proteins and Lectins from Elder (*Sambucus nigra* L.) Leaves. *Toxins*, 14(9), 611.
- [25] Mach, L., Scherf, W., Ammann, M., Poetsch, J., Bertsch, W., März, L. ve Glössl, J. (1991). Purification and partial characterization of a novel lectin from elder (*Sambucus nigra* L.) fruit. *Biochemical Journal*, 278(3), 667-671.
- [26] Tejero, J., Jiménez, P., Quinto, E. J., Cordoba-Diaz, D., Garrosa, M., Cordoba-Diaz, M., ve ark. (2015). Elderberries: A source of ribosome-inactivating proteins with lectin activity. *Molecules*, 20(2), 2364-2387.
- [27] Girbes, T., Ferreras, J., Arias, F., Muñoz, R., Iglesias, R., Jimenez, P., ve ark. (2003). Non-toxic type 2 ribosome-inactivating proteins (RIPs) from *Sambucus*: occurrence, cellular and molecular activities and potential uses. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 49(4), 537-545.
- [28] Dulf, F. V., Oroian, I., Vodnar, D. C., Socaciu, C. ve Pintea, A. (2013). Lipid classes and fatty acid regiodistribution in triacylglycerols of seed oils of two *Sambucus* species (*S. nigra* L. and *S. ebulus* L.). *Molecules*, 18(10), 11768-11782.
- [29] Fazio, A., Plastina, P., Meijerink, J., Witkamp, R. F. ve Gabriele, B. (2013). Comparative analyses of seeds of wild fruits of *Rubus* and *Sambucus* species from Southern Italy: Fatty acid composition of the oil, total phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory properties of the methanolic extracts. *Food chemistry*, 140(4), 817-824.
- [30] Kaack, K. ve Christensen, L. P. (2008). Effect of packing materials and storage time on volatile compounds in tea processed from flowers of black elder (*Sambucus nigra* L.). *European Food Research and Technology*, 227, 1259-1273.

- [31] Raičević, V., Mladenović, M., Aćimović, M. ve Radulović, N. (2024). New esters from the essential oil of dry flowers of elder (*Sambucus nigra* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 104(3), 1308-1321.
- [32] Nawirska-Olszańska, A., Oziemblowski, M., Brandova, P. ve Czaplicka, M. (2022). Comparison of the Chemical Composition of Selected Varieties of Elderberry with Wild Growing Elderberry. *Molecules*, 27(16), 5050.
- [33] Imenšek, N., Sem, V., Kolar, M., Ivančič, A. ve Kristl, J. (2021). The Distribution of Minerals in Crucial Plant Parts of Various Elderberry (*Sambucus* spp.) Interspecific Hybrids. *Plants*, 10(4), 653.
- [34] Kaack, K. ve Austed, T. (1998). Interaction of vitamin C and flavonoids in elderberry (*Sambucus nigra* L.) during juice processing. *Plant foods for human nutrition*, 52, 187-198.
- [35] Akbulut, M., Ercisli, S. ve Tosun, M. (2009). Physico-chemical characteristics of some wild grown European elderberry (*Sambucus nigra* L.) genotypes. *Pharmacognosy magazine*, 5(20).
- [36] Mratinić, E. ve Fotirić, M. (2007). Selection of black elderberry (*Sambucus nigra* L.) and evaluation of its fruits usability as biologically valuable food. *Genetika*, 39(3), 305-314.
- [37] Dawidowicz, A. L., Wianowska, D. ve Baraniak, B. (2006). The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidant properties of extracts). *LWT-Food Science and Technology*, 39(3), 308-315.
- [38] MedChemExpress. **Rutin.** (2024). 05/05/2024, <https://www.medchemexpress.com/Rutin.html>
- [39] MedChemExpress. **Isoquercitrin.** (2024). 05/05/2024, <https://www.medchemexpress.com/Isoquercitrin.html>
- [40] MedChemExpress. **Quercetin.** (2024). 05/05/2024, <https://www.medchemexpress.com/Quercetin.html>
- [41] Wikipedia. **Kaempferol 3-O-rutinoside.** (2024). 05/05/2024, https://en.wikipedia.org/wiki/Kaempferol_3-O-rutinoside
- [42] MedChemExpress. **Astragalín.** (2024). 05/05/2024, <https://www.medchemexpress.com/Astragalín.html>
- [43] Extrasynthese. **Isorhamnetin-3-O-rutinoside.** (2024). 05/05/2024, <https://www.extrasynthese.com/flavonol/581-isorhamnetin-3-o-rutinoside.html>
- [44] Extrasynthese. **Isorhamnetin-3-O-glucoside.** (2024). 05/05/2024, <https://www.extrasynthese.com/flavonol/580-isorhamnetin-3-o-glucoside.html>
- [45] Extrasynthese. **Hyperoside.** (2024). 05/05/2024, <https://www.medchemexpress.com/hyperoside.html>
- [46] Qazimi, B., Stanoeva, J. P., Cvetanoska, M., Geskovski, N., Dragusha, S., Koraqi, H., ve ark. (2023). Phenolic Compound Composition of *Sambucus nigra* L. Wild-Growing Plants from Kosovo. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20(6), 380.
- [47] Przybylska-Balcerek, A., Szablewski, T., Szwajkowska-Michalek, L., Świerk, D., Cegielska-Radziejewska, R., Krejpcio, Z., ve ark. (2021). *Sambucus nigra* Extracts–Natural Antioxidants and Antimicrobial Compounds. *Molecules*, 26(10), 2910.
- [48] MedChemExpress. **Naringenin.** (2024). 05/05/2024, <https://www.medchemexpress.com/Naringenin.html>
- [49] MedChemExpress. **Luteolin.** (2024). 05/05/2024, <https://www.medchemexpress.com/Luteolin.html>

- [50] Wikipedia. **Apigenin.** (2024). 05/05/2024,
<https://en.wikipedia.org/wiki/Apigenin>
- [51] MedChemExpress. **(-)-Epicatechin.** (2024). 05/05/2024,
<https://www.medchemexpress.com/---Epicatechin.html>
- [52] MedChemExpress. **Catechin.** (2024). 05/05/2024,
<https://www.medchemexpress.com/Catechin.html>
- [53] MedChemExpress. **Chlorogenic acid.** (2024). 05/05/2024,
<https://www.medchemexpress.com/Chlorogenic-acid.html>
- [54] MedChemExpress. **Neochlorogenic acid.** (2024). 05/05/2024,
<https://www.medchemexpress.com/Neochlorogenic-acid.html>
- [55] MedChemExpress. **Caffeic acid.** (2024). 05/05/2024,
https://www.medchemexpress.com/Caffeic_acid.html
- [56] MedChemExpress. **D-(-)-Quinic acid** (2024). 05/05/2024,
https://www.medchemexpress.com/D-_-_-Quinic_acid.html
- [57] Merck. **Cyanidin 3-Glucoside.** (2024). 05/05/2024,
<https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/search/cyanidin-3-glucoside?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=cyanidin%203-glucoside&type=product>
- [58] Merck. **Cyanidin 3-Sambubioside.** (2024). 05/05/2024,
<https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/search/cyanidin-3-sambubioside?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=cyanidin%203-sambubioside&type=product>
- [59] MedChemExpress. **Cyanidin 3,5-diglucoside.** (2024). 05/05/2024,
<https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sial/phl89615>
- [60] Axios-research. **Cyanidin 3-Sambubioside-5-Glucoside.** (2024). 05/05/2024,
<https://www.axios-research.com/products/cyanidin-3-sambubioside-5-glucoside-chloride>
- [61] ChemFaces. **Cyanidin-3-O-rutinoside chloride.** (2024). 05/05/2024,
<https://www.chemfaces.com/natural/Cyanidin-3-O-rutinoside-chloride-CFN92135.html>
- [62] Enaru, B., Dreţcanu, G., Pop, T. D., Stănilă, A. ve Diaconeasa, Z. (2021). Anthocyanins: Factors Affecting Their Stability and Degradation. *Antioxidants*, 10(12), 1967.
- [63] Smeriglio, A., Monteleone, D. ve Trombetta, D. (2014). Health effects of *Vaccinium myrtillus* L.: evaluation of efficacy and technological strategies for preservation of active ingredients. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 14(7), 567-584.
- [64] Fernández-López, J. A., Angosto, J. M., Giménez, P. J. ve León, G. (2013). Thermal stability of selected natural red extracts used as food colorants. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68, 11-17.
- [65] Rodríguez Madrera, R. ve Suárez Valles, B. (2021). Analysis of cyanogenic compounds derived from mandelonitrile by ultrasound-assisted extraction and high-performance liquid chromatography in Rosaceae and *Sambucus* families. *Molecules*, 26(24), 7563.
- [66] Demirbolat, I. ve Kartal, M. (2019). Prulaurasin content of leaves, kernels and pulps of *Prunus lauracerasus* L. (Cherry Laurel) during ripening. *Journal of Research in Pharmacy*, 23(1).
- [67] Fleming, T. (1998). *PDR for herbal medicines*. Montvale, New Jersey, USA: Medical Economics Company.

- [68] **Sidor, A. ve Gramza-Michalowska, A.** (2015). Advanced research on the antioxidant and health benefit of elderberry (*Sambucus nigra*) in food – a review. *Journal of Functional Foods*, 18, 941-958.
- [69] **European Food Safety Authority.** (2012). Compendium of botanicals reported to contain naturally occurring substances of possible concern for human health when used in food and food supplements. *EFSA Journal*, 10(5), 2663.
- [70] EMA/HMPC. **European Union herbal monograph on *Sambucus nigra* L., flos.** (2018). 14/02/2024, https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-monograph/final-european-union-herbal-monograph-sambucus-nigra-l-flos-revision-1_en.pdf
- [71] **Mota, A. H., Andrade, J. M., Rodrigues, M. J., Custódio, L., Bronze, M. R., Duarte, N., ve ark.** (2020). Synchronous insight of in vitro and in vivo biological activities of *Sambucus nigra* L. extracts for industrial uses. *Industrial Crops and Products*, 154, 112709.
- [72] **Mota, A. H., Sousa, A., Figueira, M., Amaral, M., Sousa, B., Rocha, J., ve ark.** (2020). Natural-based consumer health nanoproducts: Medicines, cosmetics, and food supplements. *Handbook of functionalized nanomaterials for industrial applications* ss. 527-578): Elsevier.
- [73] EMA/HMPC. **Assessment report on *Sambucus nigra* L., fructus.** (2014). 16/02/2024, https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-sambucus-nigra-l-fructus_en.pdf
- [74] **Yeşilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Fujita, T., Tanaka, T., ve ark.** (1995). Traditional medicine in Turkey. V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains. *Journal of ethnopharmacology*, 46(3), 133-152.
- [75] **Yeşilada, E., Üstün, O., Sezik, E., Takaishi, Y., Ono, Y. ve Honda, G.** (1997). Inhibitory effects of Turkish folk remedies on inflammatory cytokines: interleukin-1 α , interleukin-1 β and tumor necrosis factor α . *Journal of Ethnopharmacology*, 58(1), 59-73.
- [76] **Cornara, L., La Rocca, A., Marsili, S. ve Mariotti, M.** (2009). Traditional uses of plants in the Eastern Riviera (Liguria, Italy). *Journal of Ethnopharmacology*, 125(1), 16-30.
- [77] **Guarrera, P. M.** (2005). Traditional phytotherapy in Central Italy (marche, abruzzo, and latium). *Fitoterapia*, 76(1), 1-25.
- [78] **GEMAŞ AŞ.** 2024. RxMediaPharma® İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı.
- [79] Seasons of New England. **Healing Salve with Calendula by Merry Little Elderberry.** (2024). 15/05/2024, <https://seasonsofnewengland.com.au/products/general-salve-by-merry-little-elderberry>
- [80] **Liu, D., He, X.-Q., Wu, D.-T., Li, H.-B., Feng, Y.-B., Zou, L. ve Gan, R.-Y.** (2022). Elderberry (*Sambucus nigra* L.): Bioactive Compounds, Health Functions, and Applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(14), 4202-4220.
- [81] **Duymuş, H. G., Göger, F. ve Başer, K. H. C.** (2014). In vitro antioxidant properties and anthocyanin compositions of elderberry extracts. *Food chemistry*, 155, 112-119.
- [82] **Olejnik, A., Olkowicz, M., Kowalska, K., Rychlik, J., Dembczyński, R., Myszk, K., ve ark.** (2016). Gastrointestinal digested *Sambucus nigra* L. fruit extract protects in vitro cultured human colon cells against oxidative stress. *Food chemistry*, 197, 648-657.

- [83] **Hearst, C., McCollum, G., Nelson, D., Ballard, L. M., Millar, B. C., Goldsmith, C. E., ve ark.** (2010). Antibacterial activity of elder (*Sambucus nigra* L.) flower or berry against hospital pathogens. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(17), 1805-1809.
- [84] **Krawitz, C., Mraheil, M. A., Stein, M., Imirzalioglu, C., Domann, E., Pleschka, S. ve Hain, T.** (2011). Inhibitory activity of a standardized elderberry liquid extract against clinically-relevant human respiratory bacterial pathogens and influenza A and B viruses. *BMC complementary and alternative medicine*, 11, 1-6.
- [85] **Olejnik, A., Kowalska, K., Olkowicz, M., Rychlik, J., Juzwa, W., Myszk, K., ve ark.** (2015). Anti-inflammatory effects of gastrointestinal digested *Sambucus nigra* L. fruit extract analysed in co-cultured intestinal epithelial cells and lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Journal of Functional Foods*, 19, 649-660.
- [86] **Ciocioiu, M., Badescu, L., Badulescu, O., Tutunaru, D. ve Badescu, M.** (2012). Protective intervention of *Sambucus nigra* polyphenols in the diabetic heart. *Annals of the Romanian Society for cell biology*, 17(1).
- [87] **Badescu, M., Badulescu, O., Badescu, L. ve Ciocioiu, M.** (2015). Effects of *Sambucus nigra* and *Aronia melanocarpa* extracts on immune system disorders within diabetes mellitus. *Pharmaceutical biology*, 53(4), 533-539.
- [88] **Frøkiær, H., Henningsen, L., Metzdorff, S. B., Weiss, G., Roller, M., Flanagan, J., ve ark.** (2012). Astragalus root and elderberry fruit extracts enhance the IFN- β stimulatory effects of *Lactobacillus acidophilus* in murine-derived dendritic cells. *PLoS One*, 7(10), e47878.
- [89] **Mogoşanu, G. D., Popescu, F. C., Busuioc, C. J., Pop, O. T., Pârvănescu, H., Lascăr, I. ve Mogoantă, L.** (2011). The effect of a topical treatment based on sambuci flos extract in experimental thermal third degree skin burns. *Studia Universitatis Vasile Goldis Seria Stiintele Vietii (Life Sciences Series)*, 21(4).
- [90] **Della Volpe, A., Ricci, G., Ralli, M., Gambacorta, V., Lucia, A., Minni, A., ve ark.** (2019). The effects of oral supplements with *Sambucus nigra*, Zinc, Tyndallized *Lactobacillus acidophilus* (H122), Arabinogalactans, vitamin D, vitamin E and vitamin C in otitis media with effusion in children: a randomized controlled trial. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 23(14), 6360-6370.
- [91] **Roxas, M. ve Jurenka, J.** (2007). Colds and influenza: a review of diagnosis and conventional, botanical, and nutritional considerations. *Alternative Medicine Review*, 12(1).
- [92] **Zakay-Rones, Z., Varsano, N., Zlotnik, M., Manor, O., Regev, L., Schlesinger, M. ve Mumcuoglu, M.** (1995). Inhibition of Several Strains of Influenza Virus in Vitro and Reduction of Symptoms by an Elderberry Extract (*Sambucus nigra* L.) during an Outbreak of Influenza B Panama. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 1(4), 361-369.
- [93] **Burge, B., Mumcuoglu, M. ve Simmons, T.** (1999). The effect of Sambucol on flu-like symptoms in chimpanzees: prophylactic and symptom-dependent treatment. *International Zoo News*, 16-19.
- [94] **Kinoshita, E., Hayashi, K., Katayama, H., Hayashi, T. ve Obata, A.** (2012). Anti-influenza virus effects of elderberry juice and its fractions. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 76(9), 1633-1638.

- [95] **Torabian, G., Valtchev, P., Adil, Q. ve Dehghani, F.** (2019). Anti-influenza activity of elderberry (*Sambucus nigra*). *Journal of functional foods*, 54, 353-360.
- [96] **Tiralongo, E., Wee, S. S. ve Lea, R. A.** (2016). Elderberry Supplementation Reduces Cold Duration and Symptoms in Air-Travellers: A Randomized, Double-Blind Placebo-Controlled Clinical Trial. *Nutrients*, 8(4), 182.
- [97] **Gracián-Alcaide, C., Maldonado-Lobón, J. A., Ortiz-Tikkakoski, E., Gómez-Vilchez, A., Fonollá, J., López-Larramendi, J. L., ve ark.** (2020). Effects of a Combination of Elderberry and Reishi Extracts on the Duration and Severity of Respiratory Tract Infections in Elderly Subjects: A Randomized Controlled Trial. *Applied Sciences*, 10(22), 8259.
- [98] **Salvador, Â. C., Król, E., Lemos, V. C., Santos, S. A. O., Bento, F. P. M. S., Costa, C. P., ve ark.** (2017). Effect of Elderberry (*Sambucus nigra* L.) Extract Supplementation in STZ-Induced Diabetic Rats Fed with a High-Fat Diet. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 13.
- [99] **Gray, A. M., Abdel-Wahab, Y. H. ve Flatt, P. R.** (2000). The traditional plant treatment, *Sambucus nigra* (elder), exhibits insulin-like and insulin-releasing actions in vitro. *The Journal of nutrition*, 130(1), 15-20.
- [100] **Farrell, N. J., Norris, G. H., Ryan, J., Porter, C. M., Jiang, C. ve Blesso, C. N.** (2015). Black elderberry extract attenuates inflammation and metabolic dysfunction in diet-induced obese mice. *British Journal of Nutrition*, 114(8), 1123-1131.
- [101] **Farrell, N., Norris, G., Lee, S. G., Chun, O. K. ve Blesso, C. N.** (2015). Anthocyanin-rich black elderberry extract improves markers of HDL function and reduces aortic cholesterol in hyperlipidemic mice. *Food & function*, 6(4), 1278-1287.
- [102] **Bhattacharya, S., Christensen, K. B., Olsen, L. C., Christensen, L. P., Grevsen, K., Færgeman, N. J., ve ark.** (2013). Bioactive components from flowers of *Sambucus nigra* L. increase glucose uptake in primary porcine myotube cultures and reduce fat accumulation in *Caenorhabditis elegans*. *J Agric Food Chem*, 61(46), 11033-11040.
- [103] **Chrubasik, C., Maier, T., Dawid, C., Torda, T., Schieber, A., Hofmann, T. ve Chrubasik, S.** (2008). An observational study and quantification of the actives in a supplement with *Sambucus nigra* and *Asparagus officinalis* used for weight reduction. *Phytotherapy Research*, 22(7), 913-918.
- [104] **Davis, P. H.** (1972). *Sambucus* L. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* Cilt 4, ss. 542-543): Edinburgh University Press.
- [105] **OHAUS. Moisture Analyzer MB35.** 06/04/2024, <https://us.ohaus.com/en-us/products/balances-scales/moisture-analyzers/mb35/moisture-analyzer-mb35-am>
- [106] **Singleton, V. L. ve Rossi, J. A.** (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*, 16(3), 144-158.
- [107] **Woisky, R. G. ve Salatino, A.** (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J Apic Res*, 37(2), 99-105.
- [108] **The United States Pharmacopeial Convention.** (2024). <1225> Validation of Compendial Procedures. *United States Pharmacopeia*. Rockville, MD: USP-NF.

- [109] Goiffon, J.-P., Mouly, P. P. ve Gaydou, E. M. (1999). Anthocyanic pigment determination in red fruit juices, concentrated juices and syrups using liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 382(1), 39-50.
- [110] Süntar, İ. (2011) *Türkiye'de halk arasında yara iyileştirici amaçla kullanılan bazı bitkilerin aktiviteleri üzerinde araştırmalar*: Gazi Üniversitesi.
- [111] Turgut, R., Kartal, M., Küpeli Akkol, E., Demirbolat, İ. ve Taştan, H. (2021). Development of cholesterol-lowering and detox formulations using bentonite and herbal ingredients. *Front Pharmacol*, 12.
- [112] Bacak, E. (2010) *Yağlı diyet ile beslenen sıçanlarda timokinonun plazma leptin, karnitin, paraoksanaz, tiroid hormonları, insülin ve glikoz ile lipid profiline etkilerinin araştırılması* (Doctoral thesis). Afyon Kocatepe University.
- [113] Bustanji, Y., Mohammad, M., Hudaib, M., Tawaha, K., Al-Masri, I. M., AlKhatib, H. S., ve ark. (2011). Screening of some medicinal plants for their pancreatic lipase inhibitory potential. *Jordan J Biol Sci*, 4(2), 81-88.
- [114] Jo, Y. H., Kim, S. B., Liu, Q., Do, S.-G., Hwang, B. Y. ve Lee, M. K. (2017). Comparison of pancreatic lipase inhibitory isoflavonoids from unripe and ripe fruits of *Cudrania tricuspidata*. *PLoS One*, 12(3), e0172069.
- [115] Zhang, J., Kang, M.-J., Kim, M.-J., Kim, M.-E., Song, J.-H., Lee, Y.-M. ve Kim, J.-I. (2008). Pancreatic lipase inhibitory activity of *Taraxacum officinale* *in vitro* and *in vivo*. *Nutr Res Pract*, 2(4), 200.
- [116] Státní zemědělská a potravinářská inspekce. (2004). Determination of vitamin C in beverages, fruits and vegetables by HPLC/UV method (accredited SZPI method A/11, ČSN EN 14130).
- [117] Abdramanov, A., Massanyi, P., Sarsembayeva, N., Usenbayev, A., Alimov, J. ve Tvrdá, E. (2017). The *in vitro* effect of elderberry (*Sambucus nigra*) extract on the activity and oxidative profile of bovine spermatozoa. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 6(6), 1319-1322.
- [118] Baysan, G., Husemoglu, R. B. ve Havitçioğlu, H. (2020). Cytotoxic effects of hawthorn and elderberry extracts on 3T3 fibroblast cell line. *Journal of Medical Innovation and Technology*, 2(1), 85-91.
- [119] Banach, M., Khaidakov, B., Korewo, D., Weşierska, M., Cyplik, W., Kujawa, J., ve ark. (2021). The Chemical and Cytotoxic Properties of *Sambucus nigra* Extracts—A Natural Food Colorant. *Sustainability*, 13(22), 12702.
- [120] Palomino, O., García-Aguilar, A., González, A., Guillén, C., Benito, M. ve Goya, L. (2021). Biological actions and molecular mechanisms of *Sambucus nigra* L. in neurodegeneration: A cell culture approach. *Molecules*, 26(16), 4829.
- [121] Ferreira-Santos, P., Nogueira, A., Rocha, C. M., Wilson, C. P., Teixeira, J. A. ve Botelho, C. (2022). *Sambucus nigra* flower and berry extracts for food and therapeutic applications: Effect of gastrointestinal digestion on *in vitro* and *in vivo* bioactivity and toxicity. *Food & Function*, 13(12), 6762-6776.
- [122] Ferreira-Santos, P., Badim, H., Salvador, Â. C., Silvestre, A. J., Santos, S. A., Rocha, S. M., ve ark. (2021). Chemical characterization of *Sambucus nigra* L. flowers aqueous extract and its biological implications. *Biomolecules*, 11(8), 1222.
- [123] Vujanović, M., Zengin, G., Đurović, S., Mašković, P., Cvetanović, A. ve Radojković, M. (2019). Biological activity of extracts of traditional wild medicinal plants from the Balkan Peninsula. *South African Journal of Botany*, 120, 213-218.

- [124] **Pereira, D. I., Amparo, T. R., Almeida, T. C., Costa, F. S. F., Brandão, G. C., Santos, O. D. H. d., ve ark.** (2022). Cytotoxic activity of butanolic extract from *Sambucus nigra* L. flowers in natura and vehiculated in micelles in bladder cancer cells and fibroblasts. *Natural product research*, 36(4), 1100-1104.
- [125] **Ghanbari, A., Roshankhah, S., Salahshoor, M. R., Jalili, C. ve Esmaeli, M.** (2022). Targeting Mitochondrial-Nuclear Apoptotic Signaling Pathways, Metabolic Pathways and Reversal of Doxorubicin (DOX) Cell Resistance in MCF-7 and MDA-MB-231 Cancer Cell Lines by *Sambucus nigra* (SNA). *Archives of Breast Cancer*, 83-95.
- [126] **da Silva, R. F., Barreira, J. C., Heleno, S. A., Barros, L., Calhelha, R. C. ve Ferreira, I. C.** (2019). Anthocyanin profile of elderberry juice: A natural-based bioactive colouring ingredient with potential food application. *Molecules*, 24(13), 2359.
- [127] **Milagro, F. I., Campión, J. ve Martínez, J. A.** (2006). Weight gain induced by high-fat feeding involves increased liver oxidative stress. *Obesity*, 14(7), 1118-1123.
- [128] **Yang, J.-Y., Lee, S.-J., Park, H.-W. ve Cha, Y.-S.** (2006). Effect of genistein with carnitine administration on lipid parameters and obesity in C57Bl/6J mice fed a high-fat diet. *J Med Food*, 9(4), 459-467.
- [129] **Chilliard, Y., Bonnet, M., Delavaud, C., Faulconnier, Y., Leroux, C., Djiane, J. ve Bocquier, F.** (2001). Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. *Domest Anim Endocrinol*, 21(4), 271-295.
- [130] **Houseknecht, K. L., Baile, C. A., Matteri, R. L. ve Spurlock, M. E.** (1998). The biology of leptin: a review. *J Anim Sci*, 76(5), 1405-1420.
- [131] **Trayhurn, P., Hoggard, N., Mercer, J. ve Rayner, D.** (1999). Leptin: fundamental aspects. *Int J Obes*, 23(1), S22-S28.
- [132] **Schwartz, M. W. ve Seeley, R. J.** (1997). Neuroendocrine responses to starvation and weight loss. *N Engl J Med*, 336(25), 1802-1811.
- [133] **Kelly, G.** (2000). Peripheral metabolism of thyroid hormones: a review. *Altern Med Rev*, 5(4), 306-306.
- [134] **Kaneko, J. J.** (1997). Chapter 21 - Thyroid Function. İçinde J.J. Kaneko, J.W. Harvey, M.L. Bruss, (Ed.), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals (Fifth Edition)* ss. 571-588). San Diego: Academic Press.
- [135] **Ortega, E., Pannacciulli, N., Bogardus, C. ve Krakoff, J.** (2007). Plasma concentrations of free triiodothyronine predict weight change in euthyroid persons. *Am J Clin Nutr*, 85(2), 440-445.
- [136] **Aslan, K., Serdar, Z. ve Tokullugil, H. A.** (2004). Multifonksiyonel hormon: leptin. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 30(2), 113-118.
- [137] **Benvenga, S. ve Robbins, J.** (1998). Thyroid hormone efflux from monolayer cultures of human fibroblasts and hepatocytes. Effect of lipoproteins and other thyroxine transport proteins. *Endocrinology*, 139(10), 4311-4318.
- [138] **Everts, M., Lim, C., Moerings, E., Docter, R., Visser, T., De Jong, M., ve ark.** (1995). Effects of a furan fatty acid and indoxyl sulfate on thyroid hormone uptake in cultured anterior pituitary cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 268(5), E974-E979.
- [139] **Brito, P., Ramos, C., Passos, M. ve Moura, E.** (2006). Adaptive changes in thyroid function of female rats fed a high-fat and low-protein diet during gestation and lactation. *Braz J Med Biol Res*, 39, 809-816.

- [140] Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R. E., Lee, G. H., Zhang, Y., ve ark. (1995). Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med*, 1(11), 1155-1161.
- [141] Noriega-López, L., Tovar, A. R., Gonzalez-Granillo, M., Hernández-Pando, R., Escalante, B., Santillán-Doherty, P. ve Torres, N. (2007). Pancreatic Insulin Secretion in Rats Fed a Soy Protein High Fat Diet Depends on the Interaction between the Amino Acid Pattern and Isoflavones*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(28), 20657-20666.
- [142] Noyan, A. (1993). *Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji*. İstanbul: Meteksan Yayın Evi.
- [143] Future Market Insights. **Elderberry Supplements Market Outlook (2023 to 2033)**. <https://www.futuremarketinsights.com/reports/elderberry-supplements-market>
- [144] Skowrońska, W., Granica, S., Piwowarski, J. P., Jakupović, L., Zovko Končić, M. ve Bazylko, A. (2024). Wound healing potential of extract from *Sambucus nigra* L. leaves and its fractions. *Journal of Ethnopharmacology*, 320, 117423.

EKLER

EK A: Etik kurul onayı



EK A



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Şeyma ULUSOY

Doğum Tarihi ve Yeri :

E-posta :

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2020, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2020-(Devam ediyor) Araştırma Görevlisi, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR VE SUNUMLAR:

- **Ulusoy, Ş., İnal, E., Küpeli Akkol, E., Çiçek, M., Kartal, M., & Sobarzo-Sánchez, E.** (2024). Evaluation of the anti-obesity effect of *Sambucus nigra* L. (elderberry) and *Vitex agnus-castus* L. (chasteberry) extracts in high-fat diet-induced obese rats. *Frontiers in Pharmacology*. 15, 1410854, doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1410854>
- **Ulusoy, Ş., İnal, E., Özdemir Nath, E., Abudayyak, M., & Kartal, M.** (2023). Phenolic content determination by LC-HRMS and cytotoxicity assessment of *Sambucus nigra* leaf, flower and fruit extracts. *Trends in Natural Product Research - Phytochemical Society of Europe (PSE) Young Scientists' Meeting*, June 28-30, Paris, France.

DİĞER YAYINLAR VE SUNUMLAR:

- **Algın Yapar, E., Gökçe, E. H., Şahiner, A., İnal, E., Ulusoy, Ş., Souto, E. B., Akanoğlu, B., & Kartal M.** (2024). Development of phytoactive essential oils-composed organogels against oral pathogens. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 97, 105778.
- **Demirbolat, I., Ulusoy, Ş., İnal, E., & Kartal, M.** (2023). Variations in essential oil compositions and biological activities of *Artemisia annua* L. (sweet wormwood) at different growth periods. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 26(4), 1008-1017.

- **İnal, E., Nath, E. O., Abudayyak, M., Ulusoy, Ş., İnan, H. A., Çiçek, M., & Kartal, M.** (2023). Chemical composition of different parts of the *Vitex agnus-castus* L. essential oils and their in-vitro cytotoxic activities. *Records of Natural Products*, 17(5), 904-917.
- **Demirbolat, I., Inal, E., Ulusoy, Ş., & Kartal, M.** (2022). Variations in chemical compositions and biological activities of *Artemisia vulgaris* L. (common mugwort) essential oils at different growth stages. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 25(2), 393-402.
- **Inal, E., Ulusoy, Ş., Yapar, E. A., Gürer, E. S., Yalçın, Ş., & Kartal, M.** (2022). Investigation of resveratrol and phenolic compounds of ethnomedicinal plant *Polygonum cognatum* Meissn. collected from Sivas. *Journal of Research in Pharmacy*, 26(6), 1752-1757.
- **Kartal, M., Ulusoy, Ş., & İnal, E.** (2022). Bitkisel Droglarda Kalite Kontrol. Rüyeyde Tunçtürk (Ed.), *Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Fonksiyonel Kullanım Alanları Ticareti ve Sürdürülebilirliği* (s. 183-219), Ankara: İksad Yayınevi.
- **Ulusoy, Ş., Kartal, M., & İnal, E.** (2021). Alzheimer Hastalığı ve Doğal Kaynaklı Bileşikler. *Türk Farmakope Dergisi*, 6(2), 56-74.
- **İnal, E., Kartal, M., & Ulusoy, Ş.**, (2021). Pektinin Kimyasal Yapısı, Özellikleri ve Ekonomik Önemi: Eczacılık ve Kozmetikte Kullanımı. *Türk Farmakope Dergisi*, 6(3), 29-44.
- **Algın Yapar, E., Gökçe, E. H., İnal, E., Ulusoy, Ş., Çankaya, İ. İ., & Kartal, M.** (2024). Design of a Burn Treatment Ointment Containing Herbal Bioactives. *Tashkent International Congress on Modern Sciences-III* (pp.245), April 22-23, Tashkent, Uzbekistan.
- **İnal, E., Ulusoy, Ş., Özdemir Nath, E., Abudayyak, M., & Kartal, M.** (2023). Phenolic content determination by LC-HRMS and cytotoxicity assesment of *Vitex agnus-castus* fruit, flower and leaf extracts. *Trends in Natural Product Research - Phytochemical Society of Europe (PSE) Young Scientists' Meeting*, June 28-30, Paris, France.
- **Kartal, M., İnal, E., Ulusoy, Ş., Özdemir Nath, E., & Abudayyak, M.** (2023). Chemical content determination by GC-FD/MS and cytotoxicity assesment of *Vitex agnus-castus* fruit, flower and leaf essential oils. *Trends in Natural Product Research - Phytochemical Society of Europe (PSE) Young Scientists' Meeting*, June 28-30, Paris, France.