

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI TIBBİ BİTKİ EKSTRELERİNİN ANTİOKSİDAN VE ANTİKOLİNESTERAZ AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

EZGİCAN ULAÇ

DANIŞMAN
PROF. DR. UFUK KOLAK

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI

İSTANBUL-2016

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programında Yüksek Lisans öğrencisi Ezgican ULAÇ tarafından Prof. Dr. Ufuk KOLAK'ın danışmanlığında hazırlanan "Bazı Tıbbi Bitki Ekstrelerinin Antioksidan ve Antikolinesteraz Aktivitelerinin Belirlenmesi" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 06/09/2016 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı
Prof. Dr. Serap SAĞLIK ASLAN
İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Analitik Kimya Anabilim Dalı

Jüri-Danışman
Prof. Dr. Ufuk KOLAK
İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Analitik Kimya Anabilim Dalı

Jüri
Yrd. Doç. Dr. Fatemah BAHADORİ
Bezmi Alem Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı

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 çalışmayla 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 olmadığı beyan ederim.

Ezgican ULAÇ



İTHAF

En değerli varlığım 'aileme' ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının hazırlanmasında çok değerli bilgisinden ve deneyiminden yararlandığım, çalışmalarımda bana en büyük enerji ve ilham kaynağı olan, ilgisini benden esirgemeyen, bana büyük sabır gösteren, akademik yaşantısına ve kişiliğine hayran olduğum, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum saygı değer danışman hocam *Sayın Prof. Dr. Ufuk KOLAK*'a çok teşekkür ederim.

İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Başkanı *Sayın Prof. Dr. Serap SAĞLIK ASLAN*'a teşekkür ederim.

En yoğun çalışmaları sırasında dahi benden her türlü yardımını ve güler yüzünü esirgemeyen sevgili *Arş. Gör. Dr. Pelin KÖSEOĞLU YILMAZ'* a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında bana en büyük manevi desteği gösteren canım anneciğim Leyla ULAÇ'a teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 50585

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ X
ÖZET ..... Xİİİ
ABSTRACT ..... XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Aslanpençesi, Biberiye, Devedikeni, Ebegümeci ve Isırganotu Hakkında Botanik Bilgiler ve Halk Arasında Kullanılışları 3
2.1.1. Aslanpençesi (*Aphanes arvensis* L., syn: *Alchemilla arvensis* (L.) Scop.) 3
2.1.2. Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) 3
2.1.3. Devedikeni (*Silybum marianum* L. Gaertner) 4
2.1.4. Ebegümeci (*Malva sylvestris* L.) 4
2.1.5. Isırganotu (*Urtica dioica* L.) 5
2.2. Aslanpençesi, Biberiye, Devedikeni, Ebegümeci ve Isırganotu ile Yapılan Aktivite Çalışmaları 6
2.3. Antioksidanlar 8
2.4. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri 10
2.5. Alzheimer Hastalığı 10
3. GEREÇ VE YÖNTEM 11
3.1. Çalışmanın Yapıldığı Yer 11
3.2. Bitkisel Materyaller 11
3.3. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler 11
3.3.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler 11
3.3.2. Çözeltiler 12
3.3.2.1. Toplam Fenolik ve Flavonoit Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması 12

3.3.2.2. DPPH Serbest, ABTS Katyon ve Süperoksit Anyon Radikalleri Giderim Aktiviteleri Yöntemlerinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması 12
3.3.2.3. Ellman Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması 13
3.3.2.4. Standart Çözeltilerinin Hazırlanması 15
3.4. Ekstrelerin Hazırlanışı 15
3.5. Cihazlar ve Diğer Gereçler 16
3.6. Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit İçerik Tayini 17
3.6.1. Toplam Fenolik İçerik Tayini 17
3.6.2. Toplam Flavonoit İçerik Tayini 18
3.7. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri 19
3.7.1. DPPH Serbest Radikali Giderim Yöntemi 19
3.7.2. ABTS Katyon Radikali Giderim Yöntemi 20
3.7.3. Süperoksit Anyon Radikali Giderim Yöntemi 20
3.8. Ellman Yöntemi 21
3.8.1. Asetilkolinesteraz aktivite tayini 21
3.8.2. Butirilkolinesteraz aktivite tayini 22
3.9. İstatistik Hesaplamalar 22
4. BULGULAR 23
4.1. Fenolik ve Flavonoit Miktar Tayini 23
4.2. Antioksidan Aktivite Sonuçları 24
4.2.1. DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi 24
4.2.2. ABTS Katyon Radikali Giderim Aktivitesi 25
4.2.3. Süperoksit Anyon Radikali Giderim Aktivitesi 26
5. SONUÇ VE TARTIŞMA 28
KAYNAKLAR 31
HAM VERİLER 36
ÖZGEÇMİŞ 39

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 4-1: Fenolik ve Flavonoit Miktar Tayini[a] 23
Tablo 4-2: Antikolinesteraz Aktivite[a] 27

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Türkiye'de Aslanpençesi Bitkisinin Yetiştiği Alanlar 3
Şekil 2-2: Türkiye'de Biberiye Bitkisinin Yetiştiği Alanlar 4
Şekil 2-3: Türkiye'de Devedikeni Bitkisinin Yetiştiği Alanlar 4
Şekil 2-4: Türkiye'de Ebegümeci Bitkisinin Yetiştiği Alanlar 5
Şekil 2-5: Türkiye'de Isırganotu Bitkisinin Yetiştiği Alanlar 5
Şekil 3-1: Pirokatekolün Ölçü Grafiği 17
Şekil 3-2: Kersetinin Ölçü Grafiği 18
Şekil 3-3: DPPH Molekülünün Antioksidan Madde ile Reaksiyonu 19
Şekil 3-4: ABTS Katyon Radikali Oluşum Reaksiyonu 20
Şekil 3-5: Süperoksit Anyon Radikali Oluşumu ve NBT ile Reaksiyonu 21
Şekil 4-1: DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi 25
Şekil 4-2: ABTS Katyon Radikali Giderim Aktivitesi 26
Şekil 4-3: Süperoksit Anyon Radikali Giderim Aktivitesi 26

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AD: Aktif değil

$RO^{\cdot}$: Alkoksi radikali

$Al(NO_3)_3.9H_2O$: Alüminyum nitrat nonahidrat

ACh: Asetilkolin

AcI: Asetilkolin iyodür

AChE: Asetilkolinesteraz

AAE: Askorbik aside eşdeğer

AA: Aslanpençesi aseton ekstresi

AE: Aslanpençesi etil alkol ekstresi

AH: Aslanpençesi hekzan ekstresi

ABTS: 2,2′-Azino-bis(3-etilbenztiazolin-6-sülfonik asit)

$NO^{\cdot}$: Azot monoksit radikali

CUPRAC: Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi

BA: Biberiye aseton ekstresi

BE: Biberiye etil alkol ekstresi

BH: Biberiye hekzan ekstresi

BuI: Butirilkolin iyodür

BChE: Butirilkolinesteraz

BHA: *2- t*-Bütil-4-hidroksianisol

FRAP: Demir (III) iyonu indirgeme gücü

DA: Devedikeni aseton ekstresi

DE: Devedikeni etil alkol ekstresi

DH: Devedikeni hekzan ekstresi

DPPH: 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil

DTNB: 5,5-Ditiyobis (2-nitro benzoik asit)

EA: Ebegümeci aseton ekstresi

EE: Ebegümeci etil alkol ekstresi

EH: Ebegümeci hekzan ekstresi

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

PMS: Fenazin meta-sülfat

FCR: Folin-Ciocalteu reaktifi

GAE: Gallik aside eşdeğer

g: Gram

H_2O_2: Hidrojen peroksit

$OH^{\cdot}$: Hidroksil radikali

IA: Isırganotu aseton ekstresi

IE: Isırganotu etil alkol ekstresi

IH: Isırganotu hekzan ekstresi

CTE: Kateşine eşdeğer

QE: Kersetine eşdeğer

kg: Kilogram

L: Litre

µg: Mikrogram

µL: Mikrolitre

MLP: Mikrosomal lipit peroksit

mg: Miligram

mL: Mililitre

mmol: Milimol

mM: Milimolar

ppm: Milyonda bir birim

M: Molar

nm: Nanometre

NADH: Nikotinamitadenindinükleotit

NBT: Nitroblutetrazolyum

NO^{-}: Nitroksi anyonu

NO^{+}: Nitrozil katyonu

HNO_2: Nitröz asit

ORAC: Oksijen radikal absorplama kapasitesi

O_3: Ozon

$HOO^{\cdot}$: Peroksi radikali

CH_3COOK: Potasyum asetat

$K_2S_2O_8$: Potasyum peroksi disülfat

ºC: Santigrat derece

$^1O_2$: Singlet oksijen

$O^{\cdot}{}_2^-$: Süperoksit anyon radikali

$NaH_2PO_4.2H_2O$: Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat

$Na_2HPO_4.2H_2O$: Sodyum hidrojen fosfat dihidrat

Na_2CO_3: Sodyum karbonat

TRAP: Toplam radikal tutma parametresi

TEAC: Troloxa eşdeğer antioksidan kapasite

UV: Ultraviyole

U: Ünite

α-Toc: α-Tokoferol

ÖZET

Ulaç, E. (2016). Bazı Tıbbi Bitki Ekstrelerinin Antioksidan ve Antikolinesteraz Aktivitelerinin Belirlenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Bu çalışmada, Türkiye'de ve dünyada halk arasında tıbbi amaçla kullanılan aslanpençesi, biberiye, devedikeni, ebegümeci ve ısırganotu bitkilerinden hazırlanan hekzan, aseton ve etil alkol ekstrelerinin toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarlarının, antioksidan ve antikolinesteraz etkilerinin belirlenmesi amaçlandı. DPPH serbest radikali, ABTS katyon radikali ve süperoksit anyon radikali süpürücü yöntemleri ile ekstrelerin antioksidan potansiyelleri ve Ellman yöntemi ile antikolinesteraz etkileri tayin edildi. Aslanpençesi etil alkol ekstresinin hem fenolik hem flavonoit miktar bakımından diğer ekstrelerden daha zengin olduğu tespit edildi. DPPH yönteminde aslanpençesi etil alkol ve devedikeni hekzan ekstreleri, ABTS yönteminde aslanpençesi aseton ve etil alkol ekstreleri ile biberiye aseton ve etil alkol ekstrelerinin 100 µg/mL konsantrasyonda en aktif ekstreler oldukları belirlendi. Hiçbir ekstre süperoksit anyon radikalini gidermedi. Isırganotu etil alkol ekstresinin galantaminden daha yüksek, ebegümeci aseton ekstresinin galantamin kadar, aslanpençesi hekzan, ebegümeci hekzan, ebegümeci etil alkol ve ısırganotu aseton ekstrelerinin yaklaşık olarak galantamin kadar butirilkolinesteraz enzimini inhibe edici etki gösterdiği saptandı. Sonuç olarak, aslanpençesi bitkisinin yaprak ile çiçeklerinden hazırlanan ekstrelerin ABTS katyon radikali ve süperoksit anyon radikali giderim potansiyelleri ile antikolinesteraz etkileri, devedikeni tohumlarından hazırlanan ekstrelerin antikolinesteraz aktiviteleri, ebegümeci bitkisinin yaprak ile çiçeklerinden hazırlanan ekstrelerin ABTS katyon radikali giderim ve butirilkolinesteraz enzimini inhibe edici etkileri ilk defa çalışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Tıbbi Bitki, Toplam Fenolik, Toplam Flavonoit, Antioksidan, Antikolinesteraz

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 50585

ABSTRACT

Ulaç, E. (2016). Determination of Antioxidant and Anticholinesterase Activities of Some Medicinal Plant Extracts. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Analytical Chemistry. Master Thesis. İstanbul.

The aim of this study was to determine total phenolic and total flavonoid contents, antioxidant and anticholinesterase activities of the hexane, acetone and ethanol extracts prepared from mantle, rosemary, thistle, mallow and nettle commonly consumed for medicinal purposes in Turkey and all around the world. DPPH free radical, ABTS cation radical and superoxide anion radical scavenging assays, and Ellman method were used to establish the antioxidant and anticholinesterase potantial of the extracts, respectively. Total phenolic and flavonoid contents of the mantle ethanol extract was found to be the richest extract among the other extracts. Mantle ethanol and thistle hexane extracts in DPPH free radical scavenging method, and acetone and ethanol extracts of mantle and rosemary in ABTS cation radical scavenging assay showed the highest inhibition in 100 μg/mL concentration. None of the extracts exhibited superoxide anion radical scavenging activity. Nettle ethanol extract indicated higher butyrylcholinesterase inhibitory activity than galanthamine, mallow acetone extract as galanthamine, mantle hexane, mallow hexane and ethanol, and nettle acetone extracts almost as galanthamine. As a result to our knowledge, ABTS cation radical and superoxide anion radical scavenging activity and anticholinesterase potantial of the extracts prepared from mantle leaves and flowers, anticholinesterase activity of thistle seeds extracts, ABTS cation radical scavenging activity and butyrylcholinesterase inhibitory activity of the extracts prepared from mallow leaves and flowers were investigated for the first time in this study.

Key Words: Medicinal Plant, Total Phenolic, Total Flavonoid, Antioxidant, Anticholinesterase

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No.50585

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bitkiler yüz yıllar boyunca hastalıkların tedavi edilmesi amacıyla tüm dünyada yaygın olarak kullanılmışlardır. On dokuzuncu yüz yıldan itibaren de tıbbi bitkilerin içerdiği sekonder metabolitlerin saflaştırılıp yapılarının aydınlatılmasına başlanmıştır. Sentetik ilaçların bulunması ile bu alandaki endüstri çok hızlı bir şekilde gelişerek doğal kaynaklardan bir süreliğine uzaklaşılmıştır. Ancak zaman içerisinde bazı sentetik ilaçların yan etkilerinin fazla olduğunun ortaya çıkması ve bu yan etkilere bağlı olarak başka hastalıkların meydana gelmesi bilim adamlarını doğal kaynaklı ilaç etken maddelerinin ve gıda takviyelerinin bulunmasına yönlendirmiştir. Ayrıca dengeli ve sağlıklı beslenmenin yaşam süresinin uzamasında etkili olduğu da yine bilimsel çalışmalarla ortaya koyulmuştur (Ertaş ve ark. 2014).

Bir hücrede aşırı miktarda serbest radikalin oluşmasına oksidatif stres adı verilir. Bu olayda, hücrenin her bir bileşeni hasar görür. Hücrelerin hasar görmesi hücresel yaşlanma, hücresel ölüm ve kanser olaylarını başlatır ve ilerlemesine neden olur. Canlı organizmadaki antioksidan savunma olayı oksidatif stresi geciktirir ve önler. Antioksidanlar, organizma tarafından sentezlenebildikleri gibi gıdalarla da alınabilirler (Reische ve ark. 2002). Serbest radikaller alkol, hava kirliliği, stresli ve hareketsiz bir yaşam gibi etkenler nedeniyle canlılarda oluşur. Antioksidan ve serbest radikaller arasındaki denge bozulursa oksidatif stres meydana gelir. Bu dengenin korunarak oksidatif stresin zararlı etkilerinin ortaya çıkmasının önlenmesinde antioksidan etkisi yüksek gıdaların ve tıbbi bitkilerin tüketilmesinin önemli katkısı olduğu bilimsel çalışmalarla ortaya koyulmuştur (Boğa ve ark. 2011).

Sentetik antioksidanlar paketlenmiş gıdaların bozulmasını geciktirmek ve önlemek için endüstride kullanılmaktadır. Ancak bu antioksidanların hastalıklara neden olan yan etkilerinin olduğu bilimsel araştırmalarla kanıtlanmıştır. Bu nedenle, sağlıklı gıdalar üretip tüketebilmek için doğal kaynaklı antioksidanların bulunmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır (Öztürk ve ark. 2011).

Oksidatif stres, biyomoleküllerin oksitlenmesi sonucu hücre hasarına neden olur (Piazzi ve ark. 2008). β-Amiloitlerin birikimi nöronların yapısal olarak bozulmasına yol

açar. β-Amiloit birikimini arttıran etkenlerden biri olan oksidatif stres Alzheimer hastalığının ortaya çıkma riskini olumsuz yönde etkilemektedir (Hartman 2010).

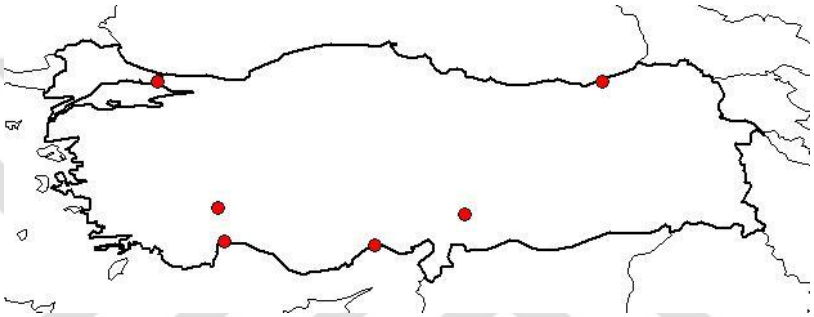
Bu tez çalışmasında, Türkiye'de ve dünyada halk arasında tıbbi amaçla yaygın olarak kullanılan aslanpençesi, biberiye, devedikeni, ebegümeci ve ısırganotu bitkilerinden hazırlanan hekzan, aseton ve etil alkol ekstrelerinin toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarlarının, antioksidan ve antikolinesteraz etkilerinin belirlenmesi amaçlandı. DPPH serbest radikali, ABTS katyon radikali ve süperoksit anyon radikali süpürücü yöntemleri ile ekstrelerin antioksidan potansiyelleri ve Ellman yöntemi ile antikolinesteraz etkileri tayin edildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Aslanpençesi, Biberiye, Devedikeni, Ebegümeci ve Isırganotu Hakkında Botanik Bilgiler ve Halk Arasında Kullanılışları

2.1.1. Aslanpençesi (*Aphanes arvensis* L., syn: *Alchemilla arvensis* (L.) Scop.)

Rosaceae familyasının bir üyesi olan *Aphanes arvensis* L. tek yıllık otsu bir bitkidir. Çiçeklenme zamanı Mayıs-Temmuz ayları arasıdır. Halk arasında aslanayağı olarak da bilinmektedir. Kök ve yaprakları kabız, idrar arttırıcı ve kuvvet verici olarak kullanılmaktadır (Baytop 1984 p. 417).

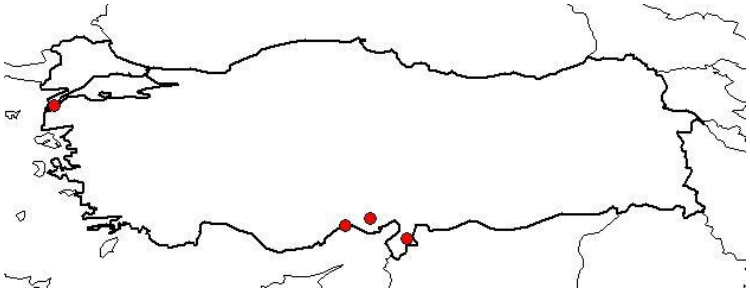


Şekil 2-1: Türkiye'de Aslanpençesi Bitkisinin Yetiştiği Alanlar

(http://www.tubives.com/index.php?sayfa=karsilastir)

2.1.2. Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.)

Lamiaceae familyasının bir üyesi olan *Rosmarinus officinalis* L. çok yıllık çalımsı bir bitkidir. Çiçeklenme zamanı Şubat-Mayıs ayları arası olan bitki halk arasında hasalban ve kuşdili olarak da bilinmektedir. Dahilen kabız, hazım sistemi uyarıcısı, safra arttırıcı ve idrar söktürücü olarak, haricen cerahatli yaraların tedavisinde kullanılmaktadır. İnfüzyon (%5-10) dahilen günde 2-3 bardak içilir. Haricen bu infüzyon ile pansuman öncesinde yaralar temizlenir (Baytop 1984 p. 184).

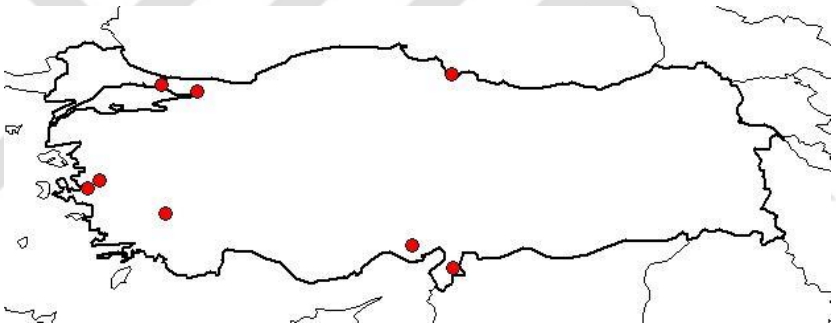


Şekil 2-2: Türkiye'de Biberiye Bitkisinin Yetiştiği Alanlar

(http://www.tubives.com/index.php?sayfa=karsilastir)

2.1.3. Devedikeni (*Silybum marianum* L. Gaertner)

İki yıllık otsu bir bitki olan *Silybum marianum* L. Gaertner Asteraceae familyasının bir üyesidir. Nisan-Mayıs aylarında çiçeklenen bitki halk arasında devekengeli, kengel, kıbbun, Meryem ana dikeni ve sütlü kengel olarak da bilinmektedir. Toprak üstü kısmı idrar arttırıcı, ateş düşürücü, romatizma ağrılarını azaltıcı, yatıştırıcı ve iştah açıcı olarak etkilidir. İnfüzyonu (%5) yemeklerden önce bir bardak içilerek kullanılır. Meyvaları, aktarlarda "Devedikeni tohumu" ismi altında satılmaktadır. Karaciğer hastalıklarına karşı ve safra artırıcı olarak tozu bal ile karıştırılarak veya meyvalardan hazırlanan dekoksiyon (%5) kullanılmaktadır (Baytop 1984 pp. 221-222).



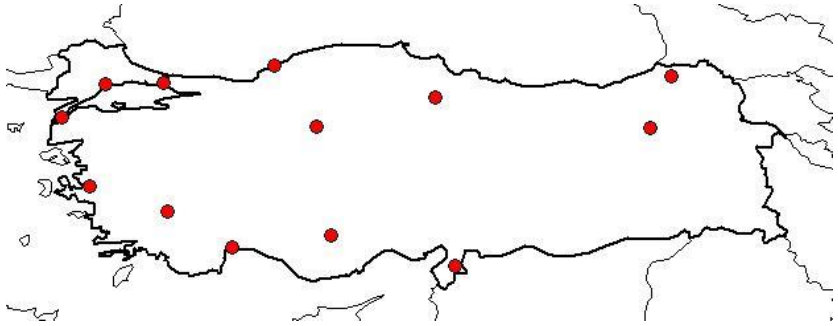
Şekil 2-3: Türkiye'de Devedikeni Bitkisinin Yetiştiği Alanlar

(http://www.tubives.com/index.php?sayfa=karsilastir)

2.1.4. Ebegümeci (*Malva sylvestris* L.)

Mayıs-Ekim ayları arasında çiçeklenen ve çok yıllık olan bitki, Malvaceae familyasının bir üyesidir. Halk arasında büyük ebegümeci olarak da bilinen bitki, solunum ve sindirim sistemi tahrişleri ve iltihaplarında koruyucu olarak kullanılır. Taze yapraklarından hazırlanan lapa, cilt üzerindeki çıban ve yaraların ağrılarını dindirmek için tülbent arasında deri üzerine konur. İnfüzyon veya dekoksiyon şeklinde kullanılır: dahilen

kullanmak için %1-3, haricen gargara halinde kullanmak için ise %5 oranında hazırlanır. Lapa, taze yapraklardan yapılmalıdır (Baytop 1984 p. 226).

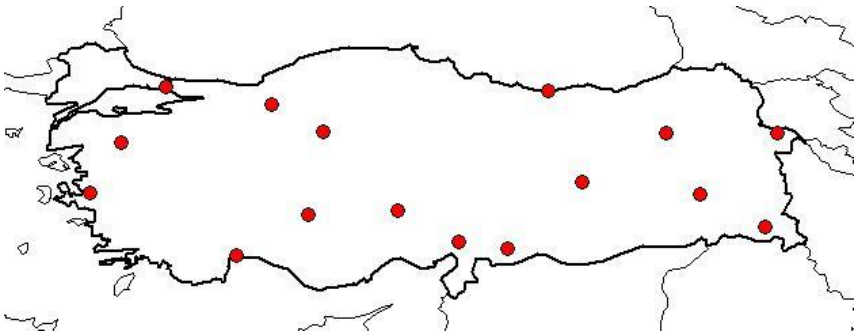


Şekil 2-4: Türkiye'de Ebegümeci Bitkisinin Yetiştiği Alanlar

(http://www.tubives.com/index.php?sayfa=karsilastir)

2.1.5. Isırganotu (*Urtica dioica* L.)

Urticaceae familyasının bir üyesi olan ve Haziran-Eylül ayları arasında çiçeklenen ısırganotu çok yıllık otsu bir bitkidir. Halk arasında büyük ısırganotu ve acı ısırgan olarak da bilinmektedir. Yaprak veya kök dahilen kan temizleyici, idrar arttırıcı ve iştah açıcı olarak kullanılır. Taze bitki, romatizma ağrılarını dindirmek için, ağrıyan yerlere sürülerek tahriş yapılır ve kan toplanması sağlanır. Bu türün yapraklı dalları ilkbaharda İstanbul pazarlarında satılmakta ve sebze olarak kullanılmaktadır. Yapraktan hazırlanan infüzyon (%2-5) veya kök dekoksiyonu (%3-4) olmak üzere, günde 2-3 bardak içilir (Baytop 1984 pp. 258-259).



Şekil 2-5: Türkiye'de Isırganotu Bitkisinin Yetiştiği Alanlar

(http://www.tubives.com/index.php?sayfa=karsilastir)

2.2. Aslanpençesi, Biberiye, Devedikeni, Ebegümeci ve Isırganotu ile Yapılan Aktivite Çalışmaları

Kurtulmuş ve toz edilmiş aslanpençesi yapraklarından hazırlanan metanol ekstresinin DPPH serbest radikali giderim aktivitesinin trolox ve vitamin C'ye yakın olduğu belirlenmiştir, ayrıca metanol ekstresinin su ekstresinden daha aktif olduğu saptanmıştır. Metanol ekstresinin fenolik madde miktarı 157,43±2,83 (mg GAE/g kuru ekstre ağırlığı) olarak tespit edilmiştir (Hamad ve ark. 2010). Condrat ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada aslanpençesi yapraklarının etil alkol ile masere edilmesi sonucu elde edilen ekstrenin flavonoit miktarı 0,42±0,03 mmol/g kuru bitki olarak bulunmuştur (Condrat ve ark. 2009).

Biberiye çayı (Rosemary tea) su ekstresinin toplam fenol miktarı 30,84±0,93 mg GAE/g çay ve toplam flavonoit miktarı 14,94±0,21 mg CTE/g çay olarak belirlenmiştir. Aynı örneklerin DPPH (15,06±0,57 mg AAE/g çay) ve ABTS (35,25±3,65 mg AAE/g çay) antioksidan aktivite tayinleri de yapılmıştır. Biberiye çayı etil alkol ekstresinin toplam fenol miktarı (39,44±0,92 mg GAE/g çay) ve toplam flavonoit miktarı (20,83±0,09 mg CTE/g çay) ile DPPH (37,02±3,53 mg AAE/g çay) ve ABTS (50,48±0,59 mg AAE/g çay) antioksidan aktivitelerinin su ekstresinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Oh ve ark. 2012). Piyasadan satın alınan toz haldeki biberiye bitkisinin %80 metanol ekstresi g Trolox/100 g kuru ağırlık olarak antioksidan kapasitesi ORAC, DPPH, FRAP, ABTS ve MLP yöntemlerinde sırasıyla 26,90±0,20, 11,02±0,10, 14,54±0,25, 18,34±0,20 ve 3,05±0,03 olarak, toplam fenol miktarı ise 8,05±0,21 (g GAE/100 g kuru bitki) olarak belirlenmiştir (Hossain ve ark. 2011). Biberiye bitkisinin metanol ekstresinin süperoksit anyon radikalini giderici etki gösterdiği saptanmıştır (Başağa ve ark. 1997). Biberiye bitkisinden hazırlanan petrol eteri, kloroform, etil asetat ve metanol ekstrelerinin asetilkolinesteraz enzimini inhibe etmedikleri, metanol ekstresinin (%83,9±0,97 inhibisyon) standart olarak kullanılan galantaminden (%80,3±1,14 inhibisyon) daha yüksek butirilkolinesteraz inhibisyonu gösterdiği bulunmuştur (Orhan ve ark. 2008).

Sulas ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada devedikeni bitkisinin topraküstü kısımlarından hazırlanan ekstrelerin toplam fenol miktarları 10,02±0,49 – 13,27±1,51 g GAE/kg kuru bitki, toplam flavonoit miktarları 5,75±0,62 – 9,47±1,18 g CTE/kg kuru

bitki olarak belirlenmiştir, ABTS katyon radikali (3,45±0,31 – 5,42±0,88 TEAC mmol/100 g kuru bitki) ve DPPH serbest radikali giderim aktiviteleri (3,83±0,33 – 6,32±0,43 TEAC mmol/100 g kuru bitki) saptanmıştır (Sulas ve ark. 2016). Devedikeni meyve ve yapraklarından hazırlanan ekstrenin süperoksit anyon radikalini giderim aktivitesi standart olarak kullanılan vitamin C ile karşılaştırıldığında orta seviyede olduğu bulunmuştur (Kim ve ark. 2006).

Ebegümeci yapraklarından hazırlanan %70 aseton ekstresinde fenolik içerik 24,123±0,718 mg GAE/g kuru bitki olarak belirlenmiştir (Zohra ve ark. 2013). Ebegümeci dekoksiyonundan hazırlanan 0,006; 0,01; 0,02 ve 1 g/L konsantrasyonlarındaki örneklerin süperoksit anyon radikali giderim aktivitesi sırasıyla %19,15, %23,75, %26,87 ve %49,37 inhibisyon olarak, DPPH serbest radikali giderim aktivitesi ise 0,005; 0,01; 0,68 ve 1 g/L konsantrasyonları için sırasıyla %13,75 %22,50 %50 ve %72,5 inhibisyon olarak saptanmıştır (Marouane ve ark. 2011). Ebegümeci çiçeklerinden hazırlanan metanol ekstresinin asetilkolinesteraz enzimini hemen hemen hiç inhibe etmediği (%1,5 inhibisyon) belirlenmiştir (Gholamhoseinian ve ark. 2009). Ebegümeci topraküstü kısımlarından hazırlanan etil alkol ekstresinin asetilkolinesteraz enzimini inhibe etmediği saptanmıştır (Ferreira ve ark. 2006).

Isırganotu yapraklarından hazırlanan etil alkol ekstresinin gallik aside eşdeğer toplam fenol miktarı 190 mg/g ekstre, DPPH aktivitesi 0,019±0,002 mM/g kuru ekstre ve ABTS aktivitesi 0,021±0,002 mM/g kuru ekstre olarak bulundu (Kozlowska ve ark. 2015). Isırganotu su ekstresinin süperoksit anyon radikalini gidermediği Gülçin ve arkadaşları tarafından belirlenmiştir (Gülçin ve ark. 2004). Topraküstü kısımlarından hazırlanan kloroform, metanol ve su ekstreleri içinde toplam fenolik miktar açısından en zengin ekstrenin su ekstresi (7,89±0,38 mg GAE/g kuru bitki) ve toplam flavonoit miktar bakımından ise kloroform ekstresinin (15,40±0,53mg QE/g) daha zengin olduğu, DPPH serbest radikali giderim aktivitesi bakımından ise metanol ekstresinin (IC_{50} 199,71±1,02 µg/ml) en yüksek etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Ebrahimzadeh ve ark. 2015). Isırganotu topraküstü kısımlarından hazırlanan metanol ekstresinin asetilkolinesteraz inhibisyonu %2,9 olarak tayin edilmiştir (Gholamhoseinian ve ark. 2009).

2.3. Antioksidanlar

Oksidatif stres, biyolojik sistemlerde karbonhidrat, lipit, nükleik asit ve proteinlerin okside olması sonucu zararlı oksidasyon ürünlerinin meydana gelmesi durumudur. Bu durumun oluşmasından reaktif oksijen türleri sorumludur. Hücrede bulunan reaktif oksijen ile azot türleri ikiye ayrılır: radikalik olan ve olmayan türler (Reische ve ark. 2002).

Radikalik reaktif oksijen türleri;

- süperoksit anyon ($O^{\cdot}{}_2^-$)
- hidroksil ($OH^{\cdot}$)
- peroksit ($HOO^{\cdot}$)
- alkoksi ($RO^{\cdot}$) radikalleri

Radikalik olmayan oksijen türleri;

- hidrojen peroksit (H_2O_2)
- ozon (O_3)
- singlet oksijen ($^1O_2$)

Radikalik reaktif azot türleri;

- azot monoksit ($NO^{\cdot}$) radikalleri

Radikalik olmayan azot türleri;

- nitröz asit (HNO_2)
- nitrozil katyonu (NO^+)
- nitroksi anyonu (NO^-)

Radikaller arasında en etkili olanları süperoksit ile hidroksil radikalleridir.

İç ve dış (çevresel) faktörler olmak üzere radikallerin kaynakları ikiye ayrılabilir:

İç kaynaklar

- Mitokondrial elektron transport zinciri
- Otooksidasyon reaksiyonları
- Enzim reaksiyonları
- Hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar

Dış kaynaklar

- Diyet faktörleri
- İlaçlar
- Sigara dumanı
- İyonize radyasyon
- UV ışık
- Kimyasal karsinojenler

Serbest radikaller, tek elektrona sahip olduklarından elektron alışverişi yapabilmek için başka moleküllerle kolayca reaksiyona girmektedirler (Reische ve ark. 2002). Serbest radikaller özellikle süperoksit, hidroksil, hidrojen peroksit ve singlet oksijen vücudumuzda enzim oksidasyonu, protein ve doku hasarlarına sebep olabilirler, bunun sonucunda da kanser, kalp damar hastalıkları, Parkinson gibi nörolojik hastalıklar ve çeşitli kronik hastalıklar ortaya çıkmaktadır (Wu ve Ng 2008).

Antioksidanlar canlıları, serbest radikallerin hasar verici etkilerini önleyerek ve geciktirerek korumaktadırlar. Canlılardaki antikarsinojenik ve antimutajenik gibi çok sayıda etki antioksidanlardan kaynaklanmaktadır (Bilaloğlu ve Harmandar 1999).

Canlı organizma dışında gıdalarda da antioksidan maddeler bulunmaktadır. Bu gıdaların özellikle de fenolik ve flavonoit içerik bakımından zengin olanların antioksidan aktivitelerinin yüksek olduğu araştırmalar sonucu belirlenmiştir. Bu nedenle halk arasında tedavi amacıyla kullanılan çok sayıda tıbbi bitki ile meyve ve sebzenin antioksidan potansiyellerinin araştırılması pek çok çalışmanın konusunu oluşturmaktadır (Boğa ve ark. 2011). Epidemiyolojik ve klinik araştırma sonuçlarına göre beslenme alışkanlığında bol meyve ve sebze tüketimi olan kişilerde kronik hastalıkların görülmediği ya da daha az rastlandığı ortaya çıkmıştır (Boğa ve ark. 2011).

Bütillenmiş hidroksianisol, bütillenmiş hidroksitoluen, propil gallat ve *t*-bütilhidrokinon gibi gıda endüstrisinde bozulmayı önlemek amacıyla sık kullanılan sentetik antioksidanların hastalıklara neden oldukları bilimsel araştırmalarla

kanıtlandığından doğal kaynaklı antioksidanların bulunması amacıyla dünyada ve ülkemizde çok sayıda çalışma yapılmaktadır (Ertaş ve ark. 2015).

2.4. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

- β-Karoten Renk Açılım
- DPPH Serbest Radikali Giderim
- ABTS Katyon Radikali Giderim
- CUPRAC
- FRAP
- Süperoksit Anyon Radikali Giderim
- Ferrisiyanür İndirgeme Gücü
- TRAP
- Luminol
- Diklorofloresin-Diasetat
- ORAC
- Siklik Voltametri

2.5. Alzheimer Hastalığı

Nörodejeneratif bir hastalık olan Alzheimer, zamanla artan hafıza kaybı ve bunun yanı sıra bilişsel bozulma ile kendini göstermektedir. Alzheimer, demansın (bunama), en sık rastlanan tipidir (Orhan 2002). Bu hastalık dünyada yaşlı nüfusun artmasıyla önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir (Howes ve ark. 2003).

Sebebi henüz tam olarak bilinmeyen Alzheimer hastalığının tedavisinde izlenen yol hastalığın ilerlemesini yavaşlatmaktır, bu da asetilkolinesteraz enzimini inhibe ederek mümkün olmaktadır (Lin ve ark. 2008). Asetilkolinesteraz inhibitörleri olan ilaçlar hastalığın ilerlemiş safhalarında etkili olmadıkları ve yan etkilerinden dolayı doğal kaynaklı etken maddelerin ve bitkilerin bulunmasına yönelik araştırmalar artmıştır (Kolak ve ark. 2009).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmanın Yapıldığı Yer

Bu tez çalışması İ. Ü. Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya ABD laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.2. Bitkisel Materyaller

Aslanpençesi, biberiye, devedikeni, ebegümeci ve ısırganotu bitkileri 12.02.2014 tarihinde İstanbul'daki bir aktardan satın alındı.

Türkçe adı	Latince adı	Kullanılan kısım	Miktarı (g)
Aslanpençesi	*Aphanes arvensis* L.	Yaprak + Çiçek	15.0
Biberiye	*Rosmarinus officinalis* L.	Yaprak	15.0
Devedikeni	*Silybum marianum* L.Gaertner	Tohum	15.0
Ebegümeci	*Malva sylvestris* L.	Yaprak + Çiçek	15.0
Isırganotu	*Urtica dioica* L.	Yaprak	15.0

3.3. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler

3.3.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Kersetin, pirokatekol, DPPH, BHA, KI, DTNB, NADH, PMS, NBT, α-TOC, gallik asit, $K_2S_2O_8$, ABTS Sigma firmasından (St. Louis, ABD), hekzan, aseton, $Al(NO_3)_3.9H_2O$, CH_3COOK Merck (Darmstadt, Almanya), $Na_2HPO_4.2H_2O$, $NaH_2PO_4.2H_2O$, galantamin hidrobromür, (+)-kateşin, AChE (498,3498 U) ve BChE (11,4 U) (Sigma-Aldrich, ABD), AcI, FCR (Applichem, Almanya), BuI (Fluka, İsviçre), Na_2CO_3 Riedel-de-Haen firmasından temin edildi. Bu tez çalışmasında teknik etil alkol kullanıldı, kullanılan tüm çözücüler ve kimyasal maddeler analitik saflıktadır.

3.3.2. Çözeltiler

3.3.2.1. Toplam Fenolik ve Flavonoit Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Sodyum karbonat çözeltisi (% 2)

0,2 g Na_2CO_3 bir miktar distile su ile çözüldü ve hacmi 10 mL'ye distile su ile tamamlandı.

Folin-Ciocalteu fenol reaktifi piyasadan satın alındı ve doğrudan kullanıldı.

Alüminyum nitrat çözeltisi (% 10)

$Al(NO_3)_3.9H_2O$ (1,76 g) bir miktar distile su ile çözüldü ve hacmi 10 mL'ye distile su ile tamamlandı.

Potasyum asetat çözeltisi (1 M)

CH_3COOK (0,9815 g) bir miktar distile su ile çözüldü ve hacmi 10 mL'ye distile su ile tamamlandı.

3.3.2.2. DPPH Serbest, ABTS Katyon ve Süperoksit Anyon Radikalleri Giderim Aktiviteleri Yöntemlerinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

DPPH çözeltisi (0.1 mM)

DPPH (4 mg) etanolde (100 mL) çözüldü.

ABTS çözeltisi (7 mM)

ABTS (19,2 mg) distile su (5 mL) ile çözüldü. Üzerine $K_2S_2O_8$ (3,3 mg) ilave edilerek karıştırıldı. Karanlık ortamda oda sıcaklığında 12 saat bekletildi.

Sodyum hidrojen fosfat dihidrat çözeltisi (0,1 M)

$Na_2HPO_4.2H_2O$ (8,89 g) bir miktar distile su ile çözüldü ve hacmi distile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat çözeltisi (0,1 M)

$NaH_2PO_4.2H_2O$ (1,56 g) bir miktar distile su ile çözüldü ve hacmi 100 mL'ye distile su ile tamamlandı.

pH 7,4 Fosfat tamponu (0,1 M)

Derişimleri 0,1 M olan $NaH_2PO_4.2H_2O$ (20 mL) ve $Na_2HPO_4.2H_2O$ (80 mL) çözeltileri karıştırılarak 0,1 M pH 7,4 tampon çözeltisi hazırlandı.

Nitroblu tetrazolyum çözeltisi (156 µM)

Yirmi beş mililitrelik balon jojeye alınan NBT (3,2 mg), fosfat tamponu (pH 7,4) ile hacmine tamamlanarak çözüldü.

Nikotinamit adenin dinükleotit çözeltisi (468 µM)

Yirmi beş mililitrelik balon jojeye alınan NADH (8,3 mg), fosfat tamponu (pH 7,4) ile hacmine tamamlanarak çözüldü.

Fenazin meta-sülfat çözeltisi (60 µM)

On mililitrelik balon jojeye alınan PMS (1,8 mg), fosfat tamponu (pH 7,4) ile çözülerek PMS (600 µM) çözeltisi hazırlandı. Altıyüz mikromolar PMS çözeltisinden 1 mL alınarak fosfat tamponu (pH 7,4) ile 10 mL'ye tamamlandı. Seyreltme işlemiyle 60 µM PMS çözeltisi elde edildi. Çözelti taze hazırlanarak karanlıkta saklandı.

3.3.2.3. Ellman Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

pH 8 Tampon çözeltisi (0,1 M)

$NaH_2PO_4.2H_2O$ (5,3 mL) ve $Na_2HPO_4.2H_2O$ (94,7 mL) çözeltileri karıştırıldıktan sonra 100 mL distile su ilave edilerek hazırlandı.

pH 7 Tampon çözeltisi (0,1 M)

$Na_2HPO_4.2H_2O$ (6,1 mL) ve $NaH_2PO_4.2H_2O$ (3,9 mL) çözeltileri karıştırıldıktan sonra 10 mL distile su ilave edilerek hazırlandı.

5,5-Ditiyobis(2-nitro benzoik asit) çözeltisi (5 mM)

$NaHCO_3$ (37,5 mg) ve DTNB (80 mg) ayrı ayrı pH 7 tampon çözeltisinde (5'er mL) çözüldü ve daha sonra bu iki çözelti karıştırıldı. Hazırlanan bu çözelti karışımından 2 mL alınarak aynı tampon çözelti ile hacmi 4 mililitreye tamamlandı. Kullanmadan önce 4 mL tampon çözelti (pH 8) ilave edildi.

Asetiltiyokolin iyodür çözeltisi (7,1 mM)

AcI (32,8 mg), distile su (8 mL) ile çözüldü. Kullanmadan önce 8 mL tampon çözelti (pH 8) ilave edildi.

Butiriltiyokolin iyodür çözeltisi (0,79 mM)

BuI (4 mg), distile su (8 mL) ile çözüldü. Kullanmadan önce 8 mL tampon çözelti (pH 8) ilave edildi.

Asetilkolinesteraz enzimi

Asetilkolinesteraz enzimi (1,17 mg, 498,3498 U) pH 8 tampon çözeltisinde (5 mL) çözüldü ve her biri 1 mL olan 5 kısma ayrıldı. Böylece her birinin konsantrasyonu 99,66996 U/mL oldu. Hazırlanan her bir 1 mL'lik stoklar 8 eşit kısma (125 µL) ayrıldı (0,09966996 U/µL). Yüz yirmi beş mikrolitrelik enzim çözeltisine 460 µL tampon çözelti (pH 8) ilave edilerek 0,021297 U/µL konsantrasyon sağlanmış oldu. Bu çözeltiden 585 µL alınarak 25 µL'ik eppendorf tüplere dolduruldu ve kullanılıncaya kadar -30°C'de bekletildi. Konsantrasyonun $2{,}476 \times 10^{-4}$ U/µL olması için kullanılmadan önce bu çözeltiler tampon çözeltiyle (pH 8) 2125 µL'ye tamamlandı.

Butirilkolinesteraz enzimi

Butirilkolinesteraz enzimi (1 mg, 11,4 U) tampon çözeltide çözüldü (pH 8, 5 mL), böylece konsantrasyon 2,28 U/mL oldu. Bu çözeltiden stoklar (300 µL) oluşturuldu ve kullanılıncaya kadar -30°C'de bekletildi (0,00228 U/µL). Konsantrasyonun $3{,}1813 \times 10^{-4}$ U/µL olması için kullanılmadan önce bu çözeltiler tampon çözeltiyle (pH 8) 1850 µL'ye tamamlandı.

3.3.2.4. Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

Kersetin çözeltisi (1000 ppm)

Kersetin (25 mg) etanolde (25 mL) çözülerek hazırlandı.

Pirokatekol çözeltisi (100 ppm)

Pirokatekol (10 mg) suda (100 mL) çözülerek hazırlandı.

2- t-Bütil-4-hidroksianisol çözeltisi (1000 ppm)

BHA (10 mg) etanolde (10 mL) çözülerek hazırlandı.

α-Tokoferol çözeltisi (1000 ppm)

α-Toc (10,31 mg, %97) etanolde (10 mL) çözülerek hazırlandı.

Gallik asit çözeltisi (2500 ppm)

Gallik asit (25 mg) etanolde (10 mL) çözülerek hazırlandı.

Galantamin çözeltisi (4000 μM)

Galantamin hidrobromür (2,3 mg) etanolde (2 mL) çözülerek hazırlandı.

Tablo ve grafiklerdeki konsantrasyonlar, çözeltilerin son konsantrasyonlarıdır.

3.4. Ekstrelerin Hazırlanışı

Hekzan ekstrelerine **H**, aseton ekstrelerine **A**, etil alkol ekstrelerine **E** sembolü, bitkilere ise Aslanpençesi **A**, Biberiye **B**, Devedikeni **D**, Ebegümeci **E**, Isırganotu **I** sembolleri verildi. Beşer gram bitki örneği hekzan, aseton ve etil alkol ile oda sıcaklığında (200 mL) üçer kez (60 dakika) masere edildi. Süzme işlemini takiben rota evaporatörde çözücüleri uçurulduktan sonra elde edilen ekstre miktarları **AH** 0,0316 g, **AA** 0,1157 g, **AE** 0,2052 g, **BH** 0,0900 g, **BA** 0,7494 g, **BE** 1,0484 g, **DH** 0,6452 g, **DA** 0,9091 g, **DE** 0,9016 g, **EH** 0,0350 g, **EA** 0,1103 g, **EE** 0,1186 g, **IH** 0,0327 g, **IA** 0,0457 g, **IE** 0,1225 g olarak belirlendi. Kısaltmalar yapılırken önce bitkinin daha sonra çözücü adının ilk harfleri kullanıldı.

Farklı konsantrasyonlarda ekstre çözeltilerinin hazırlanması

Dört bin ppm konsantrasyonda ekstre çözeltisi hazırlamak için, 4 mg bitki ekstresi etil alkolde (1 mL) çözüldü.

Hazırlanan 4000 ppm konsantrasyondaki ekstrelerden 125 µL alınarak 500 µL'ye etil alkol ile tamamlandığında 2500 ppm'lik çözelti elde edildi.

Hazırlanan 4000 ppm konsantrasyondaki ekstrelerden 125 µL alınarak 250 µL'ye etil alkol ile tamamlandığında 1000 ppm'lik çözelti elde edildi.

3.5. Cihazlar ve Diğer Gereçler

Cihaz/Gereç	Marka-Model/Özellik	Menşei
Rota evaporator	R-200 Büchi	İsviçre
Vacuum Controller	V-800 Büchi	İsviçre
Heating Bath	B-490 Büchi	İsviçre
Hassas terazi	Scaltec SBA 31	Almanya
Manyetik karıştırıcı	Heidolph MR 3001	Almanya
pH-metre	Thermo	Amerika Birleşik Devletleri
BioTek Power Wave	XS	Amerika Birleşik Devletleri
Ultrasonik banyo	WiseClean	Almanya
Ultra saf su cihazı	Younglin Inst./aquaMAX-Ultra	Güney Kore
Vortex	LMS Co. LTD	Japonya
Toshiba bilgisayar	NB250	Japonya
Gen 5 yazılımı	Biotek	Amerika Birleşik Devletleri
Hesap makinası	Casiofx-3600 PA	Japonya
Otomatik pipetler	Eppendorf/0,5-10 µL, 2-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL, 500-5000 µL	Almanya
Cam balon jojeler	ISO lab/10, 25, 50, 100, 500 mL ISO lab/50 mL	Almanya

3.6. Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit İçerik Tayini

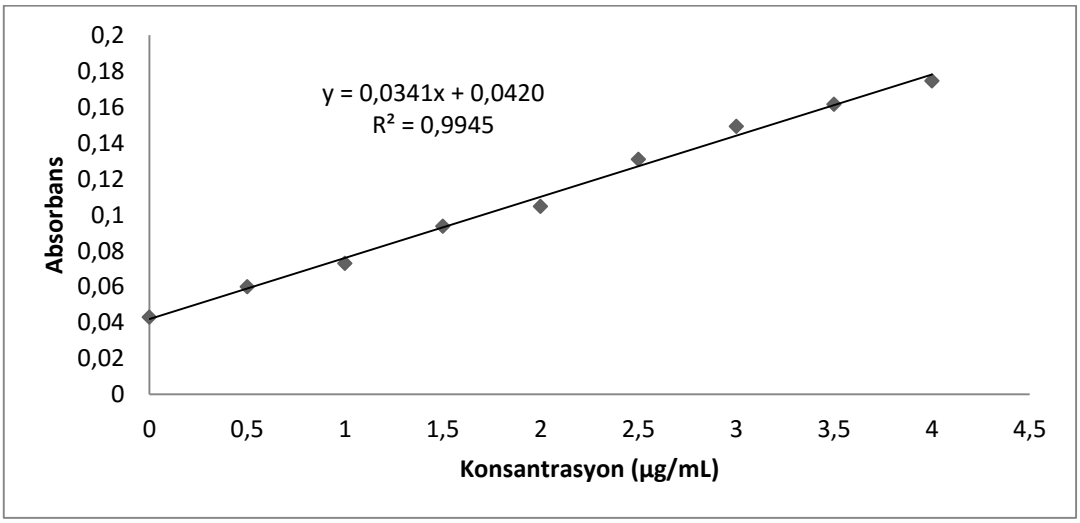
3.6.1. Toplam Fenolik İçerik Tayini

a) Standart ile çalışma

Slinkard ve Singleton (1977) tarafından geliştirilen yönteme göre fenolik içerik FCR kullanılarak pirokatekole eşdeğer olarak tayin edildi. Yüz ppm konsantrasyonda pirokatekol çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden farklı hacimlerde (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 µL) alındı ve son hacim 184 µL olacak şekilde distile su ile tamamlandı. Dört mikrolitre FCR ve 3 dakika sonra 12 µL Na_2CO_3 (%2) çözeltisi ilave edildi. Son konsantrasyonlar sırasıyla 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4 ve 4,5 µg/mL oldu. Oda sıcaklığında 2 saat bekletilen standart çözeltilerin absorbansları 760 nm dalga boyunda ölçüldü. Üç paralel çalışma gerçekleştirildi. Elde edilen absorbans değerleri konsantrasyon değerlerine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 3.1). Denklem $y = 0,0341x + 0,0420$ $R^2 = 0,9945$ şeklindedir.

b)Numune ile çalışma

Konsantrasyonu 1000 ppm olan ekstre çözeltisinden 4 µL alınarak distile su (180 µL) ilave edildi. Dört mikrolitre FCR ve 3 dakika sonra 12 µL Na_2CO_3 (%2) çözeltisi ilave edildi. Oda sıcaklığında 2 saat bekletilen çözeltinin absorbansı 760 nm dalga boyunda ölçüldü. Üç paralel çalışma gerçekleştirildi. Toplam fenolik içerik standart pirokatekol grafiğinin denklemi ile hesaplandı.



Şekil 3-1: Pirokatekolün Ölçü Grafiği

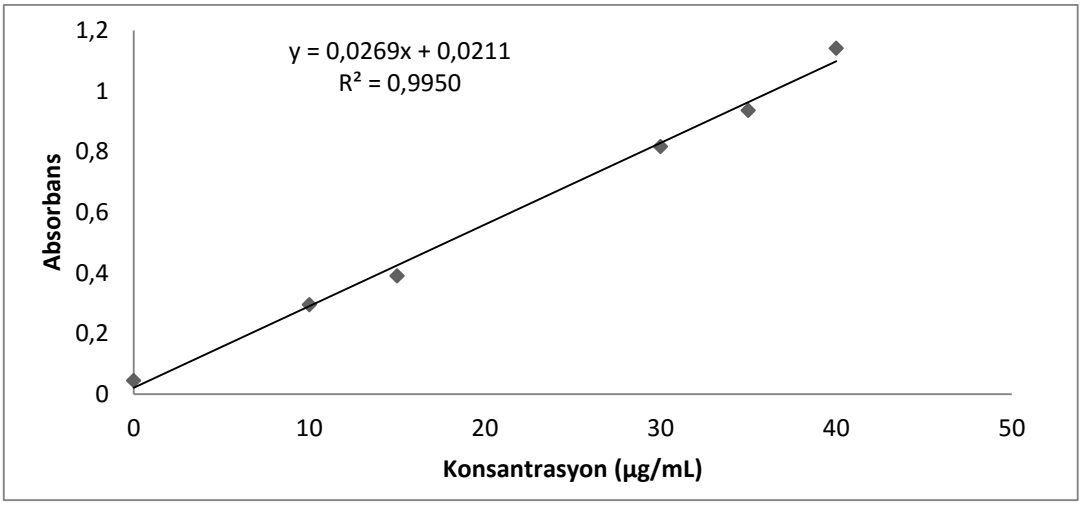
3.6.2. Toplam Flavonoit İçerik Tayini

a)Standart ile çalışma

Alüminyum nitrat yöntemi kullanılarak ve kersetine eşdeğer olarak toplam flavonoit içerik tayin edildi (Moreno ve ark. 2000). Bin ppm konsantrasyonda kersetin çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden farklı hacimlerde (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 µL) alınarak son hacim 192 µL olacak şekilde etil alkol (%80) ile tamamlandı. Potasyum asetat (1 M) çözeltisinden 4 µL eklendi ve 1 dakika sonra alüminyum nitrat çözeltisinden (%10) 4 µL eklendi. Kırk dakika inkübe edildikten sonra ELISA okuyucu ile 415 nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü. Üç paralel çalışma gerçekleştirildi. Elde edilen absorbans değerleri konsantrasyon değerlerine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 3.2). Denklem y = 0,0269x + 0,0211 R^2 = 0,9950 şeklindedir.

b)Numune ile çalışma

Bin ppm konsantrasyonda hazırlanan çözeltiden 20 µL alınarak son hacim 192 µL olacak şekilde etil alkol (%80) ile tamamlandı. Potasyum asetat (1 M) çözeltisinden 4 µL eklendi ve 1 dakika sonra alüminyum nitrat çözeltisinden (%10) 4 µL eklendi. Kırk dakika inkübasyon maksadıyla bekletilmesinin ardından ELISA okuyucu ile 415 nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü. Üç paralel çalışma gerçekleştirildi. Toplam flavonoit içeriği standart kersetin grafiğinin denklemi ile hesaplandı.



Şekil 3-2: Kersetinin Ölçü Grafiği

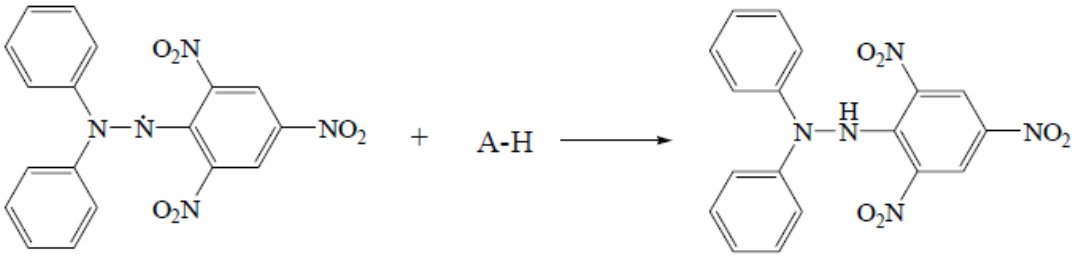
3.7. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

Aslanpençesi, biberiye, devedikeni, ebegümeci ve ısırganotu bitkilerinden hazırlanan hekzan, aseton ve etil alkol ekstrelerinin antioksidan aktivitelerini belirlemek için DPPH serbest radikali, ABTS katyon radikali ve süperoksit anyon radikali giderim yöntemleri kullanıldı.

3.7.1. DPPH Serbest Radikali Giderim Yöntemi

Blois (1958) tarafından geliştirilen yöntem kullanılarak ekstrelerin serbest radikali giderim aktiviteleri tayin edildi. Aslanpençesi, biberiye, devedikeni, ebegümeci ve ısırganotu bitkilerinden hazırlanan hekzan, aseton ve etil alkol ekstrelerinin stok çözeltilerinden (1000 ppm) farklı hacimlerde (2, 5, 10, 20 µL) alınarak 40 µL'ye etil alkol ile tamamlandı. Bu çözeltilere DPPH çözeltisinden (0,1 mM) 160 µL eklendi. Hazırlanan çözeltilerin karanlık bir ortamda 30 dakika süresince oda sıcaklığında bekletilmelerinin ardından 517 nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü. % İnhibisyon değerleri, örneklere ait absorbans değerleri ve kontrolün absorbans değerleri kullanılarak hesaplandı. Her bir örneği temsil eden üç paralel çalışma gerçekleştirildi. Bu yöntemde BHA ve α-Toc standart olarak kullanıldı. Eşitlik-1 yardımıyla ekstrelerin % inhibisyon olarak serbest radikali giderim potansiyelleri hesaplandı.

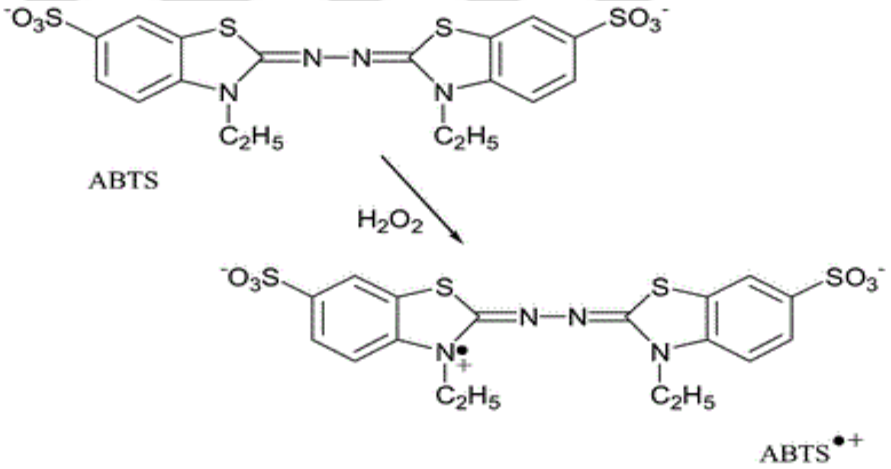
$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{(\text{Absorbans}_{\text{kontrol}} - \text{Absorbans}_{\text{örnek}})}{\text{Absorbans}_{\text{kontrol}}} \times 100 \qquad \text{(Eşitlik-1)}$$



Şekil 3-3: DPPH Molekülünün Antioksidan Madde ile Reaksiyonu

3.7.2. ABTS Katyon Radikali Giderim Yöntemi

ABTS katyon radikali giderim aktivite tayininde Re ve arkadaşları (1999) tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı. Aslanpençesi, biberiye, devedikeni, ebegümeci ve ısırganotu bitkilerinden hazırlanan hekzan, aseton ve etil alkol ekstrelerinin stok çözeltilerinden (1000 ppm) farklı hacimlerde (2, 5, 10, 20 µL) alındı ve 40 µL'ye etil alkol ile tamamlandıktan sonra 160 µL ABTS katyon radikali çözeltisinden (7 mM) eklendi. Hazırlanan çözeltiler 6 dakika karanlıkta bekletildi ve ardından absorbansları 734 nm dalga boyunda ölçüldü. % İnhibisyon değerleri, örneklere ait absorbans değerleri ve kontrolün absorbans değerleri kullanılarak hesaplandı. Her bir örneği temsil eden üç paralel çalışma gerçekleştirildi. Bu yöntemde BHA ve (+)-kateşin standart olarak kullanıldı. Eşitlik-1 yardımıyla ekstrelerin % inhibisyon olarak ABTS katyon radikali giderim potansiyelleri hesaplandı.

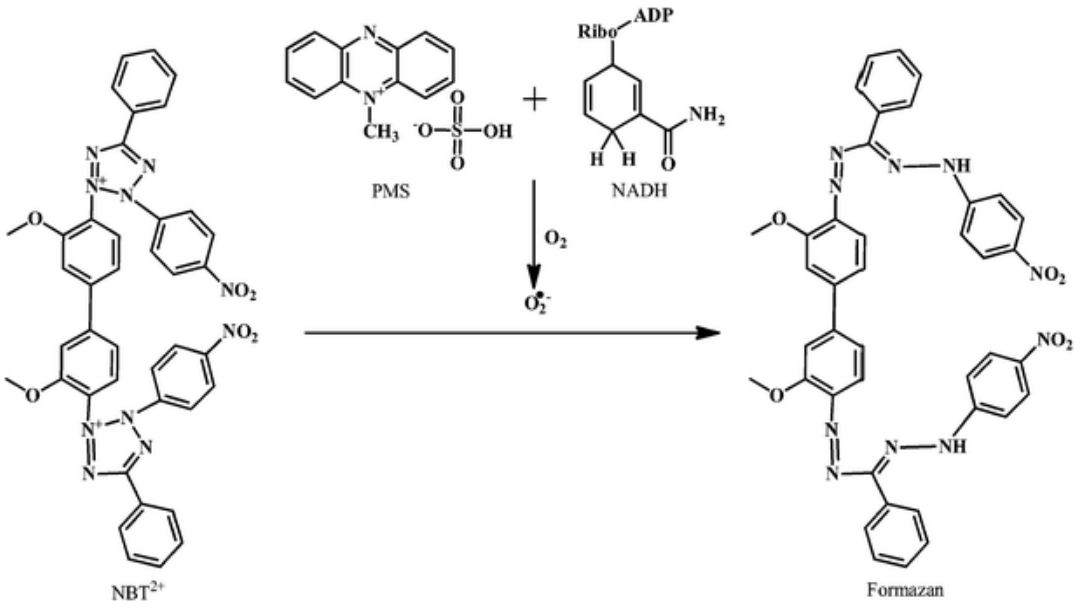


Şekil 3-4: ABTS Katyon Radikali Oluşum Reaksiyonu

3.7.3. Süperoksit Anyon Radikali Giderim Yöntemi

Nitroblu tetrazolyumun indirgenmesi yöntemine göre süperoksit anyon radikali giderim aktivite tayini yapıldı (Nishikimi ve ark. 1972). Aslanpençesi, biberiye, devedikeni, ebegümeci ve ısırganotu bitkilerinden hazırlanan hekzan, aseton ve etil alkol ekstrelerinin stok çözeltilerinden (2500 ppm) farklı hacimlerde (0,88, 2,2, 4,4, 8,8 µL) alınarak mikroplakalardaki kuyucuklara koyuldu ve distile su ile 10 µL'ye tamamlandı. Ardından mikroplakadaki her bir kuyucuğa 100 µL NBT çözeltisi (156 µM), 100 µL NADH çözeltisi (468 µM) ve 10 µL PMS çözeltisi (60 µM) ilave edildi. Reaksiyonun

başlaması için PMS çözeltisinin ilave edilmesi gerekir. Mikroplakadaki çözeltiler 25°C'de 5 dakika bekletildi ve 560 nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü. % İnhibisyon değerleri, örneklere ait absorbans değerleri ve kontrolün absorbans değerleri kullanılarak hesaplandı. Her bir örneği temsil eden üç paralel çalışma gerçekleştirildi. Bu yöntemde gallik asit standart olarak kullanıldı. Eşitlik-1 yardımıyla ekstrelerin % inhibisyon olarak süperoksit anyon radikali giderim potansiyelleri hesaplandı.



Şekil 3-5: Süperoksit Anyon Radikali Oluşumu ve NBT ile Reaksiyonu

3.8. Ellman Yöntemi

Ellman yöntemi kolorimetrik bir yöntemdir ve bu tez çalışmasında ELISA okuyucuda 96 kuyucuklu mikroplakalar kullanılarak ölçüm yapıldı (Ellman ve ark. 1961).

3.8.1. Asetilkolinesteraz aktivite tayini

Bu tayinde asetilkolinesteraz enzim olarak, asetiltiyokolin iyodür ise substrat olarak kullanıldı. Doksanaltı kuyucuklu mikroplakaya pH 8 tampon çözeltisi (130 µL), 4000 ppm'lik ekstre çözeltisi (10 µL) ve 20 µL enzim çözeltisi koyuldu. Bu çözelti 25°C'de 10 dakika bekletildikten sonra her birinden 20 µL olmak üzere AcI ve DTNB reaktifi ilave edildi. ELISA okuyucuda 412 nm'de absorbanslar ölçüldü.

% İnhibisyon değerleri, örneklere ait absorbans değerleri ve kontrolün absorbans değerleri kullanılarak hesaplandı. Her bir örneği temsil eden üç paralel çalışma gerçekleştirildi. Bu yöntemde galantamin standart olarak kullanıldı. Eşitlik-1 yardımıyla ekstrelerin % inhibisyon olarak asetilkolinesteraz etkileri hesaplandı.

3.8.2. Butirilkolinesteraz aktivite tayini

Bu tayinde butirillkolinesteraz enzim olarak, butiriltiyokolin iyodür ise substrat olarak kullanıldı. Doksanaltı kuyucuklu mikroplakaya pH 8 tampon çözeltisi (130 µL), 4000 ppm'lik ekstre çözeltisi (10 µL) ve 20 µL enzim çözeltisi koyuldu. Bu çözelti 25°C'de 10 dakika bekletildikten sonra her birinden 20 µL olmak üzere BuI ve DTNB reaktifi ilave edildi. ELISA okuyucuda 412 nm'de absorbanslar ölçüldü. % İnhibisyon değerleri, örneklere ait absorbans değerleri ve kontrolün absorbans değerleri kullanılarak hesaplandı. Her bir örneği temsil eden üç paralel çalışma gerçekleştirildi. Bu yöntemde galantamin standart olarak kullanıldı. Eşitlik-1 yardımıyla ekstrelerin % inhibisyon olarak butirilkolinesteraz etkileri hesaplandı.

3.9. İstatistik Hesaplamalar

Üç paralel ölçümün ortalaması alındı ve bu ortalamalardan yararlanılarak standart sapmalar hesaplandı. Student's *t*-testine göre analiz sonuçlarının uygunluğu (güven sınırları %95 içinde, $p < 0,05$) belirlendi.

4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında, aktardan satın alınan aslanpençesi, biberiye, devedikeni, ebegümeci ve ısırganotu bitkilerinden hazırlanan hekzan, aseton ve etil alkol ekstrelerinin DPPH serbest radikali, ABTS katyon radikali ve süperoksit anyon radikali giderim yöntemleri ile antioksidan potansiyelleri belirlendikten sonra Ellman yöntemi ile antikolinesteraz etkileri saptandı. Tüm ekstrelerin toplam fenolik miktarları pirokatekole ve flavonoit miktarları kersetine eşdeğer olarak tayin edildi.

Bu tez çalışmasında, aslanpençesi bitkisinden hazırlanan ekstrelerin ABTS katyon radikali giderim ve süper oksit anyon radikali giderim aktiviteleri ile antikolinesteraz etkileri, devedikeni bitkisinden hazırlanan ekstrelerin antikolinesteraz aktiviteleri, ebegümeci bitkisinden hazırlanan ekstrelerin ABTS katyon radikali giderim aktiviteleri ve butirilkolinesteraz enzimini inhibe edici etkileri ilk defa çalışılmıştır.

4.1. Fenolik ve Flavonoit Miktar Tayini

Tablo 4-1'de aslanpençesi, biberiye, devedikeni, ebegümeci ve ısırganotu bitkilerinden hazırlanan ekstrelerin toplam fenolik miktar sonuçları pirokatekole ve toplam flavonoit miktar sonuçları kersetine eşdeğer olarak verildi. Aslanpençesi etil alkol ekstresinin (**AE**) hem fenolik hem flavonoit miktar bakımından diğer ekstrelerden daha zengin olduğu tespit edildi. Aslanpençesi aseton (**AA**), ebegümeci aseton (**EA**) ve ısırganotu etil alkol (**IE**) ekstrelerinin flavonoit miktarlarının oldukça yüksek olduğu saptandı.

Tablo 4-1: Fenolik ve Flavonoit Miktar Tayini[a]

Ekstreler	Toplam fenolik miktar µg pirokatekole eşdeğer/mg ekstre[b]	Toplam flavonoit miktar µg kersetine eşdeğer/mg ekstre[c]
AH	5,38 ± 3,05	18,67 ± 4,69
AA	46,92 ± 3,88	81,37 ± 2,57
AE	164,22 ± 1,47	114,36 ± 4,69
BH	66,47 ± 1,69	31,437 ± 2,42
BA	13,68 ± 2,24	15,20 ± 0,74
BE	22,48 ± 0,85	21,40 ± 0,77
DH	7,82 ± 3,05	47,05 ± 4,27
DA	7,82 ± 0,85	40,11 ± 4,83
DE	11,73 ± 0,00	33,29 ± 5,41
EH	20,53 ± 1,47	25,36 ± 0,56
EA	17,59 ± 2,54	87,82 ± 2,84
EE	11,24 ± 3,39	29,70 ± 0,37
IH	12,21 ± 2,24	27,84 ± 1,28
IA	17,59 ± 1,47	54,36 ± 1,54
IE	13,19 ± 6,72	83,97 ± 3,17

[a] Sonuçlar 3 paralel ölçümün ortalaması alınarak ve standart sapmaları ile verildi.

[b] Pirokatekole eşdeğer fenolik içerik ($y=0,0341x + 0,042$ $R^2 =0,9945$)

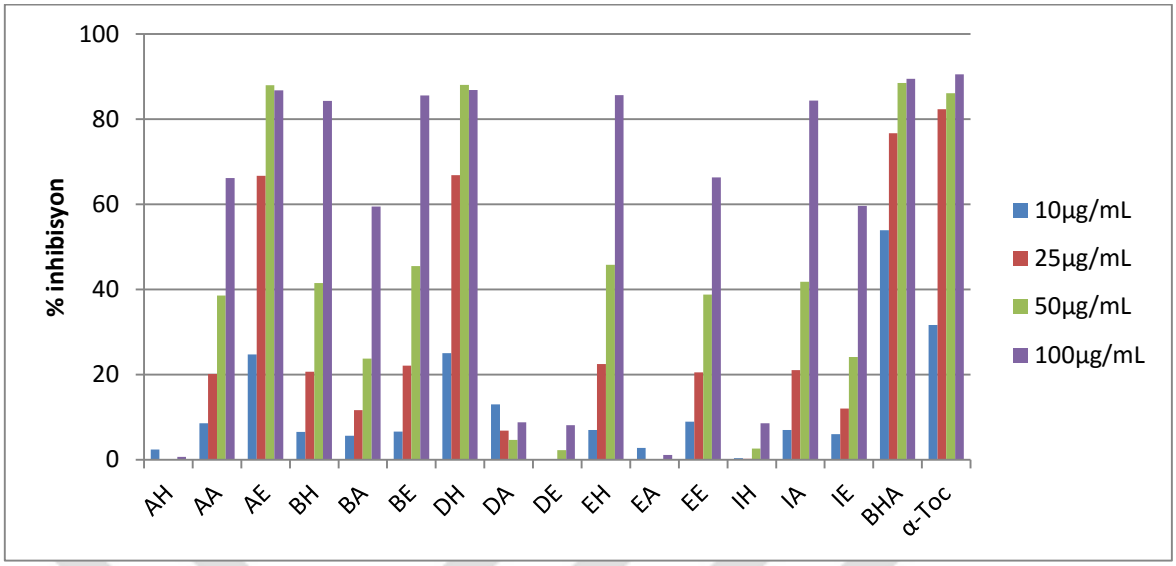
[c] Kersetine eşdeğer flavonoit içerik ($y=0,0269x + 0,0211$ $R^2 =0,9950$)

Kısaltmalar yapılırken önce bitkinin daha sonra çözücü adının ilk harfleri kullanıldı.

4.2. Antioksidan Aktivite Sonuçları

4.2.1. DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi

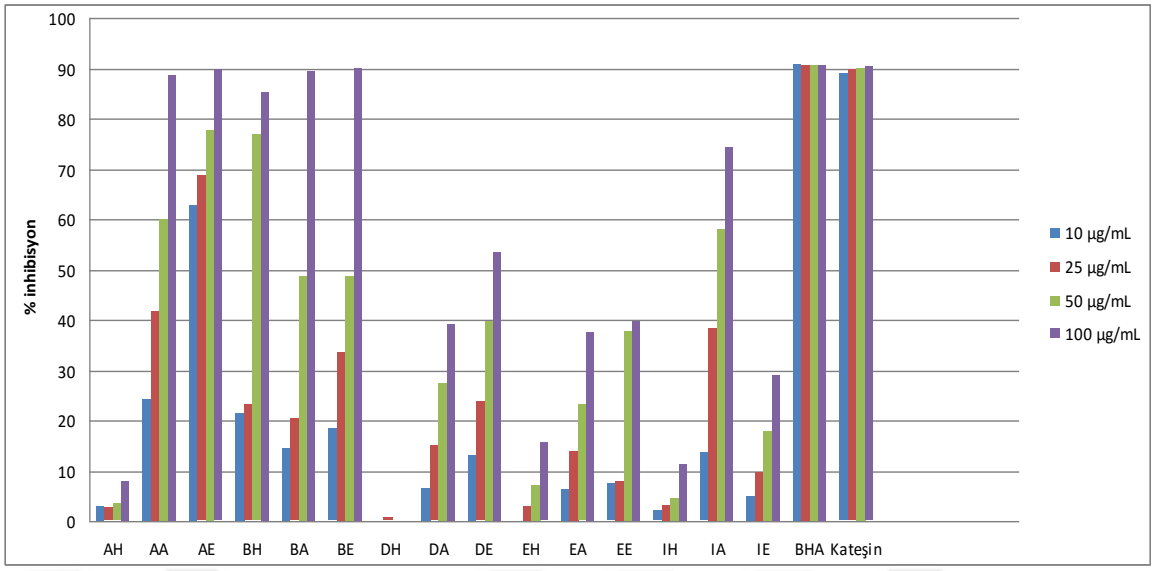
Aslanpençesi, biberiye, devedikeni, ebegümeci ve ısırganotu bitkilerinden hazırlanan ekstrelerin DPPH serbest radikali giderim etkisi dört farklı konsantrasyonda (10, 25, 50, 100 µg/mL) tayin edildi. Standart olarak kullanılan BHA ve α-Toc'e göre aktivite karşılaştırmaları yapıldı. Bu yöntemde 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarda aslanpençesi etil alkol (**AE**) ve devedikeni hekzan (**DH**) ekstrelerinin diğer ekstrelerden daha yüksek aktivite (%80'nin üzerinde inhibisyon) gösterdiği ve yaklaşık olarak BHA ve α-tokoferol kadar etkiye sahip olduğu belirlendi. Diğer ekstrelerin BHA ve α-Toc'den daha az inhibisyon yaptığı tespit edildi (Şekil 4-1).



Şekil 4-1: DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi

4.2.2. ABTS Katyon Radikali Giderim Aktivitesi

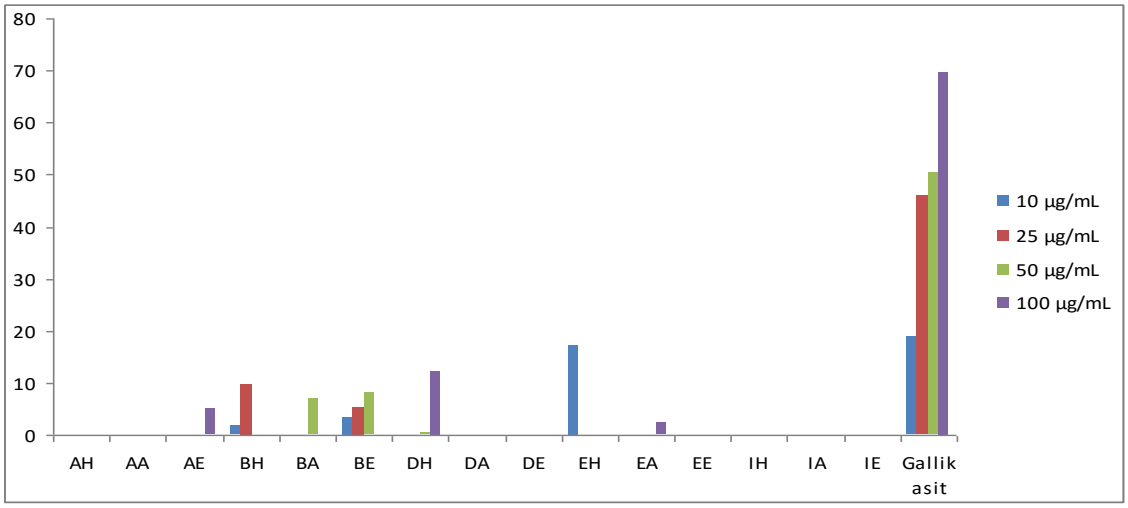
Aslanpençesi, biberiye, devedikeni, ebegümeci ve ısırganotu bitkilerinden hazırlanan ekstrelerin ABTS katyon radikali giderim aktiviteleri dört farklı konsantrasyonda (10, 25, 50, 100 µg/mL) belirlendi. Bu yöntemde aslanpençesi etil alkol ekstresinin (**AE**) 10, 25 ve 50 µg/mL'de diğer ekstrelerden daha yüksek aktivite gösterdiği belirlendi. Aslanpençesi aseton (**AA**) ve etil alkol (**AE**) ekstrelerinin, biberiye aseton (**BA**) ve etil alkol ekstrelerinin (**BE**) 100 µg/mL konsantrasyonda standart olarak kullanılan BHA ve (+)-kateşin kadar aktivite (yaklaşık olarak %90 inhibisyon) gösterdiği belirlendi (Şekil 4-2).



Şekil 4-2: ABTS Katyon Radikali Giderim Aktivitesi

4.2.3. Süperoksit Anyon Radikali Giderim Aktivitesi

Aslanpençesi, biberiye, devedikeni, ebegümeci ve ısırganotu bitkilerinden hazırlanan ekstrelerin süperoksit anyon radikali giderim aktiviteleri dört farklı konsantrasyonda (10, 25, 50, 100 µg/mL) belirlendi. Bu yöntemde ekstrelerin standart olarak kullanılan gallik asit ile karşılaştırıldığında aktivite göstermedikleri saptandı (Şekil 4-3).



Şekil 4-3: Süperoksit Anyon Radikali Giderim Aktivitesi

4.3. Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları

Aslanpençesi, biberiye, devedikeni, ebegümeci ve ısırganotu bitkilerinden hazırlanan ekstrelerin antikolinesteraz aktiviteleri 200µg/mL konsantrasyonda belirlendi. Standart olarak kullanılan galantaminle karşılaştırıldığında hiçbir ekstrenin AChE enzimini inhibe etmediği tespit edildi. Isırganotu etil alkol ekstresinin (**IE**) galantaminden daha yüksek, ebegümeci aseton ekstresinin (**EA**) galantamin kadar, aslanpençesi hekzan (**AH**), ebegümeci hekzan (**EH**), ebegümeci etil alkol (**EE**) ve ısırganotu aseton ekstrelerinin (**IA**) yaklaşık olarak galantamin kadar butirilkolinesteraz enzimini inhibe ettiği saptandı (Tablo 4-2).

Tablo 4-2: Antikolinesteraz Aktivite[a]

Ekstreler	AChE (%İnhibisyon)	BChE (%İnhibisyon)
AH	AD	83,29 ± 8,33
AA	1,30 ± 7,26	66,22 ± 0,38
AE	AD	69,70 ± 2,95
BH	17,73 ± 3,93	72,64 ± 1,59
BA	5,01 ± 6,07	77,41 ± 8,31
BE	4,19 ± 6,61	72,64 ± 1,59
DH	26,88± 3,85	79,96 ± 3,20
DA	AD	71,00 ± 1,64
DE	AD	64,60 ± 2,68
EH	30,59 ± 6,96	84,15 ± 2,27
EA	47,83 ± 1,23	88,73 ± 0,88
EE	20,71 ± 4,49	81,89± 2,25
IH	11,61 ± 5,13	65,08 ± 2,21
IA	38,63 ± 2,21	84,78 ± 4,06
IE	44,75 ± 7,36	92,68 ± 4,89
Galantamin[b]	82,51± 0,25	88,44 ± 0,50

[a] 200µg/mL

[b] Standart madde

AD: Aktif değil

Kısaltmalar yapılırken önce bitkinin daha sonra çözücü adının ilk harfleri kullanıldı.

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Halk arasında tıbbi amaçla kullanılan bitkiler çoğunlukla aktarlardan temin edilmektedir. Bu tez çalışmasında, aktardan satın alınan aslanpençesi yaprak ile çiçeklerinin, biberiye yapraklarının, devedikeni tohumlarının, ebegümeci yaprak ile çiçeklerinin ve ısırganotu yapraklarının hekzan, aseton ve etil alkol ile ayrı ayrı masere edilmesiyle hazırlanan ekstrelerin pirokatekole eşdeğer olarak toplam fenolik ve kersetine eşdeğer olarak toplam flavonoit miktarları, DPPH serbest radikali, ABTS katyon radikali ve süperoksit anyon radikali giderim yöntemleri ile antioksidan etkileri ve Ellman yöntemi kullanılarak antikolinesteraz potansiyelleri belirlendi.

AE ve **BH** hariç, tüm ekstrelerin flavonoit miktarlarının fenolik miktarlarından daha yüksek olduğu bulundu. Fenolik içerikleri en yüksek olan ekstreler **AE** (164,22±1,47 µg pirokatekole eşdeğer/mg ekstre) ve **BH** (66,47±1,69 µg pirokatekole eşdeğer/mg ekstre) olarak belirlendi. Flavonoit miktarı yüksek olan ekstreler sırasıyla **AE** (114,36 ± 4,69 µg kersetine eşdeğer/mg ekstre), **EA** (87,82 ± 2,84 µg kersetine eşdeğer/mg ekstre), **IE** (83,97 ± 3,17 µg kersetine eşdeğer/mg ekstre) ve **AA** (81,37 ± 2,57 µg kersetine eşdeğer/mg ekstre) olarak tespit edildi.

AE ve **DH** ekstrelerinin 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarda, yaklaşık olarak standart olarak kullanılan BHA ve α-Toc kadar DPPH serbest radikalini giderdiği ve diğer ekstrelerden daha yüksek aktivite gösterdiği belirlendi. Yüz µg/mL konsantrasyonda **BH**, **BE**, **EH** ve **IA** ekstrelerinin %80'in üzerinde inhibisyon yaptığı saptandı.

ABTS yönteminde, standart olarak kullanılan BHA ile (+)-kateşin 10, 25, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarda %90 inhibisyon gösterdi. Bu yöntemde, çalışılan tüm konsantrasyonlarda **AH**'nin aktif olmadığı, **AA** ve **AE**'nin ise 100 µg/mL konsantrasyonda yaklaşık %90 inhibisyon gösterdiği ancak diğer konsantrasyonlarda %80'in altında inhibisyona sahip olduğu saptandı. Bu yöntemde, **BA** ve **BE** tüm konsantrasyonlarda yaklaşık olarak aynı etkiyi gösterdiler, her iki ekstrenin en yüksek katyon radikali giderici etkilerinin (%90 inhibisyon) 100 µg/mL konsantrasyonda olduğu belirlendi. **BH**'nin (%77 inhibisyon) ise 50 µg/mL konsantrasyonda **BA** ve **BE**'den daha yüksek etkiye sahip olduğu tespit edildi. Devedikeni ve ebegümeci ekstrelerinin ABTS

katyon radikali giderim etkilerinin %40'ın altında olduğu belirlendi. Sadece **DE** 100 µg/mL konsantrasyonda %54 inhibisyon gösterdi. **IH** ve **IE**'nin katyon radikali giderim etkisi %30'un altında bulundu, **IA**'nın ise 100 µg/mL konsantrasyonda %75 inhibisyon yaptığı tespit edildi.

Ekstrelerden hiçbirinin süperoksit anyon radikalini giderici etki göstermediği saptandı.

Aslanpençesi, biberiye, devedikeni, ebegümeci ve ısırganotu bitkilerinden hazırlanan ekstrelerin AChE enzimini inhibe etmedikleri buna karşılık BChE enzimini %64,60-92,68 arasında inhibe ettikleri tespit edildi. Aslanpençesi ekstreleri arasında en yüksek BChE inhibisyonuna **AH**'nin (%83,29 ± 8,33 inhibisyon) sahip olduğu, biberiye (ortalama olarak %74 inhibisyon) ve ebegümeci (ortalama olarak %84 inhibisyon) ekstrelerinin kendi içlerinde yaklaşık olarak aynı seviyede inhibisyon yaptığı, devedikeni ekstreleri arasında en yüksek inhibisyonu hekzan ekstresinin (%79,96 ± 3,20 inhibisyon), ısırganotu ekstreleri arasında ise etil alkol ekstresinin (%92,68 ± 4,89 inhibisyon) gösterdiği belirlendi. Bu çalışma ile analiz edilen bu beş bitkinin anlamlı seviyede BChE enzimini inhibe ettikleri tespit edildi.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında, aslanpençesi bitkisinin yaprak ile çiçeklerinden hazırlanan ekstrelerin ABTS katyon radikali ve süperoksit anyon radikali giderim potansiyelleri ile antikolinesteraz etkileri, devedikeni tohumlarından hazırlanan ekstrelerin antikolinesteraz aktiviteleri, ebegümeci bitkisinin yaprak ile çiçeklerinden hazırlanan ekstrelerin ABTS katyon radikali giderim ve butirilkolinesteraz enzimini inhibe edici etkileri ilk defa çalışılmıştır. Birçok hastalık gibi sindirim sistemi hastalıklarının da antioksidan savunma mekanizmasının bozulması/azalması sonucunda ortaya çıktığı bilimsel çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bu hastalıkların önlenmesi ve tedavi edilmesinde antioksidan aktivite gösteren sebze, meyve ve tıbbi bitkilerin tüketilmesi önerilmektedir. Bu tez çalışmasında, incelenen beş bitkinin de halk arasında kullanım amaçları arasında yer alan sindirim sistemi hastalıklarında etkili olmalarının sebebinin sahip oldukları antioksidan etkiden ileri geldiği ortaya çıkarılmıştır. Antioksidan ve antikolinesteraz etkileri yüksek çıkan ekstrelerden sekonder metabolitlerin saflaştırılıp

yapıları aydınlatıldıktan sonra aktivitelerinin belirlenmesi yeni doğal kaynaklı bileşiklerin bulunmasına yönelik araştırmalara katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

Başağa H., Tekkaya C. ve Açıkel F. (1997). Antioxidative and free radical scavening properties of rosemary extact. *Lebensittel-Wissenschaft&Technologie*, ***30***, 105-108.

Baytop T. (1984). *Türkiye'de Bitkilerle Tedavi (Geçmişte ve Bugün)*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayınları; 184, 221-222, 226, 258-259, 417.

Bilaloğlu G.V. ve Harmandar M. (1999). *Flavonoidler*. İstanbul: Bakanlar Matbaacılık Ltd. Şti; 336-343.

Blois, M.S. (1958). Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, ***181***, 1199-1200.

Boğa M., Gazioğlu I., ve Kolak U. (2011). Antioxidant and anticholinesterase activities of eleven edible plants. *Pharmaceutical Biology*, ***49***, 290-295.

Condrat D., Szabo M-R, Crişan F. ve Lupea A-X. (2009). Antioxidant activity of some phanerogam plant extracts. *Food Science and Technology Research*, ***15***, 95-98.

Ebrahimzadeh M.A., Gharekhani M., Ghorbani M. ve Dargany P. (2015). Effect of extract of aerial parts of *Urtica dioica* (Urticaceae) on the stability of soybean oil. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, ***14***, 125-131.

Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. ve Featherstone R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacol*ogy, ***7***, 88-95.

Ertaş A., Boğa M., Haşimi N., Yeşil Y., Topçu G., Gören A. C. ve Kolak U. (2014). Antioxidant, anticholinesterase, antimicrobial activities and fatty acid constituents of *Achillea cappadocica*. *Turkish Journal of Chemistry*, ***38***, 592-599.

Ertaş A., Gören A. C., Haşimi N., Tolan V. ve Kolak U. (2015). Evaluation of antioxidant, cholinesterase inhibitory and antimicrobial properties of *Mentha longifolia* subsp. *noeana* and its secondary metabolites. *Records of Natural Products*, ***9***, 105-115.

Ferreira A., Proenca C., Serralheiro M.L.M. ve Araujo M.E.M. (2006). The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal, *Journal of Ethnopharmacology*, ***108***, 7-31.

Gholamhoseinian A., Moradi M.N. ve Sharifi-Far F. (2009). Screening the methanol extracts of some Iranian plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Research in Pharmaceutical Sciences*, ***4***, 105-112.

Gülçin İ., Küfrevioğlu Ö.İ., Oktay M. ve Büyükokuroğlu M.E. (2004). Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *Journal of Ethnopharmacology*, ***90***, 205–215.

Hamad İ., Erol-Dayi Ö., Pekmez M., Önay-Uçar E. ve Arda N. (2010). Antioxidant and cytotoxic activities of *Aphanes arvensis* extracts. *Plant Foods Human Nutrition*, ***65***, 45-49.

Hartman R.E., (2010). *Actions of Bioactive Phytochemicals in Cell Function and Alzheimer's Disease Pathology*. İçinde Cadenas E. ve Packer L. (Ed) *Micronutrients and Brain Health*. LLC; Taylor & Francis Group.

Hossain M.B., Patras A., Barry-Ryan C., Martin-Diana A.B. ve Brunton N.P. (2011). Aplications of principal component and hieararchical cluster analysis to classify different spices based on in vitro antioxidant activity and individual polyphenolic antioxidant compounds. *Journal of Functional Foods*, ***3***, 179-189.

Howes M.J.R., Perry N.S.L. ve Houghton P.J. (2003). Plants with traditional uses activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and cognitive disorders, *Phytotherapy Research*, ***17***, 1-18.

Kim K-B, Yoo K-H, Park H-Y ve Jeong J-M. (2006). Anti-oxidative activities of commercial edible plant extracts distributed in Korea. *Han'guk Eungyong Sangmyong Hwahakhoeji*, ***49***, 328-333.

Kozlowska M., Ścibiszb I., Zarębac D. ve Ziarnoc M. (2015). Antioxidant properties and effect on lactic acid bacterial growth of spice extracts. *CyTA-Journal of Food*, ***13***, 573-577.

Kolak U., Gazioğlu I., Öztürk M., Özgökçe F., Topçu G., ve Ulubelen A. (2009). Antioxidant and anticholinesterase constituents of *Salvia poculata*. *Turkish Journal of Chemistry*, ***33***, 813-823.

Lin H.Q., Ho M.T., Lau L.S., Wong K.K., Shaw P.C. ve Wan D.C.C. (2008). Anti-acetylcholinesterase activities of traditional Chinese medicine for treating Alzheimer's disease, *Chemico-Biological Interactions*, ***175***, 352–354.

Marouane W., Soussi A., Murat J-C, Bezzine S. ve El F. A. (2011). The protective effect of *Malva sylvestris* on rat kidney damaged by vanadium. *Lipids in Health and Disease*, ***10***, 1-8.

Moreno M.I.N., Isla M.I., Sampietro A.R., Vattuone M.A. (2000). Comparison of the free radical-scavenging activity of *Propolis* from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, ***71***, 109–114.

Nishikimi M., Rao N.A. ve Yagi K. (1972). The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and moleculer oxygen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, ***46***, 849-854.

Oh J., Jo H., Cho A.R., Kim S-J ve Han J. (2012). Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. *Food Control*, ***31***, 403-409.

Orhan İ. (2002). Türkiye'de yetişen bazı bitkilerin asetilkolinestereaz inhibitörü aktiviteleri yönünden incelenmesi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara, 165.

Orhan İ., Aslan S., Kartal M., Şener B. ve Başer K.H.C. (2008). Inhibitory effect of Turkish *Rosmarinus officinalis* L. on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes. *Food Chemistry*, ***108***, 663-668.

Öztürk M., Kolak U., Topçu G., Öksüz S. ve Choudhary I.M. (2011). Antioxidant and anticholinesterase active constituents from *Micromeria cilicica* by radical-scavening activity-guided fractionation. *Food Chemistry*, ***126***, 31-38.

Piazzi L., Cavalli A., Colizzi F., Belluti F., Bartolini M., Mancini F., Recanatini M., Andrisano V. ve Rampa A. (2008). Multi-target-directed coumarin derivatives: hAChE and BACE1 inhibitors as potential anti-Alzheimer compounds, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, ***18***, 423-426.

Reische D.W., Lillard D.A. ve Eitenmiller R.R. (2002). Antioxidants. İçinde C.A. Akoh ve D.B. Min (Ed.), *Food Lipids Chemistry, Nutrition and Biotechnology.* (2nd ed.). New York: Marcel Dekker, Inc; 489-516.

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. ve Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS cation radical decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine, **26***, 1231-1237.

Slinkard K. ve Singleton V.L. (1977). Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, ***28***, 49-55.

Sulas L., Giovanni A.R., Simonetta B. ve Giovanna P. (2016). Chemical and productive properties of two Sardinian milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) populations as sources of nutrients and antioxidants. *Genetic Resources and Crop Evolution*, ***63***, 315-326.

TUBIVES Version 2.0 Beta. Turkish Plants Data Service. Taxa comparison. Erişim 01.06.2016, http://www.tubives.com/index.php?sayfa=karsilastir .

Wu S.J. ve Ng L.T. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) in Taiwan, *Food Science and Technology*, ***41***, 323-330.

Zohra S.F., Meriem B. ve Samira S. (2013). Some extracts of mallow plant and its role in health. *APCBEE Procedia*, ***5***, 546-550.

HAM VERİLER

DPPH analiz sonuçları (% inhibisyon)

Ekstreler	10µg/mL	25µg/mL	50µg/mL	100µg/mL
AH	2,39±2,10	0,43±0,32	0,82±0,24	0,87±0,94
AA	8,56±2,36	20,17±3,83	38,56±2,72	66,20±2,41
AE	24,74±3,47	66,71±3,64	88,03±0,18	86,80±0,32
BH	6,53±1,32	20,73±0,62	41,54±1,86	84,33±5,55
BA	5,63±1,38	11,64±0,89	23,81±2,54	59,47±4,60
BE	6,60±1,92	22,12±1,24	45,54±1,26	85,62±3,47
DH	25,07±3,45	66,86±3,63	88,08±0,18	86,86±0,32
DA	13,03±1,66	6,84±0,84	4,65±3,05	8,81±1,92
DE	0,08±0,24	0,18±1,20	2,24±0,32	8,14±0,41
EH	7,02±1,92	22,47±1,23	45,79±1,25	85,68±3,45
EA	2,83±2,09	0,01±0,32	0,37±0,23	1,14±0,94
EE	8,96±2,35	20,52±3,82	38,83±2,71	66,35±2,40
IH	0,37±0,23	0,27±1,20	2,67±0,32	8,55±0,41
IA	7,02±1,31	21,08±0,62	41,80±1,85	84,40±5,53
IE	6,05±1,38	12,03±0,89	24,15±2,53	59,65±4,58
BHA	50,63±6,49	76,68±4,28	88,56±0,34	89,49±0,00
α-Toc	31,69±0,16	82,38±1,33	86,15±4,67	90,59±0,09

ABTS analiz sonuçları (% inhibisyon)

Ekstreler	10µg/mL	25µg/mL	50µg/mL	100µg/mL
AH	2,81±0,23	2,43±0,35	3,42±1,25	7,87±0,47
AA	24,33±1,25	41,55±2,18	59,90±3,06	88,60±0,26
AE	68,74±4,99	77,72±6,82	62,70±4,03	89,73±0,13
BH	21,50±3,22	23,05±3,82	76,82±2,58	85,35±0,35
BA	14,29±2,20	20,26±5,64	48,65±6,81	89,65±0,26
BE	18,44±1,41	33,62±5,61	48,80±13,88	90,18±0,13
DH	0,11±0,57	0,49±0,60	0,93±0,86	0,17±0,57
DA	6,38±1,26	15,00±1,20	27,24±1,20	39,18±2,20
DE	12,86±0,80	23,58±1,51	39,66±1,37	53,48±1,02
EH	0,42±2,96	2,76±0,82	6,91±2,38	15,53±1,95
EA	6,23±0,13	13,79±0,69	23,01±2,03	37,36±1,37
EE	7,31±2,27	8,01±7,64	37,72±20,81	39,72±16,65
IH	2,02±1,22	4,64±3,20	3,10±4,97	11,34±3,74
IA	13,49±1,98	38,42±3,86	57,99±3,64	74,24±2,03
IE	4,87±0,13	9,63±1,73	17,79±1,46	28,98±2,03
BHA	90,87±3,67	90,83±0,13	90,76±0,00	90,76±0,00
(+)- Kateşin	89,06±0,53	89,91±0,13	90,37±0,13	90,06±0,00

Süperoksit analiz sonuçları (% inhibisyon)

Ekstreler	**10µg/mL**	**25µg/mL**	**50µg/mL**	**100µg/mL**
AE	0,07±7,26	0,19±4,82	0,15±4,70	5,07±0,83
BH	1,65±3,99	9,66±5,16	0,10±5,94	0,08±8,13
BA	0,25±38,95	0,35±20,14	6,83±5,95	0,07±4,69
BE	3,41±10,93	7,90±14,07	5,17±12,31	0,58±17,97
DH	0,28±2,33	0,45±2,90	0,14±1,06	12,29±2,32
EH	17,15±38,31	0,53±10,98	0,61±6,33	0,58±3,17
EA	0,18±2,09	0,15±2,55	0,14±5,54	2,08±10,73
Gallik asit	18,78±2,80	45,88±6,10	50,25±4,98	69,68±2,18