

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ROSMARİNUS TÜRLERİNDE BULUNAN BAZI DİTERPENÖİD
BİLEŞİKLERİN PLAZMADA SIVI KROMATOĞRAFİK ANALİZLERİ VE
BİYOYARARLANIMLARININ İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Burhan CEYLAN

Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Anabilim Dalı

Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Doktora Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şerife Evrim TEKKELİ

ARALIK 2021

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ROSMARINUS TÜRLERİNDE BULUNAN BAZI DİTERPENOID
BİLEŞİKLERİN PLAZMADA SIVI KROMATOĞRAFİK ANALİZLERİ VE
BİYOYARALANIMLARININ İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

**Burhan CEYLAN
(175312006)**

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

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şerife Evrim TEKKELİ

ARALIK 2021

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 175312006 numaralı Doktora Öğrencisi "Burhan CEYLAN", ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "ROSMARİNUS TÜRLERİNDE BULUNAN BAZI DİTERPENOID BİLEŞİKLERİN PLAZMADA SIVI KROMATOĞRAFİK ANALİZLERİ VE BİYOYARARLANIMLARININ İNCELENMESİ" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Şerife Evrim TEKKELİ**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

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

Prof. Dr. Murat KARTAL
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Prof. Dr. Sıdıka TOKER
İstanbul Üniversitesi

Prof. Dr. Armağan ÖNAL
İstanbul Üniversitesi

Teslim Tarihi : 13.12.2021

Savunma Tarihi : 8.12.2021



Sevgili Aileme ve Yeğenim Defne'ye,

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim boyunca bilgi birikiminden ve tecrübelerinden her daim yararlandığım, tez çalışmam sırasında gerek pratik gerek teorik bilgisiyle, büyük bir sabır ve titizlikle bana yardımcı olan, her konuda anlayış ve hoşgörüsüyle güvenini her daim hissettiğim, farklı bakış açılarıyla ufkumu ve kendimi geliştirmemi sağlayan çok kıymetli danışmanım hocam sayın Prof. Dr. Şerife Evrim TEKKELİ'ye içtenlikle minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Doktora ders döneminden bu yana üstün bilgi birikimini benimle paylaşan, doktora yeterlilik sınavımda ve tez izleme jürilerimde engin deneyimleri ve bilgisi ile destek olan değerli AD Başkanı hocam sayın Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin deneysel kısmında kullandığım ekstrelerin hazırlanması aşamasında yardımını esirgemeyen Bezmialem Vakıf Üniversitesi Fitoterapi Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürü Prof. Dr. Murat KARTAL'a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan, desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen Arş. Gör. Dr. Gizem TIRIS'a sonsuz teşekkür ederim.

Birbirimize her zaman destek olduğumuz ve aynı yolda ilerlediğimiz arkadaşlarım Arş. Gör. Dilhe Nur ÇİM'e, Gözde Gülin DALTABAN İNAN'a ve Şeyma CEYLAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Sabır ve emekle beni en iyi koşullarda büyütüp bugünlere gelmemi sağlayan, maddi ve manevi destekleri ile hep yanımda olan başta annem ve babam Münevver-Raif CEYLAN'a, ablam Burcu CEYLAN'a, kardeşim Buket CEYLAN'a, halam Nebiye CEYLAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından 202023 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Aralık 2021

Burhan Ceylan
(Yüksek Kimyager)

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.

Burhan Ceylan

İmza

XXXXXX

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	iv
BEYAN.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	ix
TABLO LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
ÖZET.....	xii
SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Botanik Bilgiler	3
2.1.1 Bitkinin sistematik sınıflandırılması	3
2.1.2 Lamiaceae (Labiatae) familyası	3
2.1.3 <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	4
2.2 Fitokimyasal Bilgiler	6
2.2.1 Sekonder metabolitler	6
2.2.2 Terpenler	7
2.1.3 Diterpenler	9
2.3 Biyolojik Aktivite Bilgileri	11
2.3.1 Antioksidan aktivite	11
2.3.2 Antimikrobiyal aktivite	12
2.3.3 Anti-enflamatuvar etkisi	13
2.3.4 Analjezik etkisi	14
2.3.5 Asetilkolinesteraz (AChE) enzimi üzerine etkisi	14
2.3.6 Antidepresan etkisi	15
2.3.7 Nöroprotektif etkisi	16
2.4 Analiz Yöntemleri	16
2.5 Farmakokinetik Çalışmalar	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler, Ekstraktlar, Cihazlar ve Ekipman	20
3.1.1 Kimyasal maddeler ve çözücüler	20
3.1.2 Çözeltiler	20
3.1.2.1 Hareketli faz çözeltileri	20
3.1.2.2 Standart çözeltiler	21

3.1.3 Ekstreler	22
3.1.4 Aletler ve diğer gereçler	22
3.2 Plazmadan Analitlerin Ekstre Edilmesi İşlemi	23
3.3 Karnosol ve Karnosik Asidin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Analizi	24
3.3.1 Kromatografik koşulların belirlenmesi	24
3.4 Yöntem Validasyonu	24
3.4.1 Seçicilik	25
3.4.2 Tayin ve gözlenebilme sınırı	25
3.4.3 Doğrusallık	25
3.4.3.1 Karnosol analizi için doğrusallık	25
3.4.3.2 Karnosik asit analizi için doğrusallık	25
3.4.4 Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik	26
3.4.4.1 Karnosol analizi için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik	26
3.4.4.2 Karnosik asit analizi için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik	26
3.4.5 Doğruluk	26
3.4.5.1 Karnosol analizi için doğruluk	26
3.4.5.2 Karnosik asit analizi için doğruluk	27
3.4.6 Sağlamlık	27
3.4.7 Çözelti stabilitesi	27
3.5 Kromatogram Üzerinde Belirlenen Karnosol ve Karnosik Asit Maddelerinin Yapılarının Aydınlatılması	28
3.6 Biyoyararlanım ve Farmakokinetik Çalışmalar	28
3.6.1 Karnosolun ve karnosik asidin biyoyararlanımının ve farmakokinetiğinin incelenmesi	28
4. BULGULAR	29
4.1 Karnosolun ve Karnosik Asidin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) İle Yapılan Analizlerine Ait Sonuçlar	29
4.1.1 Plazmadan ekstraksiyon işlemi	29
4.2 Kromatografik Koşulların Belirlenmesi	30
4.2.1 Dedeksiyonun belirlenmesi	30
4.2.2 Kromatografik ayırma koşullarının belirlenmesi	30
4.2.3 Kromatografik sistem parametreleri	32
4.3 Yöntem Validasyonu	32
4.3.1 Seçicilik	32
4.3.1.1 Karnosol analizi için seçicilik	32
4.3.1.2 Karnosik asit analizi için seçicilik	33
4.3.2 Tayin sınırı (LOQ) ve gözlenebilme sınırı (LOD)	33
4.3.2.1 Karnosol için tayin sınırı (LOQ) ve gözlenebilme sınırı (LOD)	33
4.3.2.2 Karnosik asit için tayin sınırı (LOQ) ve gözlenebilme sınırı (LOD)	33
4.3.3 Doğrusallık	34
4.3.3.1 Karnosol analizi için doğrusallık	34
4.3.3.2 Karnosik asit analizi için doğrusallık	35
4.3.4 Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik	36
4.3.4.1 Karnosol analizi için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik	36
4.3.4.2 Karnosik asit analizi için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik	37
4.3.5 Doğruluk	37
4.3.5.1 Karnosol analizi için doğruluk	37
4.3.5.2 Karnosik asit analizi için doğruluk	38

4.3.6 Sağlamlık	38
4.3.6.1 Karnosol analizi için sağlamlık	38
4.3.6.2 Karnosik asit analizi için sağlamlık	39
4.3.7 Çözelti stabilitesi	39
4.3.7.1 Karnosol analizi için çözelti stabilitesi	39
4.3.7.2 Karnosik asit analizi için çözelti stabilitesi	40
4.4 Farmakokinetik Çalışma Sonuçları	40
4.5 Kromatogram Üzerinde Belirlenen Karnosol ve Karnosik Asit Maddelerinin Yapılarının Aydınlatılması	41
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	45
KAYNAKLAR	48
EKLER.....	53
ÖZGEÇMİŞ	57



KISALTMALAR

AChE	: Asetilkolinesteraz
AFB₁	: Aflatoksin B ₁
AUC	: Konsantrasyon-zaman Eğrisinin Altındaki Alan
BHA	: Bütilendirilmiş Hidroksi Anisol
BHT	: Bütilendirilmiş Hidroksi Toluen
CCl₄	: Karbon Tetraklorür
CZE	: Kapiler Zon Elektroforezi
DAD	: Diyot Dizi Dedektörü
DMAPP	: Dimetil Allil Fosfat
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DPPH•	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
ESI-HRMS	: Yüksek Çözünürlüklü Elektrosprey İyonizasyon Kütle Spektrometrisi
FPP	: Farnesil Pirofosfat
FST	: Zorla Yüzme Testi
FT-IR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GGPP	: Geranil-geranil Pirofosfat
GPP	: Geranil Pirofosfat
HETP	: Teorik Plakaya Eşdeğer Yükseklik
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPLC-ELSD	: Buharlaştırılabilir Işık Saçılımı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPLC-UV	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Ultraviyole
ICH	: Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu
IPP	: İzopentil Pirofosfat
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografisi – Tandem Kütle Spektrometrisi
LOD	: Gözlenebilme Sınırı
LOQ	: Tayin Sınırı
MIC	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
MS	: Kütle Spektrometresi
PLE	: Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu
RP-HPLC	: Ters Fazlı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
RSD	: Bağlı Standart Sapma
SD	: Standart Sapma
SFE	: Süperkritik Sıvı Ekstraksiyonu
UHPLC-MS/MS	: Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi – Tandem Kütle Spektrometrisi
UPLC-MS/MS	: Ultraperformanslı Sıvı Kromatografisi – Tandem Kütle Spektrometrisi
UV	: Ultraviyole
WEPO	: Su Ekstraksiyonu ve Parçacık Oluşumu

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1 : Terpenlerin sınıflandırılması.	8
Tablo 3.1 : Plazmadan analitlerin ekstraksiyonu için denenen sıvı-sıvı ekstraksiyon sistemleri.	23
Tablo 4.1 : Hareketli faz gradient elüsyonu programı.	31
Tablo 4.2 : Karnosolun 1-20 ng/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alanı değerleri ve istatistik veriler.	34
Tablo 4.3 : Karnosol için ölçü eğrilerinin regrasyon analizlerine ait parametreler.	35
Tablo 4.4 : Karnosik asidin 0,25-8 ng/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alanı değerleri ve istatistik veriler.	36
Tablo 4.5 : Karnosik asit ölçü eğrilerinin regrasyon analizlerine ait parametreler.	36
Tablo 4.6 : Karnosol için aynı gün içinde ve farklı günlerde yapılan analizlerin tekrarlanabilirliği.	36
Tablo 4.7 : Karnosik asit için aynı gün içinde ve farklı günlerde yapılan analizlerin tekrarlanabilirliği.	37
Tablo 4.8 : Karnosol için standart katma yöntemine ait analiz sonuçları.	38
Tablo 4.9 : Karnosik asit için standart katma yöntemine ait analiz sonuçları.	38
Tablo 4.10 : Karnosol için sağlamlık çalışması sonuçları.	39
Tablo 4.11 : Karnosik asit için sağlamlık çalışması sonuçları.	39
Tablo 4.12 : Karnosol standart çözeltilerine ait stabilite sonuçları.	40
Tablo 4.13 : Karnosik asit standart çözeltilerine ait stabilite sonuçları.	40
Tablo 4.14 : 1000 mg biberiye ekstresinin uygulanmasından sonra karnosolun farmakokinetik parametreleri.	40
Tablo 4.15 : 1000 mg biberiye ekstresinin uygulanmasından sonra karnosik asidin farmakokinetik parametreleri.	41

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	: <i>Rosmarinus officinalis</i> L. bitkisinin Türkiye’de bulunduğu bölgeler. ...	5
Şekil 2.2	: Dalı ve çiçeği ile görünen <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	5
Şekil 2.3	: Sekonder metabolitlerin biyosentezi.	7
Şekil 2.4	: İzopren birimlerinin birleşme şekilleri.	8
Şekil 2.5	: Terpenlerin biyosentezi.	9
Şekil 2.6	: En yaygın diterpen iskeletleri.	10
Şekil 2.7	: <i>Rosmarinus türlerinde</i> bulunan önemli diterpenler.	10
Şekil 4.1	: Plazmadan ekstraksiyon işlemi.	29
Şekil 4.2	: Karnosolun etanol çözeltisinin uv-görünür bölgede gözlenen absorpsiyon spektrumu.	30
Şekil 4.3	: Karnosik asidin etanol çözeltisinin uv-görünür bölgede gözlenen absorpsiyon spektrumu.	30
Şekil 4.4	: a:sulu ortam boş deneme, b:10 ng/mL standart karnosol çözeltisi ve c:boş plazma numunesi, d: 5 ng/mL karnosol eklenmiş plazma numunesi, e: t _{maks} süresine ait içilmiş plazma numunesi.	32
Şekil 4.5	: a:sulu ortam boş deneme, b:2 ng/mL standart karnosik asit çözeltisi ve c:boş plazma numunesi, d:2 ng/mL karnosik asit eklenmiş plazma numunesi, e: t _{maks} süresine ait içilmiş plazma numunesi.	33
Şekil 4.6	: Karnosolun 1-20 ng/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi.	34
Şekil 4.7	: Karnosik asidin 0,25-8 ng/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi.	35
Şekil 4.8	: Retansiyon zamanında toplanan karnosol fraksiyonunun LC-MS/MS spektrumu.	42
Şekil 4.9	: Retansiyon zamanında toplanan karnosik asit fraksiyonunun LC-MS/MS spektrumu.	42
Şekil 4.10	: Retansiyon zamanında toplanan karnosol fraksiyonunun FT-IR spektrumu.	43
Şekil 4.11	: Retansiyon zamanında toplanan karnosik asit fraksiyonunun FT-IR spektrumu.	43

ROSMARINUS TÜRLERİNDE BULUNAN BAZI DİTERPENÖİD BİLEŞİKLERİN PLAZMADA SIVI KROMATOĞRAFİK ANALİZLERİ VE BİYOYARARLANIMLARININ İNCELENMESİ

ÖZET

Bu çalışmada başta antikarsinojenik etki olmak üzere çok çeşitli tıbbi etkileri olduğuna dair bilimsel çalışmalar bulunan, başta *Rosmarinus türleri* olmak üzere Lamiaceae familyasından değişik türlerde de var olan karnosol ve karnosik asit adlı iki diterpenoid bileşiğin insan plazmasında miktar tayini yapılabilmesini sağlayan her iki bileşik için yeni birer yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) metodu geliştirilmiştir. Bu amaçla plazma numunelerinden sıvı sıvı ekstraksiyon tekniği ile ekstre edilen maddeler; karnosol için ters faz kromatografisi, C18 (250 mm × 4,6 mm × 5 µm) kolon ve metanol-%2 o-fosforik asit karışımından oluşan bir mobil fazla gradient akış profili ve 1,2 mL/dk akış hızıyla, karnosik asit için ise C18 (150 mm × 4,6 mm × 5 µm) kolon ve metanol-%2 o-fosforik (90:10 (h/h)) asit karışımından oluşan bir mobil fazla izokratik akışta ve 1 mL/dk akış hızıyla ayrılmışlardır. Her iki bileşikte UV dedeksiyonda 230 nm de tayin edilmiştir. Geliştirilen yöntemler ICH kriterleri çerçevesinde seçicilik, doğruluk, kesinlik, gözlenebilme sınırı (LOD), tayin sınırı (LOQ), sağlamlık ve dayanıklılık bakımından valide edilmiştir. Karnosol ve karnosik asite ait yöntemlerin sırasıyla doğruluk sınırları 1-20 ng/mL ve 0,25-8 ng/mL, kalibrasyon sonucu elde edilen doğru denklemlerinin korelasyon katsayıları 0,9942 ve 0,9906'dır. Karnosole ve karnosik aside ait yöntemlerin gün içi ve günler arası kesinliklerini gösteren % RSD değerleri sırasıyla en fazla 5,71 ve 5,13'dür. Ayrıca, her iki bileşik de retansiyon zamanlarında preparatif HPLC kullanılarak toplanmış ve tandem kütle spektrometrik dedektörlü HPLC ve IR yöntemleriyle yapıları aydınlatılmıştır. Geliştirilen yöntemler sağlıklı gönüllü üzerinde *Rosmarinus officinalis* L. ekstresinin oral yolla verilmesinin ardından her iki bileşiğin farmakokinetik parametrelerinin (C_{maks} , t_{maks} , $t_{1/2}$ ve AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$) hesaplanmasında kullanılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Karnosol, karnosik asit, HPLC-UV, metod validasyonu, farmakokinetik

LIQUID CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF SOME DITERPENOID COMPOUNDS OF ROSMARINUS SPECIES IN PLASMA AND INVESTIGATION ON THEIR BIOAVAILABILITY

SUMMARY

In this study high performance liquid chromatographic (HPLC) methods have been developed in order to determine two diterpenoid compounds called carnosol and carnosic acid in human plasma, which are subjected to scientific studies due to mainly anticarcinogenic and other several medical effects and which are found in the species of Lamiaceae family but mainly in *Rosmarinus species*. For this purpose the analytes, that are extracted from plasma by liquid-liquid extraction technique, separated with reverse phase chromatography, C18 (250 mm × 4.6 mm × 5 µm) column and a mobile phase composed of methanol-%2 o-phosphoric acid using gradient elution profile with a flow rate 1.2 mL/min for carnosol and with C18 (150 mm × 4.6 mm × 5 µm) column and methanol-%2 o-phosphoric acid (90:10 (v/v)) mixture as mobile phase with isocratic flow and 1 mL/min flow rate for carnosic acid. Both of the analytes have been detected by UV detection at 230 nm. The developed methods have been validated according to ICH criteria in the terms of selectivity, accuracy, precision, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), robustness and stability. The linearity and the correlation coefficient of the linearity equation for carnosol and carnosic acid methods are 1-20 ng/mL and 0.25-8 ng/mL and 0.9942 and 0.9906, respectively. The RSD % values for carnosol and carnosic acid methods are 5.71 and 5.13, respectively. Additionally, both compounds have been collected by preparative HPLC and their qualitative analysis have been performed by LC - tandem mass spectrometry combination and IR spectrometry. The developed methods have been applied to healthy volunteer following oral administration of the extract of *Rosmarinus officinalis* L. and the methods have been used to determine the pharmacokinetic parameters such as C_{max} , t_{max} , $t_{1/2}$ and AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$.

Keywords: Carnosol, carnosic acid, HPLC-UV, method validation, pharmacokinetics

1. GİRİŞ

İnsanlığın varoluşundan bu yana, bitkilerin sağlık için kullanılmalarına ait kayıtlar söz konusudur. M.Ö. 1550’de yazılmış “Papyrus Ebers”, tıbbi ve aromatik bitkiler hakkında en önemli ve en eski belgedir. Papirüste bitkilerden ve hayvanlardan elde edilen 700 drog, 450 kadar hastalığın tedavisi için kullanılan 811 reçete kayıtlıdır. *Mentha x piperita* L. (nane), *Sinapis nigra* L. (siyah hardal), *Cassia acutifolia* L. (sinameki), *Papaver somniferum* L. (haşhaş), *Scilla maritima* L. (ada soğanı), *Datura stramonium* L. (tatula) gibi tıbbi bitkilerin kullanımları papirüste yer almaktadır. 1806’da *Papaver somniferum* L.’dan morfin alkaloidinin eldesi ile biyoaktif madde araştırmaları başlamış, ardından striknin, veratrin ve kinin alkaloidlerinin izole edilmesiyle de fitokimya çalışmalarında hızlı ilerlemeler kaydedilmiştir [1].

Dünya üzerinde beşyüzbin kadar bitki türü tanımlanıp isimlendirilmiştir. Türkiye’de ise üçte biri endemik olan 11400 kadar bitki türünden, 1000 kadarı tıbbi amaçla kullanılmakta ve bunlardan da Farmakopeye kayıtlı 200’den fazla bitki bulunmaktadır [2].

Lamiaceae (Ballıbabagiller) familyası 250 cins ve 6500 tür ile, endemik türleri açısından da önemli bir konumdaki ülkemizin hemen hemen her bölgesinde yetişen, ılıman ve tropikal iklimin hakim olduğu Ege ve Akdeniz Bölgelerinde iyi uyum gösteren çok geniş bir familyadır. Familya tıbbi ve aromatik bitki türlerinden adaçayı (*Salvia* spp.), kekik (*Thymus* spp.), nane (*Mentha* spp.), biberiye (*Rosmarinus* spp.), lavanta (*Lavandula* spp.), reyhan (*Ocimum* spp.) gibi bitkileri kapsamaktadır [3].

Lamiaceae (Labiatae) familyasının tıbbi ve aromatik bir bitkisi olan biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) ülkemizde Ege ve Akdeniz Bölgelerinde, 1000 m yüksekliklere kadar yayılış gösterir. *Rosmarinus officinalis* L. içerdiği sekonder metabolitler nedeniyle antikanser, antimikrobiyal, insektisit, antioksidan, nöroprotektif etki gibi birçok biyolojik aktivite göstermektedir [4,5].

Aynı zamanda aromaterapide çok değerli olan biberiye uçucu yağı (Oleum Rosmarini), ilaveten cilt bakım kremleri ve losyonların hazırlanmasında, diğer uçucu yağlarla karıştırılıp doğal parfüm yapımında da kullanılmaktadır [6].

Mentha, Salvia, Rosmarinus, Lepechinia, Oreganum ve *Thymus* cinslerinde bulunan karnosol, karnosik asit, rosmanol, izorosmanol, epirosmanol, rosmaridifenol ve rosmariguinon diterpen bileşiklerdir. Bu bileşikler antikanserojenik, antiadipojenik, yaşlanma önleyici, antienflamatuvar, nöroprotektif etkileri ile birlikte kozmetikte ve ağız sağlığında da kullanılmaktadır [7,8].

Bu çalışmada *Rosmarinus* türlerinde bulunan bazı diterpenoid bileşiklerin plazmada sıvı kromatografik analizleri için, ICH (Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu) kriterlerine uygun bir biyoanalitik metot geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Ardından da bu yeni yöntem ile, bir sağlıklı gönüllüye oral yolla *Rosmarinus officinalis* L. ekstresi uygulanarak alınan plazma örneklerinde karnosol ve karnosik asit miktar tayinleri yapılmış ve bu iki maddenin başlıca farmakokinetik parametreleri (C_{maks} , t_{maks} , $t_{1/2}$ ve AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$ gibi) hesaplanmıştır. Yapılan bu prototip biyoyararlanım ve farmakokinetik çalışma çerçevesinde yöntemin daha sonra bu maddeleri içeren preparatların ve ekstrelerin biyoeşdeğerlik, biyoyararlanım çalışmalarında, farmakokinetik araştırmalarda ve toksikolojik incelemelerde kullanılabilir olması hedeflenmektedir. Geliştirilmiş olan yöntem, biberiye ekstreleri, ilaç ve gıda etkileşimleri ile araştırmalar yapmaya da olanak sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Botanik Bilgiler

2.1.1 Bitkinin sistematik sınıflandırılması

Rosmarinus officinalis L. türünün sistematik sınıflandırılması şu şekildedir (plant. usda. gov. 2002):

Alem: Plantae

Bölüm: Spermatophyta

Alt Bölüm: Angiospermae

Sınıf: Dicotyledonae

Takım: Lamiales

Familya: Lamiaceae (Ballıbabagiller) / Labiatae

Alt Familya: Nepetoideae

Cins: *Rosmarinus* L.

Tür: *Rosmarinus officinalis* L.

2.1.2 Lamiaceae (Labiatae) familyası

Lamiaceae (Ballıbabagiller) familyası dünyada 250 cins ve 6500 tür ile, Türkiye’de ise 45 cins ve 574 tür, alt türler, varyeteler ve hibritler ile birlikte toplamda 763 takson ile temsil edilmektedir. Familya akdeniz ikliminin hakim olduğu yerler başta olmak üzere, Güney Amerika, Avustralya ve Güney Batı Asya’da yoğun bir şekilde yayılış göstermektedir [9].

Türkiye’de içerdiği takson sayısı bakımından en zengin üçüncü familyası olan Lamiaceae familyası % 44,5 endemizm oranı ile de önemli bir yere sahiptir. *Origanum* cinsinin 15’i endemik 23 türü, *Salvia* cinsinin 45’i endemik 90 türü, *Nepeta* cinsinin 14’ü endemik 33 türü, *Sideritis* cinsinin 41 türü ve 10 alt türü, *Teucrium*’un 27 türü ile Türkiye florasında yer almaktadır [2-10].

Bu familya; adaçayı (*Salvia* spp.), kekik (*Thymus* spp.), nane (*Mentha* spp.), mercanköşk (*Majorana* spp.), biberiye (*Rosmarinus* spp.), lavanta (*Lavandula* spp.), reyhan (*Ocimum* spp.) gibi tanınmış ve ekonomik öneme sahip bitkileri içermektedir. Ayrıca bu bitkiler süs bitkisi olarak da yetiştirilir ve baharat olarak da kullanılır [11].

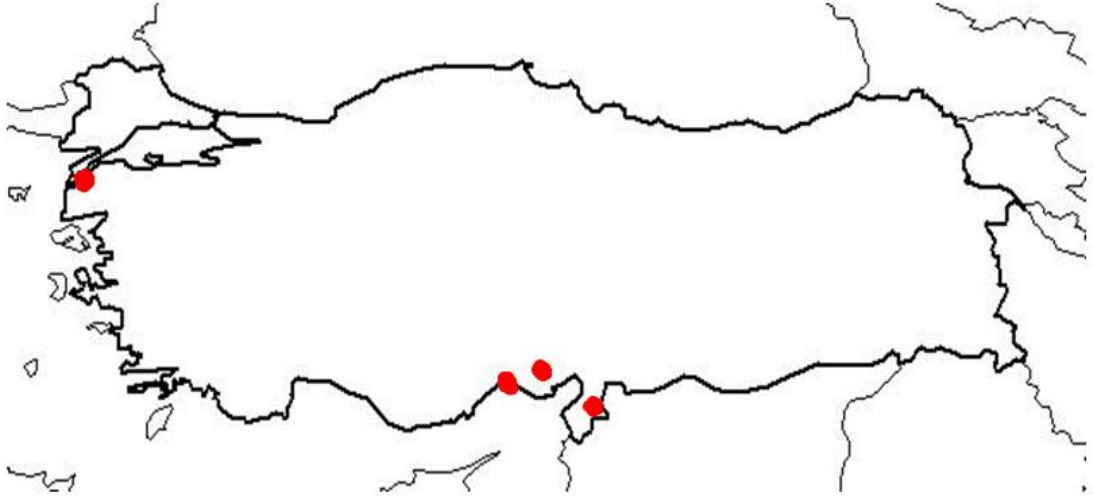
Ülkemizdeki etnobotanik kullanımının da oldukça yaygın olduğu Lamiaceae familyası, zengin sekonder metabolit içeriği sayesinde ve uçucu-aromatik yağlar içermesi sebebiyle; tıp, eczacılık, zirai mücadele ve kozmetik gibi alanlar başta olmak üzere, çeşitli sanayi dallarına (boya, dişmacunu, sakız vb) ve kimya sektörüne hammadde temininde de büyük öneme sahiptir [12].

Familyadaki bazı türlerin (oğul otu, nane, reyhan ve kekik) bağışıklık sistemini güçlendirici etkisi bulunmakta ve alzheimer, aids ve ülser tedavisinde rol oynamaktadır. *Melissa officinalis* L. (oğul otu), *Rosmarinus officinalis* L. (biberiye), *Origanum vulgare* L. (kekik), *Salvia fruticosa* L. (anadolu adaçayı) ve *Rhus coriaria* L. (sumak) ekstraktlarının yüksek potansiyelde antioksidan etkileri sebebiyle dejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanıldıkları yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır [13,14].

Lamiaceae familyası içeriğinde en çok diterpenler ve triterpenler olmak üzere, alkaloidler, fenolik bileşikler, flavonoidler, irodoidler bulunmaktadır. İçerdiği bu bileşikler sayesinde de önemli farmakolojik etkiler göstermektedir. *Salvia* türlerinden izole edilen bazı diterpenoidlerin antitümör özellik gösterdiği, *Mentha piperita* L. ekstraktlarının ülser oluşumunu engellediği, bazı *Sideritis* türlerinin otoimmün hastalıklarda etkili olduğu, *Thymus vulgaris* L. migren, sinir sistemi güçlüğü ve dolaşım sistemi bozukluğu hastalıklarında kullanıldığı yapılan çalışmalar sonucu bildirilmiştir [15,16].

2.1.3 *Rosmarinus officinalis* L.

Halk arasında biberiye, hasalbal, kuşdili ve akpüren isimleriyle de bilinen, Lamiaceae familyasına ait olan *Rosmarinus officinalis* L. (syn. *Rosmarinus officinalis* var. *prostratus* Hort.), 50-150 cm boyunda, her zaman yeşil kalan (Şekil 2.1), mavi ve mor renkli çiçekleri bulunan, çok yıllık odunsu bir bitkidir [2].



Şekil 2.1 : *Rosmarinus officinalis* L. bitkisinin Türkiye’de bulunduğu bölgeler.

Rosmarinus officinalis L.’yi teşhis edici özellikler; dalları dört köşeli, 50 cm uzunluğunda ve diktir. Yaprakları koyu yeşil, 10-25×1-2 mm uzunluğunda, alt kısmı tüylü ve gri yeşil renktedir. Yaprak ucu küttür. Yaprak ayası derimsi ve mızraksıdır. Kaliks 3-4 mm ve beyazdır. Çiçekleri mavi, mor, pembe ve eflatun (Şekil 2.2) rengindedir [17].

Hafıza arttırıcı etkisi olan biberiye, Antik Yunan ve Roma’da tıbbi ve gıda amaçlı olarak uzun yıllar kullanılmıştır. Hasta odalarının havasının arındırılmasında, idrar söktürücü olarak, yara tedavisinde, hazım sistemini uyarıcı olarak, romatizma ağrılarının hafifletilmesinde kullanılmaktadır. Biberiye yaprakları yemeklerde baharat olarak, uçucu yağı kozmetik ve parfümeride kullanılmaktadır [18].



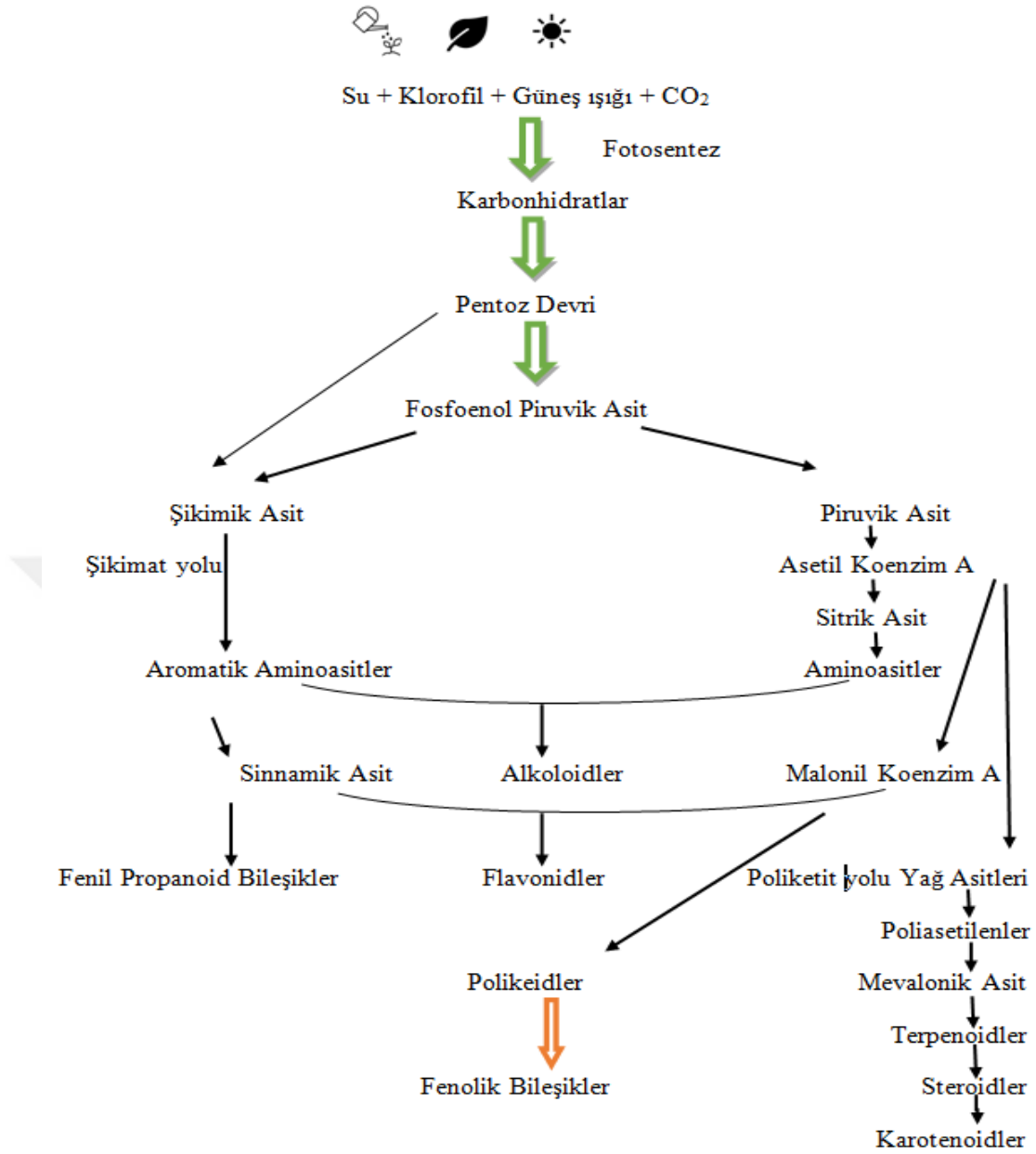
Şekil 2.2 : Dalı ve çiçeği ile görünen *Rosmarinus officinalis* L.

2.2 Fitokimyasal Bilgiler

2.2.1 Sekonder metabolitler

Primer metabolitler organizmanın tüm hücrelerinde bulunan, yaşamsal faaliyetler için gerekli olan; karbonhidratlar, lipitler, proteinler, nükleik asitler ve enzimler gibi canlının yapı taşı oluşturarak organik moleküllerden oluşur. Sekonder metabolitler ise bitkinin temel yaşamsal faaliyetleri ile doğrudan ilişkisi bulunmayan, buna karşılık bitkide savunma, ortama uyum sağlama, dış etkilere korunma, diğer bitkilerle haberleşme, nesillerini devam ettirme gibi özellikleri sağlayan bitkiler tarafından geliştirilmiş mekanizmaların ürünleridir [19].

Sekonder metabolitler başta ilaç yapımında hammadde olup, kozmetikte, gıda katkı maddesi olarak, zirai ilaç ve birçok farklı kimya sektöründe kullanılmaktadır. Sekonder metabolitler biyosentetik oluşumlarına üç büyük gruba ayrılırlar: terpenler ve steroidler, alkaloidler ve biyolojik aminler, flavonoidler ve diğer fenolik bileşikler [20].

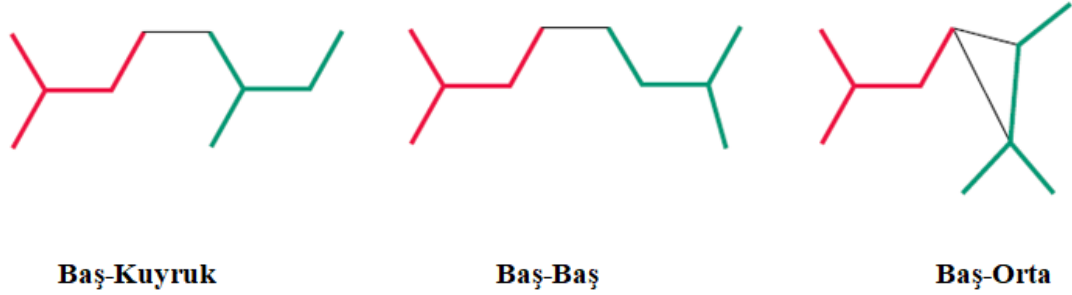


Şekil 2.3 : Sekonder metabolitlerin biyosentezi.

2.2.2 Terpenler

Sekonder metabolitlerin en geniş sınıfını temsil eden organik moleküller olan terpenler, başta bitkiler ve hayvanlardan elde edildiği gibi; algler, likenler ve bazı deniz canlılarından da elde edilirler. Terpen ismi, çam ağacı kozalağından elde edilen turpentin (reçine bileşiği) isminden türemiştir. Terpenler sadece hidrokarbonlardan oluşabileceği gibi, alkol, keton, aldehit ve asit grubu da taşıyabilirler. Oksijen içeren terpenler terpenoidler olarak isimlendirilir [21].

Terpenlerin biyosentezinde temel birim olan izopren (C_5H_8) üniteleri, mevalonik asitin (3-metil-3,5-dihidroksi pentanoik asit) karbondioksit ve su kaybetmesi sonucu oluşur. İzopren birimlerinin baş-kuyruk, baş-baş ve baş-orta (Şekil 2.4) şeklinde birleşmesi sonucu terpenler meydana gelmektedir [22].



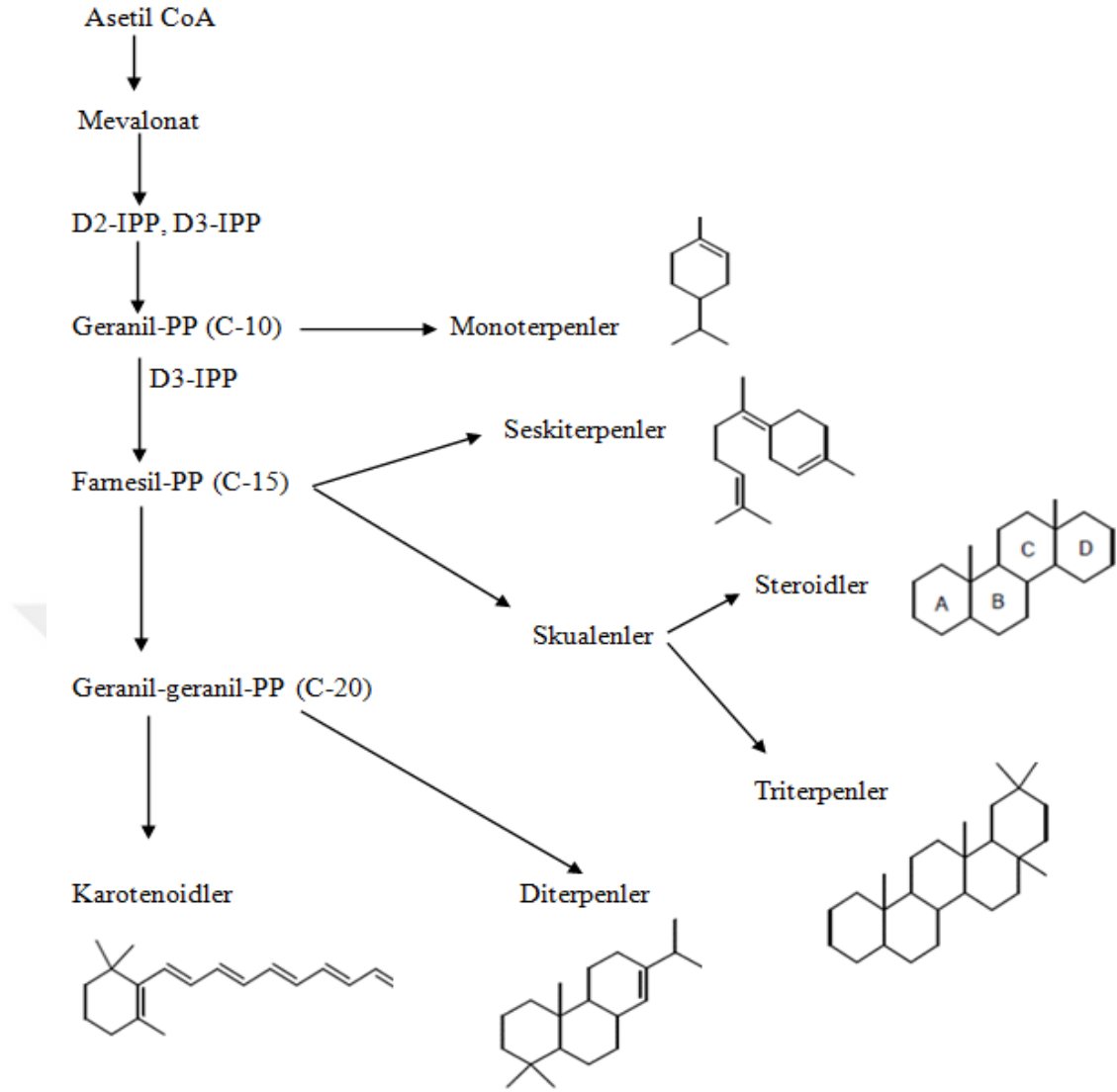
Şekil 2.4 : İzopren birimlerinin birleşme şekilleri.

Terpenler izopren birimlerinin sayısı ve büyüklüğüne göre hemiterpenler, monotерpenler, seskiterpenler, diterpenler, sesterpenler, triterpenler, tetraterpenler ve politerpenler (Tablo 2.1) şeklinde sınıflandırılırlar.

Tablo 2.1 : Terpenlerin Sınıflandırılması.

İzopren biriminin sayısı	Sınıfı	Karbon sayısı
1	Hemiterpenler	5
2	Monoterpenler	10
3	Seskiterpenler	15
4	Diterpenler	20
5	Sesterpenler	25
6	Triterpenler	30
8	Tetraterpenler	40
>8	Politerpenler	>40

Diğer doğal bileşiklerin sentezinde de başlangıç maddesi olarak Asetil koenzim A, terpenlerin sentezinde de kullanılmaktadır. Asetil koenzim A'nın kondenzasyonu sonucu oluşan mevalonik asitten (MVA) su ve karbondioksit çıkması sonucu izopentil pirofosfat (IPP) oluşur. İzopentil pirofosfatın (IPP) izomerizasyonu sonucu dimetil allil fosfat (DMAPP) oluşur. Bu iki bileşiğin birbiriyle olan kondenzasyonu sonucu geranil pifofosfat (GPP) yani monotерpenler oluşur. Farnesil pirofosfatın (FPP), izopentil pirofosfat (IPP) ile kondenzasyonu sonucu geranil-geranil pirofosfat (GGPP) yani diterpenler oluşur (Şekil 2.5) [22].

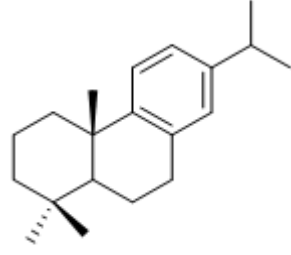


Şekil 2.5 : Terpenlerin biyosentezi.

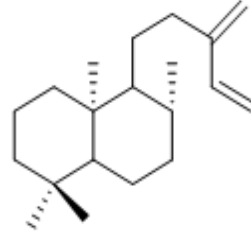
2.2.3 Diterpenler

$C_{20}H_{32}$ molekül formülüne sahip en basit diterpenler, dört izopren biriminden meydana gelmiş, geranil geranil pirofosfattan türemiş, terpenler içerisinde en geniş sınıfı oluşturmaktadır. Diterpenler, sekonder metabolitler içerisinde en fazla biyolojik aktiviteye sahiptirler [20].

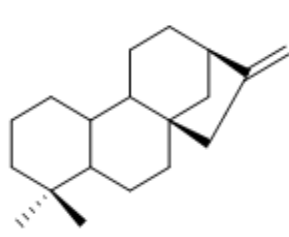
Diterpenler; asiklik diterpenler, monosiklik diterpenler, bisiklik diterpenler, trisiklik diterpenler ve tetrasiklik diterpenler olmak üzere beş farklı şekilde biyogenetik olarak sınıflandırılırlar. Abietan, labdan, kauren, pimarane, beyeran, giberan, taksan (Şekil 2.6) en yaygın ana diterpen iskeletleridir [20].



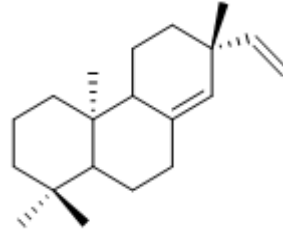
Abietan



Labdan



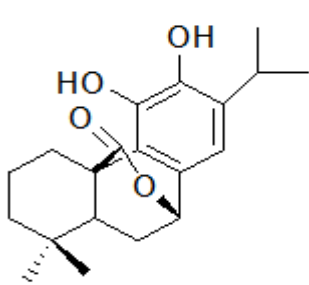
Kauren



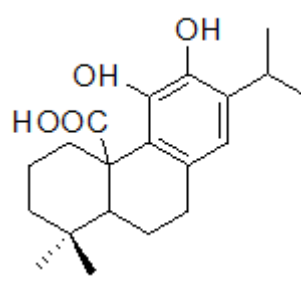
Pimaran

Şekil 2.6 En yaygın diterpen iskeletleri.

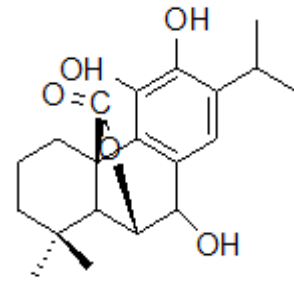
Karnosol, karnosik asit ve rosmanol (Şekil 2.7) abietan tip diterpenlerdir. Abietan tip diterpenlerde son halka aromatiktir ve izopropil bağlanması çok karakteristiktir. Karnosol, karnosik asit ve rosmanol moleküllerinde son halkanın aromatik olmasından ve bağlı hidroksillerden dolayı aynı zamanda fenolik diterpenler olarak da bilinmektedir. Karnosik asit fenolik diterpenlerin ana bileşenidir. Karnosol ve rosmanol ise karnosik asidin yıkımı sonucu oluşan türevleridir [24].



Karnosol



Karnosik asit



Rosmanol

Şekil 2.7 : *Rosmarinus türlerinde* bulunan önemli diterpenler.

2.3 Biyolojik Aktivite Bilgileri

Biberiyenin (*Rosmarinus officinalis* L.) biyolojik aktivitesi ve farmakolojik özelliklerinden sorumlu başlıca sekonder metabolitler; diterpenlerden karnosol, karnosik asit ve rosmanol, triterpenlerden oleanolik asit ve ursolik asit, flavonoidlerden apigenin, kersetin ve diosmin, fenolik asitlerden kafeik asit ve rosmarinik asittir [25].

Sahip olduğu bu sekonder metabolitler sayesinde, *Rosmarinus officinalis* L. üzerinde yapılan biyolojik aktivite çalışmaları şu şekilde sınıflandırılır:

- Antioksidan aktivite
- Antimikrobiyal aktivite
- Anti-enflamatuvar aktivite
- Analjezik etki
- Asetilkolinesteraz enzimi üzerine inhibitör etki
- Antidepresan etki
- Nöroprotektif etki

2.3.1 Antioksidan aktivite

Rosmarinus officinalis L.'nin antioksidan etkisi karnosol, karnosik asit, rosmanol ve epirosmanol olmak üzere dört diterpenoidden, ayrıca içerdiği fenolik bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Bu diterpenoidlerin ve fenolik bileşiklerin oksidatif strese karşı da koruyucu özellik gösterdikleri bilinmektedir [26].

Fenolik bileşikler ve karnosik asit bakımından zengin olan *Rosmarinus officinalis* L. yaprak ekstresinin, DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) serbest radikali giderme yöntemine göre antioksidan aktivitesi, sentetik antioksidanlar olan BHA ve BHT'den 4 kat yüksek olduğu sonucu varılmıştır. Benzer bir çalışmada da *Rosmarinus officinalis* L. ve *Nigella sativa* L.'de bulunan karnosik asit ve rosmarinik asitin aynı yöntemle göre antioksidan aktivitesinin tayininde, *Rosmarinus officinalis* L.'nin daha yüksek aktivite gösterdiği bulunmuştur [27,32].

Rosmarinik asitin V79 (çin hamster akciğer fibroblast hücre hattı) hücreleri üzerinde, mikroçekirdek yöntemi ve doksurubisin kullanılarak oluşturulan DNA hasarı üzerinde etkisi incelemiştir. Yapılan çalışma sonucu artan konsantrasyonlarda rosmarinik asit

verildiğinde, DNA hasarını azalttığı ve konsantrasyonla doğru orantılı olduğu sonucuna varılmıştır [28].

Rosmarinus officinalis L. yapraklarından farklı çözücülerle (benzen, kloroform, hekzan, etil eter, metanol, etilen diklorid) yapılan ekstrelerin, lipid peroksidasyonu inhibisyonu yöntemine (β -karoten-linoleik asit yöntemi) göre antioksidan aktivitesinde, metanol ekstresinin çok iyi antioksidan olduğu ve ayrıca sabit yağlar (ayçiçek, kanola) üzerinde otooksidasyonu engellediği, bu etkinin α -tokoferolden de daha yüksek olduğu bildirilmiştir [29,30].

Karbon tetraklorür (CCl_4) intoksikasyonu kullanılarak oksidatif stres oluşturulmuş hayvan modellerinde, CCl_4 serbest radikallerin artmasına, toksisiteye ve hatta tümöre neden olmaktadır. *Rosmarinus officinalis* L. yaprak-su ekstresinin toksisiteyi engellediği, serbest radikallere elektron vererek yakalama özelliği gösterdiği, endojen antioksidanların sentezini hızlandığı ve karaciğer enzimlerinde koruyucu özellik gösterdiği bildirilmiştir [14].

2.3.2 Antimikrobiyal aktivite

Listeria monocytogenes insanları, *Listeria ivanovii* ise hayvanları enfekte eden patojenlerdir. İşlenmiş ve işlenmemiş birçok üründe *Listeria* kontaminasyonu listeriyoz hastalığına sebep olur. Karnosik asit içeriği yüksek *Rosmarinus officinalis* L. ekstrelerinin, *Listeria* patojeni üzerinde yüksek antimikrobiyal etkisinin olduğu, etkinin konsantrasyona, içerdiği diterpen ve triterpenlere, incelenen mikroorganizmaya göre farklı olabileceği bulunmuştur. Karnosol ve ursolik asitin antimikrobiyal aktivitesi karşılaştırıldığında, ursolik asitin daha fazla antimikrobiyal etki sergilediği gösterilmiştir [27,31].

Streptococcus (*Streptococcus mutans* ve *Streptococcus sobrinus*) türleri diş çüreklerine neden olmaktadır. Bazı antiseptikler ve antimikrobiyal maddeler diş çürüklerinin engellenmesinde rol oynarlar. Fakat bu maddeler birçok yan etkiye (gastrointestinal bozukluklar, diş taşı) sebep olmaktadır. *Rosmarinus officinalis* L. yaprak ekstrelerinin diş çürükleri üzerinde antimikrobiyal aktivitesinin olduğu, en düşük minimum inhibitör konsantrasyonunun (MIC) etanol/su ekstresinde olduğu, antimikrobiyal etkiden karnosol ve karnosik asitin sorumlu olduğu bildirilmiştir [33].

Rosmarinus officinalis L. uçucu yağının güvenli kullanımı, fenolik bileşiklerden, diterpenlerden ve triterpenlerden daha yüksek antimikrobiyal etki göstermesi

sebebiyle, uçucu yağının üzerinde daha fazla çalışmalar yapılmıştır. Ana bileşenleri alfa-pinen, 1,8-sineol ve linalool olan *Cuminum cyminum* L. ve *Rosmarinus officinalis* L. türlerinin uçucu yağlarının *E. coli*, *S. aureus* ve *L. monocytogenes* bakterileri üzerinde antimikrobiyal etkileri üzerine yapılan çalışmada, her iki türünde antimikrobiyal aktivite gösterdiği, fakat *C. cyminum* L. uçucu yağının daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği sonucuna varılmıştır [34].

Aspergillus türleri (*Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasticus*) tarafından sentezlenen kanserojen ve hepatotoksik metabolitler olan aflatoksinler, zehirlenmeye ve aspergillozise neden olmaktadır. Aflatoksin B1 (AFB₁), aflatoksinler içerisinde en fazla toksik olan maddedir. *Rosmarinus officinalis* L. uçucu yağının, aflatoksin sentezini engellediği, bunu da hücre duvarını bozarak sağladığı bildirilmiştir [35].

2.3.3 Anti-enflamatuvar etkisi

Lamiaceae familyasının *Thymus*, *Rosmarinus*, *Salvia* ve *Satureja* türlerinin sabit bileşiklerinin antieflamatuvar özellik gösterdikleri yapılan çalışmalar sonucu bulunmuştur. Serbest radikallerin sentezinde görev alan indüklenmiş nitrik oksit sentetaz (iNOS) enzimi ve L-arginin amino asidi tarafından üretilen nitrik oksit (NO), damar gevşemesini ve vücudun bağışıklık sisteminin azalmasına yol açar. *Rosmarinus officinalis* L. yaprak ekstresi nitrik oksit miktarında azalmaya yol açmıştır. Rosmarinik asit daha az etkili olmak üzere, karnosik asit ile beraber kullanıldığı hücreler üzerinde antienflamatuvar etkisi olduğu gösterilmiştir [36].

Triterpenlerden ursolik asit ve oleanolik asitin antienflamatuvar etkisi nöroprotektif ajanların gelişimini sağlayabilir, oksidatif stresi amiloid β -protein ile beraber kullanılarak azaltabilir ve böylece nörolojik rahatsızlıkların önlenmesinde kullanılabilir. Nörolojik rahatsızlıkların araştırılmasında çalışılan hücre hattı olan PC12 üzerinde enflamatuvar hasar oluşturmak için serbest radikaller gibi çeşitli ajanlar kullanılmaktadır. Ursolik asit ve oleanolik asit oluşan bu hasarların giderilmesinde antienflamatuvar olarak kullanılabileceğine ve ursolik asitin en güçlü bileşik olduğu sonucuna varılmıştır. [37].

Kroton yağı kullanılarak oluşturulmuş dermatit modelinde, sentetik ve doğal ajanların topikal antienflamatuvar etkileri üzerinde yapılan bir çalışmada, *Rosmarinus officinalis* L. yapraklarından farklı çözücüler kullanılarak elde edilen lipofilik ekstrahların, sentetik ajanlara yakın antienflamatuvar etki gösterdiği bildirilmiştir [38].

2.3.4 Analjezik etkisi

Sentetik olarak üretilmiş analjezik etkili ilaçların yan etkilerinin fazla olması sebebiyle, araştırmacılar insanlarda ve hayvanlarda düşük ve uzun süreli toksisite gösteren doğal analjezik maddelerin kullanımının daha güvenilir olduğunu yapılan araştırmalar sonucunda kanıtlamışlardır [39].

Rosmarinus officinalis L.'nin toprak üstü kısmının etil asetat ekstresinden elde edilen triterpenlerin (ursolik asit, oleanolik asit ve mikromerik asit), etanol ekstresinden elde edilen diterpenlerin (karnosol, karnosik asit, rosmanol ve epi-/izo-rosmanol), terpenlerinin yanı sıra rosmarinik asitin ve sentetik türevlerinin abdominal kasılma testinde klinik olarak kullanılan en yüksek analjezik etki gösteren sentetik ilaç olan ketorolak ile benzer etkiler gösterdiği bildirilmiştir [40,41].

Rosmarinus officinalis L.'nin etanol ekstresinden elde edilen flavonoidlerinin (diosmin, hesperidin ve luteolin) romatizmal ağrıları hafifletmek amacıyla kullanıldığı, hesperidin biyoflavonoidinin ise gut hastalığında görülen enflamasyonu azaltmak amacıyla kullanıldığı ve etkinin doza bağlı olduğu yapılan araştırmalar sonucunda bulunmuştur [42].

2.3.5 Asetilkolinesteraz (AChE) enzimi üzerine etkisi

Alzheimer hastalığı nörolojik hastalıklar arasında en yaygın görülenidir ve beyindeki asetilkolin miktarında azalmalar sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu hastalığın tedavisinde asetilkolini parçalayan asetilkolinesteraz (AChE) enziminin inhibisyonu sonucu, asetilkolin miktarı artar ve hastalık tedavi edilebilir. Hastalığı durdurma özelliği olmayan ama klinikte kullanılan galantamin ve rivastigmin sentetik bileşiklerdir [43].

Hafıza geliştirici bitkilerin AChE enzimi üzerine etkisi olup olmadığı konusunda pek çok araştırma yapılmıştır. AChE enziminin inhibisyonu üzerinde olan etkinin belirlenmesine yönelik *in vitro* spektrofotometrik yöntem olan Ellman metodu kullanılarak, *Rosmarinus officinalis* L.'den elde edilen ekstraktların AChE inhibisyonu gösterdikleri yapılan çalışma sonucu gösterilmiştir [44].

Rosmarinus officinalis L.'den elde edilen uçucu yağların, başta 1,8-sineol, kafur, α -pinen ve linalol olmak üzere borneol, kamfen, piperiton, verbenon, ve bornil asetatın AChE inhibisyonuna neden olduğu bildirilmiştir. Etkin maddenin rosmarinik asit

olduğu ekstrelerin ise bütirilkolinesteraz enzimi üzerinde inhibisyonu olduğu bildirilmiştir [44].

2.3.6 Antidepresan etkisi

Yeni farmakoterapi çalışmaları, antidepresan ilaçların (monoamin oksidaz inhibitörü, trisiklikler ve selektif serotonin geri alım engelleyiciler) yan etkilerinin fazla olması nedeniyle nörolojik ve psikolojik hastalıklarda kullanılmak üzere daha az yan etkili tıbbi bitkileri araştırmaktadır. Araştırmalar sonucunda antidepresan olarak kullanılabilecek bitkiler; *Hypericum perforatum* (Sarı kantaron), *Curcuma longa* (Zerdeçal), *Ginkgo biloba* (Mabet ağacı), *Schinus molle* (Yalancı karabiber)'dir [45].

Rosmarinus officinalis L.'nin alkol ekstraktlarının, zorla yüzme testi (FST) ve kuyruk süspansiyon testi (TST) kullanılarak hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışma sonucu antidepresan özellik göstermiştir. Uçucu yağının ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, sinir krizi ve depresyon durumunda oluşan belirtileri gidermek için kullanıldığı bildirilmektedir [46].

Akut hipogliseminin depresyon benzeri etkiler göstermesi nedeniyle, kontrol grubu ve olfaktör bulbektomi yapılan hayvanlar üzerinde serum glikoz seviyesinin bir antidepresan ilaç olan fluoksetin ile değişmediği fakat *Rosmarinus officinalis* L. yaprak ekstresi ile normale döndüğü gösterilmiştir [47].

Geleneksel antidepresanlardan (fluoksetin, imipramin ve bupropiyon) daha hızlı etki gösteren üçlü geri alım inhibitörleri (serotonin, dopamin ve noradrenalin) üzerine *Rosmarinus officinalis* L.'nin etkisi incelendiğinde, antidepresan etkisinin serotonin yolağı üzerinden görüldüğü bildirilmiştir [46].

Rosmarinus officinalis L.'den izole edilen ursolik asit, karnosol ve betülinik asitin TST ve FST testlerinde pozitif sonuç gösterdiği, *Rosmarinus officinalis* L. yaprak ekstresi ile karşılaştırıldığında 100-1000 kat daha az kullanılsa da aynı etkiyi gösterdiği ve aynı zamanda toksik etki göstermediği bulunmuştur [48].

2.3.7 Nöroprotektif etkisi

Isı şok proteinleri, nöron hücrelerini dışarıdan gelen fizyolojik etkilere (sıcaklık, enfeksiyon, enflamasyon ve çevresel kirleticiler gibi) karşı koruyucu olarak görev

yaparlar. Hasarlı katlanmış, katlanmamış veya yanlış katlanmış ısı şok proteinlerinin artması, nörodejeneratif hastalıkların teşhisinde önemlidir [49].

Rosmarinus officinalis L.'nin yaprak ekstresinden izole edilen karnosik asit, rosmarinik asit ve luteolinin ısı şok proteinleri üzerindeki etkisi araştırılmış ve nöron hücrelerindeki fizyolojik etkileri azalttığı ve ısıya karşı toleransı arttırdığı bulunmuştur. Ayrıca bu üç polifenolün sinir büyüme faktörü üzerinde pozitif sonuçlar gösterdiği bildirilmiştir [49].

Yiyeceklerin kızartılması sonucu ortaya çıkan akrilamid, insan için kanserojen bir maddedir ve pek çok kanser türüne (akciğer, meme ve tiroid gibi) neden olmaktadır. Vücutta akrilamid miktarının artması sonucu nörotransmitterlerin miktarında bir azalma görülmektedir. *Rosmarinus officinalis* L. yaprak ekstresinin akrilamid kaynaklı nörotoksite üzerinde *in vitro* pozitif sonuç gösterdiği ve 100 mg/kg'da *in vivo* etki gösterdiği bildirilmiştir [50].

Primer beyin tümörlerinin %30'unu oluşturan glioblastoma hücreleri üzerinde *Rosmarinus officinalis* L.'den izole edilen karnosol ve karnosik asitin etkisi incelendiğinde, sinir büyüme faktörünün sentezini arttırdığı ve doza bağlı olduğu bildirilmiştir [51].

2.4 Analiz Yöntemleri

Okamura ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, *Rosmarinus officinalis* L. ve *Salvia officinalis* L. yapraklarında yüksek antioksidatif etki gösteren fenolik diterpenler olan karnosol ve karnosik asitin tayini için ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) yöntemini kullanmışlar. Analiz izokratik koşullar altında, 1,0 mL/dak akış hızında, hareketli faz olarak % 0,1'lik fosforik asit içeren su ve asetronitril (40:60) kullanılarak ve 230 nm'de 15 dakika içinde gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle göre karnosol ve karnosik asit sırasıyla 0,521 ve 0,104 ng/mL düzeyinde tayin sınırına sahiptir [52].

Li ve arkadaşları biberiye ve biberiye içeren ekstraktların; stabilitesi, güvenliği, etkililiği ve kalitesini hızlı ve maliyet açısından verimli bir şekilde analiz ve kontrol etmek amacıyla, buharlaşmalı ışık saçılımlı yüksek performanslı sıvı kromatografisini (HPLC-ELSD) içeren yeni bir analitik yöntem geliştirmişlerdir. Yöntem biberiyedeki

rosmarinik asit, karnosol, karnosik asit, oleanolik asit ve ursolik asitin eş zamanlı tayini için geliştirilmiştir.

Kromatografik ayırma, 1,0 mL/dak akış hızında, hareketli faz olarak metanol ve asetik asit (40:60), sabit faz olarak C18 kolon (4,6 mm × 250 mm × 5 µm) kullanılarak, gradient elüsyon modu ile gerçekleştirilmiştir. ELSD'nin sürüklenme tüpü sıcaklığı 70 °C ve nebulizör nitrojen gazının basıncı 40 Psi ve nebulizör sıcaklığı 30 °C idi. Geliştirilen yöntemle göre bu 5 maddenin tespit limiti 1,3-8,6 µg/mL ile yüksek hassasiyete sahiptir. Karnosol ve karnosik asit ise sırasıyla 4,3 ve 8,5 µg/mL düzeyinde tayin sınırına sahiptir [53].

Lu ve arkadaşları *Rosmarinus officinalis* L.' de karnosik asit ve karnosolün yüksek performanslı kapiler elektroforez ile analizini gerçekleştirmişlerdir. Taze toplanan *Rosmarinus officinalis* örnekleri kurutulup, bir elekten geçirildikten sonra 50 °C' de sabit ağırlığa gelene kadar kurutuldu. *Rosmarinus officinalis* tozu 20 dakika boyunca 170 W ve 50 kHz'de 20 mL metanol ile ultrasonik banyoda muamele edildi. Analiz 50 cm'lik (75 µm × 57 cm) kapilerde, 25 kV gerilim uygulanarak, 12 mmol/L pH 9,9 boraks:metanol (80:20) tamponu kullanılarak, 30 °C'de, 280 nm dalga boyunda, enjeksiyon 5 saniye süreyle 0,5 psi basınç modunda gerçekleştirilmiştir. Tespit edilen pikin tek bir bileşenden kaynaklandığını ve analitlerin saflık indekslerini doğrulamak için DAD dedektörlü kapiler elektroforez kullanılmıştır. Karnosol ve karnosik asit için gözlenebilme sınırı 0,5 µg/mL, tayin sınırı 1,6 µg/mL dir [54].

Lopez ve arkadaşları biberiye ekstraktlarının antioksidan özelliklerinden sorumlu olan başlıca fenolik diterpenler olan karnosol ve karnosik asitin analizi için kapiler zon elektroforezi (CZE) yöntemini geliştirmişlerdir. Yöntemde 56 cm uzunluğunda kaplamasız erimiş silika kapiler, 30 kV gerilim ve ortalama 100 µA akım ile 50 mM pH 10,1 disodyum tetraborat tamponu ile ayırım sağlanmıştır. Kapiler sıcaklığı 25 °C' de tutulmuş ve numuneler hidrodinamik enjeksiyon ile 50 mbar' da 3 saniye süreyle enjekte edilmiştir. Karnosol ve karnosik asit biberiye ekstraktlarının elektroforegramlarında migrasyon süreleri ile tanımlandıktan sonra HPLC fraksiyonu ile biberiye ekstraktından izole edilen saf bileşikler CZE analizi sonucu MS ile dedekte edilmiştir [55].

Herrero ve arkadaşları biberiyeden biyoaktif maddelerin ekstraksiyonu için su ve etanol kullanarak basınçlı sıvı ekstraksiyonu (PLE), süper kritik sıvı ekstraksiyonu

(SFE) ve etanol ile modifiye edilmiş saf CO₂ ile süperkritik CO₂ kullanılarak yeni bir ekstraksiyon işlemi olarak adlandırılan su ekstraksiyonu ve parçacık oluşumu on-line (WEPO) olmak üzere üç farklı ekstraksiyon yöntemini kullanmışlar. Üç farklı ekstraksiyon yöntemine göre elde edilen tüm ekstraktlar yeni bir ultra performanslı sıvı kromatografisi / tandem kütle spektrometrisi UPLC-MS/MS yöntemi kullanılarak kimyasal olarak karakterize edilmiştir. Analiz (hypersil gold kolon) C18 kısa kolon (50 mm × 2,1 mm × 1,9 µm) kullanılarak, gradient elüsyonda, hareketli faz olarak % 0,1 'lik formik asit içeren su ve asetonytril, 0,4 mL/dak akış hızında, tandem MS kullanılmasıyla dedeksiyon sağlandı. Geliştirilen yöntemde göre karnosol ve karnosik asit için tayin sınırı sırasıyla 41,79 ve 6,19 ng/mL olmak üzere hassas düzeyde bir tayin sınırı elde edilmiştir. Gözlenebilme sınırı ise sırasıyla 12,81 ve 1,86 ng/mL'dir [56].

Troncoso ve arkadaşları taze biberiyedeki temel fenolik antioksidanlar olan karnosol, karnosik asit ve rosmarinik asitin tayini için HPLC-UV yöntemi geliştirmişlerdir. Ayırma için analitik kolondan önce 10 mm'lik bir ön kolon ve 100-4,6 mm C18 kolon kullanılmış, hareketli faz olarak asetonytril ve su, gradient elüsyonda, 230 ve 330 nm'de iki farklı dedeksiyonda gerçekleşmiştir. Karnosol ve karnosik asit için alıkonma zamanları sırasıyla 5,7 ve 6,6 dakikadır [57].

Thorsen ve arkadaşları biberiye ekstraktlarından fenolik diterpenlerin izolasyonunu için Prep-HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntemde, C18 kolon (5 µm × 250 × 21,2 mm), izokratik elüsyonda, hareketli faz olarak su ve asetonytril (35:65), 25 mL/dak akış hızında, 230 nm'de gerçekleşmiştir [58].

Haq ve arkadaşları beş farklı *Salvia* türünün metabolik profillerini, dereplikasyonunu ve kantitasyonunu belirlemek için sıvı kromatografisi / tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) yöntemini geliştirmişlerdir. Analizde C18 (3,0 × 100 mm, 1,8 µm) kolon, 40 °C sıcaklık, hareketli faz olarak % 0,1'lik formik asit içeren su ve metanol, gradient elüsyonda, akış hızı 0,7 mL/dak gerçekleşmiş. Yönteme göre beş farklı *Salvia* türünde 47 doğal ürün belirlenmiştir. Karnosol, karnosik asit ve rosmarinik asit bu belirlenen biyoaktif bileşenler arasındadır [59].

Wang ve arkadaşları *Rosmarinus officinalis* L. ekstresinin oral uygulanmasından sonra sıçan plazmasında üç diterpenin (karnosol, karnosik asit ve rosmanol) ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi – tandem kütle spektrometresi (UHPLC-ESI-

MS/MS) yöntemi ile belirlemişler ve sonra farmakokinetik çalışmaya uygulanmıştır. Geliştirilen yöntemde C18 kolon (1,8 µm, 2,1 mm ×100 mm), gradient elüsyonda, hareketli faz olarak su (% 0,1 formik asit):asetonitril, akış hızı 0,3 mL/dak, 10 µL enjeksiyon hacmi ile analiz 9 dakikada tamamlanmıştır. Karnosol, karnosik asit ve rosmanol için gözlenebilme sınırı sırasıyla 1,453, 10,750 ve 1,700 ng/mL düzeyindedir [60].

2.5 Farmakokinetik Çalışmalar

Farmakokinetik bilim dalı, bir canlıya uygulanan ilacın vücutta emilimi (absorpsiyon), dağılımı (distribüsyon), metabolizasyonu (biyotransformasyon) ve eliminasyon (atılım) (ortak kısaltma-ADME) gibi parametreleri inceler [63].

İlaç uygulama yerinden emilir ve kan dolaşımı ile organ ve dokulara dağılır. İlacın emilim hızını etkileyen bazı faktörler vardır. Bunlar ilaç molekülüne (lipofilisite) ve ilaç uygulanan bireye (emilme yüzeyi genişliği) ait olabilir. Uygulandığı yerden emilen ilaç, vücuda dağılır ve plazma proteinlerine bağlanır. Ardından karaciğer veya diğer dokular tarafından metabolitlerine dönüştürülür. Burada ki amaç ilacı etkisizleştirmek için molekülü parçalamak veya başka bir moleküle dönüştürmektir. Son olarak ilaç veya metabolit idrar, safra, solunum yolları aracılığıyla vücuttan atılır [64, 65].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler, Ekstraktlar, Cihazlar ve Ekipman

3.1.1 Kimyasal maddeler ve çözücüler

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

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

Karnosol ($\geq 98,0$ % HPLC) (Sigma, St. Louis, Missouri, ABD)

Karnosik asit ($\geq 98,0$ % HPLC) (Sigma, St. Louis, Missouri, ABD)

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

İzoamilalkol (Merck, Darmstadt, Almanya)

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

Kloroform (Merck, Darmstadt, Almanya)

Diklorometan (Merck, Darmstadt, Almanya)

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

Ultra saf su (HPLC saflığında)

3.1.2 Çözeltiler

3.1.2.1 Hareketli faz çözeltileri

Karnosolün analizi için kullanılan hareketli faz çözeltisi

Karnosolün analizi için kullanılan hareketli faz çözeltisi 830 mL metanol üzerine 170 mL %2 oranında ortofosforik asit içeren ultra saf su ilave edilerek, son hacim 1000 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Degaze edildikten sonra 5 μ m filtreden süzüldü. Metanol:su (%2 orto-fosforik asit) (83:17) (h/h) karışımı gradient elüsyonda kullanılmıştır.

Karnosik asit analizi için kullanılan hareketli faz çözeltisi

Karnosik asidin analizi için kullanılan hareketli faz çözeltisi 900 mL metanol üzerine 100 mL %2 oranında ortofosforik asit içeren ultra saf su ilave edilerek, son hacim 1000 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Degaze edildikten sonra 5 µm filtreden süzüldü. Metanol:su (%2 orto-fosforik asit) (90:10) (h/h) karışımı izokratik elüsyonda kullanılmıştır.

3.1.2.2 Standart çözeltiler

Karnosol analizi için kullanılan standart çözeltiler

Karnosol stok çözeltisi:

2 mg karnosol tam olarak tartılıp, 10 mL'lik balonjojeye aktarıldı, yaklaşık 5 mL etanol ilave edilerek 10 dk. ultrasonik banyo yardımı ile çözündürüldü ve etanol ile hacmine tamamlandı (0,2 mg/mL karnosol'e eşdeğer). Karnosol stok çözeltisi +4 °C' de yaklaşık 1 ay boyunca dayanıklıdır.

Karnosol stok çözeltisinin seyreltilmesi ile hazırlanan standart çözeltiler:

Doğrusallık çalışması için 5 farklı konsantrasyonda standart çözeltiler hazırlandı. Bu çözeltiler karnosolün stok çözeltisinden metanol ile uygun miktarlarda seyreltilmeler ile 1-20 ng/mL aralığında olacak şekilde hazırlandı.

Karnosik asit analizi için kullanılan standart çözeltiler

Karnosik asit stok çözeltisi:

1 mg karnosik asit tam olarak tartılıp, 5 mL'lik balonjojeye aktarıldı, yaklaşık 3 mL etanol ilave edilerek 10 dk. ultrasonik banyo yardımı ile çözündürüldü ve etanol ile hacmine tamamlandı (0,1 mg/mL karnosik asit'e eşdeğer). Karnosik asit stok çözeltisi +4 °C' de yaklaşık 1 ay boyunca dayanıklıdır.

Karnosik asit stok çözeltisinin seyreltilmesi ile hazırlanan standart çözeltiler:

Doğrusallık çalışması için 7 farklı konsantrasyonda standart çözeltiler hazırlandı. Bu çözeltiler karnosik asidin stok çözeltisinden metanol ile uygun miktarlarda seyreltilmeler ile 0,25-8 ng/mL aralığında olacak şekilde hazırlandı.

3.1.3 Ekstreler

Ekstre *Rosmarinus officinalis* L. yapraklarının etanolde bekletilmesinin ardından liyofilize edilmesiyle hazırlanmıştır. Liyofilize toz jelatin kapsul içinde enkapsule edilerek formülasyon yapılmıştır. Ekstre en az %10 karnosol, %10 karnosik asit ve %10 rosmarinik asit içeriyor.

3.1.4 Aletler ve diğer gereçler

- Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazı (Shimadzu Corporations-Japonya)
- C18 kolon (150 mm × 4,6 mm × 5µm) (Shim-Pack, Shimadzu Corporations-Japonya)
- UV-görünür bölge spektrofotometre (Hitachi-Japonya)
- FT-IR (Bruker-ABD)
- Sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi cihazı (Thermo scientific-ABD)
- Preparatif yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazı (Waters-ABD)
- Santrifüj cihazı (Nüve-Türkiye)
- Terazî (Shimadzu Corporations-Japonya)
- Vorteks karıştırıcı (Velp Scientifica-İtalya)
- Ultrasonik banyo (VBR-Kanada)
- Ultra saf su cihazı (Younglin Instruments-Kore)
- pH metre (Hanna Instruments-İtalya)
- Otomatik pipetler (100 µL-1000 µL ve 10 µL-100 µL'lik) (Eppendorf-Almanya)
- Hareketli faz süzme ünitesi (Milipor, 5µm)
- Enjektör (2 mL)
- HPLC enjeksiyon öncesi filtreleri (0,44 µm)
- Balon jojeler (5 mL, 10 mL, 50 mL ve 100 mL'lik) (Isolab-Almanya)
- Reaksiyon tüpleri (Vidalı, kapaklı 10 mL'lik) (Isolab-Almanya)
- Dereceli ve transfer pipetler (Isolab-Almanya)
- C18 SPE kartuşları (Resprep 6 ml)

- Yazılımlar; LC Solution Programı, MS Office Word Programı ve MS Office Excel Programı

3.2 Plazmadan Analitlerin Ekstre Edilmesi İşlemi

Her iki analit için de, protein çöktürme tekniği, sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve katı-faz ekstraksiyonu biyoanalitik numune hazırlama tekniklerinde kullanılan yöntemlerdir [62]. Plazmadan olası girişimlerin engellenmesi amacıyla belirtilen bu üç teknikte denenmiştir. Asetonitril ve metanol ile plazma proteinlerini çöktürme, sıvı-sıvı ekstraksiyon (karnosolu ve karnosik asidi en yüksek verimde ekstre edebilmek için çeşitli tipte çözücüler ve çözücü hacimleri denenmiştir, ayrıca ekstraksiyon sayısı ile ilgili denemelerde yapılmıştır) ve katı faz ekstraksiyonu teknikleri (çeşitli içerikte ve miktarda kartuşlar ve elüsyon çözücüler) denenmiştir.

Denenen katı faz kartuşları ve elüsyon çözücüler:

-C18 (1 g × 6 mL) kartuş, elüsyon çözücü: metanol

-C18 (0,5 g × 5 mL) kartuş, elüsyon çözücü: metanol

-CN (1 g × 6 mL) kartuş, diklorometan

Tüm denemeler sonucunda her iki analit için de, sıvı-sıvı ekstraksiyon tekniğinin daha verimli olacağı saptanmıştır ve aşağıda belirtilen çözücüler ve ekstraksiyon sayıları denenmiştir.

Tablo 3.1: Plazmadan analitlerin ekstraksiyonu için denenen sıvı-sıvı ekstraksiyon sistemleri.

Ekstraksiyon çözücüsü	Ekstraksiyon sayısı
Kloroform (5 mL)	1 kere (5 mL)
Kloroform (5 mL)	2 kere (2,5 mL)
Diklorometan (5 mL)	1 kere (5 mL)
Diklorometan (5 mL)	2 kere (2,5 mL)
Hekzan (5 mL)	1 kere (5 mL)
Hekzan (5 mL)	2 kere (2,5 mL)
Hekzan:izoamil alkol (4:1)	1 kere (5 mL)
Hekzan:izoamil alkol (4:1)	2 kere (2,5 mL)

Sıvı-sıvı ekstraksiyonu:

500 µL plazma örneğine standard karnosol veya karnosik asit çözeltisinden katım yapılmasının ardından vorteks karıştırıcı ile bir dakika karıştırıldıktan sonra 5 mL

hekzan çözeltilisinden ilave edildi. Bir dakika daha vorteks ile karıştırıldıktan sonra 5 dakika (x1) 4000 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası hekzanlı faz alınarak azot akımında uçurulmuştur. Kalıntıyı 1 mL etanolde çözdükten sonra filtreden süzüldü ve HPLC sistemine enjekte edildi. Sonuç Bölüm 4.1.1’de verilmiştir.

3.3 Karnosol ve Karnosik Asidin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Analizi

Karnosol ve karnosik asidin HPLC ile analizi için uv-görünür bölge spektrometrik dedektör dalga boyu, kolon özellikleri (yapısı, boyu, iç çapı, partikül boyutu), hareketli faz oranları, akış profili, akış hızı, kolon sıcaklığı, enjeksiyon hacmi gibi kromatografik koşullar belirlenerek, analize uygun şartlar optimize edilerek belirlendi. Geliştirilen yöntemler akabinde valide edildi.

3.3.1 Kromatografik koşulların belirlenmesi

İlk olarak karnosol ve karnosik asidin ayrı ayrı etanoldeki çözeltilerinin spektrofotometre ile uv-görünür bölgede maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyu belirlendi. Belirlenen maksimum dalga boyu kullanılarak HPLC cihazında, farklı uzunlukta (10, 15, 25 ve 30 cm) ve yarı çapta (2,1 ve 4,6 mm), çeşitli içerik yapısında –C18, -NH₂, -NO₂, -NO, monolitik C18 gibi farklı kolonlar ve partikül boyutu (1-5 µm) olan kolonlar ve çeşitli hareketli fazlar (asetonitril-su, metanol-asetik asit, metanol-borik asit tamponu, metanol-su karışımları, metanol-fosfat tamponu, metanol-o-fosforik asit) farklı oranlarda kullanılarak denemeler yapıldı. Değişik akış hızları ve profilleri, kolon sıcaklıkları ve farklı enjeksiyon hacimleri için de denemeler yapıldı. Uygun kromatografik koşullar belirlendikten sonra validasyon işlemleri için çalışıldı. Geliştirilen yöntem biberiye ekstreleri, preparatları ile katılmış ve içilmiş plazma numunelerinde karnosol ve karnosik asidin kantitatif analizi için kullanıldı. Elde edilen veriler Bölüm 4.2’ de yer almaktadır.

3.4 Yöntem Validasyonu

Yöntem geliştirme işlemi tamamlandıktan sonra analitik yöntem validasyonu ICH kılavuzu Q2 (R1)’e göre yapıldı [61].

3.4.1 Seçicilik

Seçicilik çalışmasındaki amaç, hareketli faz çözeltisinden ve boş plazmadan kaynaklanan herhangi bir girişim olup olmadığının incelenmesidir. Elde edilen verilere göre pikin saflık değeri ve buna ait kromatogramlar Bölüm 4.3.1’ de gösterilmiştir.

3.4.2 Tayin ve gözlenebilme sınırı

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

$$LOD = 3 \times SD/m$$

$$LOQ = 10 \times SD/m$$

SD: Kalibrasyon doğrusunun y kesişiminin standart sapması

m: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

3.4.3 Doğrusallık

ICH’ ye göre doğrusallık aralığı en az 5 noktadan ile belirlenmelidir [61].

3.4.3.1 Karnosol analizi için doğrusallık

Yöntemin doğrusallık gösterdiği aralığın belirlenebilmesi için 5 farklı konsantrasyonda karnosol içeren çözeltiler hazırlandı ve analizleri yapıldı. Kromatogramlardan elde edilen pik alanlarından konsantrasyonlara karşılık gelen noktalar yardımıyla doğrusallık grafikleri çizildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3.3.1’de gösterilmiştir.

3.4.3.2 Karnosik asit analizi için doğrusallık

Yöntemin doğrusallık gösterdiği aralığın belirlenebilmesi için 7 farklı konsantrasyonda karnosik asit içeren çözeltiler hazırlandı ve analizleri yapıldı. Kromatogramlardan elde edilen pik alanlarından konsantrasyonlara karşı gelen noktalar yardımıyla doğrusallık grafikleri çizildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3.3.2’de gösterilmiştir.

3.4.4 Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik

3.4.4.1. Karnosol analizi için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik

Karnosol stok çözeltisinden etanolde seyreltmelerle üç farklı konsantrasyon seviyesinde (düşük, orta, yüksek) karnosol (5, 10 ve 20 ng/mL) içeren kalite kontrol çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltiler ile çalışıldı. Analizler aynı gün (gün içi) ve 3 farklı günde (günler arası) 3 tekrar olacak şekilde yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3.4.1’de gösterilmiştir.

3.4.4.2 Karnosik asit analizi için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik

Karnosik asit stok çözeltisinden etanolde seyreltmelerle üç farklı konsantrasyon seviyesinde (düşük, orta, yüksek) karnosik asit (0,75, 2 ve 5 ng/mL) içeren kalite kontrol çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltiler ile çalışıldı. Analizler aynı gün (gün içi) ve 3 farklı günde (günler arası) 3 tekrar olacak şekilde yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3.4.2’de gösterilmiştir.

3.4.5 Doğruluk

3.4.5.1 Karnosol analizi için doğruluk

Standart katma metodu kullanılarak geliştirilen yöntemin doğruluğu saptandı. Bunun için 10 ng/mL konsantrasyonlardaki karnosol numune çözeltileri üzerine 1, 5, 10 ng/mL konsantrasyonunda karnosol standart çözeltilerinden ilave edildi. Elde edilen alan değerleri daha önceden hazırlanan ölçü eğrisi denkleminde yerine konularak konsantrasyonlar elde edildi. Geri kazanım değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

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

C_t: bulunan toplam analit konsantrasyonu

C_u: numunede standart katmadan önce bulunan analit konsantrasyonu

C_a: ilave edilen analit konsantrasyonu

Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3.5.1’de verilmiştir.

3.4.5.2 Karnosik asit analizi için doğruluk

Standart katma metodu kullanılarak geliştirilen yöntemin doğruluğu saptandı. Bunun için 2 ng/mL konsantrasyonlardaki karnosik asit numune çözeltileri üzerine 0,75, 2, 5 ng/mL konsantrasyonunda karnosik asit standard çözeltilerinden ilave edildi. Elde edilen değerleri daha önceden hazırlanan ölçü eğrisi denkleminde yerine konularak konsantrasyonlar elde edildi. Geri kazanım değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

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

C_t: bulunan toplam analit konsantrasyonu

C_u: numunede standart katmadan önce bulunan analit konsantrasyonu

C_a: ilave edilen analit konsantrasyonu

Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3.5.2’de verilmiştir.

3.4.6 Sağlamlık

Yöntemin sağlamlık testi için temel analiz koşullarından farklı olmak üzere 3 parametre belirlendi. Bunlar; kolon sıcaklığı değişikliği (± 5 °C), akış hızı değişikliği ($\pm 0,2$ mL/dak) ve hareketli faz oranları (karnosol için gradient elüsyonda değişiklikler, karnosik asit için izokratik elüsyondaki değişiklikler)’dır. Her konsantrasyon için analizler 3 kez tekrarlandı. Her iki analit için elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3.6’da verilmiştir. Analiz sonucunda yöntemin küçük modifikasyonlardan etkilenip etkilenmediği test edilmiştir.

3.4.7 Çözelti stabilitesi

Karnosol ve karnosik asit çözeltilerinin stabilitesinin belirlenmesi için standart çözeltiler ve plazma numune çözeltileri, karanlıkta 24 saat, otomatik numune örnekliyicisinde 24 saat ve +4 °C’de 1 ay süreyle bekletildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3.7’de gösterilmiştir.

3.5 Kromatogram Üzerinde Belirlenen Karnosol ve Karnosik Asit Maddelerinin Yapılarının Aydınlatılması

Gerek karnosol gerekse karnosik asit için geliştirilen ve valide edilen yöntem koşulları preparatif HPLC'ye uyarlanmıştır ve analitlerin retansiyon zamanlarında gelen fraksiyonlar toplanarak FT-IR ve LC-MS/MS'e verilmiştir. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.5'te gösterilmiştir.

3.6 Biyoyararlanım ve Farmakokinetik Çalışmalar

3.6.1 Karnosolun ve karnosik asidin biyoyararlanımının ve farmakokinetiğinin incelenmesi

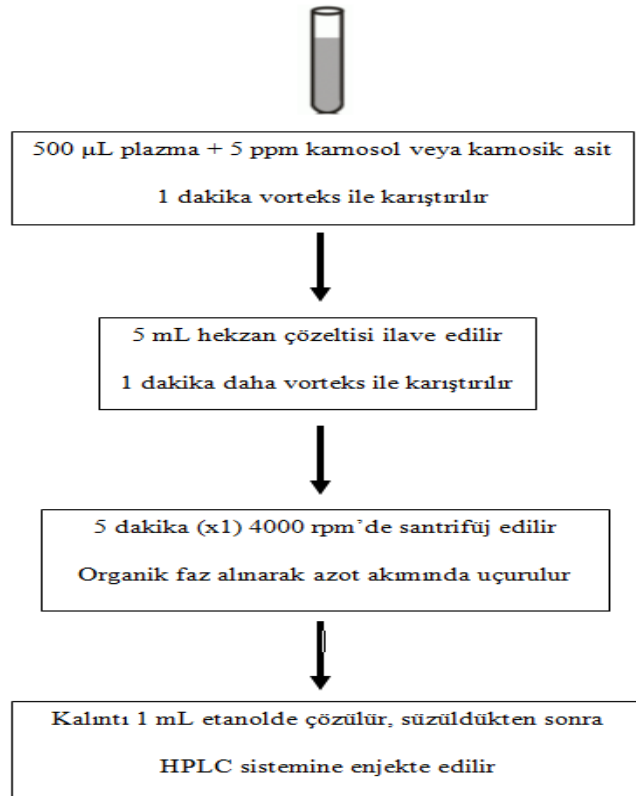
Rosmarinus türlerinde bulunan bazı diterpenoid bileşiklerin (karnosol ve karnosik asit) insan plazmasında sıvı kromatografik analizleri ve biyoyararlanım çalışmalarını yürütebilmek için öncelikle Bezmialem Vakıf Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onay alındı (No: 24/23). 27 yaşındaki sağlıklı bir erkek gönüllüye, %10 karnosol, %10 karnosik asit ve %10 rosmarinik asit (1000 mg) içeren tek bir doz biberiye ekstresi oral yolla verildi. Analizler için kan örnekleri (5 mL) ekstre verilmeden önce (0. saat, kontrol) ve verildikten 0,25., 0,5., 0,75., 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. saatlerde alınarak EDTA'lı tüplere aktarıldı. Plazmanın ayrılmasını sağlamak amacıyla 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Plazma örnekleri analiz edilinceye kadar -20 °C'de saklandı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.4'te gösterilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Karnosolun ve Karnosik Asidin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) İle Yapılan Analizlerine Ait Sonuçlar

4.1.1 Plazmadan ekstraksiyon işlemi

Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı şekilde, farklı organik çözücülerle sıvı-sıvı ekstraksiyonu denemeleri yapıldı. Yapılan denemeler sonucunda karnosolün ve karnosik asitin plazmadan ekstraksiyonu için en yüksek verimi sağlayan çözücü olarak hekzan kullanıldı. Geliştirilen örnek hazırlama metodu Şekil 4.1’de verilmiştir.

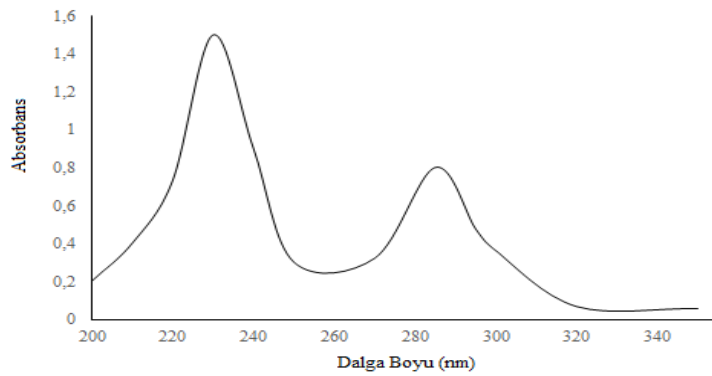


Şekil 4.1. Plazmadan ekstraksiyon işlemi.

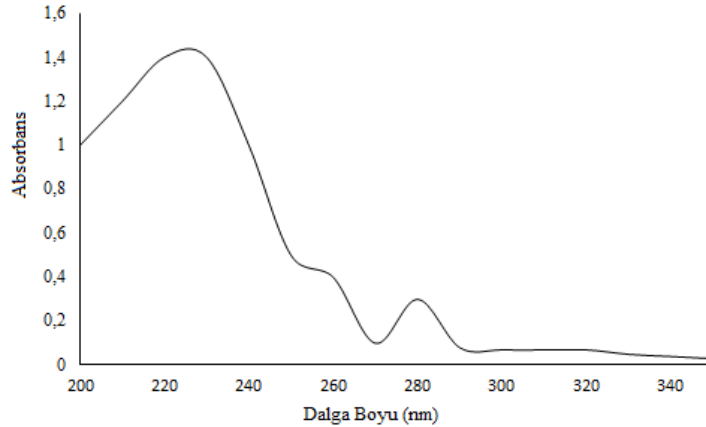
4.2 Kromatografik Koşulların Belirlenmesi

4.2.1 Dedeksiyonun belirlenmesi

Kromatografik ayırma ve koşulların belirlenmesi çalışmalarından önce spektrofotometre de karnosolün ve karnosik asidin etanolde maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyları (230 nm ve 280 nm) belirlenmiştir. 230 nm de yapılan ölçümlerde daha yüksek seçicilik elde edildiği için bu dalga boyunda çalışılması daha uygun bulunmuştur. Karnosol'ün spektrumu Şekil 4.2.'de, karnosik asidin spektrumu Şekil 4.3.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2 : Karnosolün etanol çözeltisinin uv-görünür bölgede gözlenen absorpsiyon spektrumu.



Şekil 4.3 : Karnosik asidin etanol çözeltisinin uv-görünür bölgede gözlenen absorpsiyon spektrumu.

4.2.2 Kromatografik ayırma koşullarının belirlenmesi

Analitlerin HPLC ile analizinin yapılabilmesi için, dedektör dalga boyu belirlenmesinin ardından, en yüksek ayırma gücü ve en verimli ayırmayı sağlayacak durgun ve hareketli fazın seçimi, kolon özellikleri (yapısı, boyu, iç çapı, partikül

boyutu), hareketli faz içeriği, hareketli faz oranları, akış profili, akış hızı, kolon sıcaklığı, enjeksiyon hacmi gibi kromatografik koşullar aşağıdaki gibi belirlenmiştir.

Karnosolün analizi için HPLC sistem parametreleri

- Durgun faz (Kolon): C18 (250 mm × 4,6 mm × 5 µm)
- Mobil faz: Metanol:su (%2 o-fosforik asit) (83:17, h/h başlangıçlı gradient akış)
- Akış hızı: 1,2 mL/dk
- Enjeksiyon hacmi: 20 µL
- Fırın sıcaklığı: 25 °C
- Akış profili: gradient

Tablo 4.1: Hareketli faz gradient elüsyonu programı.

Zaman (dk)	% A (Metanol)	% B (Su)
0	83	17
3,00	83	17
3,01	90	10
3,30	94	6
4,00	94	6
4,01	83	17

10 ng/mL standart karnosol çözeltisine ait kromatogram Şekil 4.4'te gösterilmiştir.

Alıkonma (Retansiyon) zamanı $3,40 \pm 0,01$ dakikadır.

Karnosik asit analizi için HPLC sistem parametreleri

- Durgun faz (Kolon): C18 (150 mm × 4,6 mm × 5 µm)
- Mobil faz: Metanol:su (%2 o-fosforik asit) (90:10, h/h izokratik akış)
- Akış hızı: 1,0 mL/dk
- Enjeksiyon hacmi: 20 µL
- Fırın sıcaklığı: 25 °C
- Akış profili: izokratik akış

2 ng/mL standart karnosik asit çözeltisine ait kromatogram Şekil 4.5'te gösterilmiştir.

Alıkonma (Retansiyon) zamanı $4,2 \pm 0,03$ dakikadır.

4.2.3 Kromatografik sistem parametreleri

Parametre*	Kapasite faktörü	Resolüsyon	HEPT	Kuyruklanma faktörü	Asimetri faktörü
Karnosol analizi için değerler	6,72	2,5	1257,9	1,2	0,9
Karnosik asit analizi için değerler	6,51	2,4	1325,2	1,2	0,8

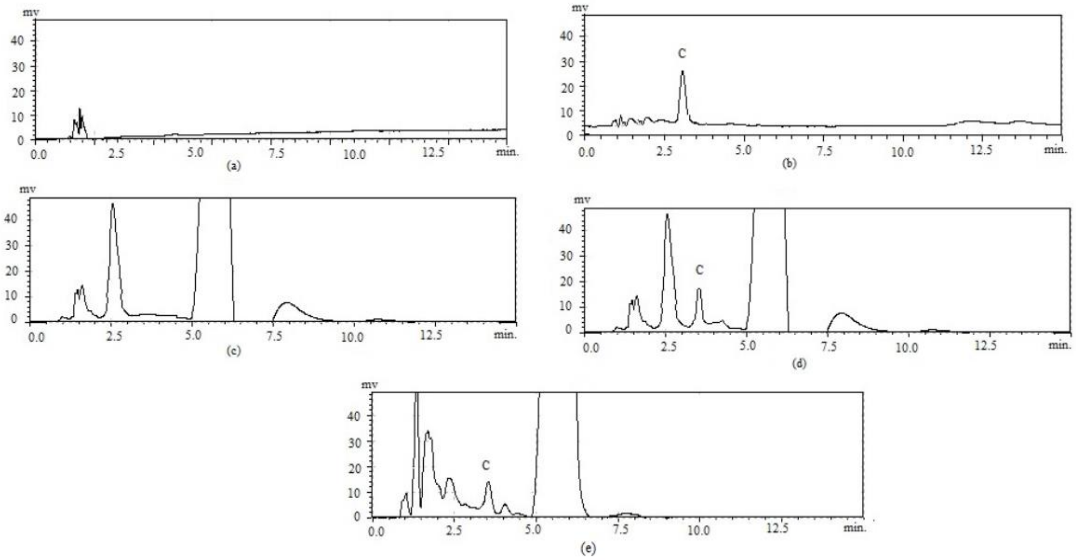
*kalibrasyon eğrisine ait tüm noktalara ait verilerin ortalama değeridir.

4.3 Yöntem Validasyonu

4.3.1 Seçicilik

4.3.1.1 Karnosol analizi için seçicilik

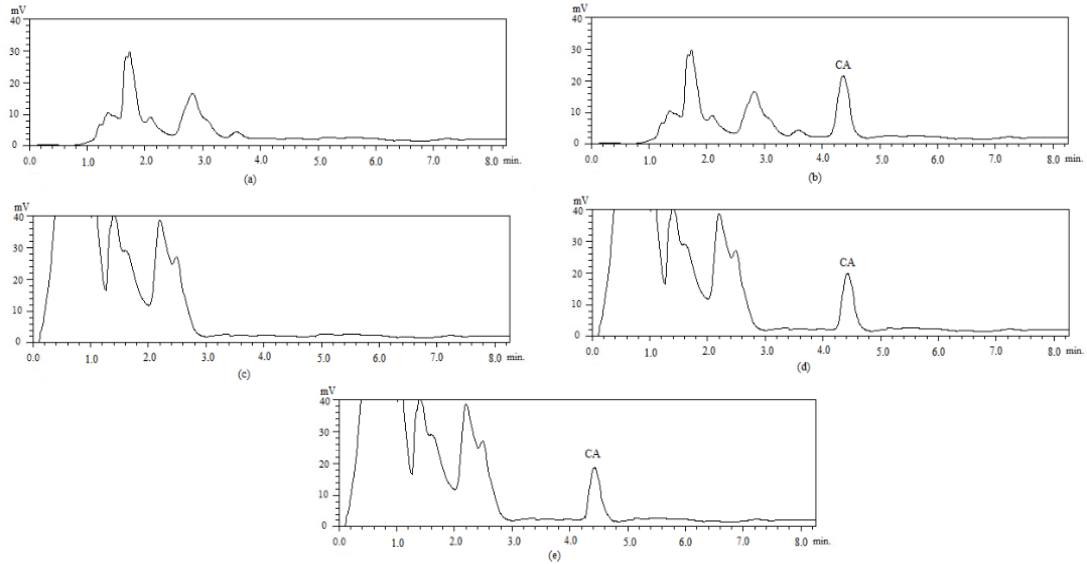
Şekil 4.4'te (a): sulu ortam boş denemesine, (b): 10 ng/mL standart karnosol çözeltisine, (c): plazma boş denemesine, (d): 5 ng/mL karnosol eklenmiş plazma numunesine, (e): t_{maks} süresine ait içilmiş plazma numunesine ait kromatogramlar belirtilmiştir. Alıkonma zamanı $3,40 \pm 0,01$ dakikadır.



Şekil 4.4 : a: Sulu ortam boş deneme, b:10 ng/mL standart karnosol çözeltisi ve c: Boş plazma numunesi, d:5 ng/mL karnosol eklenmiş plazma numunesi, e: t_{maks} süresine ait içilmiş plazma numunesi.

4.3.1.2 Karnosik asit analizi için seçicilik

Şekil 4.5'te (a): sulu ortam boş denemesine, (b): 2 ng/mL standart karnosik asit çözeltisine, (c): plazma boş denemesine, (d): 2 ng/mL karnosol eklenmiş plazma numunesine, (e): t_{maks} süresine ait içilmiş plazma numunesine ait kromatogramlar belirtilmiştir. Alıkonma zamanı $4,2 \pm 0,03$ dakikadır.



Şekil 4.5: a: Sulu ortam boş deneme, b:2 ng/mL standart karnosik asit çözeltisi ve c: Boş plazma numunesi, d:2 ng/mL karnosik asit eklenmiş plazma numunesi, e: t_{maks} süresine ait içilmiş plazma numunesi.

4.3.2 Tayin sınırı (LOQ) ve gözlenebilirlik sınırı (LOD)

4.3.2.1 Karnosol için tayin sınırı (LOQ) ve gözlenebilirlik sınırı (LOD)

Bölüm 3.3.2'de verilen denklemlere göre karnosol için hesaplanan LOD değeri 0,33 ng/mL ve LOQ değeri ilse 1 ng/mL olarak bulunmuştur.

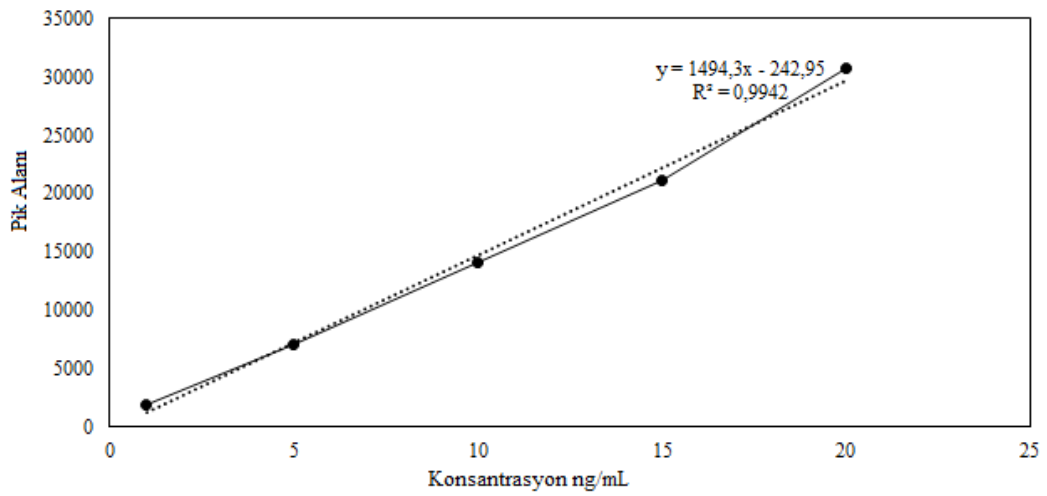
4.3.2.2 Karnosik asit için tayin sınırı (LOQ) ve gözlenebilirlik sınırı (LOD)

Bölüm 3.3.2'de verilen denklemlere göre karnosik asit için hesaplanan LOD değeri 0,075 ng/mL ve LOQ değeri ise 0,25 ng/mL olarak bulunmuştur.

4.3.3 Doğrusallık

4.3.3.1 Karnosol analizi için doğrusallık

Karnosol stok çözeltisinden uygun etanol miktarıyla seyreltilerek hazırlanmış 5 farklı konsantrasyondaki standart çözeltiler, 1-20 ng/mL konsantrasyon aralığında olacak şekilde çalışıldı. Her konsantrasyona karşı elde edilen ortalama pik alan değerleri yardımı ile belirtilen konsantrasyon değerleri arasında çizilen ölçü eğrisi Şekil 4.6’da gösterilmiştir.



Şekil 4.6 : Karnosolun 1-20 ng/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi.

Tablo 4.2’de pik alanları (A), SD ve RSD değerleri, en küçük kareler yöntemi uygulanarak hesaplanan doğru denklemi ($A = mC + b$ [m = eğim, b = kesim noktası, C = konsantrasyon]) ve korelasyon katsayısı (r) verilmiştir.

Tablo 4.2: Karnosolun 1-20 ng/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alanı değerleri ve istatistik veriler.

A \ C	1	5	10	15	20
1	1939	7074	14148	21222	30733
2	2019	7033	14066	21099	30779
3	2010	7088	14177	21265	30640
4	1995	7005	14010	21015	30676
5	1957	7079	14158	21237	30611
6	1837	7059	14119	21179	30728
Ortalama	1959,5	7056,3	14113	21169,5	30694,5
SD	67,5033	31,6712	63,5609	95,2507	632921
% RSD	3,44	0,44	0,45	0,44	0,20

Ortalama alan (A) değerlerinden hesaplanan doğru denklemi:

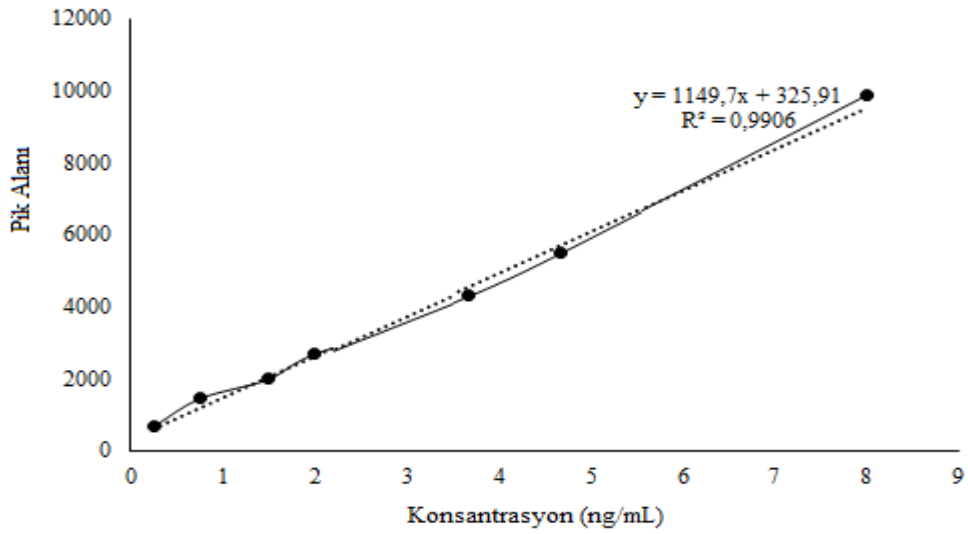
$$A = 1494,3C - 242,95 \quad (r= 0,9942)$$

Tablo 4.3: Karnosol için ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler.

	1	2	3	4	5	6	Ortalama	SD	RSD
Eğim	1494,4	1494,6	1491,2	1490,1	1491,7	1500,7	1494,28	4,1150	0,0027
Kesim noktası	250,1	245,5	173,8	258,81	206,69	322,79	242,95	50,5576	0,2080
R değeri	0,9945	0,9933	0,9948	0,9933	0,9949	0,9945	0,9942		

4.3.3.2 Karnosik asit analizi için doğrusallık

Karnosik asit stok çözeltisinden uygun etanol miktarıyla seyreltilerek hazırlanmış 7 farklı konsantrasyondaki standart çözeltiler, 0,25-8 ng/mL konsantrasyon aralığında olacak şekilde çalışıldı. Her konsantrasyona karşı elde edilen ortalama pik alan değerleri yardımı ile belirtilen konsantrasyon değerleri arasında çizilen ölçü eğrisi Şekil 4.7’de gösterilmiştir.



Şekil 4.7 : Karnosik asidin 0,25-8 ng/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi.

Tablo 4.4’te pik alanları (A), SD ve RSD değerleri, en küçük kareler yöntemi uygulanarak hesaplanan doğru denklemi ($A = mC + b$ [m = eğim, b = kesim noktası, C = konsantrasyon]) ve korelasyon katsayısı (r) verilmiştir.

Tablo 4.4: Karnosik asidin 0,25-8 ng/mL konstrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alanı değerleri ve istatistik veriler.

A \ C	0,25	0,75	1,5	2	4	5	8
1	673,1	1512	2140,2	2874	4225,9	6023,4	9687,3
2	724,5	1456,7	2035,5	2754,1	4457,2	6005,3	9625,2
3	724,6	1534,7	1943,5	2653,3	4215	6027,3	9757,2
4	662,8	1463,4	1953,6	2741	4534,8	6047,3	9772,3
5	700	1463,2	1927,2	2477,69	4259,1	5544,7	10108
Ortalama	697	1466	2000	2700,018	4338,4	5929,6	9870
SD	28,5826	35,13111	88,82756	147,0429	147,359	215,6824	187,2294
% RSD	4,1	2,4	4,44	5,45	3,39	3,63	1,9

Ortalama alan (A) değerlerinden hesaplanan doğru denklemi:

$$A = 1149,7C + 325,91 \quad (r= 0,9906)$$

Tablo 4.5: Karnosik asit için ölçü eğrilerinin regrasyon analizlerine ait parametreler.

	1	2	3	4	5	Ortalama	SD	RSD
Eğim	1122	1125,3	1137,1	1151	1165,2	1140,12	18,05871	0,015839
Kesim noktası	430,29	409,17	344,05	346,82	204,05	346,876	88,38226	0,254795
R değeri	0,9887	0,9947	0,9884	0,9949	0,9821	0,9897		

4.3.4 Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik

4.3.4.1 Karnosol analizi için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik

Plazma örneklerinin çözeltileri 5, 10 ve 20 ng/mL karnosol miktarı Bölüm 3.3.4'te anlatıldığı gibi çalışıldı.

Aynı gün içinde yapılan analizlere ait bağıl standart sapma değerleri % 0,47 – 5,71 arasında hesaplandı (Tablo 4.6).

Farklı günlerde yapılan analizler sonucunda elde edilen bağıl standart sapma değerleri ise % 1,81 – 5,53 arasında bulundu (Tablo 4.6).

Tablo 4.6: Karnosol için aynı gün içinde ve farklı günlerde yapılan analizlerin tekrarlanabilirliği.

Gün içi (n=3)			Günler arası* (n=3)		
Alınan Konsantrasyon (ng/mL)	Bulunan Konsantrasyon (ng/mL)	RSD (%)	Alınan Konsantrasyon (ng/mL)	Bulunan Konsantrasyon (ng/mL)	RSD (%)
5	5,44	0,47	5	4,89	1,81
10	9,61	0,4	10	9,39	5,53
20	20,14	5,71	20	18,92	2,57

*Üç farklı günde elde edilen sonuçlar

4.3.4.2 Karnosik asit analizi için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik

Plazma örneklerinin çözeltileri 0,75, 2 ve 5 ng/mL karnosol miktarı Bölüm 3.3.4'te anlatıldığı gibi çalışıldı.

Aynı gün içinde yapılan analizlere ait bağıl standart sapma değerleri % 1,75 – 3,9 arasında hesaplandı (Tablo 4.7).

Farklı günlerde yapılan analizler sonucunda elde edilen bağıl standart sapma değerleri ise % 3,17 – 5,13 arasında bulundu (Tablo 4.7).

Tablo 4.7: Karnosik asit için aynı gün içinde ve farklı günlerde yapılan analizlerin tekrarlanabilirliği.

Gün içi (n=3)			Günler arası* (n=3)		
Alınan Konsantrasyon (ng/mL)	Bulunan Konsantrasyon (ng/mL)	RSD (%)	Alınan Konsantrasyon (ng/mL)	Bulunan Konsantrasyon (ng/mL)	RSD (%)
0,75	0,77	3,9	0,75	0,78	5,13
2	2,11	1,75	2	2,05	3,17
5	4,94	2,75	5	5,35	4,6

*Üç farklı günde elde edilen sonuçlar

4.3.5 Doğruluk

4.3.5.1 Karnosol analizi için doğruluk

Geliştirilen yöntemin doğruluğunu saptamak için standart katma yöntemi uygulandı. Bunun için Bölüm 3.3.6'da anlatıldığı gibi çalışıldı.

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

C_t: Bulunan toplam karnosol konsantrasyonu,

C_u: Plazma numunesinden alınan analit konsantrasyonu,

C_a: İlave edilen standart çözeltisinin konsantrasyonudur.

Geri kazanım değerleri % aralığında ve %RSD değerleri ile bulundu (Tablo 4.8).

Tablo 4.8: Karnosol için standart katma yöntemine ait analiz sonuçları.

Alınan Konsantrasyon (ng/mL)	İlave edilen Konsantrasyon (ng/mL)	Bulunan Konsantrasyon (ng/mL) (Ortalama $\pm$ SD)	Geri Kazanım (%)	RSD (%)
10	1	10,18 $\pm$ 0,0713	92,70	0,70
10	5	14,61 $\pm$ 0,0416	97,37	0,28
10	10	19,63 $\pm$ 0,0264	98,07	0,13
<i>n=3</i>				

4.3.5.2 Karnosik asit analizi için doğruluk

Geliştirilen yöntemin doğruluğunu saptamak için standart katma yöntemi uygulandı. Bunun için Bölüm 3.3.6’da anlatıldığı gibi çalışıldı.

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

C_t: Bulunan toplam karnosol konsantrasyonu,

C_u: Plazma numunesinden alınan analit konsantrasyonu,

C_a: İlave edilen standart çözeltisinin konsantrasyonudur.

Geri kazanım değerleri % aralığında ve %RSD değerleri ile bulundu (Tablo 4.9).

Tablo 4.9: Karnosik asit için standart katma yöntemine ait analiz sonuçları.

Alınan Konsantrasyon (ng/mL)	İlave edilen Konsantrasyon (ng/mL)	Bulunan Konsantrasyon (ng/mL) (Ortalama $\pm$ SD)	Geri Kazanım (%)	RSD (%)
2	0,75	2,8 $\pm$ 0,0577	101,87	2,07
2	2	3,10 $\pm$ 0,1069	77,5	3,45
2	5	6,71 $\pm$ 0,4000	95,95	5,95
<i>n=3</i>				

4.3.6 Sağlamlık

4.3.6.1 Karnosol analizi için sağlamlık

Yöntemin sağlamlığını belirlemek için metanol:su (83:17, h/h) olan mobil faz oranı 85:15 ve 80:20 olarak 1,2 mL/dk olan akış hızı 1,0 ve 1,4 olarak ve 25 °C olan kolon sıcaklığı 20 °C ve 30 °C olarak değiştirilerek standart çözeltileriyle her konsantrasyon için analizler 3 kez tekrarlandı. Pik alanlarında ve karnosol piklerinin resolüsyon değerlerinde anlamlı bir fark görülmedi ve tüm koşullar arasında en yüksek %RSD değeri 3,30 olarak bulundu (Tablo 4.10).

Tablo 4.10: Karnosol için sağlamlık çalışması sonuçları.

Koşul	Oran	Geri Kazanım (%)	RSD (%)
Akış hızı mL/dakika	1,0	102,97	0,99
	1,4	94,81	3,30
Mobil faz bileşimi	85:15	94,67	0,16
	80:20	95,86	1,26
Kolon sıcaklığı �C	20	102,30	0,74
	30	101,57	1,26

n=3

4.3.6.2 Karnosik asit analizi için sağlamlık

Yöntemin sağlamlığını belirlemek için metanol:su (90:10, h/h) olan mobil faz oranı 95:5 ve 85:15 olarak 1,0 mL/dk olan akış hızı 0,8 ve 1,2 olarak ve 25  C olan kolon sıcaklığı 20  C ve 30  C olarak değiştirilerek standart  zeltileleriyle her konsantrasyon için analizler 3 kez tekrarlandı. Pik alanlarında ve karnosik asit piklerinin resol syon değerlerinde anlamlı bir fark görülmedi ve tüm koşullar arasında en yüksek %RSD değer 8,64 olarak bulundu (Tablo 4.11).

Tablo 4.11: Karnosik asit için sağlamlık çalışması sonuçları.

Koşul	Oran	Geri Kazanım (%)	RSD (%)
Akış hızı mL/dakika	0,8	111,46	8,64
	1,2	112	3,50
Mobil faz bileşimi	95:5	97,93	0,97
	85:15	101,2	2,17
Kolon sıcaklığı �C	20	97	0,36
	30	96,8	0,55

n=3

4.3.7 Çözelti stabilitesi**4.3.7.1 Karnosol analizi için çözelti stabilitesi**

Karnosolun laboratuvar numunesi olarak etanoldeki kalite kontrol çözeltilerinin, oda sıcaklığında karanlıkta 24 saat, otomatik numune örnekleyicisinde 24 saat ve +4  C’de 1 ay stabil kaldığı saptanmıştır. Karnosolün test edilen tüm koşullar altında kararlı olduğunu bulunmuştur.

Tablo 4.12: Karnosol standart çözeltilerine ait stabilite sonuçları.

Uygulama	Geri Kazanım (ortalama±SD) (%)	RSD (%)
Oda sıcaklığında, karanlıkta 24 saat bekletme	98,3	4,23
Buzdolabında +4°C de 1 ay bekletme	99,4	3,12
Otomatik numune örnekleyicisinde 24 saat bekletme	97,4	5,34
n=3		

4.3.7.2 Karnosik asit analizi için çözelti stabilitesi

Karnosik asidin laboratuvar numunesi olarak etanoldeki kalite kontrol çözeltilerinin, oda sıcaklığında karanlıkta 36 saat, otomatik numune örnekleyicisinde 36 saat ve +4 °C’de 1 ay stabil kaldığı saptanmıştır. Karnosik asidin test edilen tüm koşullar altında kararlı olduğunu bulunmuştur.

Tablo 4.13: Karnosik asit standart çözeltilerine ait stabilite sonuçları.

Uygulama	Geri Kazanım (ortalama±SD) (%)	RSD (%)
Oda sıcaklığında, karanlıkta 24 saat bekletme	95,7	4,55
Buzdolabında +4°C de 1 ay bekletme	96,4	4,72
Otomatik numune örnekleyicisinde 24 saat bekletme	98,3	5,12
n=3		

4.4 Farmakokinetik Çalışma Sonuçları

Bölüm 3.6.1’de anlatıldığı şekilde elde edilen sağlıklı gönüllüye ait plazma örnekleri TOPFIT 2.0 farmakokinetik ve farmakodinamik veri analiz programı kullanılarak hesaplanan biberiye ekstresine ait farmakokinetik parametre sonuçları tablo 4.14 ve 4.15’te verilmiştir.

Tablo 4.14: 1000 mg biberiye ekstresinin uygulanmasından sonra karnosolun farmakokinetik parametreleri.

Parametre	Bulunan değer
T _{maks} ^a (h)	1,0
C _{maks} ^b (ng mL ⁻¹)	2,7
t _{1/2} ^c (h)	2,5
AUC ₀₋₆ ^d (ng h mL ⁻¹)	71,6
AUC _{0-∞} ^d (ng h mL ⁻¹)	107,5

^aMaksimum konsantrasyona ulaşma süresi

^bMaksimum konsantrasyon

^cEliminasyon yarı ömrü

^dKonsantrasyon-zaman eğrisinin altındaki alan

Karnosolun maksimum konsantrasyona ulaşma süresi (T_{maks}) 1. saat, maksimum konsantrasyonu (C_{maks}) 2,7 ng/mL, eliminasyon yarı ömrü ($t_{1/2}$) 2,5. saat, dozlama zamanından gözlenen son konsantrasyona kadar eğri altında kalan alan ($AUC_{0-\infty}$) 107,5 ng h/mL bulunmuştur.

Tablo 4.15: 1000 mg biberiye ekstresinin uygulanmasından sonra karnosik asidin farmakokinetik parametreleri.

Parametre	Bulunan değer
T_{maks}^a (h)	1,0
C_{maks}^b (ng mL ⁻¹)	2,2
$t_{1/2}^c$ (h)	6,0
AUC_{0-6}^d (ng h mL ⁻¹)	96,2
$AUC_{0-\infty}^d$ (ng h mL ⁻¹)	154,6

^aMaksimum konsantrasyona ulaşma süresi

^bMaksimum konsantrasyon

^cEliminasyon yarı ömrü

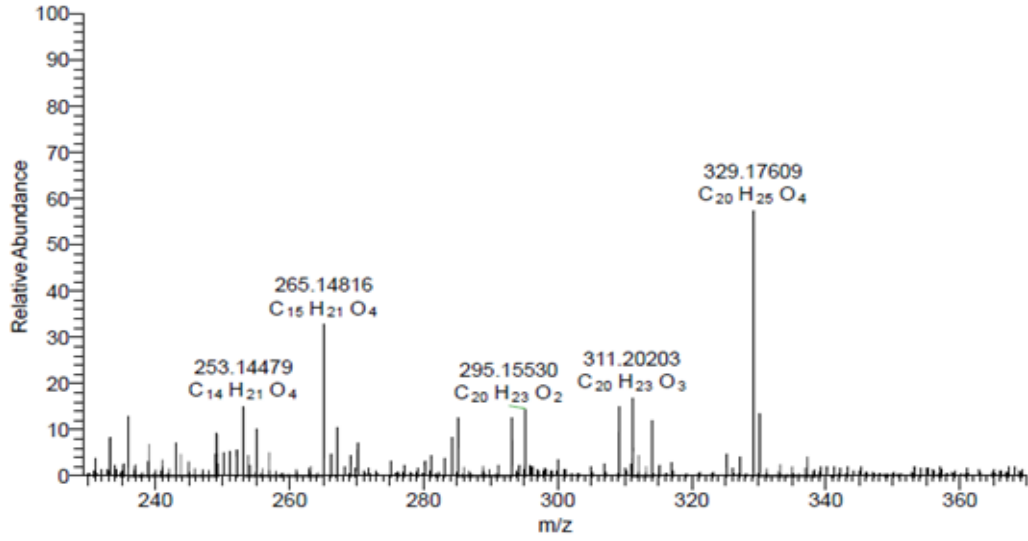
^dKonsantrasyon-zaman eğrisinin altındaki alan

Karnosik asidin maksimum konsantrasyona ulaşma süresi (T_{maks}) 1. saat, maksimum konsantrasyonu (C_{maks}) 2,2 ng/mL, eliminasyon yarı ömrü ($t_{1/2}$) 6. saat, dozlama zamanından gözlenen son konsantrasyona kadar eğri altında kalan alan ($AUC_{0-\infty}$) 154,6 ng h/mL bulunmuştur.

4.5 Kromatogram Üzerinde Belirlenen Karnosol ve Karnosik Asit Maddelerinin Yapılarının Aydınlatılması

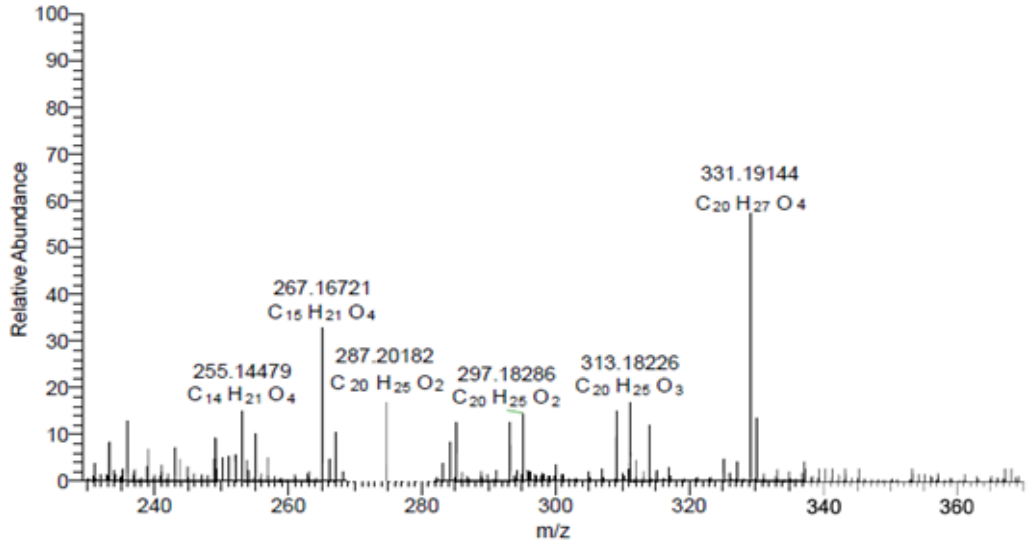
Analitlerin yapılarının aydınlatılması çalışması kapsamında, retansiyon (alığınma) zamanlarında toplanan fraksiyonların LC-MS/MS ve FT-IR spektrumları aşağıdaki şekillerde verilmiştir.

ETL-P #654 RT: 6.44 AV: 1 NL: 8.13E6
T: FTMS - p ESI Full ms[100.0000-1400.0000]



Şekil 4.8 : Retansiyon zamanında toplanan karnosol fraksiyonunun LC-MS/MS spektrumu.

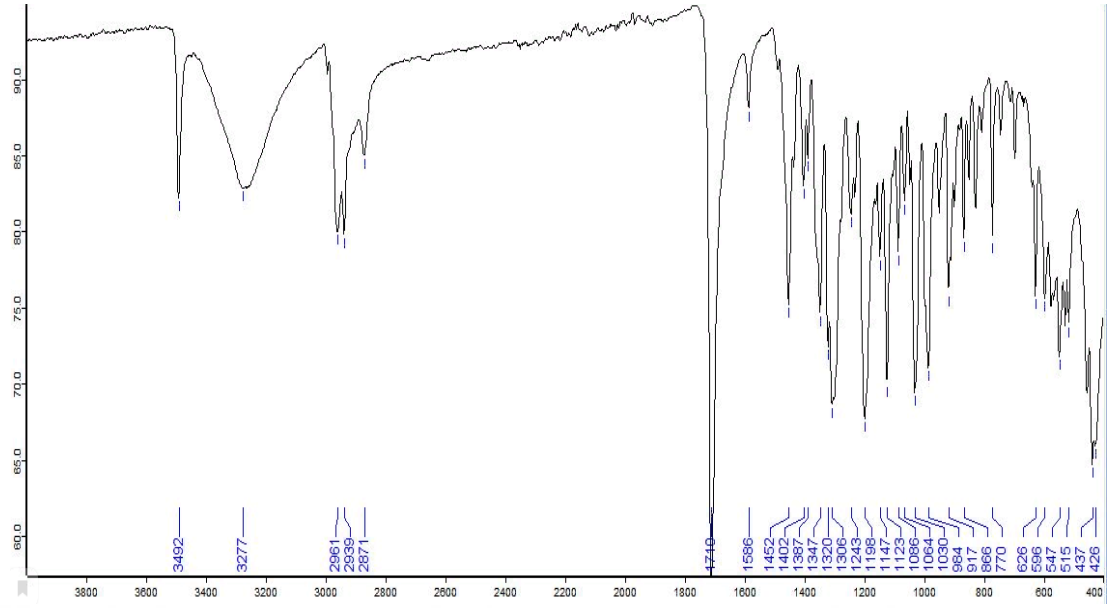
ETL-P #654 RT: 6.44 AV: 1 NL: 8.13E6
T: FTMS - p ESI Full ms[100.0000-1400.0000]



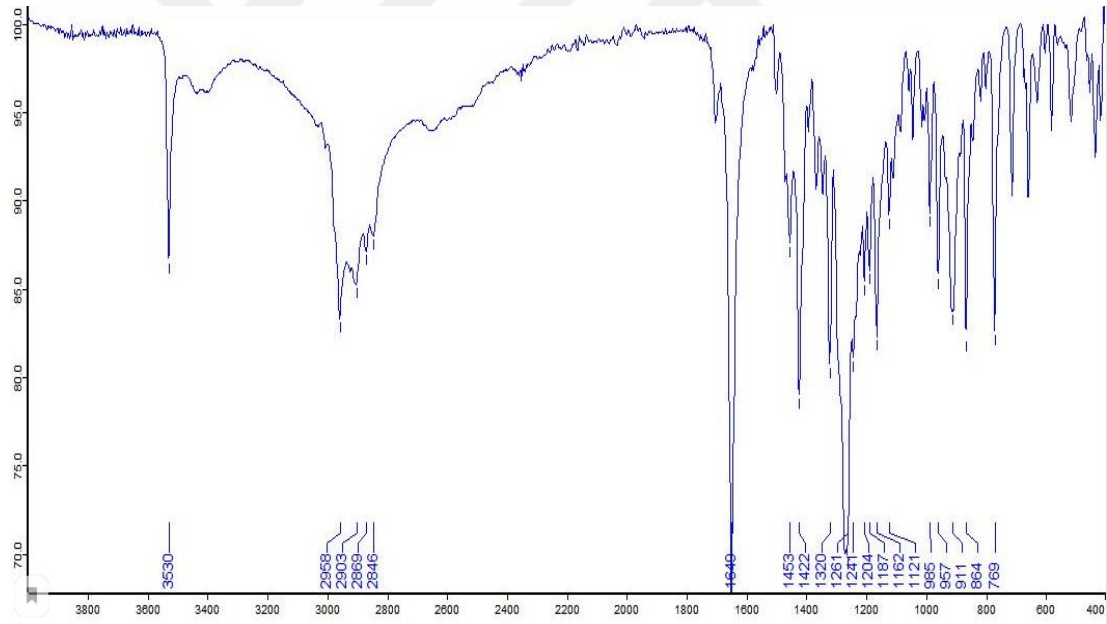
Şekil 4.9 : Retansiyon zamanında toplanan karnosik asit fraksiyonunun LC-MS/MS spektrumu.

Karnosol, ESI-HRMS: kimyasal formülü (C₂₀H₂₆O₄), tam kütle = 330,18311, hesaplanan m/z [M-H]⁺ = 329,17528, deneysel m/z [M-H]⁺ = 329,17609.

Karnosik asit, ESI-HRMS: kimyasal formülü (C₂₀H₂₈O₄), tam kütle = 332,19876, hesaplanan m/z [M-H]⁺ = 331,19093, deneysel m/z [M-H]⁺ = 331,19144.



Şekil 4.10 : Retansiyon zamanında toplanan karnosol fraksiyonunun FT-IR spektrumu.



Şekil 4.11 : Retansiyon zamanında toplanan karnosik asit fraksiyonunun FT-IR spektrumu.

Karnosol FT-IR (cm⁻¹): 3277 (–OH), 2962, 2939, 2871 (alifatik –CH, CH₂, CH₃), 1710 (ester C=O), 1347 (–CH₃ grupları), 626-984 (alifatik karbonların hidrojenleri).

Karnosik asit FT-IR (cm^{-1}): 3530 ($-\text{OH}$), 2958, 2903, 2869, 2846 (alifatik $-\text{CH}$, CH_2 , CH_3), 1640 (karboksilik asit $\text{C}=\text{O}$), 1320 ($-\text{CH}_3$ grupları), 1261 (karboksilik asit $\text{C}-\text{O}$), 789-985 (alifatik karbonların hidrojenleri).

Her iki analitin retansiyon zamanlarında toplanan fraksiyonlarının LC-MS/MS ve FT-IR değerleri yapıların karnosol ve karnosik asit olduğunu doğrulamaktadır.



5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Günümüzde birçok bitkisel kökenli preparat takviye edici gıda adı altında üretilip, piyasaya sunulmaktadır. Takviye edici gıdaların ithalatı, üretimi, işlenmesi ve piyasaya arzına ilişkin usul ve esasları belirlemek amacıyla Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından ‘Takviye Edici Gıdaların İthalatı, Üretimi, İşlenmesi Ve Piyasaya Arzına İlişkin Uygulama Talimatı’ yayımlanmıştır. Bu tip ürünler ilaç adı altında onaylanmadığı için üretim ve pazara sunulma süreci daha hızlı olmaktadır. Bir molekülün ilaç olma yolculuğu 10-15 yıllık klinik öncesi ve klinik faz çalışmalarını içerirken, takviye edici gıdalarda bu süreçler yürütülmemektedir. Ancak, sekonder metabolitlerin tıbbi etkileri ilk çağlardan beri ampirik yöntemlerle ortaya konmuş ve kullanımları süre gelmiştir. Günümüzde de yoğun olarak kullanılan sekonder metabolitlerin tıbbi etkilerine dair aktivite, klinik öncesi ve klinik araştırmalarına dair bilimsel çalışmaların sayısı artan bir ivme ile sürekli yükselmektedir.

Toplum ve sağlık çalışanları olarak sekonder metabolitlerden tıbbi etkileri nedeniyle yararlanmak isterken bu bileşikler içeren ekstreler, formülasyonlar ilaç geliştirme prosedürlerinden geçmediği için bir çoğunun farmakokinetik özellikleri ve biyoyararlanımları bilinmemektedir. Bu eksiklik sekonder metabolitlerden kaynaklı advers etkiler, ilaç veya diğer gıda takviyeleri ile etkileşimler konusunda da büyük bir belirsizlik yaratmaktadır.

Biz bu tez çalışmasında birçok tıbbi etkisi bulunduğu dair bilimsel çalışmalar olan karnosol ve karnosik asit adlı iki diterpen maddenin insan plazmasında ng/mL düzeyinde analizini sağlayan bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirdik. Geliştirilen yöntemi ICH kriterlerine göre valide ettik. Bunu takiben bu iki diterpeni içeren *Rosmarinus officinalis* L. nin yapraklarının etanol 1000 mg’lik ekstresini Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayını alarak 27 yaşındaki sağlıklı erkek gönüllüye oral yoldan uyguladık. Böylelikle her iki bileşiğe ait plazma analizleri ile farmakokinetik verileri ortaya çıkardık. Karnosol ve karnosik asit bileşiklerinin seçilmesinin nedeni 26-51 literatürlerinde ortaya konan tıbbi etkilerini gösteren makaleler ve özellikle de nöroprotektif ve antikarsinogenik etkilerinin çok ilgi

uyandırması ve literatürde bu maddelere ait farmakokinetik verilerin yer almamasıydı. 60 no'lu referansa baktığımızda sırasıyla karnosol ve karnosik asit için, sıçanlar üzerinde yapılmış farmakokinetik incelemeye rastlamak mümkündür. Bu tez çalışması karnosol ve karnosik asit için insana dair farmakokinetik verileri hesaplayan ilk çalışmadır.

Bunun dışında literatürde karnosolun ve karnosik asidin birarada analizini yapan sıvı kromatografisi ve kapiler elektroforez yöntemleri mevcut ancak hepsi bitki ekstreleri içinde miktar tayini yapan yöntemlerdir. Hiçbirisi plazmada analiz sağlamamaktadır. Bir çalışmada HPLC ESLD dedektörü ile kombine edilmiştir, sunulan yönteme göre daha komplike kromatografik koşulları vardır [52], bir diğer HPLC yönteminde DAD kullanılmış ve yine ekstrelerde $\mu\text{g/mL}$ düzeyinde yani hassasiyeti sunulan yönteme göre oldukça düşük sonuçlar elde edilmiştir [53]. Ekstreler için geliştirilmiş bir LC-MS/MS yönteminde ise hassas sonuçlar elde edilmesine rağmen pahalı dedeksiyon ve sofistike operatör gereksinimi mevcuttur [56], bir diğer HPLC-UV yönteminde de komplike bir numune hazırlama süreci ve düşük hassasiyetle ekstrelerden analizler yapılmıştır [57]. Varolan kapiler elektroforez yöntemleri de $\mu\text{g/mL}$ düzeyinde ve sadece ekstrelerde uygulanabilecek analiz imkanı sağlamaktadırlar [55, 60].

Oysa bu çalışmada, ng/mL düzeyinde analizler sağlanmakta ve validasyon çalışmalarında her iki madde için de yüksek seçicilik, varolan yöntemlere göre düşük LOD ve LOQ değerleri, yüksek kesinlik ve doğruluk, sağlamlık gözlenmektedir.

Bu çalışmada kullanılan numune hazırlama yöntemi olan sıvı-sıvı ekstraksiyon tekniği oldukça hızlı, basit bir prosedür ve yüksek verim sağlamaktadır. UV dedeksiyon bulunabilecek en basit ve kullanımı en kolay dedeksiyondur. Karnosol için $3,40 \pm 0,01$, karnosik asit için $4,2 \pm 0,03$ olan retansiyon zamanları ne kadar hızlı bir analiz yapıldığını göstermektedir. Ayrıca, Bölüm 4.2.3'te sunulan kromatografik sistem parametreleri de ayırmaların yüksek kalitede gerçekleştiğini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak, sunulan bu çalışma tıbbi etkilerine dair çok fazla araştırma ve kullanım alanı olan karnosol ve karnosik asit bileşiklerinin insan plazmasında hassas ve kaliteli analizi için imkan sağlamaktadır. Bu yöntemlerle bu analitlere dair her türlü farmakokinetik, biyoyararlanım, eşdeğerlik ve adli analizleri yapmak mümkündür. Sunulan prototip farmakokinetik ve biyoyararlanım çalışmaları ise bu maddelerin kullanımında nasıl bir dağılım, sistemik dolaşıma geçme, etki süresi, yarılanma ömrü,

kan konsantrasyonları (doz çalışmaları için) ve güvenilirlik profillerine sahip olduğunu ilk kez ortaya koymuştur.



KAYNAKLAR

- [1] **Kaya, A.** (2010). *Tıbbi Bitkiler ve Etnobotanik Çalışmalar* (sayfa 11-19). Bitkilerle Tedavi Sempozyumu, İstanbul.
- [2] **Davis, P. H.** (1982). *Flora of Turkey and East Aegean Islands*. Edinburgh University Press.
- [3] **Cantino, P. D., Harley, R. M., & Wagstaff, S. J.** (1992). *Genera of Lamiaceae: status and classification*. In: **Harley, R. M., & Reynolds, T. (eds)** *Advances in Labiate Science*. Kew: Royal Botanic Gardens.
- [4] **Bai, N., He, K., Roller, M., Lai, C. S., Shao, X., & Pan, M. H.** (2010). Flavonoids and phenolic compounds from *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(9), 5363-5367.
- [5] **Hussain, A. I., Anwar, F., Chatha S. A. S., Jabar, A., Mahboob, S., & Nigam, P. S.** (2010). *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 1070-1078.
- [6] **Angioni, A., Barra, A., Cereti, E., Barile, D., Coisson, J. D., Arlorio, M., Dessi, S., Coroneo, V., & Cabras, P.** (2004). Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essentail of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), 3530-3535.
- [7] **Kuhlmaan, A., & Röhl, C.** (2006). Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro. Cultures of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*.) and their antiinflammatory effect on lipopolysaccharide-activated microglia. *Pharmaceutical Biology*, 44(6), 401-410.
- [8] **BirtiĆ, S., Dussort, P., Pierre, F. X., Bily, A., & Roller, M.** (2015). Carnosic acid. *Phytochemistry*, 115, 9-19.
- [9] **Cantino, P. D.** (1992a). Evidence for a polyphyletic origin of the Lamiaceae. *Ann. Missouri Bot. Gar.*, 79, 361-379.
- [10] **Başer, K. H. C., & N, Kırimer.** (2006). Essantial oils of Lamiaceae plants of Turkey. *Acta Horticulture*, 723, 163-172.
- [11] **Cantino, P. D.** (1992b). *Toward a phylogenetic classification of the Labiate*. In: **Harley, R. M., & Reynolds, T. (eds)** *Advances in Labiate Science*. Kew: Royal Botanic Gardens.
- [12] **Başer, K. H. C.** (1993). Essential oils of anatolian Labiateae: A profile. *Acta Horticulture*, 333, 217-237.
- [13] **Özcan, M.** (2003). Antioxidant activities of rosemary, sage, and sumac extracts and their combinations on stability of natural peanut oil. *Journal of Medicinal Food*, 6(3), 267-270.
- [14] **Rašković, A., Milanović, I., Pavlović, N., Čebović, T., Vukmirović, S., & Mikov, M.** (2014). Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 225.

- [15] **Topçu, G., & Ulubelen, A.** (1991). New diterpenoids from an Endemic *Salvia* Species. *İlaç Hammaddeleri Toplantısı* (sayfa 61-71). Anadolu Üniversitesi Yayınları, Eskişehir.
- [16] **Khayyal, M. T., el-Ghazaly, M. A., Kenawy, S. A., Seif-el-Nasr, M., Mahran, L. G., Kafafi, Y. A., & Okpanyi, S. N.** (2001). Antiulcerogenic effect of some gastrointestinally acting plant extracts and their combination. *Arzneimittelforschung*, 51(7), 545-553.
- [17] **Mill, R. R.** (1982). *Rosmarinus L.* – In: Davis, P. H. ed. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Edinburg: Edinburg University Press.
- [18] **Baytop, A.** (1996). *Farmasötik Botanik Ders Kitabı*, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul.
- [19] **Hanson, R. J.** “Tutorial Chemistry Texts, Natural Products: The Secondary Metabolites”, *Royal Society of Chemistry*, pp. 1-2.
- [20] **Dey, P. M., & Harborne, J. B.** (1989). *Methods in Plant Biochemistry (Volume 1)*. Academic Press, London.
- [21] **Sell, C. S.** (2003). *A Fragrant Introduction to Terpenoid Chemistry*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- [22] **Kılıç, T.** (2002). *S. lycia ve S. leptoclada Türlerinin Diterpen Bileşiklerinin İzolasyonu ve Karakterizasyonu* (Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı).
- [23] **Çulhaoğlu, B.** (2011). *Salvia chrysophylla ve Salvia trichoclada bitkilerindeki sekonder metabolitlerin izolasyonu, yarı sentetik türevlerinin eldesi, antioksidan ve antikolinesteraz aktivitelerinin incelenmesi* (Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı).
- [24] **Boulebd, H.** (2021). Modeling the peroxy radical scavenging behavior of Carnosic acid: Mechanism, kinetics, and effects of physiological environments. *Phytochemistry*, 192, 112950.
- [25] **Machado, D. G., Cunha, M. P., Neis, V. B., Balen, G. O., Colla, A., Bettio, L. E. B., Oliveira, A., Pazini, F. L., Dalmarco, J. B., Simionatto, E. L., Pizzolatti, M. G., & Rodrigues, A. L. S.** (2013). Antidepressant-like effects of fractions, essential oil, carnosol and betulinic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. *Food Chemistry*, 136(2), 999-1005.
- [26] **Sakr, S. A., & Lamfon, H. A.** (2012). Protective effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves extract on carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity in albino rats. *Life Sciences*, 9(1), 779-785.
- [27] **Collins, M. A. & Charles, H. P.** (2017). Antimicrobial activity of Carnosol and Ursolic acid: two anti-oxidant constituents of *Rosmarinus officinalis* L. *Food Microbiology*, 4(4), 311-315.
- [28] **Furtado, R. A., De Araujo, F. R. R., Resende, F. A., Cunha, W. R., & Tavares, D. C.** (2010). Protective effect of rosmarinic acid on V79 cells evaluated by the micronucleus and comet assays. *Journal of Applied Toxicology*, 30(3), 254-259.
- [29] **Chang, S. S., Ostic-Matijasavic, B., Hsieh, O. A. L., & Huang, C. L.** (1977). Natural antioxidants from Rosemary and Sage. *Journal of Food Science*, 44(4), 1102-1106.
- [30] **Frankel, E. N., Huang, S. W., Aeschbach, R., & Prior, E.** (1996). Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(1), 131-135.

- [31] **Rozman, T., & Jersek, B.** (2009). Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of *Listeria*. *Acta agriculturae Slovenica*, 93(1), 51-58.
- [32] **Erkan, N., Ayranci, G., & Ayranci, E.** (2008). Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid, and sesamol. *Food Chemistry*, 110(1), 76-82.
- [33] **Bernardes, W. A., Lucarini, R., Tozatti, M. G., Flauzino L. G. B., Souza, M. G. M., Turatti, I. C. C., Silva, M. L. A., Martins, C. H. G., Filho, A. A. S. W., & Cunha W. R.** (2010). Antibacterial activity of the essential oil from *Rosmarinus officinalis* and its major components against oral pathogens. *Z Naturforsch C J Biosci*, 65(9-10), 588-593.
- [34] **Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M. B., Taghizadeh, M., Astaneh, S. A., & Rasooli, I.** (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*, 102(3), 898-904.
- [35] **Rasooli, I., Fakoor, M. H., Yadegarinia, D., Gachkar, L., Allameh, A., & Rezaei, M. B.** (2008). Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 122(1), 135-139.
- [36] **Lo, A. H., Liang, Y. C., Lin-Shiau, S. Y., Ho, C. T., & Lin, J. K.** (2002). Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor- κ B in mouse macrophages. *Carcinogenesis*, 23(6), 983-991.
- [37] **Tsai, S. J., & Yin, M. C.** (2008). Antioxidative and anti-inflammatory protection of oleanolic acid and ursolic acid in PC12 cells. *Journal of Food Science*, 73(7), 174-178.
- [38] **Altinier, G., Sosa, S., Aquino, R. P., Mencherini, T., Loggia, R. D., & Tubaro, A.** (2007). Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(5), 1718-1723.
- [39] **González-Trujano, M. E., Peña, E. I., Martínez, A. L., Moreno, J., Guevara-Fefer, P., Deciga-Campos, M., & López-Muñoz, F. J.** (2007). Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(3), 476-482.
- [40] **Martínez, A. L., González-Trujano, M. E., Chávez, M., & Pellicer, F.** (2012). Antinociceptive effectiveness of triterpenes from rosemary in visceral nociception. *Journal of Ethnopharmacology*, 142(1), 28-34.
- [41] **Lucarini, R., Bernardes, W. A., Ferreira, D. S., Tozatti, M. G., Furtado, R., Bastos, J. K., Pauletti, P. M., Januário, A. H., Silva, M. L. A., & Cunha, W. R.** (2013). In vivo analgesic and anti-inflammatory activities of *Rosmarinus officinalis* aqueous extracts, rosmarinic acid and its acetyl ester derivative. *Pharmaceutical Biology*, 51(9), 1087-1090.
- [42] **Martínez, A. L., González-Trujano, M. E., Chávez, M., Pellicer, F., Moreno, J., & López-Muñoz, F. J.** (2011). Hesperidin produces antinociceptive response and synergistic interaction with ketorolac in an arthritic gout-type pain in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 97(4), 683-689.
- [43] **Giacobini, E.** (2002). Long-term stabilizing effect of cholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer's disease, *J Neural Transm Suppl.*, 62, 181-187.

- [44] **Orhan, I., Aslan, S., Kartal, M., Şener, B., & Başer, K. H. C.** (2008). Inhibitory effect of Turkish *Rosmarinus officinalis* L. on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes. *Food Chemistry*, 108(2), 663-668.
- [45] **Alnamer, R., Alaoui, K., Boudida, E., Benjouad, A., & Cherrah, Y.** (2012). Psychostimulant activity of *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Journal of Natural Products*, 5, 83-92.
- [46] **Machado, D. G., Bettio, L. E., Cunha, M. P., Capra, J. C., Dalmarco, J. B., Pizzolatti, M. G., & Rodrigues, A. L. S.** (2009). Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: involvement of the monoaminergic system. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(4), 642-650.
- [47] **Machado, D. G., Cunha, M. P., Neis, V. B., Balen, G. O., Colla, A. R., Grando, J., Brocardo, P. S., Bettio, L. E. B., Dalmarco, J. B., Rial, D., Prediger, R. D., Pizzolatti, M.G., & Rodrigues, A. L. S.** (2012). *Rosmarinus officinalis* L. hydroalcoholic extract, similar to fluoxetine, reverses depressive-like behavior without altering learning deficit in olfactory bulbectomized mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 143(1), 158-169.
- [48] **Machado, D. G., Neis, V. B., Balen, G. O., Colla, A., Cunha, M. P., Dalmarco, J. B., Pizzolatti, M. G., Prediger, R. D., & Rodrigues, A. L. S.** (2012). Antidepressant-like effect of ursolic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. in mice: evidence for the involvement of the dopaminergic system. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 103(2), 204-211.
- [49] **El Omri, A., Han, J., Abdrabbah, M. B., & Isoda, H.** (2012). Down regulation effect of *Rosmarinus officinalis* polyphenols on cellular stress proteins in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Cytotechnology*, 64(3), 231-240.
- [50] **Waggas, A. M., & Balawi, E. A.** (2008). Neurophysiological Study on Possible Protective Effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) Leaves Extract in Male Albino Rats Treated with Acrylamide. *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, 3(2), 163-171.
- [51] **Kosaka, K., & Yokoi, T.** (2003). Carnosic acid, a component of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), promotes synthesis of nerve growth factor in T98G human glioblastoma cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26(11), 1620- 1622.
- [52] **Okamura, N., Fujimoto Y., Kuwabara, S., & Yagi, A.** (1994). High-performance liquid chromatographic determination of carnosic acid and carnosol in *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. *Journal of Chromatography A*, 679(2), 381-386.
- [53] **Li, P., Liu, A., Li, Y., Yuan, B., Xiao, W., Liu, Z., Zhang, S., & Lin, H.** (2019). Development and Validation of an Analytical Method Based on HPLC-ELSD for the Simultaneous Determination of Rosmarinic Acid, Carnosol, Carnosic Acid, Oleanolic Acid and Ursolic Acid in Rosemary. *Molecules*, 24(2), 323.
- [54] **Lu, P., Ma, J-q., Li, P., Zhou, H., Xu, X-m., & Guo W.** (2017). Determination of carnosic acid and carnosol in *Rosmarinus officinalis* L. by high-performance capillary electrophoresis. *Instrumentation Science & Technology*, 45(3), 268-275.
- [55] **Saenz-Lopez, R., Fernandez-Zurbano, P., & Tena, M. T.** (2002). Capillary electrophoretic separation of phenolic diterpenes from rosemary. *Journal of Chromatography A*, 953(1-2), 251-256.

- [56] **Herrero, M., Plaza, M., Cifuentes, A., & Ibanez, E.** (2010). Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and in-vitro assays. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2512-2520.
- [57] **Troncoso, N., Sierra, H., Carvajal, L., Delpiano, P., & Günther, G.** (2005). Fast high performance liquid chromatography and ultraviolet-visible quantification of principal phenolic antioxidant in fresh rosemary, *Journal of Chromatography A*, 1100(1), 20-25.
- [58] **Thorsen, M. A., & Hildebrand, K. S.** (2003). Quantitative determination of phenolic diterpenes in rosemary extracts: Aspects of accurate quantification, *Journal of Chromatography A*, 995(1-2), 119-125.
- [59] **Haq, F. U., Ali, A., Akhtar, N., Aziz, N., Khan, M. N., Ahmad, M., & Musharraf, S. G.** (2020). A high-throughput method for dereplication and assessment of metabolite distribution in *Salvia* species using LC-MS/MS. *Journal of Advanced Research*, 24, 79-90.
- [60] **Wang, L., Gan, C., Wang, Z., Liu, L., Gao, M., Li, Q., & Yang, C.** (2017). Determination and Pharmacokinetic Study of Three Diterpenes in Rat Plasma by UHPLC-ESI-MS/MS after Oral Administration of *Rosmarinus officinalis* L. Extract. *Molecules*, 22(6), 934.
- [61] **The International Conference on Harmonisation (ICH).** (2005). *ICH Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use on validation of analytical procedures Q2A*. IFPM, Geneva.
- [62] **Kole, P. L., Venkatesh, G., Kotecha, R., & Sheshala, R.** (2011). Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomed Chromatogr*, 25(1-2), 199-217.
- [63] **Boucher, B. A., Wood, G. C., & Swanson, J. M.** (2006). Pharmacokinetic changes in critical illness. *Critical Care Clinics*, 22(2), 255-271.
- [64] **Michael, M., & Doherty, M.** (2005). Tumoral drug metabolism: overview and its implications for cancer therapy. *J.Clin.Oncol.*, 23(1), 205-229.
- [65] **Yang, Q., Xie, L., Wu, Z., Chen, X., Yang, Y., Liu, J., & Zhang, O.** (2013). Pharmacokinetics of florfenicol after oral administration in yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 44(4), 586-592.

EKLER

EK A: Etik kurul onayı

EK A



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Burhan CEYLAN

Doğum Tarihi ve Yeri :

E-posta :

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2015, Trakya Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü
- **Yüksek lisans** : 2018, Trakya Üniversitesi, Temel Eczacılık Bilimleri Anabilim Dalı

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2015 Trakya Üniversitesi – Fen Fakültesi – Kimya Bölümü Birincilik Ödülü

DOKTORA TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Ceylan, B., Tırıs, G., & Tekkeli S.** (2021). A New HPLC Method with UV Detection for the Determination of Carnosol in Human Plasma and Application to a Pharmacokinetic Study. *Chromatographia*, 84(9), 855-860.

DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Aslan, N., Ceylan, B., Koç, M. M., & Fındık, F.** (2020). Metallic nanoparticles as X-Ray computed tomography (CT) contrast agents: A review. *Journal of Molecular Structure*, 1219, 128599.
- **Ceylan B., Yeşiloğlu Y.** (2017). Üvez Ekstraktlarının Toplam Fenolik Madde İçeriğinin Tayini. *International Symposium On Medicinal, Aromatic and Dye Plants*, October 5-7, Malatya, Turkey.
- **Ceylan B., Yeşiloğlu Y.** (2018). Determination of the total antioxidant activity by the phosphomolybdenum method of rowanberry extracts. *1st International Balkan Chemistry Congress*, September 17-20, Edirne, Turkey.
- **Ceylan B., Yeşiloğlu Y.** (2018). Determination of the anthocyanin content of rowanberry extracts. *1st International Balkan Chemistry Congress*, September 17-20, Edirne, Turkey.
- **Ceylan B., Yeşiloğlu Y.** (2018). A spectroscopic study on the determination of total ferric (Fe³⁺) ions reduction capacity of rowanberry extracts. *3rd International Conference on Organic Electronic Material Technologies*, September 20-22, Kırklareli, Turkey.

- **Ceylan B., Yeşiloğlu Y.** (2018). A spectroscopic study on the chelating activity of iron(II) ions of rowanberry extracts. *3rd International Conference on Organic Electronic Material Technologies*, September 20-22, Kırklareli, Turkey.
- **Ceylan B., Yeşiloğlu Y.** (2018). Determination of the total flavonoid substance content of rowanberry extracts. *4rd International Symposium of Medicinal and Aromatic Plants*, October 2-4, İzmir, Turkey.
- **Ceylan B., Yeşiloğlu Y.** (2018). Determination of the chlorophyll content of the rowanberry leaf. *4rd International Symposium of Medicinal and Aromatic Plants*, October 2-4, İzmir, Turkey.
- **Serim E., Tekkeli Ş. E., Ceylan B.** (2019). Determination of apigenin in cosmetic formulations containing chamomile extract. *International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development*, July 1-3, Malatya, Turkey.
- **Ceylan B., Aslan N., Koç M. M.** (2019). Bizmut nanoparticles as X-ray computed tomography (CT) and multipurpose contrast agents. *International Natural Science, Engineering and Material Technologies Conference*, September 9-10, İstanbul, Turkey.
- **Ceylan B., Aslan N., Koç M. M.** (2019). Gold nanoparticles as X-ray computed tomography (CT) and multipurpose contrast agents. *International Natural Science, Engineering and Material Technologies Conference*, September 9-10, İstanbul, Turkey.
- **Ceylan B., Aslan N., Koç M. M.** (2019). Metallic nanoparticles as X-ray computed tomography (CT) and multipurpose contrast agents. *International Natural Science, Engineering and Material Technologies Conference*, September 9-10, İstanbul, Turkey.
- **Dayan S., Ceylan B., Gazioğlu I., Kurt Zengin B.** (2020). Determination of the antidiabetic activity of callus tissue extracts of *Bellevalia edirnensis* Özhatay & Mathew: An endemic plant from Balkans. *II. International, Agricultural, Biological & Life Science Conference*, September 1-3, Edirne, Turkey.
- **Dayan S., Ceylan B., Gazioğlu I., Kurt Zengin B.** (2020). Determination of the anti-alzheimer activity of *Bellevalia edirnensis* Özhatay & Mathew (*Asparagaceae*) callus tissue extracts. *II. International, Agricultural, Biological & Life Science Conference*, September 1-3, Edirne, Turkey.
- **Bucak S., Tekkeli Ş. E., Ceylan B., Tırıs G.** (2020). A new HPLC method for the determination of Allicin and S-Allyl cysteine in garlic (*Allium sativum* L.) extracts. *II. International, Agricultural, Biological & Life Science Conference*, September 1-3, Edirne, Turkey.
- **Önal C., Ceylan B., Tekkeli Ş. E.** (2020). Ultra fast liquid chromatographic (UFLC) analysis of capsaicinoids in chilli sauce. *II. International, Agricultural, Biological & Life Science Conference*, September 1-3, Edirne, Turkey.
- **Ceylan B., Tekkeli Kepekci E., Önal C.** (2021). Development of A New HPLC Method for the Determination of Mesalazine in Human Plasma by Fluorimetric Derivatization and Application to A Pharmacokinetic Study. *13th International Symposium on Pharmaceutical Sciences*, June 22-25, Ankara, Turkey.