

T.C.
ANAkkALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**YABAN ERİĞİ (*PRUNUS SPINOSA L.*) BİTKİSİNİN ANTİOKSİDAN,
SİTOTOKSİK, ENZİM AKTİF ÖZÜT VE BİLEŞENLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Merve SÖNMEZ

Kimya Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: 26/08/2016

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Mehmet AY

ANAkkALE

Merve SÖNMEZ tarafından Prof. Dr. Mehmet AY yönetiminde hazırlanan ve 26/08/2016 tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Yaban Eriği (*Prunus spinosa L.*) Bitkisinin Antioksidan, Sitotoksik, Enzim Aktif Özüt ve Bileşenlerinin Belirlenmesi**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Kimya Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Prof. Dr. Mehmet AY
Başkan

Prof. Dr. Feray KÖÇKAR
Üye

Prof. Dr. Cahit AKGÜL
Üye

Prof. Dr. Levent GENÇ
Müdür
Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:

Bu tez çalışması, ÇOMÜ BAP tarafından FYL 2014/212 numaralı projeden desteklenmiştir.

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI



Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Merve SÖNMEZ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince “Yaban eriği (*Prunus spinosa* L.) bitkisinin antioksidan, sitotoksik, enzim aktif özüt ve bileşenlerinin belirlenmesi” konulu tez çalışmasının seçiminde, yürütülmesinde, sonuçlandırılmasında ve sonuçlarının değerlendirilmesinde bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, desteğini esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Mehmet AY’a,

Bitkinin Herbaryum tanımlamasını yapan F.E.F. Biyoloji Bölümü’nden Sayın Doç. Dr. Ersin KARABACAK’a,

Enzim-Aktivite/İnhibisyon çalışmalarım süresince desteğini esirgemeyen Gebze Teknik Üniversitesi Temel Bilimler Fakültesi Kimya Bölümü, Biyokimya A.B.D. ‘ndan Sayın Prof. Dr. Ayhan ÇELİK ve doktora öğrencisi Gülden Aşçı YETİŞ’e,

Sitotoksikite çalışmalarım süresince her konuda yardımcı olan Balıkesir Üniversitesi Moleküler Biyoloji A.B.D. Başkanı Sayın Prof. Dr. Feray KÖÇKAR ve Dr. Esra TOKAY’a,

GC/MS analizi çalışmalarım süresince desteğini esirgemeyen Gıda Mühendisliği Bölümü’nden Prof. Dr. Yonca YÜCEER’e,

Dostluklarıyla ve yardımlarıyla bana her zaman destek olan ve yanımda bulunan doktora öğrencisi Ferah ÖNDER ve Arş. Gör. Tuğba GÜNGÖR’e,

Ve en önemlisi hayatımın her evresinde yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen BABAM ve ANNEM’e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca bu tez çalışmasını FYL 2014-212 no’lu proje ile destekleyen Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi’ne de teşekkür ederim.

Merve SÖNMEZ
Çanakkale, Ağustos 2016

SİMGELER VE KISALTMALAR

MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
L-DOPA	Dihidroksifenilalanin
HT-29	İnsan kolon karsinom
Hep3B	İnsan karaciğer karsinomu
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
TPTZ	2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazin
ABTS	2,2'-Azinobis(3-etilbenzothiazolin-6-sulfonik asit) diamonyum tuzu
CUPRAC	Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi
FCR	Folin & Ciocalteu's Fenol Reaktifi
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
TEAC	Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite
FRAP	Demir İyonu İndirgeme Antioksidan Gücü
QR	Kersetin
TR	Troloks
QERFC	Kersetin Eşdeğeri Flavonoid Derişimi
EtOAc	Etilasetat
DCM	Diklormetan
MeOH	Metanol
HPLC	Yüksek Ayırmalı (Basınçlı) Sıvı Kromatografisi
¹ H-NMR	Hidrojen Nükleer Magnetik Rezonans Spektroskopisi
UV-VIS	Mor Ötesi ve Görünür Bölge Soğurma Spektroskopisi
SD	Hata değeri
M	Molarite
mg	Miligram
mM	Milimolar
mL	Mililitre
μL	Mikrolitre
mmol	Milimol
nm	Nanometre

ÖZET

YABAN ERİĞİ (*PRUNUS SPINOSA L.*) BİTKİSİNİN ANTIOKSİDAN, SİTOTOKSİK, ENZİM AKTİF ÖZÜT VE BİLEŞENLERİNİN BELİRLENMESİ

Merve SÖNMEZ

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Mehmet AY

26/08/2016, 184

Bu çalışmada yaban eriği (*Prunus spinosa L.*) bitkisinin (meyve, çiçek ve yaprak kısımları) özütleri antioksidan, sitotoksik ve enzim etkinliği açısından incelenmiştir. Soxhlet yöntemi ile etilasetat, metanol, diklorometan, hekzan (meyve, çiçek, yaprak) özütleri ve maserasyon yöntemi ile metanol meyve özütü olmak üzere 13 farklı özüt elde edilmiştir. Özütlerin antioksidan etkinlik ölçümleri, DPPH yöntemi ile nitel etkinliği belirlendikten sonra 13 farklı özüt için DPPH ve TEAC; etkin olarak belirlenen özütler için FRAP ve CUPRAC yöntemleri ile yapılmıştır. Yüksek antioksidan etkin özütler; etil asetat ve metanol (çiçek, meyve yaprak) özütü, diklorometan meyve ve hekzan çiçek özütü olarak bulunmuştur. En yüksek toplam fenolik bileşik içeriği F-C reaktifi ile metanol meyve özütü için (19 mg ferulik asit/ 100 g özüt) olarak belirlenmiştir.

Etkin özütler için Proteaz, Tirozinaz, β -Laktamaz, enzimleri ile enzim aktivite/inhibisyon değerleri, V_{maks} ve % inhibisyon olarak belirlenmiştir. Özütlerin sitotoksik etkileri, 5 farklı derişimde HUVEC, HT-29 ve Hep3B hücreleri üzerinde MTT testi ile 550 nm’de soğurmaları okunarak grafiksel olarak gösterilmiştir.

Hekzan özütlerinin uçucu yağ analizleri GC-MS ile yapılmıştır. DPPH yöntemi ile etkin olarak belirlenen etilasetat ve metanol meyve, çiçek ve yaprak özütlerine etken bileşen elde etmek amacıyla kromatografik ayırma işlemleri uygulanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Yaban Eriği (*Prunus spinosa L.*), Antioksidan, DPPH, CUPRAC, TEAC, FRAP, Sitotoksikite, Enzim Aktivite/İnhibisyon, GC-MS, Kromatografik Analiz.

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF ANTIOXIDANT, CYTOTOXIC AND ENZYME ACTIVE COMPONENTS FROM *PRUNUS SPINOSA L.* EXTRACTS

Merve SÖNMEZ

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Chair For Chemistry Thesis of Master of Science

Advisor: Prof. Dr. Mehmet AY

26/08/2016, 184

In this study; extracts of sloe (*Prunus spinosa L.*) plant (the fruit, flowers and leaves) were examined from the point of antioxidant, enzyme and cytotoxic activity. 13 Extracts of ethyl acetate, methanol, dichloromethane and hexane (fruit, flowers and leaves) obtained by Soxhlet method and metanol extract of fruit obtained by maceration method . Determination of antioxidant activities of extracts were measured qualitatively first by DPPH, then by DPPH and TEAC for 13 different extracts and by FRAP and CUPRAC for active extracts. The highest antioxidant active extracts were defined as ethyl acetate and methanol extracts of flowers, fruit and leaves, dichloromethane extract of fruit and hexane extract of flower. The amount of total phenolic components of the extracts were determined with the highest value for methanol fruit extract (19 mg ferulic acid/ 100 g extract) by F-C reagent.

Inhibition values of enzyme-activity were obtained as of V_{max} and % inhibition for active extracts with protease, tyrosinase, β -lactamase enzymes. Cytotoxicity effects of the extracts of sloe, were indicated graphically among HUVEC, Hep3B and HT29 cell lines with MTT assay by measuring absorbance at 550 nm for five different concentration.

The volatile oil analysis of the hexane extracts were performed by GC-MS. For active component seperation, determined active extracts by DPPH of ethyl acetate and methanol extracts of flowers, fruit and leaves were processed by chromatographicly.

Keywords: *Prunus spinosa L.* Sloe, Antioxidant, DPPH, CUPRAC, TEAC, FRAP, Cytotoxicity, Enzyme Activity/Inhibition, GC-MS, Chromatographic Analysis.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAV SONUÇ FORMU	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	v
ÖZET	vii
ABSTRACT.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxiv
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1. Antioksidanlar (Yükseltgen Önleyiciler)	1
1.2. Doğal Antioksidanlar	3
1.3. Bitkisel Biyoaktif Bileşikler	4
1.4. Antioksidan Yapı Etkinlik Tayinleri.....	5
1.4.1. DPPH Radikal Süpürücü Antioksidan Kapasite Yöntemi	6
1.4.2. Folin-Ciocalteu Yöntemi İle Toplam Fenolik Bileşen Tayini	7
1.4.3. Troloks Eşiti Antioksidan Kapasite (TEAC) Yöntemi.....	7
1.4.4. Demir İyon İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Yöntemi.....	8
1.4.5. (CUPRAC) Bakır (II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite Yöntemi	8
1.5. Enzim-Aktivite/İnhibisyon Çalışmaları	9
1.5.1. DMSO Uyumu	10
1.5.2. Enzim Çalışmaları	10
1.5.2.1. Proteaz İnhibisyon Çalışmaları	11
1.5.2.2. Tirozinaz İnhibisyonu Çalışması	12
1.5.2.3. β -Laktamaz İnhibisyonu Çalışması	13
1.6. Sitotoksisite Denemesi	13
BÖLÜM 2	
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	15
2.1. <i>Prunus spinosa L</i>	15
BÖLÜM 3	

MATERYAL VE METOT	20
3.1. Materyaller	20
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar..	20
3.1.2.Kullanılan Cihazlar.....	21
3.2. Deneysel Yöntemler.....	22
3.2.1. Bitkinin Toplanması ve Tanımlanması.....	23
3.2.2. Bitkinin Kurutulması, Öğütülmesi ve Depolanması	23
3.2.3. Bitki Örneklerine Özütleme İşleminin Uygulanması	24
3.2.4. Bitki Özütlerinin Aktifliğinin DPPH (1,1-Difenil-2-Pikril Hidrazil) İle Nitel Olarak Belirlenmesi.....	26
3.2.5. DPPH (1,1-Difenil 2-Pikril Hidrazil) Serbest Radikal Süpürücü Aktivite Tayini	27
3.2.6. Toplam Fenolik Bileşik Miktarı Tayini	28
3.2.7. (CUPRAC) Bakır (II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite Yöntemi	29
3.2.8. TEAC (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi) Yöntemi.....	30
3.2.9. FRAP (Demir İyon İndirgeyici Antioksidan Güç) Yöntemi.....	31
3.2.10. Enzim-Aktivite/İnhibisyon Çalışmaları.....	31
3.2.10.1. Proteaz İnhibisyon Çalışmaları.....	32
3.2.10.2. Tirozinaz İnhibisyonu Çalışması.	34
3.2.10.3. β -Laktamaz İnhibisyonu Çalışması	34
3.2.11. Yaban Eriği Bitki Özütlerine Uygulanan Sitotoksite Çalışmaları	35
3.2.11.1. Hücre Kültürü Ortamının Hazırlanması.....	35
3.2.11.2. FCS Hazırlanması.....	35
3.2.11.3. PBS Tampon Çözeltilsinin Hazırlanması.....	36
3.2.11.4. Çalışmada Kullanılan Hücre Soyları	36
3.2.11.5. Hücre Soyunun Başlatılması	36
3.2.11.6. Hücrelerin Büyütülmesi	36
3.2.11.7. Hücrelerin Pasajlanması.....	36
3.2.11.8. Canlı Hücrelerin Belirlenmesi (Tripin Mavis Testi) ve Hücre Sayımı.	37
3.2.11.9. Maddelerin Uygulanması	37
3.2.11.10. MTT Denemesi.....	38
3.2.12. GC-MS Analizi.....	38
3.2.13. Kromatografik Ayırma İşlemleri	38

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	40
4.1. DPPH (Serbest Radikal Süpürücü Kapasite) Sonuçları	40
4.2. Toplam Fenolik Bileşen Miktar Tayini Sonuçları	46
4.3. CUPRAC (Cu (II) İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi) Sonuçları.....	48
4.4. TEAC (ABTS•+ Radikal Giderme Aktivitesi) Sonuçları	54
4.5. FRAP (Demir İyon İndirgeyici Antioksidan Güç) Sonuçları.....	64
4.6. Enzim-Aktivite/İnhibisyon Sonuçları	66
4.6.1. Proteaz İnhibisyon Sonuçları	66
4.6.2. Tirozinaz İnhibisyon Sonuçları	110
4.6.3. β -Laktamaz İnhibisyon Sonuçları	128
4.7. Yaban Eriği Özütlерinin Sitotoksisite Çalışmasının Sonuçları.....	149
4.8. GC/MS Ham Özütleri Bileşen Analizi Sonuçları.....	162

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER.....	170
KAYNAKLAR	178
ÖZGEÇMİŞ	I

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. DPPH radikalının antioksidan ile etkileşim reaksiyonu.....	6
Şekil 1.2. ABTS [•] radikalının antioksidan ile reaksiyonu	7
Şekil 1.3. Antioksidanın TPTZ ile reaksiyonu.....	8
Şekil 1.4. CUPRAC yönteminin kromoforunu oluşturan Bis(2,9-dimetil-1,10 fenantrolin)bakır(I) kelatı'nın 'Cu(I)-Nc' kimyasal yapısı	9
Şekil 1.5. Karboksipeptidaz A ve substratı Hippuril-L-fenilalanin arasındaki tepkime	11
Şekil 1.6. Kimotripsin ve substratı N-süksinik-fenil- <i>p</i> -nitroanilit arasındaki tepkime.....	12
Şekil 1.7. Tripsin ve substratı N-benzoil-D-L-arjinin-4-nitroanilit arasındaki tepkime	12
Şekil 1.8. <i>L</i> -tirozinin <i>L</i> -DOPA'ya dönüşüm mekanizması.....	13
Şekil 1.9. β -laktamaz enziminin amit bağıını hidroliz tepkimesi	13
Şekil 2.1. Yaban eriği meyve, çiçek ve yapraklarına ait görseller; a, b, c, d, e.....	17
Şekil 3.1. <i>Prunus spinosa</i> L. (Yaban eriği) bitkisi için yapılan çalışmaların şematik gösterimi	22
Şekil 3.2. Enzim, özüt ve tampon çözeltilerinin 96 kuyucuklu plakaya ekilişi; a), substrat ekledikten sonra; b), reaksiyon bitiminin ardından gerçekleşen renk değişimi; c).....	35
Şekil 3.3. a) Hep3B (İnsan hepatoma) hücre hattı, b) HT-29 (İnsan kolon kanseri) hücre hattı, c) HUVEC hücre hattı	36
Şekil 4.1. Yaban eriği DCM meyve özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi	42
Şekil 4.2. Yaban eriği DCM yaprak özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi	42
Şekil 4.3. Yaban eriği DCM çiçek özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi	42
Şekil 4.4. Yaban eriği etilasetat çiçek özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi ...	43
Şekil 4.5. Yaban eriği etilasetat meyve özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi .	43
Şekil 4.6. Yaban eriği etilasetat yaprak özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi..	43
Şekil 4.7. Yaban eriği MeOH çiçek özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi	44
Şekil 4.8. Yaban eriği MeOH yaprak özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi.....	44
Şekil 4.9. Yaban eriği MeOH meyve özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi	44
Şekil 4.10. Yaban eriği maserasyon meyve özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi.	45
Şekil 4.11. Yaban eriği hekzan meyve özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi ..	45
Şekil 4.12. Yaban eriği hekzan yaprak özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi...	45

Şekil 4.13. Yaban eriği hekzan çiçek özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi	46
Şekil 4.14. Toplam fenolik bileşen tayininde kullanılan Ferulik asit standardı çalışma grafiği.	47
Şekil 4.15. CUPRAC tayininde kullanılan kersetin standardı çalışma grafiği	49
Şekil 4.16. DCM yaprak özütü ve standart olarak kullanılan kersetinin farklı derişimlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları	49
Şekil 4.17. DCM meyve özütü ve standart olarak kullanılan kersetinin farklı derişimlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları.....	50
Şekil 4.18. Etilasetat çiçek özütü ve standart olarak kullanılan kersetinin farklı derişimlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları..	50
Şekil 4.19. Etilasetat meyve özütü ve standart olarak kullanılan kersetinin farklı derişimlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları..	51
Şekil 4.20. Etilasetat yaprak özütü ve standart olarak kullanılan kersetinin farklı derişimlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları..	51
Şekil 4.21. Hekzan çiçek özütü ve standart olarak kullanılan kersetinin farklı derişimlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları	52
Şekil 4.22. MeOH çiçek özütü ve standart olarak kullanılan kersetinin farklı derişimlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları	52
Şekil 4.23. MeOH yaprak özütü ve standart olarak kullanılan kersetinin farklı derişimlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları	53
Şekil 4.24. MeOH meyve özütü ve standart olarak kullanılan kersetinin farklı derişimlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları	53
Şekil 4.25. Yaban eriği MeOH meyve özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS ^{•+} radikalini süpürme etkisi	55
Şekil 4.26. Yaban eriği DCM yaprak özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS ^{•+} radikalini süpürme etkisi	56
Şekil 4.27. Yaban eriği etilasetat çiçek özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS ^{•+} radikalini süpürme etkisi	56
Şekil 4.28. Yaban eriği etilasetat meyve özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS ^{•+} radikalini süpürme etkisi	57
Şekil 4.29. Yaban eriği DCM meyve özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS ^{•+} radikalini süpürme etkisi.	58
Şekil 4.30. Yaban eriği MeOH çiçek özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS ^{•+}	

radikalini süpürme etkisi.	58
Şekil 4.31. Yaban eriği MeOH yaprak özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS ^{•+} radikalini süpürme etkisi.	59
Şekil 4.32. Yaban eriği hekzan çiçek özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS ^{•+} radikalini süpürme etkisi.	60
Şekil 4.33. Yaban eriği etilasetat yaprak özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS ^{•+} radikalini süpürme etkisi	60
Şekil 4.34. Yaban eriği DCM çiçek özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS ^{•+} radikalini süpürme etkisi.	61
Şekil 4.35. Yaban eriği hekzan yaprak özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS ^{•+} radikalini süpürme etkisi.	62
Şekil 4.36. Yaban eriği hekzan meyve özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS ^{•+} radikalini süpürme etkisi.	62
Şekil 4.37. Yaban eriği maserasyon meyve özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS ^{•+} radikalini süpürme etkisi.	63
Şekil 4.38. FRAP yönteminde kullanılan FeSO ₄ .7H ₂ O standart grafiği	65
Şekil 4.39. Substrat+ Enzim (α -kemotripsin)+ Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon grafiği	67
Şekil 4.40. PMSF+ Substrat+ Enzim (α -kemotripsin)+ Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon grafiği.	67
Şekil 4.41. DMSO+ Substrat+ Enzim (α -kemotripsin)+ Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon grafiği..	68
Şekil 4.42. Yaban eriğinin MeOH yaprak özütünün (1 mg/ mL’lik özütler) α -kemotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği..	68
Şekil 4.43. Yaban eriğinin MeOH meyve özütünün (1 mg/ mL’lik özütler) α -kemotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.	69
Şekil 4.44. Yaban eriğinin MeOH çiçek özütünün (1 mg/ mL’lik özütler) α -kemotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.	69
Şekil 4.45. Yaban eriğinin DCM yaprak özütünün (1 mg/ mL’lik özütler) α -kemotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği... ..	70
Şekil 4.46. Yaban eriğinin DCM meyve özütünün (1 mg/ mL’lik özütler) α -kemotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	70
Şekil 4.47. Yaban eriğinin etilasetat meyve özütünün (1 mg/ mL’lik özütler) α -kemotripsin	

enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.	71
Şekil 4.48. Yaban eriğinin etilasetat çiçek özütünün (1 mg/ mL'lik özütler) α -kemotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği	71
Şekil 4.49. Yaban eriğinin etilasetat yaprak özütünün (1 mg/ mL'lik özütler) α -kemotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği	72
Şekil 4.50. Yaban eriğinin maserasyon meyve özütünün (1 mg/ mL'lik özütler) α -kemotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.	72
Şekil 4.51. Yaban eriğinin hekzan çiçek özütünün (1 mg/mL'lik özütler) α -kemotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.	73
Şekil 4.52. DMSO+ Substrat+ Enzim (α -kemotripsin)+ Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon grafiği (10 mg/mL'lik özütler için).	73
Şekil 4.53. Yaban eriğinin MeOH yaprak özütünün (10 mg/mL'lik özütler) α -kemotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.	74
Şekil 4.54. Yaban eriğinin MeOH meyve özütünün (10 mg/mL'lik özütler) α -kemotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği	74
Şekil 4.55. Yaban eriğinin MeOH çiçek özütünün (10 mg/mL'lik özütler) α -kemotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.	75
Şekil 4.56. Yaban eriğinin DCM yaprak özütünün (10 mg/mL'lik özütler) α -kemotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.	75
Şekil 4.57. Yaban eriğinin DCM meyve özütünün (10 mg/mL'lik özütler) α -kemotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.	76
Şekil 4.58. Yaban eriğinin etilasetat meyve özütünün (10 mg/mL'lik özütler) α -kemotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.	76
Şekil 4.59. Yaban eriğinin etilasetat çiçek özütünün (10 mg/mL'lik özütler) α -kemotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.	77
Şekil 4.60. Yaban eriğinin etilasetat yaprak özütünün (10 mg/mL'lik özütler) α -kemotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.	77
Şekil 4.61. Yaban eriğinin maserasyon meyve özütünün (10 mg/mL'lik özütler) α -kemotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.	78
Şekil 4.62. Yaban eriğinin hekzan çiçek özütünün (10 mg/mL'lik özütler) α -kemotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.	78
Şekil 4.63. Enzim (Tripsin) + Substrat+ Tampon çözeltinin reaksiyon grafiği.	80
Şekil 4.64. PMSF + Enzim (Tripsin) + Substrat+ Tampon çözeltinin reaksiyon grafiği.	80

Şekil 4.65. DMSO+ Enzim (Tripsin) + Substrat+ Tampon çözeltinin reaksiyon grafiği...	81
Şekil 4.66. Yaban eriğinin DCM yaprak özütünün (1 mg/ mL'lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	81
Şekil 4.67. Yaban eriğinin DCM meyve özütünün (1 mg/mL'lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	82
Şekil 4.68. Yaban eriğinin etilasetat meyve özütünün (1 mg/mL'lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	82
Şekil 4.69. Yaban eriğinin etilasetat çiçek özütünün (1 mg/mL'lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	83
Şekil 4.70. Yaban eriğinin etilasetat yaprak özütünün (1 mg/mL'lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	83
Şekil 4.71. Yaban eriğinin maserasyon meyve özütünün (1 mg/mL'lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	84
Şekil 4.72. Yaban eriğinin hekzan çiçek özütünün (1 mg/mL'lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	84
Şekil 4.73. Yaban eriğinin MeOH yaprak özütünün (1 mg/mL'lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	85
Şekil 4.74. Yaban eriğinin MeOH meyve özütünün (1 mg/mL'lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	85
Şekil 4.75. Yaban eriğinin MeOH çiçek özütünün (1 mg/mL'lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	86
Şekil 4.76. DMSO+ Enzim (Tripsin) + Substrat+ Tampon çözeltinin reaksiyon grafiği. (10 mg/mL'lik örnekler için).....	86
Şekil 4.77. Yaban eriğinin MeOH yaprak özütünün (10 mg/ mL'lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	87
Şekil 4.78. Yaban eriğinin MeOH meyve özütünün (10 mg/mL'lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	87
Şekil 4.79. Yaban eriğinin MeOH çiçek özütünün (10 mg/mL'lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	88
Şekil 4.80. Yaban eriğinin DCM yaprak özütünün (10 mg/mL'lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	88
Şekil 4.81. Yaban eriğinin DCM meyve özütünün (10 mg/mL'lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	89

Şekil 4.82. Yaban eriğinin etilasetat meyve özütünün (10 mg/mL’lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	89
Şekil 4.83. Yaban eriğinin etilasetat çiçek özütünün (10 mg/mL’lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	90
Şekil 4.84. Yaban eriğinin etilasetat yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	90
Şekil 4.85. Yaban eriğinin maserasyon meyve özütünün (10 mg/mL’lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği..	91
Şekil 4.86. Yaban eriğinin hekzan çiçek özütünün (10 mg/mL’lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	91
Şekil 4.87. PMSF+ Substrat+ Enzim (Papain)+ Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon grafiği....	93
Şekil 4.88. Substrat+ Enzim (Papain)+ Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon grafiği..	93
Şekil 4.89. DMSO+ Substrat+ Enzim (Papain)+ Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon grafiği..	93
Şekil 4.90. Yaban eriğinin metanol yaprak özütünün (1 mg/mL’lik özütler) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	94
Şekil 4.91. Yaban eriğinin metanol meyve özütünün (1 mg/mL’lik özütler) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	94
Şekil 4.92. Yaban eriğinin metanol çiçek özütünün (1 mg/mL’lik özütler) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	95
Şekil 4.93. Yaban eriğinin DCM yaprak özütünün (1 mg/mL’lik özütler) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	95
Şekil 4.94. Yaban eriğinin DCM meyve özütünün (1 mg/mL’lik özütler) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	96
Şekil 4.95. Yaban eriğinin etilasetat meyve özütünün (1 mg/mL’lik özütler) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	96
Şekil 4.96. Yaban eriğinin etilasetat çiçek özütünün (1 mg/mL’lik özütler) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	97
Şekil 4.97. Yaban eriğinin etilasetat yaprak özütünün (1 mg/mL’lik özütler) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	97
Şekil 4.98. Yaban eriğinin hekzan çiçek özütünün (1 mg/ mL’lik özütler) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	98

Şekil 4.99. Yaban eriğinin maserasyon meyve özütünün (1 mg/mL’lik özütler) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.	98
Şekil 4.100. DMSO+ Substrat+ Enzim (Papain)+ Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon grafiği (10 mg/mL’lik örneklerden alınan 10 µL hacimler için).	99
Şekil 4.101. Yaban eriğinin metanol yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL ‘lik örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği... ..	99
Şekil 4.102. Yaban eriğinin metanol meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği... ..	100
Şekil 4.103. Yaban eriğinin metanol çiçek özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.	100
Şekil 4.104. Yaban eriğinin DCM yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği... ..	101
Şekil 4.105. Yaban eriğinin DCM meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL ‘lik örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.	101
Şekil 4.106. Yaban eriğinin etilasetat meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği	102
Şekil 4.107. Yaban eriğinin etilasetat yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.	102
Şekil 4.108. Yaban eriğinin etilasetat çiçek özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği	103
Şekil 4.109. Yaban eriğinin maserasyon meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL ‘lik örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği..	103
Şekil 4.110. Yaban eriğinin hekzan çiçek özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği	104
Şekil 4.111. DMSO+ Substrat+ Enzim (Papain)+ Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon grafiği (10 mg/mL’lik örneklerden alınan 30 µL’lik hacimler için).....	104
Şekil 4.112. Yaban eriğinin metanol yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 30 µL’ lik örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği..	105
Şekil 4.113. Yaban eriğinin metanol meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 30 µL’ lik örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği	105
Şekil 4.114. Yaban eriğinin metanol çiçek özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 30 µL’ lik örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.	106
Şekil 4.115. Yaban eriğinin DCM yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 30 µL’ lik örnek)	

papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği	106
Şekil 4.116. Yaban eriğinin DCM meyve özütünün (10 mg/mL'lik özüt- 30 µL'lik örnek)	
papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği	107
Şekil 4.117. Yaban eriğinin etilasetat meyve özütünün (10 mg/mL'lik özüt- 30 µL'lik	
örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği	107
Şekil 4.118. Yaban eriğinin etilasetat çiçek özütünün (10 mg/mL'lik özüt- 30 µL'lik örnek)	
papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği	108
Şekil 4.119. Yaban eriğinin etilasetat yaprak özütünün (10 mg/mL'lik özüt- 30 µL'lik	
örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.	108
Şekil 4.120. Yaban eriğinin maserasyon meyve özütünün (10 mg/mL'lik özüt- 30 µL'lik	
örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği	109
Şekil 4.121. Yaban eriğinin hekzan çiçek özütünün (10 mg/mL'lik özüt- 30 µL'lik örnek)	
papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği	109
Şekil 4.122. Substrat+ Enzim (Tirozinaz)+Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon grafiği	111
Şekil 4.123. DMSO + Substrat+ Enzim (Tirozinaz)+ Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon	
grafiği	111
Şekil 4.124. PMSF+Substrat+ Enzim (Tirozinaz)+ Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon	
grafiği	111
Şekil 4.125. Yaban eriğinin metanol yaprak özütünün (1 mg/mL'lik özüt) tirozinaz enzimi	
ile verdiği reaksiyon grafiği i.....	112
Şekil 4.126. Yaban eriğinin metanol meyve özütünün (1 mg/mL'lik özüt) tirozinaz enzimi	
ile verdiği reaksiyon grafiği.....	112
Şekil 4.127. Yaban eriğinin metanol çiçek özütünün (1 mg/mL'lik özüt) tirozinaz enzimi	
ile verdiği reaksiyon grafiği.....	113
Şekil 4.128. Yaban eriğinin DCM yaprak özütünün (1 mg/mL'lik özüt) tirozinaz enzimi ile	
verdiği reaksiyon grafiği.....	113
Şekil 4.129. Yaban eriğinin DCM meyve özütünün (1 mg/mL'lik özüt) tirozinaz enzimi ile	
verdiği reaksiyon grafiği.....	114
Şekil 4.130. Yaban eriğinin etilasetat meyve özütünün (1 mg/mL'lik özüt) tirozinaz enzimi	
ile verdiği reaksiyon grafiği.....	114
Şekil 4.131. Yaban eriğinin etilasetat çiçek özütünün (1 mg/mL'lik özüt) tirozinaz enzimi	
ile verdiği reaksiyon grafiği.....	115
Şekil 4.132. Yaban eriğinin etilasetat yaprak özütünün (1 mg/mL'lik özüt) tirozinaz enzimi	

ile verdiği reaksiyon grafiği.....	115
Şekil 4.133. Yaban eriğinin maserasyon meyve özütünün (1 mg/mL’lik özüt) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği	116
Şekil 4.134. Yaban eriğinin hekzan çiçek özütünün (1 mg/mL’lik özüt) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	116
Şekil 4.135. DMSO+ Substrat+ Enzim (Tirozinaz)+ Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon grafiği (10 mg/mL’lik örneklerden alınan 10 µL hacimler için)	117
Şekil 4.136. Yaban eriğinin metanol yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği	117
Şekil 4.137. Yaban eriğinin metanol meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	118
Şekil 4.138. Yaban eriğinin metanol çiçek özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	118
Şekil 4.139. Yaban eriğinin DCM yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.	119
Şekil 4.140. Yaban eriğinin DCM meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	119
Şekil 4.141. Yaban eriğinin etilasetat meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği	120
Şekil 4.142. Yaban eriğinin etilasetat çiçek özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	120
Şekil 4.143. Yaban eriğinin etilasetat yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği i.....	121
Şekil 4.144. Yaban eriğinin maserasyon meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	121
Şekil 4.145. Yaban eriğinin hekzan çiçek özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	122
Şekil 4.146. DMSO+ Substrat+ Enzim (Tirozinaz)+ Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon grafiği (10 mg/mL’lik örneklerden alınan 30 µL’lik hacimler için) i	122
Şekil 4.147. Yaban eriğinin metanol yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 30 µL’ lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	123
Şekil 4.148. Yaban eriğinin metanol meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 30 µL’ lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	123

Şekil 4.149. Yaban eriğinin metanol çiçek özütünün (10 mg/mL'lik özüt- 30 µL' lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	124
Şekil 4.150. Yaban eriğinin DCM yaprak özütünün (10 mg/mL'lik özüt- 30 µL' lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	124
Şekil 4.151. Yaban eriğinin DCM meyve özütünün (10 mg/mL'lik özüt- 30 µL' lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	125
Şekil 4.152. Yaban eriğinin etilasetat meyve özütünün (10 mg/mL'lik özüt- 30 µL' lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	125
Şekil 4.153. Yaban eriğinin etilasetat çiçek özütünün (10 mg/mL'lik özüt- 30 µL' lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	126
Şekil 4.154. Yaban eriğinin etilasetat yaprak özütünün (10 mg/mL'lik özüt- 30 µL' lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	126
Şekil 4.155. Yaban eriğinin maserasyon meyve özütünün (10 mg/mL'lik özüt- 30 µL' lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	127
Şekil 4.156. Yaban eriğinin hekzan çiçek özütünün (10 mg/mL'lik özüt- 30 µL' lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	127
Şekil 4.157. Substrat + Enzim (Penisilinaz) + Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon grafiği.....	129
Şekil 4.158. DMSO+ Substrat+ Enzim (Penisilinaz)+ Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon grafiği	129
Şekil 4.159. PMSF+ Substrat+ Enzim (Penisilinaz)+ Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon grafiği	129
Şekil 4.160. Yaban eriğinin metanol yaprak özütünün (1 mg/mL'lik özüt) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği	130
Şekil 4.161. Yaban eriğinin metanol meyve özütünün (1 mg/mL'lik özüt) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği	130
Şekil 4.162. Yaban eriğinin metanol çiçek özütünün (1 mg/mL'lik özüt) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	131
Şekil 4.163. Yaban eriğinin DCM yaprak özütünün (1 mg/mL'lik özüt) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	131
Şekil 4.164. Yaban eriğinin DCM meyve özütünün (1 mg/mL'lik özüt) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	132
Şekil 4.165. Yaban eriğinin etilasetat meyve özütünün (1 mg/mL'lik özüt) penisilinaz	

enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği	132
Şekil 4.166. Yaban eriğinin etilasetat çiçek özütünün (1 mg/mL’lik özüt) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği	133
Şekil 4.167. Yaban eriğinin etilasetat yaprak özütünün (1 mg/mL’lik özüt) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği	133
Şekil 4.168. Yaban eriğinin maserasyon meyve özütünün (1 mg/mL’lik özüt) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği	134
Şekil 4.169. Yaban eriğinin hekzan çiçek özütünün (1 mg/mL’lik özüt) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	134
Şekil 4.170. DMSO+ Substrat+ Enzim (Penisilinaz)+ Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon grafiği (10 mg/mL’lik örneklerden alınan 10 µL ‘lik hacimler için).....	135
Şekil 4.171. Yaban eriğinin metanol yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	135
Şekil 4.172. Yaban eriğinin metanol meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL ‘lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	136
Şekil 4.173. Yaban eriğinin metanol çiçek özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	136
Şekil 4.174. Yaban eriğinin DCM yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	137
Şekil 4.175. Yaban eriğinin DCM meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	137
Şekil 4.176. Yaban eriğinin etilasetat meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL ‘lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	138
Şekil 4.177. Yaban eriğinin etilasetat çiçek özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL ‘lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	138
Şekil 4.178. Yaban eriğinin etilasetat yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	139
Şekil 4.179. Yaban eriğinin maserasyon meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	139
Şekil 4.180. Yaban eriğinin hekzan çiçek özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	140
Şekil 4.181. DMSO+ Substrat+ Enzim (Penisilinaz)+ Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon grafiği (10 mg/mL’lik örneklerden alınan 50 µL’lik hacimler için).....	140

Şekil 4.182. Yaban eriğinin metanol yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 50 µL’ lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	141
Şekil 4.183. Yaban eriğinin metanol meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 50 µL’ lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	141
Şekil 4.184. Yaban eriğinin metanol çiçek özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 50 µL’ lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	142
Şekil 4.185. Yaban eriğinin DCM yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 50 µL’ lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	142
Şekil 4.186. Yaban eriğinin DCM meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 50 µL’ lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	143
Şekil 4.187. Yaban eriğinin etilasetat meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 50 µL’ lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	143
Şekil 4.188. Yaban eriğinin etilasetat çiçek özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 50 µL’ lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	144
Şekil 4.189. Yaban eriğinin etilasetat yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 50 µL’ lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	144
Şekil 4.190. Yaban eriğinin maserasyon meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 50 µL’ lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	145
Şekil 4.191. Yaban eriğinin hekzan çiçek özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 50 µL’ lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	145
Şekil 4.192. Tirozinaz enzimi için yüksek % inhibisyon değerlerine sahip meyve, çiçek ve yaprak özütleri	147
Şekil 4.193. Penisilinaz enzimi için yüksek % inhibisyon değerlerine sahip meyve, çiçek ve yaprak özütleri.....	147
Şekil 4.194. α-kemotripsin enzimi için yüksek % inhibisyon değerlerine sahip meyve, çiçek ve yaprak özütleri.....	148
Şekil 4.195. Tripsin enzimi için yüksek % inhibisyon değerlerine sahip meyve, çiçek ve yaprak özütleri	148
Şekil 4.196. Papain enzimi için yüksek % inhibisyon değerlerine sahip meyve, çiçek ve yaprak özütleri	149
Şekil 4.197. Metanol çiçek özütünün Hep3B, HT-29 ve HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin grafik üzerinde gösterilmesi.....	150
Şekil 4.198. Metanol yaprak özütünün Hep3B, HT-29 ve HUVEC hücreleri üzerine	

stitotoksik etkilerinin grafik üzerinde gösterilmesi.....	151
Şekil 4.199. Metanol meyve özütünün Hep3B, HT-29 ve HUVEC hücreleri üzerine	
stitotoksik etkilerinin grafik üzerinde gösterilmesi.....	152
Şekil 4.200. Etilasetat yaprak özütünün Hep3B, HT-29 ve HUVEC hücreleri üzerine	
stitotoksik etkilerinin grafik üzerinde gösterilmesi.....	153
Şekil 4.201. Etilasetat meyve özütünün Hep3B, HT-29 ve HUVEC hücreleri üzerine	
stitotoksik etkilerinin grafik üzerinde gösterilmesi.....	154
Şekil 4.202. Etilasetat çiçek özütünün Hep3B, HT-29 ve HUVEC hücreleri üzerine	
stitotoksik etkilerinin grafik üzerinde gösterilmesi.....	155
Şekil 4.203. Maserasyon meyve özütünün Hep3B, HT-29 ve HUVEC hücreleri üzerine	
stitotoksik etkilerinin grafik üzerinde gösterilmesi.....	156
Şekil 4.204. Hekzan meyve özütünün Hep3B, HT-29 ve HUVEC hücreleri üzerine	
stitotoksik etkilerinin grafik üzerinde gösterilmesi.....	157
Şekil 4.205. Hekzan yaprak özütünün Hep3B, HT-29 ve HUVEC hücreleri üzerine	
stitotoksik etkilerinin grafik üzerinde gösterilmesi.....	158
Şekil 4.206. Hekzan çiçek özütünün Hep3B, HT-29 ve HUVEC hücreleri üzerine	
stitotoksik etkilerinin grafik üzerinde gösterilmesi.....	159
Şekil 4.207. DCM meyve özütünün Hep3B, HT-29 ve HUVEC hücreleri üzerine	
stitotoksik etkilerinin grafik üzerinde gösterilmesi.....	160
Şekil 4.208. DCM çiçek özütünün Hep3B, HT-29 ve HUVEC hücreleri üzerine stitotoksik	
etkilerinin grafik üzerinde gösterilmesi.....	161
Şekil 4.209. DCM yaprak özütünün Hep3B, HT-29 ve HUVEC hücreleri üzerine	
stitotoksik etkilerinin grafik üzerinde gösterilmesi.....	162

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 1.1. Proteazlar ve özel kromojenik substratları	11
Çizelge 3.1. 100 g bitki örnekleri için deriştirilmiş özüt miktarları	25
Çizelge 3.2. Miktar çoğaltma için yapılan 100 g bitki örnekleri için deriştirilmiş özüt miktarları	26
Çizelge 4.1. 517 nm’de özütlerin % inhibisyon değerleri ve % 50 inhibisyona yakın olan derişimin (1 mg/mL) soğurma değerleri	40
Çizelge 4.2. Özütlerin DPPH analizi sonucunda elde edilen IC ₅₀ değerleri.....	41
Çizelge 4.3. Ferulik asit standardına ait derişim ve soğurma değerleri	47
Çizelge 4.4. Ferulik asit cinsinden Fenolik bileşen miktarları	48
Çizelge 4.5. Özütlerin CUPRAC analizi sonucunda elde edilen QREFC (Kersetin eşdeğeri flavonoid derişimi) değerleri	52
Çizelge 4.6. Trolox standardı için % inhibisyon değerleri ve çalışma grafiğı.....	52
Çizelge 4.7. MeOH meyve özütü (1 mg/mL)’nden eklenen miktar ve % inhibisyonları	55
Çizelge 4.8. DCM yaprak özütü (1 mg/mL)’nden eklenen miktar ve % inhibisyonları	55
Çizelge 4.9. Etilasetat çiçek özütü (1 mg/mL)’nden eklenen miktar ve % inhibisyonları ..	56
Çizelge 4.10. Etilasetat meyve özütü (1 mg/mL)’nden eklenen miktar ve % inhibisyonları.....	57
Çizelge 4.11. DCM meyve özütü (1 mg/mL)’nden eklenen miktar ve % inhibisyonları ...	57
Çizelge 4.12. MeOH çiçek özütü (1 mg/mL)’nden eklenen miktar ve % inhibisyonları....	58
Çizelge 4.13. MeOH yaprak özütü (1 mg/mL)’nden eklenen miktar ve % inhibisyonları..	59
Çizelge 4.14. Hekzan çiçek özütü (1 mg/mL)’nden eklenen miktar ve % inhibisyonları...	59
Çizelge 4.15. Etilasetat yaprak özütü (1 mg/mL)’nden eklenen miktar ve % inhibisyonları	60
Çizelge 4.16. DCM çiçek özütü (1 mg/mL)’nden eklenen miktar ve % inhibisyonları.....	61
Çizelge 4.17. Hekzan yaprak özütü (1 mg/mL)’nden eklenen miktar ve % inhibisyonları	61
Çizelge 4.18. Hekzan meyve özütü (1 mg/mL)’nden eklenen miktar ve % inhibisyonları	62
Çizelge 4.19. Maserasyon meyve özütü (1 mg/mL)’nden eklenen miktar ve % inhibisyonları	63
Çizelge 4.20. Özütlerin TEAC değerleri	64
Çizelge 4.21. Özütlerin FRAP değerleri (mM FeSO ₄ /g özüt)	66
Çizelge 4.22. α-Kimotripsin enzimi % inhibisyon değerleri	79

Çizelge 4.23. Tripsin enzimi % inhibisyon değerleri	79
Çizelge 4.24. Papain enzimi % inhibisyon değerleri	92
Çizelge 4.25. Tirozinaz enzimi % inhibisyon değerleri	110
Çizelge 4.26. Penisilinaz enzimi % inhibisyon değerleri	128
Çizelge 4.27. Farklı enzimler için maximum % inhibisyona sahip özütler ve inhibisyon değerleri.....	145
Çizelge 4.28. Hekzan ham özütleri için uygulanan GC-MS analizi ile tanımlanan bileşikler	162



BÖLÜM 1

GİRİŞ

Tüm dünyada olduğu gibi bitkiler Türkiye’de de tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Türkiye’de 12.000’e yakın farklı doğal bitki türü bulunmaktadır ve bunların % 30’u endemiktir. Dünya Sağlık Örgütü’nün (WHO) araştırmalarına göre tedavi amaçlı kullanılan tıbbi bitkilerin sayısı 20.000 civarındadır. Son yıllarda sentetik kökenli maddelerin yan etkilerinin daha fazla olması, özellikle antimikrobiyal olarak kullanılan sentetik ilaçlara karşı organizmaların direnç oluşturmaları gibi sebepler tıbbi bitkilerin önemini daha da arttırmıştır.

Tıbbi bitkiler birçok hastalıkların tedavilerinde kullanılmaları yönüyle önemli bir yere sahiptirler. Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de tedavi amaçlı kullanılan tıbbi ve aromatik bitkiler antimikrobiyal, antiviral, antioksidan, antitümör gibi bir çok biyolojik aktiviteye sahiptirler (Davis 1972; Baytop, 1999)

1.1. Antioksidanlar (Yükseltgen Önleyiciler)

Metabolizmanın işleyişi sırasında doğal bir işlem olan yükseltgenme sonucunda, organizmada çeşitli hasarlar yaratan ve kanser, kalp vb. hayati öneme sahip bazı kronik hastalıkların başlatıcısı olan serbest radikaller oluşur. Böylece bunlarla mücadele eden antioksidan bileşiklere olan ilgi artmış ve bu konudaki çalışmaları daha çok gıdaların ve farmasötik preparatların antioksidan aktivitelerinin belirlenmesine yöneltmiştir (Gökpinar ve ark., 2006).

Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek veya mevcut radikalleri süpürerek hücrenin zarar görmesini engelleyen ve yapısında genellikle fenolik işlevsel gruplar taşıyan moleküllerdir (Kahkönen ve ark., 1999; Nagai ve ark., 2005). Vücutta kalkan görevi yapan bu kimyasal bileşiklerin özelliği, kendi elektronlarını vererek serbest radikalleri etkisizleştirmeleri ve bu sırada serbest radikal haline gelmemeleridir. (Prior ve Cao, 1999). Antioksidanların insan sağlığındaki yerini belirleyen en önemli etmenler, onların çözünürlükleri, kimyasal yapıları, doğal kaynaklardan elde edilebilmeleri ve yapı/aktivite ilişkileridir (Kaur ve Kapoor, 2001).

Serbest radikal molekülleri çok kararsız, diğer moleküllerle çok hızlı reaksiyona giren, eşlenmemiş elektron içeren ve kimyasal olarak kararlı hale gelebilmek için elektron almaya gereksinim duyan moleküllerdir. Moleküle saldırdığında onun elektronunu alarak

yükseltir ve bu yeni molekülün kendisi bir serbest radikal haline dönüşür. Böylece bir zincir reaksiyonlar dizisi canlı hücrenin zarar görmesi ile sonuçlanır. Serbest radikallerin yarattığı en büyük zarar hücre zarları üzerinedir. Bunlar hücre zarlarından elektron çalarak eşlenir, hücre zarı ve sonuç olarak hücre yapısını bozar (Gökpınar ve ark., 2006).

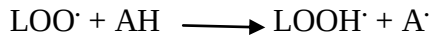
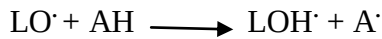
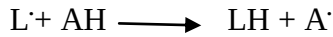
Serbest radikaller; yüksek oranda tahrip edici özelliğe sahip, vücudumuz oksijen kullanırken meydana gelen atık maddelerdir. Vücutta gerçekleşen her işlemde ve her aşamada doğal olarak oluşmaktadırlar. Vücuttaki doğal antioksidan savunma sistemleriyle bu kararsız elektron yüklü kimyasallar normalde büyük oranda yok edilmekte yada uzaklaştırılmaktadır. Antioksidan gıdalar yeterli oranda alınmadığında, antioksidan savunma sistemi yeterince iyi çalışmadığında veya antioksidan özellikli desteklerden faydalanılmadığında serbest radikaller hücrelere zarar vererek birçok önemli rahatsızlığın başlangıcına zemin oluşturur. Serbest radikallerin çok hızlı bir biçimde hücre bileşenleriyle reaksiyona girmesi sonucunda *hidrojen peroksit*, *süperoksit* ve *singlet oksijen* gibi moleküller oluşur. Bunların tümü de potansiyel olarak canlı hücrede hasar oluşturabilecek özelliktedirler.

Antioksidanlarca zengin olan besinler Oksijen Radikali Soğurma Kapasitesi (ORAC) yüksek olan besinler olarak tanımlanır. Meyve ve sebzelerin içerdikleri antioksidan kapasiteleri, sahip oldukları antioksidan aktif bileşiklerin miktarına ve türüne bağlı olarak farklılıklar gösterirler.

Antioksidanlar;

- Birincil veya zincir kırma antioksidanlar
 - İkincil veya koruyucu antioksidanlar
- olmak üzere iki gruba ayrılırlar.

Zincir kırma mekanizmaları:



Radikal başlatıcı (lipid radikal ile $L^{\cdot}$) veya radikal yayılma (alkoksil veya peroksil radikalleri ile $LO^{\cdot}$, $LOO^{\cdot}$) adımları (AH) antioksidanı tarafından söndürülmüştür. Diğer bir yol ikincil antioksidanlar, oksidasyon oranını geciktirirler (Örneğin: Metal şelatlaştırıcılar).

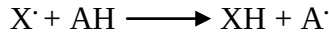
Antioksidan kapasite deneyleri

1-) Hidrojen atom aktarımı (HAA, ing. HAT) reaksiyon esaslı denemeler,

2-) Tek elektron aktarımı (TEA, ing. SET) reaksiyon esaslı denemeler.

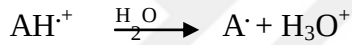
TEA esaslı denemeler, reaksiyon bitiş noktasının bir indikatörü gibi oksidan ile bir redoks reaksiyonu içermektedir. Birçok HAA esaslı denemeler reaksiyon kinetiğini gözlemeye dayanmakta ve kinetik eğrilerden miktar bulunmaktadır. HAA esaslı yöntemler genellikle sentetik bir serbest radikal üretici, yükseltgenmiş molekül ve bir antioksidan ile meydana getirilir.

HAA esaslı yöntemlerde;



Antioksidan reaktivite veya kapasite ölçümleri yarışma kinetiklerine bağlıdır. HAA reaksiyonları çözücü ve pH'tan bağımsızdır, saniye-dakika arasında tamamlanır ve genellikle hızlıdır.. HAA yönteminde metal içeren indirgen maddelerin var oluşu karışmalara neden olur ve yanlışlıkla yüksek görünür reaktiviteye örnek oluşturur.

TEA esaslı yöntemler, herhangi bir bileşiği indirgemek için potansiyel antioksidanın bir elektron aktarma yeteneği aşağıdaki denklemle gösterilir.



TEA ve HAA mekanizmaları genellikle bütün örneklerde beraber oluşur. TEA reaksiyonları genellikle yavaş gerçekleşir ve reaksiyonun tamamlanması uzun zaman alır.

$AH^{\cdot+}$ yeterli kararlılığa sahip olduğunda, yöntemler içindeki ikincil reaksiyonlar yeterli girişimi verebilir ve *in vivo* toksisite veya mutajenisiteye yol açabilir (Apak ve ark. 2007).

1.2. Doğal Antioksidan Bileşikler

Tıbbi bitkiler birçok hastalıkların tedavilerinde kullanılmaları yönüyle önemli bir yere sahiptirler. Tıbbi ve aromatik bitkilerin antimikrobiyal, antiviral, antioksidan, antitümör gibi etkilerinin olduğu bilinmektedir. Droglarda farmakolojik etkilere sahip bileşikler bulunmaktadır (Davis, 1972; Baytop, 1999).

Meyve ve sebzelerdeki doğal antioksidanlar farklı kimyasal yapılarına ve insan vücudundaki farklı etkilerine göre sınıflandırılırlar. Fitokimyasallar polifenoller, terpenoidler, N- bileşikleri, siyanojenik glikozitler, fitosteroller gibi biyoaktif bileşik sınıflarını içerirler (Balsano ve Alisi, 2009).

1.3. Bitkisel Biyoaktif Bileşikler

Bitkilerin kendilerine özgü renk, koku ve tatlarının oluşmasında biyolojik aktif maddeler olan fitokimyasallar etkili bir role sahiptir. Bazı fitokimyasalların etkileri aşağıda belirtilmiştir (Dundar, 2001).

İzoflavonlar: Oksidatif hasara uğramış, yaşlanmış ve sağlığını yitirmiş hücrelerin büyümesini durdurabildikleri, ayrıca prostaglandinin katabolik enzim aktivitesini inhibe ettikleri bildirilmektedir.

Elajik asit: Antioksidan savunma sistem aktivitesini artırmak suretiyle sigara dumanı, kirliliği hava ve organik maddelerin yanık ürünlerinin hücre DNA'sına olan zararlı etkilerini önleyebilmektedir.

Fitatlar (Fitik asit): Demir absorpsiyonunu kontrol ederek oksidatif stres oluşumunu önleyebilen fitokimyasallardır.

İndoller: Hipoglisemi ve hipotansiyon oluşturma ile östrojenin yararlı alt gruplarının yapımı ve salınması, merkezi sinir sistemi aktivitelerinin düzeltilmesi gibi fizyolojik işlevlerde rol alan antioksidan karakterli bir fitokimyasaldır.

Flavonoidler: Fosfatidil inozitol yoluyla inflamasyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerin aktivitelerini; hormonların fizyolojik etkileri dışında da zararlı etkiler oluşturmalarını inhibe ettikleri, hücrelerde mikrozomal lipid peroksidasyonu reaksiyonlarını önleyebildikleri belirlenmiştir. Flavonoidlerin gerektiğinde hücresel proliferasyonu kontrol altına alabildikleri ve kalpte uyarı ileti sisteminin regülasyonunda olumlu etkilerinin görüldüğü belirtilmiştir.

Terpenler: Terpenlerde flavonlar gibi hücrelerde mikrozomal lipid peroksidasyonunu ve dokularda yoğunlaşmış oksidatif stresi önlemektedir.

Fenolik asit: Enzimsel aktivitelerin kontrolü nitrozaminlerin oluşmasının engellenmesi ve kan lipid düzeyindeki dengesizliklerinin giderilmesinde aktif rolü vardır.

Kumarinler: Genetik bilgilerin depolandığı hücre DNA'larının yapısına zararlı etkileri olan maddelerin tesirlerinin önlenmesinde yer aldıkları kabul edilmektedir.

Polifenoller: Polifenoller, izoflavonlar ve flavonoidler antioksidan etkinliği güçlü mikro besinlerdendir. Bu özellikleri nedeniyle sayılan fitokimyasallar oksidasyonun rutin tahribatına karşı LDL oksidasyonunu inhibe ederek hücreleri korurlar. Aynı zamanda polifenoller olmak üzere, izoflavonlar ve flavonoidler gibi bazı fitokimyasal maddelerin steroidlerin metabolik profilini ve p450 substratlarının değişime uğratici etki gösterdikleri belirlenmiştir.

İzotiyosiyanatlar: En yaygın olarak bilinen etkisi DNA hasarını önlemedeki başarısıdır. Bu işlevi enzimsel aktiviteleri yönlendirerek gerçekleştirdikleri belirtilmektedir.

Karotenoidler: Bir antioksidan gibi davranarak oksidatif kaynaklı hasarı önemli düzeyde azalttığı, kanser önleyici etkinliği ve DNA sarmal kırılmalarını önlediği kabul edilmektedir.

Prunus spinosa L. meyvesinde yapılan çalışmalarda antosiyanin, tannin, fenolik bileşen, organik asit, karotenoid, flavanoid, vitamin, yağ asitleri, aminoasit, uçucu bileşen, doğal boyar madde, pektin ve şeker gibi kimyasal bileşenler, çiçek ve yapraklarında ise flavonoller, flavonoidler, fenolik asitler, terpen ve steroller gibi kimyasal bileşenler olduğu bilinmektedir.

1.4. Antioksidan Yapı Etkinlik Tayin Yöntemleri

Antioksidan kapasite tayin yöntemleri, kullanılan kimyasal reaksiyon açısından temel olarak iki sınıfta toplanabilir:

- Hidrojen Atomu Aktarımı reaksiyonuna dayananlar (HAA; İng. HAT)
- Tek Elektron Aktarımı reaksiyonlarına dayananlar (TEA; İng. SET)

HAA ve TEA esaslı yöntemler bir örneğin koruyucu antioksidan kapasitesi yerine radikal (veya oksidan) süpürücü kapasitesini ölçmeye dönüktür (Lopez-Alarcon ve Lissi, 2005). HAT temelli yöntemlerin birçoğu azobileşiklerin bozulması ile oluşan peroksil radikalleri için antioksidan ve substratın rekabetine dayanan yarışmacı reaksiyonları kullanmaktadır (Albayrak ve ark., 2010).

- Oksijen radikal soğurma kapasitesi (ORAC)
- İndüklenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein otooksidasyonu
- Toplam radikal yakalama antioksidan kapasitesi (TRAP)
- Krosin ağartma deneyleri olarak sıralanabilir.

TEA esaslı analiz yöntemleri (Albayrak ve ark., 2010)

- Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile toplam fenolik madde analizi
- DPPH kullanarak “toplam antioksidan kapasite” ölçüm yöntemi
- Cu (II) kompleksini yükseltgen olarak kullanılan “toplam antioksidan kapasite” ölçüm yöntemi
- Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) ölçümü
- Ferrik iyonu indirgeme antioksidan gücü (FRAP) ölçümü

- CUPRAC (Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi olarak sıralanabilir.

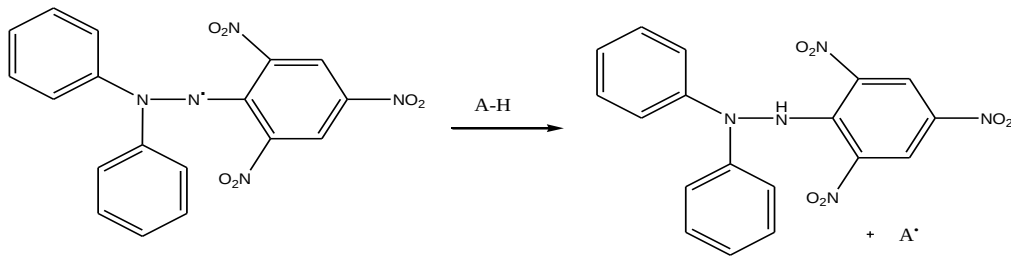
Tez kapsamında kullanılan antioksidan aktivite tayin yöntemlerinin ilkeleri aşağıda açıklanmıştır.

1.4.1. DPPH Radikal Süpürücü Antioksidan Kapasite Yöntemi

Bu yöntem ilk kez Blois (1958) tarafından 1,1-difenil-2-pikril hidrazil (DPPH) radikallerinin antioksidan moleküllerin tayininde kullanılabileceğinin önerilmesi ile ortaya çıkmıştır (Brand-Williams ve ark., 1995).

Yöntem DPPH içeren çözelti ile hidrojen atomu verme eğilimi olan bir molekülün (antioksidan) çözeltisinin karıştırılması sonucu DPPH radikalının indirgenmesine ve çözeltinin başlangıçta mor olan renginin kaybolmasına dayanır. Mor renkli çözeltinin 520 nm civarındaki soğurmanın azalması ölçülerek reaksiyon izlenir. Antioksidan etki başlangıçtaki DPPH derişiminin % 50'sinin azalması için harcanan antioksidan miktarını ifade eden IC₅₀ (aktif derişim) değeri ile verilir (Brand-Williams ve ark., 1995).

DPPH yöntemi teknik olarak basit olmasına karşın bazı olumsuzlukları bulunmaktadır. Birçok antioksidan bileşik lipid peroksidasyonunda rol oynayan peroksil radikalleri ile çok hızlı tepkime vermektedir, ancak DPPH ile yavaş tepkime vermektedir. Sonuç olarak antioksidan kapasitenin doğru bir şekilde ifade edilemediği düşünülebilir. Ayrıca, DPPH ile antioksidan bileşik arasındaki reaksiyon kinetiğinin DPPH derişimi ile her zaman doğrusallık göstermediği de bilinmektedir (Molyneux, 2004; Huang ve Prior, 2005).



Şekil 1.1. DPPH radikalının antioksidan ile etkileşim reaksiyonu (Albayrak ve ark., 2010)

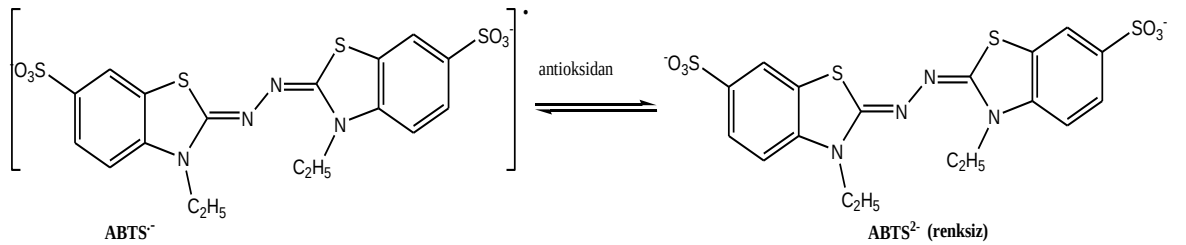
1.4.2. Folin-Ciocalteu Yöntemi ile Toplam Fenolik Bileşen Tayini

Bu yöntem Singleton ve Rossi (1965) tarafından önerilmiş ve daha sonra farklı uygulayıcılar tarafından geliştirilmiştir. Folin-Ciocalteu reaktifi (Folin Fenol Reaktifi veya Folin-Denis reaktifi) fosfomolibdat ve fosfotungstat karışımı bir reaktif olup fenolik ve

polifenolik antioksidanların kolorimetrik tayininde kullanılır (Singleton ve Rossi, 1965). Yöntem denenen materyalin reaktifin yükseltgenmesini önlemesi için gerekli miktarını ölçer (Vinson ve ark., 2005). Ancak bu reaktifin sadece toplam fenolik bileşik miktarını ölçmediği ve örnek içinde mevcut tüm indirgen maddelerle de reaksiyon vereceği bilinmektedir. Bu nedenle reaktifin sadece örnekteki fenolik bileşen düzeyini değil örneğin toplam indirgeme kapasitesini de ölçtüğü konusunda tartışma vardır (Ikawa ve ark., 2003). Buna rağmen Folin-Ciocalteu reaktifi ile toplam fenolik bileşen miktarı tayini hemen hemen tüm antioksidan çalışmalarında örnekteki fenolik içeriğinin tayininde kullanılan standart bir yöntemdir.

1.4.3. Troloks Eşiti Antioksidan Kapasite (TEAC) Yöntemi

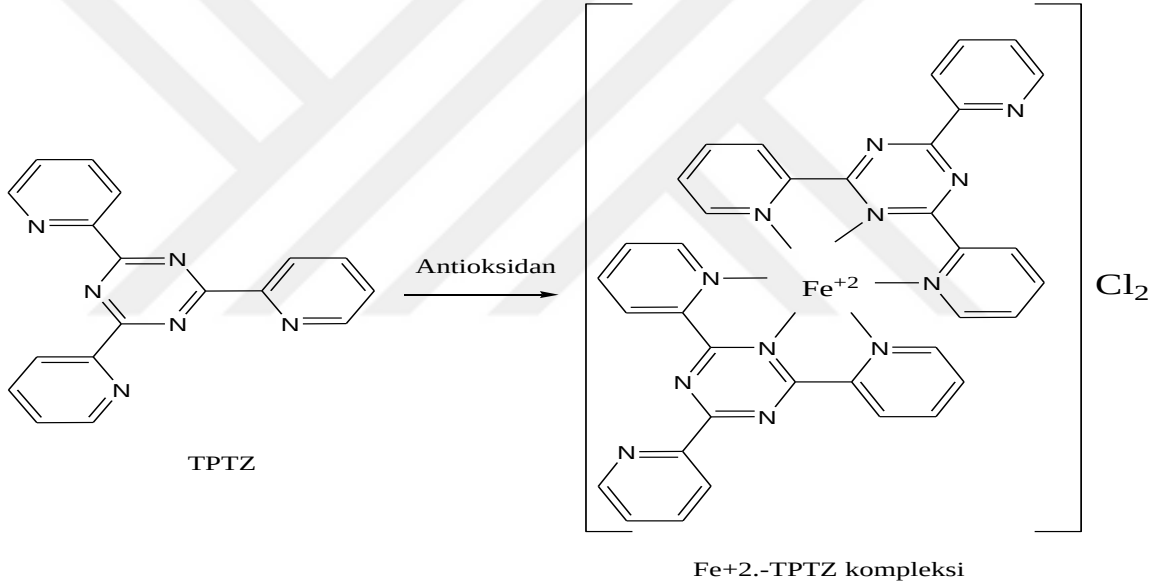
Troloks [(±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit], E vitamininin suda çözünür eşdeğeridir (Re ve ark., 1999). Troloks canlı sistemlerde doğal olarak bulunan bir bileşik olmamakla birlikte pek çok antioksidan kapasite tayin yönteminde standart olarak kullanılır. Genellikle belli bir derişim aralığında Troloks antioksidan olarak kullanılarak bir çalışma grafiği hazırlanır ve bilinmeyen antioksidanın etkisi bu grafikten Troloks eşdeğeri olarak okunur. TEAC yöntemi ilk olarak Miller ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (Miller ve ark., 1993). Kromojenik bir redoks radikali olan ABTS [2,2'-azinobis(3- etilbenzotiyazolin 6-sülfonat)] aynı zamanda kararlı bir radikaldir. Hem suda hem organik çözücülerde çözüldüğünden hem hidrofilik hem de hidrofobik antioksidan aktivite tayininde kullanılabilir. TEAC yöntemi, antioksidan varlığında çözeltideki ABTS radikalinin söğürmesindeki azalmanın ölçülmesine dayanmaktadır (Rice-Evans ve Miller, 1984; Pellegrini ve ark., 1999).



Şekil 1.2. ABTS^{•-} radikalinin antioksidan ile reaksiyonu (Huang ve ark., 2005)

1.4.4 Demir İyon İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Yöntemi

Düşük pH'ta Fe^{+3} 'ün Fe^{+2} 'ye indirgenmesi renkli ferröz-tripiridiltriazin [$\text{Fe}(\text{II})$ ($\text{TPTZ})_2\text{Cl}_3$ ($\text{TPTZ} = 2,4,6\text{-tripiridil-s-triazin}$) = Herein] kompleksinin oluşmasına neden olur. Oluşan bu demir tuzu oksidan olarak kullanılır (Benzie ve Strain, 1996). Fe^{+3} tuzunun (yaklaşık 0,70 V) redoks potansiyeli $\text{ABTS}^{\cdot-}$ 'nin ki ile (0,68 V) birbirine yakındır. Bu nedenle FRAP ve TEAC yöntemleri arasında çok fazla fark yoktur. Yalnız TEAC nötr pH'ta FRAP ise asidik koşullarda (pH = 3,6) gerçekleştirilir (Ames ve ark., 1993; Pellegrini ve ark., 2003; Huang ve ark., 2005; MacDonald-Wicks ve ark., 2006; Price ve ark., 2006; Somogyi ve ark., 2007). Asidik ortamda, antioksidanların varlığında ferritriptiridiltriazin kompleksi Fe^{+2} 'ye indirgenir ve oluşan renkli çözelti 595 nm'de soğurmada artışa neden olur.

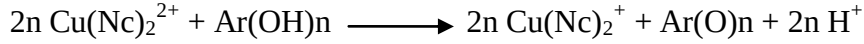


Şekil 1.3. Antioksidanın TPTZ ile reaksiyonu (Benzie ve Strain, 1996)

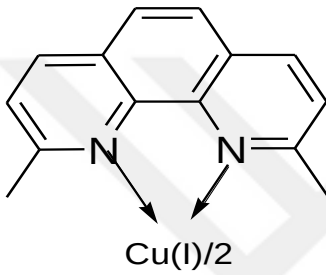
1.4.5 (CUPRAC) Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite Yöntemi

Bu yöntem kuprik iyonu indirgeme potansiyeli ölçülmek suretiyle bitki özütlerinde ve insan serumunda (Apak ve ark., 2004; 2005) toplam antioksidan kapasite tayini için geliştirilmiş ve bakır iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity: CUPRAC) olarak isimlendirilmiştir. Bu yöntemle hem hidrofilik hem lipofilik toplam antioksidan kapasitesi kolaylıkla tayin edilebilmektedir. Yeni geliştirilen CUPRAC yönteminde kullanılan renkli yükseltgeme aracı olan

bis(neokuproin)-Cu(II) klorür ile antioksidan polifenol arasındaki reaksiyon aşağıdaki gibi gerçekleşmektedir:



Bu reaksiyonda, Ar(OH)_n hidroksi grubu içeren antioksidan polifenolden oluşan kinonu ifade etmektedir. Tepkime sonunda iki proton açığa çıkmakta ve Ar(OH)_n yapısında bulunan hidroksil grubu kinon şekline dönüşmektedir. Cu(II)-Nc ise 450 nm’de en yüksek soğurma veren şiddetli renk oluşumuyla birlikte Cu(I)-Nc kelatına dönüşmektedir. Bu reaksiyonda, n-OH grubu içeren antioksidan karakterli bileşikler, 2n-e vericisi olarak hareket etmektedir (Apak ve ark., 2004).



Şekil 1.4. CUPRAC yönteminin kromoforunu oluşturan Bis(2,9-dimetil-1,10-fenantrolin)bakır(I) kelatı’nın ‘Cu(I)-Nc’ kimyasal yapısı (Apak ve ark., 2004)

1.5. Enzim Aktivite/İnhibisyon Çalışmaları

In vitro reseptör ve enzim denemeleri kullanılarak yeni terapötiklerin tanımlanmasındaki başarı, büyük ölçüde uygun tasarım ve tarama denemelerinin geçerliliğine bağlıdır. Birleştirilen kimya yöntemlerinin gelişi de biyoaktivite denemesi için yüksek verimli görüntüleme yöntemleri ile önemini arttırmıştır. Kimyasal tepkime ürünlerinin tanınması için geliştirilen yüksek yayılma hızlı enzim çalışmaları ile önemli olan değişkenler aşağıda listelenmiştir (Atta-ur-Rahman ve ark., 2005).

- | | |
|---|-----------------------|
| ▪ Enzim kaynağı | - pH denemesi |
| ▪ Enzimin son deneme derişi | - Sıcaklık denemesi |
| ▪ Substratın ve son deneme derişiminin seçimi | - İnhibitör biçimleri |
| ▪ Kofaktör ihtiyacı ve son deneme derişimleri | - DMSO uygunluğu |
| ▪ Deneme bitiminin seçimi | - Özüt uygunluğu |

1.5.1. DMSO Uyumu

Genellikle, doğal ürün özütleri temel denemelerde araştırma içinde DMSO içinde tutulur. En uygun bir araştırma denemesi, deneme inkübasyon boyunca özüt içindeki muhtemel ikincil metabolitlerin çözünür durumda kalmasını sağlamak için DMSO'nun yüksek derişimleri yapılabilmelidir. Hücre-esaslı denemeler genellikle % 0,5 DMSO'dan fazla deneme derişimlerinde iyi sonuç vermez (Atta-ur-Rahman ve ark., 2005).

1.5.2. Enzim Çalışmaları

Enzim aktivitesinin bazı maddeler veya etmenler tarafından azaltılması /durdurulmasına *enzim inhibisyonu* denir. Substrat enzimin aktif bölgesine bağlanır ve enzim-substrat kompleksi oluşur, substrat bir veya daha fazla ürüne dönüşür ve enzimin boş kalan aktif bölgesine bir diğer substrat bağlanır. İnhibitörler ise substrat yerine enzime bağlanır ve enzimin bir tepkimeyi katalizlemesini engelleyerek aktivitesini azaltır. Enzim inhibitörü olarak kullanılan ilaçların çoğu bu şekilde bir patojeni öldürür veya metabolik bir dengesizliği düzelterek tedavi eder. İnhibitörler tersinir veya tersinmez (enzimin yapısı kimyasal olarak değişir) olarak bağlanabilir. İlaç olarak kullanılan enzim inhibitörleri seçiciliklerine (diğer proteinlere bağlanmama) ve etkinliklerine (enzimi etkisizleştirmek için gerekli miktar) göre değerlendirilir. İnhibitörün seçiciliği ve etkinliği ne kadar yüksek ise yan etkileri ve toksisitesi o kadar düşüktür. (Atta-ur-Rahman ve ark., 2005; Cömert F., 2012)

Temel enzim sınıfları ve bu sınıflardan seçilen bazı enzimler;

- Liyazlar
- Ligazlar
- Transferazlar
- İzomerazlar
- Oksidoredüktazlar (Lipoksijenaz, **Tirozinaz**)
- Hidrolazlar (Asetilkolinesteraz, **β-laktamaz**, **Proteaz**, Hyaluronidaz)

Tez çalışması kapsamında etken özütlere uygulanan enzim-aktivite/inhibisyonu çalışmalarının ilkeleri aşağıda açıklanmıştır.

1.5.2.1. Proteaz İnhibisyonu Çalışmaları

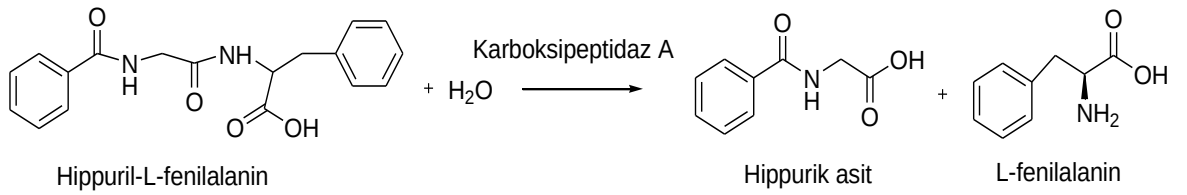
Proteazlar veya proteinazlar, protein olgunlaşması, sindirim, kan koagülasyonu, kan basıncı kontrolü gibi hücrelerin normal fizyolojik işlevlerinde temel rol oynayan proteolitik

enzimlerdir. Kanser, akciğer doku ve organları arasında hava kalması, beslenme yetersizliğine bağlı olarak kasların gelişmemesi, kireçlenme, pankreasın durdurabilecek derecede tahriş olması gibi hastalıkların bir çeşidi proteazların aşırı aktivitesi ile ilişkilendirilir. Proteaz veya proteinazların bahsi geçen hastalıklardaki rolü nedeniyle, bu enzimlere karşı doğal kaynaklardan inhibitörler gibi terapötik ajanların bulunması büyük önem taşımaktadır.

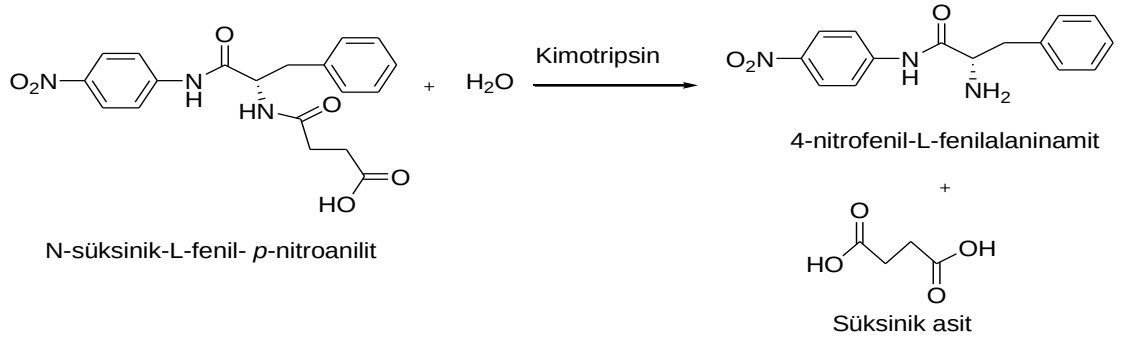
Proteazların kromojenik substratları *p*-nitroanilin gibi bir kromofor'a ardı ardına bağlı özel bir amino asite sahiptir. Substratı üzerindeki özel bir proteazın etkisi, spektrofotometrede soğurmada artış olarak ölçülen kromoforu serbest bırakmasına neden olur. Böylece kromofor miktarı, enzimin aktivitesine orantılı olarak serbest kalır (Atta-ur-Rahman ve ark., 2005).

Çizelge 1.1. Proteazlar ve özel kromojenik substratları (Atta-ur-Rahman ve ark., 2005)

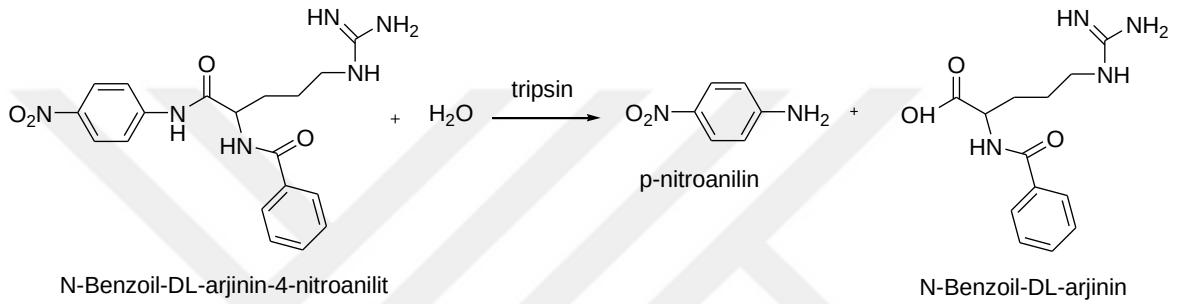
Proteaz	Substrat
α - Kimotripsin	N-Süksinil-fenil- <i>p</i> -nitroanilit
Tripsin	Bz-DL-Arjinin- <i>p</i> -nitroanilit
Elastaz	Süksinil-(Ala) ³ - <i>p</i> -nitroanilit
Karboksiptidaz A	Hippuril-L-fenilalanin
Papain	Bz-DL-Arjinin- <i>p</i> -nitroanilit



Şekil 1.5. Karboksiptidaz A ve substratı Hippuril-L-fenilalanin arasındaki tepkime (Atta-ur-Rahman ve ark., 2005)



Şekil 1.6. Kimotripsin ve substratı N-süksinik-fenil-*p*-nitroanilit arasındaki tepkime (Atta-ur-Rahman ve ark., 2005)



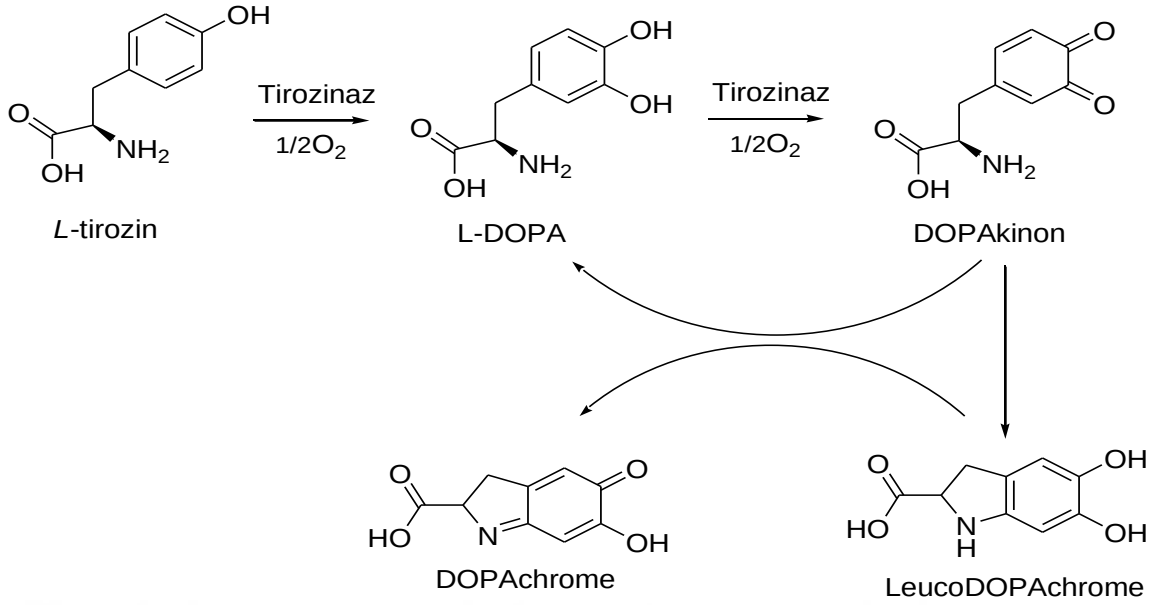
Şekil 1.7. Tripsin ve substratı N-benzoil-D-L-arjinin-4-nitroanilit arasındaki tepkime (Atta-ur-Rahman ve ark., 2005)

Enzim aktivitesinde oluşacak inhibisyonun yüzdelik ifadesi eşitlik aşağıda verilen formülle hesaplanabilir: (Atta-ur-Rahman ve ark., 2005).

$$(\%) \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{Soğurma(kontrol)} - \text{Soğurma (deneme)}}{\text{Soğurma (kontrol)}} \times 100 \quad (1.1)$$

1.5.2.2. Tirozinaz İnhibisyonu Çalışması

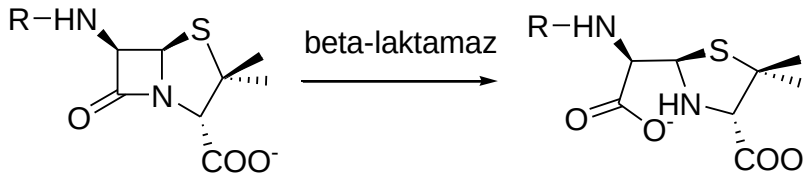
Tirozinaz enzimi, melanosomlardaki melanositlerde gerçekleşen *L*-tirozin ve *L*-DOPA (dihidroksifenilalanin)'dan deri melanin pigmenti sentezinden sorumludur. Bu enzimin, tirozinin hidroksilasyonu, *L*-DOPA'nın dopakinon'a yükseltgenmesi ve devamında melanin otopolimerizasyonu dahil olmak üzere birçok işlevi vardır.



Şekil 1.8. *L*-tirozinin *L*-DOPA'ya dönüşüm mekanizması (Satooka ve Kubo, 2011)

1.5.2.3. β -Laktamaz İnhibisyonu Çalışması

β -Laktamaz enzimi bakteriler tarafından β -laktam antibiyotiklerine karşı direnç mekanizmasının bir parçası olarak üretilir. Enzim β -laktam yapısında bulunan amid bağının hidrolizini verimli şekilde gerçekleştirir. β -Laktamaz inhibitörleri klinik açıdan önemlidir. Güvenli profilleri ve kanıtlanmış klinik etkinlik sayesinde bu antibiyotikler çok sayıda bulaşıcı hastalıkların tedavisinde yoğun kullanılmaktadır.



Şekil 1.9. β -laktamaz enziminin amit bağını hidroliz tepkimesi (Atta-ur-Rahman ve ark., 2005)

1.6. Sitotoksite Denemesi

Sitotoksite, tıbbi olarak aktif bir maddenin hücreler üzerindeki zararlı etkilerini saptamaya yönelik olarak oluşturulmuş, hızlı, duyarlı bir yöntemdir ve tüm medikal denemeler için gereklidir. Sitotoksite MTT yöntemi, Trypan blue (TB) yöntemi, Sulforhodamine B (SRB) yöntemi, WST yöntemi ve klonojenik yöntem ile ölçülebilir. MTT yöntemiyle bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle nicel olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam hücrelerde mitokondrinin MTT

boyasının tetrazolyum halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır (McGahon ve ark., 1995; Scinto ve Daffner, 2000). Bu reaksiyon dirençsiz bir mitokondriyal enzim olan süksinat dehidrojenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Tetrazolyum halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Tetrazolyumun formazana dönüşüm ürünleri NADP ve NADPH'ın indirgenmesi ile oluşur. NADH dehidrojenazlar birincil olarak solunum dönüşümünün enerji üretim reaksiyonunda (glikoliz, TCA çevrimi ve oksidatif fosforilasyon) görev alırlar. NADPH dehidrojenaz ise birincil olarak biyosentezdeki indirgeyici reaksiyonda görev alır. MTT yönteminde canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrojenazı, tetrazolyum halkasını böler ve MTT sitotoksosite yöntemi hücrenin, tetrazolyum tuzunu formazan ürününe çevirebilme yeteneğini ölçmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri işlevi bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri işlevi bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. Bu yöntem, hücrelerin MTT boyasıyla inkübasyonu, çöken reaksiyon ürününün çözünür hale getirilmesi ve reaksiyon ürününün kolorimetrik olarak ölçümü basamaklarından oluşmaktadır (Yamada ve Azuma, 1977).

BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. *Prunus spinosa* L.

Yaban Eriği (Blackthorn): Latince adı *Prunus spinosa* L. olan, Rosaceae (Gülgiller) ailesine mensup yaban eriği ağacı, çok yıllık, boyu 3-7 metreye ulaşabilen, güneşi seven ama soğuğa dayanıklı bir ağaçtır. 4-5 cm boyunda ve 2-3 cm genişliğindeki eliptik yapraklar sivri yada küt uçlu olabilir. Üst yüzü mat yeşil ve tüysüz, alt yüzü ise gri-yeşil ve tüylüdür. Genç sürgünleri tüylü ve kırmızımsı kahverengidir. Dalları, sık ve dikenlidir. 5 taç yapraklı ve 1-1,5 cm çapındaki çiçekleri, beyaz renkli olup sık gruplar halinde bulunurlar. Çanak yaprakları yumurtamsı üç köşelidir. Çiçeklenme zamanı, bahar başı (Mart-Nisan)dır. 5-12 mm boyundaki meyveleri küçük, etli, eriksi, yuvarlak ve dumanlı morumsu-siyah renklidir (Davis, 1972; Baytop, 1999).

Yaban eriği güvem eriği veya çakal eriği isimleriyle de bilinir. *Prunus spinosa* L.'nin meyve özütünün bazı tıbbi özelliklerinin olması doğal ilaçlarda kullanılmasını sağlamıştır. Dünya genelinde *P. spinosa* L. üzerine yapılan çalışmalar sürekli artmakta ve çeşitlenmektedir. Meyveleri oldukça ekşi olup yenilebilirse de daha çok reçel, şarap yapımında ve bazı içkilerde tatlandırıcı olarak kullanılır. Yaban eriğinin çiçeği, nefes yolları hastalıkları, idrar söktürücü, peklik, şişkinlik, mide krampları, bağırsak hastalıkları, ödem, böbrek ve mesane rahatsızlıklarında kullanılmaktadır. Yaban eriğinin meyvelerinden elde edilen şurup, dişeti ve bademcik iltihaplanmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Dünyada Batı, Orta ve Kuzey Anadolu ile Avrupa, Kuzeybatı Afrika, Kafkasya ve Kuzeybatı İran'da yetişmektedir. Türkiye'de ise Adana, Amasya, Ankara, Balıkesir, Çanakkale, Edirne, Kars, Kocaeli, Kütahya, Manisa, Sinop, Sivas, Zonguldak'ta bulunmaktadır (Davis, 1972; Baytop, 1999).



a)



b)



c)



d)



e)

Şekil 2.1. Yaban eriği meyve, çiçek ve yapraklarına ait görseller; a, b, c, d, e

Fraternale ve arkadaşları yaban eriğine rengini veren antosiyaninlerin enzim-inhibisyonu, antibakteriyel, kardiyovasküler koruma ve antioksidan etki yaratmada doğrudan etkili olup olmadığını araştırmışlardır. Yaban eriği'nin antioksidan aktivitesi, BHT, Trolox ve Askorbik asit için DPPH Lipoksijenaz ve ORAC testleri yapılarak sonuçlar karşılaştırılmış ve yaban eriği'nin polifenol ve antosiyanin içeriklerine bakılmıştır (Fraternale ve ark., 2009a).

Olszewska ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmalarda *Prunus spinosa L.*'nin meyve ve çiçeklerinde bulunan flavonoid, terpen ve stereoller GC-MS metodu ile belirlenerek bileşen analizi ayrıntılı bir şekilde yapılmıştır (Wolbis ve ark., 2001; Olszewska ve Wolbis 2002a; Olszewska ve Wolbis, 2002b; Olszewska ve Wolbis, 2002c).

Mariana ve arkadaşları tarafından böğürtlen, dut, yaban mersini ve yaban eriği gibi bazı küçük taneli meyvelerin özütlerinin antioksidan aktiviteleri, toplam fenolik bileşen

içerikleri ve antosiyaninlerin HPLC-DAD ve MS tanımlanması yapılmıştır. Meyve özütlerinin içerisindeki antosiyaninlerin sayısı böğürtlende 4 bileşik, dutta 3 bileşik, yaban mersininde 18 bileşik ve yaban eriğinde 5 bileşik olarak belirlenmiştir (Mariana ve ark., 2011).

Egea ve arkadaşları tarafından 6 yenilebilir yabani meyvenin toplam antioksidan aktivitesi, antioksidan bileşikleri, toplam fenolik bileşenleri, karotenoidler TEAC yöntemiyle analiz edilmiştir. Meyvelerin antioksidan aktivitesi ile sentetik antioksidantlar karşılaştırılmıştır (Egea ve ark., 2010)

Kumarasamy ve arkadaşları tarafından karşılaştırmalı çalışmalar ile *Prunus padus* ve *Prunus spinosa L.*'nin biyolojik aktiviteleri incelenmiştir. Meyve özütlerinin hekzan, diklorometan ve metanolde antibakteriyel ve serbest radikal temizleyici aktivitelerine bakılmıştır (Kumarasamy ve ark., 2004).

Tamburic'in yaptığı çalışmada yabani erik meyve özütlerinin polimer tuzak etkilerinin kozmetik etkinliği incelenmiştir (Tamburic, 2006).

Barros ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada çilek ağacı, yaban eriği ve güldeki antioksidan özelliği olan besinlerin ve fitokimyasalların ayrıntılı olarak tanımlanması incelenmiştir. Meyveler içerisindeki çok kullanışlı biyoaktif fenolik bileşikler, vitaminler (askorbik asit ve tokoferoller) ve karotenoidler gibi fitokimyasallar belirlenmiştir (Barros ve ark., 2010).

Jablonska-Rys ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada yenilebilir yabani meyvelerin içerisindeki askorbik asit ve fenolik bileşiklerin derişimlerine ve antioksidan kapasitesine bakılmıştır. Antioksidan aktivitesine FRAP ve ABTS yöntemleri ile, fenolik bileşik ve askorbik asit içeriğine ise Folin-Ciocalteau ve Tilmans' yöntemleri ile bakılmıştır (Jablonska-Rys ve ark., 2009).

Olszewska ve Wolbis yaptıkları çalışmada yabani eriğin çiçek ve yapraklarındaki fenolik asit miktarına iki boyutlu kağıt kromatografisi (2D-PC) ve ters faz (RP-HPLC) kromatografik yöntemler ile bakılmıştır (Olszewska ve Wolbis, 2000)

Gonzalez ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda yaban eriği meyvesindeki A proantosiyaniidinler türü ve A dimerik proantosiyaniidin türleri belirlenmiştir (Gonzalez ve ark., 1991; Gonzalez ve ark., 1992; Gonzalez ve ark., 1994).

Sakar ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda yaban eriği çiçeklerindeki flavonoid glikosidler ayrılmış ve flavonoidlerin antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır (Sakar ve ark., 1992; Sakar ve Kolodziej, 1993).

Horhammer ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada yaban eriği meyvesinin yapraklarındaki flavondipentositler tespit edilerek ayrılmıştır (Horhammer ve ark., 2010).

Fraternale ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada hücresiz sistemlerde DPPH ve ORAC denemeleri ile taze yaban eriği meyve suyunun antioksidan aktivitesine bakılmıştır (Fraternale ve ark., 2009b).

Makarov, V. A.'nın yaptığı çalışmada yaban eriği flavonoidleri kimyasal ve farmakolojik olarak incelenmiştir. Flavonoidlerin spazm önleyici ve antitonic olaylardaki etkisi incelenmiştir. Ayrıca Makarov ve ark. yaban eriği içerisindeki flavonoidleri, flavonoller, flavonoid diglikozitleri incelemiştir (Makarov, 1968; Makarov ve Shinkarenko, 1968; Makarov ve ark., 1969; Makarov, 1970; Makarov ve Litvinenko, 1970; Makarov, 1972).

Tamas, yaban eriğinin çiçeklerindeki flavonların incelenmesi üzerine bir çalışma yapmıştır (Tamas, 1985).

Crespo Irizar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada yaban eriği meyvesinin bileşenleri incelenmiştir. Yaban eriğinden bilinen flavonoidler, kamferol 3,7-diramnosit, kamferol, kersetin, kateşin ve epikateşin ile birlikte 5-hidroksi-6-metoksi-7-O- β -D-glukosil kumarin gibi yeni bileşikler ve A proantosiyonidin dimer, ent-epikateşin-(2 α →7,4 α →8)-kateşin türü elde edilmiştir (Crespo ve ark., 1992).

Turker ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada Kazdağı'ndaki yenilebilir taze yabani meyvelerdeki serbest radikal temizleyici aktiviteye ve meyvelerdeki toplam fenolik bileşen derişimine bakılmıştır (Turker ve ark., 2012).

Olszewska ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada yaban eriğinin yaprak ve çiçeklerinde bulunan flavonoidlerin derişimine spektrofotometrik ve RP-HPLC yöntemleri ile bakılmıştır (Olszewska ve ark., 2001).

Gyan ve Woodell tarafından yaban eriğine ait şeker, aminoasit ve potasyum içeriği ve nektar üretimi ile ilgili araştırma yapılmıştır (Gyan ve Woodell, 1987).

Humpf ve Schreier yaptıkları çalışmada yaban eriği yapraklarından iki farklı glukopiranosid bileşikleri elde etmişlerdir (Humpf ve Schreier, 1992).

Özcan ve Bayçu tarafından yapılan çalışmada yaban eriği içerisindeki aminoasit ve yağ asitleri GC/ MS analizi ile belirlenmiştir (Özcan ve Bayçu, 2008).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOT

3.1. Materyaller

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Çözücü olarak; hekzan, diklorometan, etilasetat, aseton, metanol, DMSO Merck ve Sigma-Aldrich firmalarından temin edilmiştir.

➤ Biyoaktivite çalışmaları için;

- α -Kimotripsin (Sigma, C4129-1G), N-Sük-Fenil-p-nitroanililit (Sigma, S2628-1G), Tripsin (bovin pankreasından) (Sigma, T8003-1G), N α -Benzoil-DL-arjinin-4-nitroanilit hidroklorür (Sigma, B4875-500MG), Papain (papaya lateksinden) (Sigma, P3375-25G), Tirozinaz (Mantar tirozinaz) (Sigma, T3824-500 KU), L-Tirozin (Sigma, T3754-100G), penisilinaz (Sigma, P0389), nitrocefin (Calbiochem-484400), karboksipeptidaz A (Sigma-C9268) Enzim ve substratları Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

- Tris (hidroksimetil)aminometan (Trizma base, en düşük %99,9 titrasyon, Sigma), Sodyum klorür (Sigma, S7853), MgCl₂.6H₂O (Sigma, 2670), LiCl (Sigma-213233-100g), potasyum fosfat monobazık, KH₂PO₄ (Sigma, 04243), sodyum fosfat dibazık dihidrat, Na₂HPO₄.2H₂O (Sigma, 04272) enzim çalışmalarında kullanılan tampon çözeltiler için gerekli kimyasallar Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

- MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür, M5655) Sigma firmasından temin edilmiştir.

➤ Antioksidan çalışmaları için;

- Trolox (Sigma Aldrich, 238813-5g), DPPH (Sigma Aldrich D9132-1), (Kersetin, Sigma Aldrich, Q4951-10g), (Neokuprein, Sigma aldrich, N1501-1g), Ce(IV)Sülfat, (Sigma, 359009-25g), TPTZ, (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazin) (Sigma, 93285-1g), Ferulik asit (%99), (Sigma, 12,870-8-5g), Folin-Ciocalteu's Fenol Reaktifi (2N), (Sigma, F9252-100 mL), Silikajel 60 (0,063-0,200 mm), (70-230 mesh), (Merck, 107734-1000), TLC silikajel 60 F₂₅₄, DC Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, 105554.0001) Merck ve Sigma firmalarından temin edilmiştir.

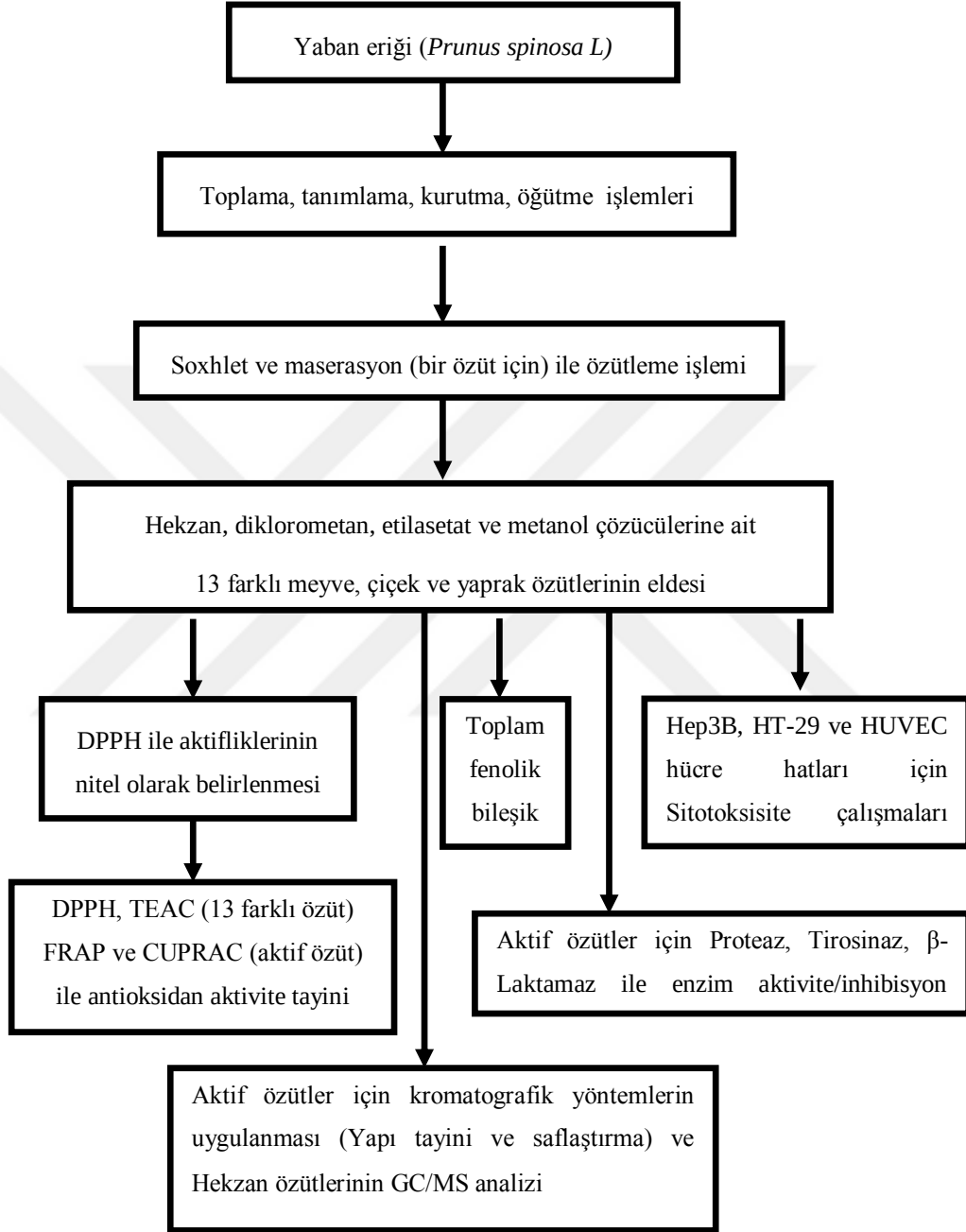
3.1.2. Kullanılan Cihazlar

- Dörtlü birleşik sistem Soxhlet düzeneği, TERMAL
- UV kabini, CAMAG
- Döner Buharlaştırı, IKA RV 10 kontrol
- CombiFlash Rf Teledyne ISCO
- Acculab, ALC-210.4, Germany, Hassas Terazî
- Arzum AR178 Ironmix Çubuk Blender seti 550 W
- Perkin Elmer lamda 25 UV spektrofotometre
- Mikroplate okuyucu



3.2. Deneysel Yöntemler

Çalışılan tez kapsamında *Prunus spinosa L.* (Yaban eriği) bitkisi için yapılan çalışmalar şematik olarak aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 3.1. *Prunus spinosa L.* (Yaban eriği) bitkisi için yapılan çalışmaların şematik gösterimi

3.2.1. Bitkinin Toplanması ve Tanımlanması

Tez projesi kapsamında Yaban eriği (*Prunus spinosa* L.) bitkisi (meyve, yaprak ve çiçek kısımları) ikincil metabolitlerinin derişiminin en fazla olduğu Nisan ve Ağustos aylarında Çanakkale/Ayvacak (Panayır yeri) bölgesinden toplanmış ve bitkinin (meyve, yaprak ve çiçek kısımları) herbaryum tanımlaması Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Botanik Bahçesi ve Herbaryum Uygulama-Araştırma Merkezi'nde yapılmıştır.

Yaban eriği bitkisinin herbaryum tanımlaması

Teşhis Edilen Örnek Bilgileri:

Taxon adı: *Prunus spinosa* L. subsp. *dasyphylla* (Schur) Domin

Teşhis eden: Dr. Ersin Karabacak

Lokaliye: B1 Çanakkale Ayvacık (Panayır yeri), Rakım: 270 m

Bitkinin Toplanma zamanı: Yaprak-çiçek: Nisan 2013, Meyve: Ağustos 2013

Toplayan Kişiler: Aysel Yıldırım ve Şengül Aydın

Tanımlama: Dikenli çalılar ya da küçük ağaççıklar; tomurcuklar pubescent tüylü. Yapraklar 5x 2,5 cm boyutlarında, ters yumurtamsı şekilli, kenarları ormalı-testere dişli, üst kısmında tüysüzce, geri kalan kısımları kesintisiz pubescent tüylü. Yaprak sapları 1 cm. ye kadar. Çiçekler beyaz, 1 adet, yapraklanmadan önce açılır, 1,5 cm çapında; çiçek sapları 1 cm'ye kadar, pubescent tüylü; çanak yapraklar kirpiksi kenarlı, tüysüzden pubescent tüylüye. Eriksi meyveler dik, küremsi, 10-15 mm çapında, olgunlukta mavimsi-siyah renkte, taze iken yeşil renkte, ekşi tatta; çekirdek çok sert, yüzeyi yumuşaktan dikenliye kadar. Çiçeklenme: Mart-Nisan. Meyve olgunlaşması: Eylül. Çalılıklar ve orman altlarında yayılış gösterir. Deniz seviyesinden 1700 m'ye kadar dağılır.

3.2.2. Bitkinin Kurutulması, Öğütülmesi ve Depolanması

Yaban eriği bitkisinin toplanma aşamasından sonra bitkinin meyve, yaprak ve çiçek kısımlarının içindeki bileşenlerin korunması ve mikroorganizma üremesini engellemek için kurutma aşamasına geçilmiştir. Bunun için bitkinin yaprak, meyve ve çiçek kısımları pamuklu bir kumaşın üzerine dökülerek güneş görmeyen, havadar ve tozlanma oluşmayacak bir ortamda kurutmak için bırakılmıştır. Bitkinin yaprak ve çiçekleri yaklaşık bir hafta sürede, meyvesi ise yaklaşık bir ay sürede kurutulmuştur. Bitkinin kurutulmuş meyve, yaprak ve çiçek kısımları blender yardımıyla öğütülmüş ve analizler için buzdolabında saklanmıştır.

3.2.3. Bitki Örneklerine Özütleme İşleminin Uygulanması

Bitkinin toz haline getirilmiş meyve, yaprak ve çiçek kısımları; öncelikle lipofilik ve küçük molekül ağırlıklı bileşiklerin (klorofil vb) ayrılması amacıyla apolardan polara doğru giden çeşitli çözücülerle (hekzan, diklorometan, etil asetat, metanol) özütlemeye tabi tutulmuştur.

Çalışmalar kapsamında antioksidan yöntemlerinin birbirleri arasında kıyaslanması, enzim aktivite, sitotoksisite gibi biyoaktivite denemelerinin hangi aktif özütte daha belirgin olduğunun saptanması amacıyla bitkinin meyve, yaprak ve çiçek kısımları hekzan, diklorometan, etil asetat, metanol gibi çözücüler ile muamele edilerek farklı özütler elde edilmiştir.

Bunun için öğütülmüş bitkinin meyve, yaprak ve çiçek kısımlarından 100 g tartılarak süzgeç kağıdından hazırlanan kartuşlara 2 seferde konulup Soxhlet düzeneğine yerleştirilmiştir. Ardından 500 mL'lik cam balona 350 mL hekzan eklenip mantolu ısıtıcı yardımıyla bu maddenin buharlaşması sağlanmıştır. Soxhlet düzeneğinde buharlaşan çözücü geri soğutucuda yoğunlaşarak kartuş içerisinde bulunan numuneyle etkileşip cam balona geri döner ve bu işlem çözücünün alabileceği tüm maddeler çözünüp çözelti rengi berraklaşınca kadar devam eder. Elde edilen özütler düşük basınç altında döner buharlaştırıcıda çözücüsü uzaklaştırılınca kadar (1 mL) deriştirilmiş ve özütlerin miktarları belirlenmiştir. Kurutulan kartuşlar sırasıyla diklorometan, etil asetat, metanol çözücülerini kullanarak özütleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen özütler antioksidan çalışmalarında kullanılmıştır.

Yaban eriği meyvesi için metanol çözücüsü kullanılarak maserasyon yöntemi ile özütleme işlemi yapılmıştır. 500 mL'lik balona 66 g öğütülmüş meyve tartılıp üzerine 300 mL metanol ilave edilerek oda sıcaklığında 1 gün karıştırılarak yapılmıştır. Karışım süzülerek kalıntı için aynı işlemler bir kez daha tekrarlanmış ve süzüntüler birleştirilerek deriştirilmiştir.

Çizelge 3.1. 100 g bitki örnekleri için deriştirilmiş özüt miktarları

<i>Prunus spinosa</i> L.	Kullanılan çözücü	Miktar
Yaprak	Hekzan	7,10 g
Çiçek	Hekzan	4,00 g
Meyve	Hekzan	2,88 g
Yaprak	Diklorometan	1,68 g
Çiçek	Diklorometan	2,54 g
Meyve	Diklorometan	0,27 g
Yaprak	Etil asetat	6,30 g
Çiçek	Etil asetat	4,58 g
Meyve	Etil asetat	1,83 g
Yaprak	Metanol	17,31 g
Çiçek	Metanol	9,93 g
Meyve	Metanol	21,90 g
Meyve (Maserasyon)	Metanol	17,40 g

Ayrıca çalışmalar kapsamında özütlerin bileşim analizleri için GC-MS ve LC-MS/MS analizlerinin yapılması, tekrarlanacak olan DPPH ve TEAC yöntemleri ile antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, bitki özütlerinin sitotoksik etkilerinin HUVEC hücre hattı ve HT-29 (İnsan kolon kanseri hücre hattı) hücreleri üzerinde belirlenmesinde MTT denemesinin uygulanması, Kromatoğrafik yöntemlerle (İTK, KK, CombiFlash, HPLC vb.) etken bileşenlerin ayrılıp saflaştırılarak yapılarının spektroskopik yöntemlerle (UV-vis, FTIR, NMR, Kütle, X-ışını vb.) saptanması amacıyla bitki örneklerine uygulanan özütleme işlemleri tekrarlanarak ham özüt miktarı çoğaltılmıştır. Bunun için bitkinin meyve, yaprak ve çiçek kısımları apolardan polara doğru giden hekzan, diklorometan, etil asetat, metanol gibi çözücülerle özütlemeye tabi tutulmuştur. Öğütölmüş bitkinin meyve, yaprak ve çiçek kısımlarından 100 g tartılarak süzgeç kağıdından hazırlanan kartuşlara 2 seferde konulup Soxhlet düzeneğine yerleştirilmiştir. Ardından 500 mL'lik cam balona 350 mL hekzan eklenip mantolu ısıtıcı yardımıyla bu maddenin buharlaşması sağlanmıştır. Kurutulan kartuşlar sırasıyla diklorometan, etil asetat, metanol çözücülerini kullanarak özütleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen özütler düşük basınç altında döner buharlaştırıcıda çözücüsü uzaklaştırılınca kadar (1 mL) deriştirilmiş ve özütlerin miktarları belirlenmiştir.

Çizelge 3.2. Miktar çoğaltma için yapılan 100 g bitki örnekleri için değiştirilmiş özüt miktarları

Prunus spinosa L.	Kullanılan çözücü	Miktar
Yaprak	Hekzan	4,48 g
Çiçek	Hekzan	3,73 g
Meyve	Hekzan	2,50 g
Yaprak	Diklorometan	1,75 g
Çiçek	Diklorometan	1,81 g
Meyve	Diklorometan	0,40 g
Yaprak	Etil asetat	7,25 g
Çiçek	Etil asetat	6,54 g
Meyve	Etil asetat	0,92 g
Yaprak	Metanol	15,50 g
Çiçek	Metanol	22,49 g
Meyve	Metanol	19,12 g

3.2.4. Bitki Özütlerinin Aktifliğinin DPPH (1,1-difenil-2-pikril hidrazil) ile Nitel Olarak Belirlenmesi

Bitki özütlerinin aktifliğinin DPPH (1,1-difenil-2-pikril hidrazil) ile nitel olarak belirlenmesi için çözeltilere ince tabaka kromatografisi uygulanmıştır. Yaban eriği bitkisinin (yaprak, çiçek ve meyve kısımları) hekzan, diklorometan, etil asetat ve metanol özütlerinin her birinden belirli bir miktar tartılarak, 10 mL metanolde çözülmüş ve bu çözeltiler için farklı çözücü sistemleri hazırlanarak nitel olarak aktiflik İTK uygulayarak belirlenmiştir.

Hekzan ve etil asetat özütleri için;

Hekzan: EtOAc (4:1), (3:1), (2:1) çözücü karışımı,

Diklorometan ve metanol özütleri için;

DKM: MeOH (4:1), (3:1), (2:1) çözücü karışımı hazırlanmıştır.

Çözeltilere İnce Tabaka Kromatografisi uygulandıktan sonra DPPH (8 mg/100 mL)'ın metanoldeki çözeltisinden İTK plakalarının üzerine püskürtülmüş ve 254/366 nm çift dalga boylu UV lambası ile lekeler gözlenmiştir. 1-2 dakika içinde % 8'lik DPPH çözeltisinin püskürtülmesiyle mor renkli olan lekeler aktif özütlerde **parlak sarı renkli** hale gelmiştir. 254 ve 365 nm'de hekzan, etilasetat, metanol ve diklorometan çözücülerinin

meyve, çiçek ve yaprak özütleri için DPPH ile İTK incelemesi sonucunda bileşen aktifliği nitel olarak belirlenmiştir.

3.2.5. DPPH (1,1-Difenil 2-pikril hidrazil) Serbest Radikal Süpürücü Aktivite Tayini

Örneklerin antioksidan kapasitesini belirlemek için yöntem Shoeb ve ark. (2007) 'nın belirttiği tekniğe göre gerçekleştirilmiştir. Yaban eriği bitkisinin meyve, yaprak ve çiçek kısımlarının hekzan, diklorometan, etil asetat ve metanol özütlerinin serbest radikal süpürücü etkileri DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) serbest radikali üzerinden tayin edilmiştir. UV spektrofotometresinde DPPH analizi ile aktivlik belirlemek için hekzan, diklorometan, etil asetat ve metanol çözücülerinin meyve, yaprak ve çiçek özütlerinden metanol çözücüsü ile çözelti derişimi **10 mg/mL** olacak şekilde depo çözeltiler hazırlanarak bu depo çözeltilerden seri seyreltmeler yapılmıştır.

Yapılan seri seyreltmeler

Meyve, çiçek ve yaprak özütlerinin hazırlanan depo çözeltilerinden (10 mg/mL) 1 mL alınmış, üzerine 9 mL MeOH ilave edilerek 1 mg/mL' lik çözelti elde edilmiştir. Daha sonra 1 mg/mL'lik çözeltiden 1 mL alınmış, üzerine 9 mL MeOH ilave edilerek 0,1 mg/mL'lik çözelti elde edilmiştir. 0,1 mg/mL'lik çözeltiden 1 mL alınmış ve 9 mL MeOH ilavesi ile 0,01 mg/mL'lik çözelti elde edilmiştir. 0,01 mg/mL' lik çözeltiden 1 mL alınmış ve 9 mL MeOH ilavesi ile 0,001 mg/mL derişimde çözelti elde edilmiştir. Böylece farklı çözücülerdeki her bir meyve, yaprak ve çiçek özütü için depo çözeltilerden (10 mg/mL) seyrelterek, 1 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,01 mg/mL ve 0,001 mg/mL'lik çözeltiler elde edilmiştir.

DPPH çözeltisi: 0,008 g DPPH tartılmış ve metanol ile çözülerek 100 mL' lik hacme tamamlanmıştır.

DPPH ile radikal süpürücü aktivite tayini için metanol çözücüsünde depo çözeltileri (10 mg/mL) hazırlanan özütlerin seri seyreltmeleri (1-0,001 mg/mL) yapıldıktan sonra 1-0,001 mg/mL'lik her bir çözeltiden 500 µL alınarak, 500 µL DPPH çözeltisinden eklenmiştir. 30 dakika sonra 517 nm'de okunan soğurmaların ortalamaları alınarak % inhibisyonları hesaplanmıştır. % 50 inhibisyona yakın olan aktif derişim **1 mg/mL** olarak belirlenmiştir. Meyve, çiçek ve yaprak özütlerinin 1 mg/mL'lik örneklerinden 200-1800 µL'lik hacimlerde alınarak üzerine toplam hacim 2 mL olacak şekilde DPPH çözeltisinden ilave edilerek 30 dakika bekletilip 517 nm'de soğurmaları okunmuş ve örneklerin 1

mg/mL’de aktif derişim aralığı belirlenmiştir. Soğurmaların ortalamaları alınarak % inhibisyon değeri hesaplanıp derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. Bu grafikten özütlerin IC₅₀ değeri belirlenmiştir. Soğurmadaki düşüş ne kadar büyükse antioksidan aktivite o kadar yüksek olmaktadır. DPPH standardı ile hazırlanmış olan aşağıdaki denklem kullanılarak reaksiyon ortamındaki DPPH derişimi (g/L) hesaplanmıştır. Standart olarak kersetin kullanılmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = ((A_{\text{kör}} - A_{\text{numune}}) / A_{\text{kör}}) \times 100 \quad (3.1)$$

Meyve, çiçek ve yaprak özütlerine ait 1 mg/mL’lik örneklerinin toplam hacim 2 mL olacak şekilde DPPH çözeltisi ilave edilmesi ile oluşan hacimleri;

1 mg/mL numune (µL)	200	400	600	800	1000	1200	1400	1600	1800
DPPH çözeltisi	1800	1600	1400	1200	1000	800	600	400	200

$V_{\text{toplam}} = 2 \text{ mL}$ çözelti

Kör deneme için; 1 mL DPPH çözeltisi + 1 mL Metanol

Hazırlanan depo çözeltilerin (10 mg/mL) ardından yapılan seri seyreltmeler (1 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,01 mg/mL, 0,001 mg/mL) için çalışılan DPPH yöntemiyle meyve, yaprak ve çiçek özütlerinin % 50 inhibisyona yakın olan aktif derişimi 1 mg/mL olarak belirlenmiştir. Özütlerin 1 mg/mL’lik çözeltilerinin soğurma değeri yardımıyla, özütlerin inhibisyonları ve IC₅₀ değeri hesaplanarak antioksidan aktifliği belirlenmiştir. Aktif derişim olarak belirlenen 1 mg/mL’lik meyve, yaprak ve çiçek özütleri için toplam fenolik bileşen içerikleri belirlenmiştir.

Toplam fenolik bileşen miktar tayini, DPPH ve TEAC antioksidan kapasite ölçüm yöntemleri için özütlerin 1 mg/mL’lik örnekleri kullanılmış, CUPRAC ve FRAP antioksidan kapasite ölçüm yöntemleri için özütlerin 1 mg/mL’lik örnekleri kullanıldığında sonuçlar doğru orantılı olmadığından, özütlerin 0,1 mg/mL’lik örnekleri kullanılarak antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir.

3.2.6. Toplam Fenolik Bileşik Miktarı Tayini

Örneklerin antioksidan kapasitesini belirlemek için yöntem Velioğlu ve ark., (1998) belirttiği tekniğe göre gerçekleştirilmiştir. Toplam fenolik bileşik miktarı tayininde, taze olarak depo çözeltisi hazırlanan özütlerden seri seyreltme ile elde edilen 1 mg/mL

derişimdeki çözeltilerden deneme tüplerine 100 µL örnek ve 10 kat saf su ile seyreltilmiş 0,75 mL F-C reaktifinden eklenerek karıştırılmıştır. Karışım oda sıcaklığında 5 dakika bekletilip, 0,75 mL % 6'lık Na₂CO₃ çözeltisi eklenerek karıştırılmıştır. 90 dakika bekletildikten sonra 725 nm'de soğurmalar okunmuştur. Standart olarak ferulik asit (0,001–0,005 mg/mL) kullanılmıştır. Sonuçlar ferulik asit standart eğrisi üzerinden mg ferulik asit/100 g özüt şeklinde ifade edilmiştir.

3.2.7. CUPRAC (Bakır (II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi

Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite tayini Güçlü ve ark., (2006) tarafından kullanılan yöntemle göre yapılmıştır. Bakır(II) indirgeyici antioksidan kapasite tayini için 10⁻² M CuCl₂, 7,5x10⁻³ M Neocuproin çözeltileri ve NH₄Ac tamponundan (pH=7) 1'er mL alınmıştır. Üzerine son hacim 4,1 mL olacak şekilde, x mL özüt çözeltisi ve (1-x) mL su ilave edilip iyice çalkalanmıştır.

Cu(II) klorür çözeltisi; 10⁻² M olacak şekilde bakır(II)klorürden (CuCl₂) 0,066 g tartım alınıp su ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

Amonyum asetat (NH₄Ac) tamponu; 1 M (pH=7) olacak şekilde amonyum klorürden 5,25 g ve sodyum asetat 8,2 g tartım alınıp su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Neocuproin çözeltisi; 7,5x10⁻³ M olacak şekilde (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin)'den 0,078 g tartım alınıp % 96'lık etil alkolle 50 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

Kullanılan hacimler aşağıda verilen eşitlikte görülmektedir.

1 mL Cu(II) + 1 mL Nc + 1 mL NH₄Ac + x mL örnek + (1,1-x) mL su

V_{toplam}: 4,1 mL

0,1 mg/mL' lik örneklerin bulunduğu tüpler oda sıcaklığında ağzı kapalı olarak 30 dakika bekletilip 450 nm'de soğurmalar okunmuştur. Standart olarak kersetin kullanılmıştır. Sonuçlar kersetin eşdeğeri flavonoid derişimi (QERFC) olarak hesaplanmıştır. 0,1 mg/mL örnek çözeltilerden tüplere sırasıyla;

100 µL, 200 µL, 300 µL, 400 µL, 500 µL, 600 µL, 700 µL, 800 µL, 900 µL

ve (1,1-x) hacim olacak şekilde üzerine sırasıyla su;

1 mL, 900 µL, 800 µL, 700 µL, 600 µL, 500 µL, 400 µL, 300 µL, 200 µL

eklenmiştir.

3.2.8. TEAC Testi (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Aktivite)

Örneklerin antioksidan kapasitesini belirlemek için yöntem Re ve ark., (1999)'nın belirttiği tekniğe göre gerçekleştirilmiştir. Örneklerin TEAC yöntemiyle antioksidan kapasitesini belirlemek için analize başlamadan önce 2,5 mM Troloks depo çözeltisinden 10 mL'lik 4 ölçü balonuna sırasıyla 2, 4, 6 ve 8 mL alınıp balonlar PBS çözeltisi ile 10 mL'lik hacme tamamlanarak, standart çözeltiler elde edilmiştir. Bu standart çözeltilerden 10 µL alınarak 1 mL radikal çözeltisine eklendiğinde sırasıyla 5, 10, 15 ve 20 µM derişimlerde troloks olması sağlanmıştır. Elde edilen troloks standartları ABTS.+ radikal çözeltisine eklenip 6 dakika sonra soğurma okunmuştur. Soğurma değerlerinden ortalama inhibisyon değerleri hesaplanarak troloks derişimine karşı grafiğe işlenmiştir. Elde edilen verilere doğrusal regresyon analizi uygulanmak suretiyle, troloks standart eğrisine ve bu eğriyi tanımlayan eşitliğe ulaşılmıştır.

ABTS.+ radikal katyon çözeltisi: 2,45 mM potasyum persülfat ($K_2S_2O_8$) içeren 7 mM'lık 10 mL ABTS çözeltisi hazırlanmıştır. 0,0384 g ABTS bir miktar damıtık su ile çözülerek 12,25 mM $K_2S_2O_8$ çözeltisinden 2 mL eklenmiş ve hacim damıtık su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Elde edilen çözelti oda sıcaklığında ve karanlıkta 12-16 saat bekletilmiştir ve ABTS.+ radikal çözeltisi ancak 2-3 gün kararlı halde kalabilmesinden dolayı analizden 1 gece önce hazırlanmıştır.

PBS (pH= 7,4 tuzlu fosfat tampon çözeltisi): 19 mL 0,2 M monobazik sodyum fosfat çözeltisi ile 81 mL 0,2 M dibazik sodyum fosfat çözeltisi karıştırılmıştır ve üzerine 8,77 g tuz eklenip hacim 1 L'ye tamamlanarak PBS çözeltisi hazırlanmıştır.

TEAC yöntemiyle antioksidan kapasite ölçümü için; ABTS+ ve PBS çözeltileri hazırlandıktan sonra **1 mg/mL** derişimdeki özütlerden 50 µL, 75 µL ve 100 µL'lik hacimlerde örnek alınarak ($20 < \%inhibisyon < 80$ kuralını sağlayacak şekilde) ABTS.+ radikal çözeltisine eklenip 6 dakika sonra soğurma okunmuştur. Radikal çözeltisi, 734 nm'de 0,700 ($\pm 0,02$) soğurma değeri gözleninceye dek PBS ile seyreltilmiştir. 6. dakikanın sonundaki soğurma değeri esas alınarak % inhibisyon değerleri aşağıda verilen eşitlikten hesaplanmıştır. ABTS.+ radikalinin 734 nm'deki soğurma değeri başlangıç soğurması olarak kaydedilmiştir. Sonuçlar TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity; troloks eşdeğer antioksidan kapasitesi) değeri olarak ifade edilmiştir.

$$\% \text{ İnhibisyon oranı} = \frac{\text{Başlangıç soğurma değeri} - \text{Son soğurma değeri}}{\text{Başlangıç soğurma değeri}} \times 100 \quad (3.2)$$

Elde edilen ortalama yüzde inhibisyon değerleri örnek hacimlerine (50, 75 ve 100 µL) karşı bir grafiğe aktarılmış ve bu verilere doğrusal regresyon analizi uygulanarak örneğe ilişkin eğriye ve bu eğriyi tanımlayan eşitliğe ulaşılmıştır.

3.2.9. FRAP Testi (Demir(III) İndirgen Antioksidan Gücü)

Benzie ve Strain (1996, 1999)'in düzenlenmiş yöntemi kullanılmıştır. FRAP analizi ile antioksidan yöntemi için 300 mmol/L asetat tamponu (pH=3,6), 10 mmol/L TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazin) ve 20 mmol/L demir (III) klorür çözeltisi (40 mmol/L HCl'de) hazırlanmıştır.

FRAP çalışma reaktifi: Taze olarak 25 mL asetat tamponu, 2,5 mL TPTZ çözeltisi ve 2,5 mL FeCl₃ çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır.

0,5 mL numune (0,1 mg/mL) 3,5 mL damıtık su ile karıştırılıp 1 mL çalışma reaktifi eklenmiştir. Karışım 37 °C'lik su banyosunda 10 dakika beklemeye bırakılmıştır. 10 dakika sonunda 593 nm'de soğurma değerleri okunmuştur ve standart olarak FeSO₄.7H₂O kullanılmıştır.

3.2.10. Enzim-Aktivite/İnhibisyon Çalışmaları

Bu çalışma Atta-ur-Rahman ve ark., (2005)'nin belirttiği yönteme göre gerçekleştirilmiştir. Enzim inhibisyonu çalışmasında; meyve, çiçek ve yaprak özütlerinin 10 ve 1 mg/ mL'lik örneklerine, enzim, substrat ve tampon çözeltiden toplam hacim 200 olacak şekilde farklı hacimlerde eklemeler yapılarak mikropate okuyucuda V_{max} değerleri belirlenmiş ve bu değerler yardımıyla % inhibisyon değerleri hesaplanarak aktif derişimin belirlenmesi sağlanmıştır. İnhibitör olarak PMSF, kontrol olarak ise DMSO kullanılmıştır.

Enzim çalışmalarında % inhibisyon değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{İnhibisyon (\%)} = \frac{(\text{Soğurma(kontrol)}) - (\text{Soğurma (test)})}{\text{Soğurma (kontrol)}} \times 100 \quad (3.3)$$

3.2.10.1. Proteaz İnhibisyonu Çalışması

Proteaz bünyesinde α -Kimotripsin, Tripsin ve Papain ve Karboksipeptidaz A enzimleri bulunmaktadır. Proteaz inhibisyonu için meyve, yaprak ve çiçek özütlerinin 10 ve 1 mg/mL'lik çözeltileri kullanılarak denemeler yapılmıştır. Proteaz inhibisyonu denemeleri için toplam hacim 200 μ L olacak şekilde özütlere farklı hacimlerde eklemeler yapılarak aktif derişimin belirlenmesi sağlanmıştır. Özütünde eklenmesi ile 37°C'de 10 dakika beklemeye bırakılan karışımların, substratın eklenmesinin ardından 410 nm'de soğurmaları okunarak PMSF (fenilmetansülfonilflorür) inhibitörüne karşı grafikleri elde edilmiştir. Proteaz bünyesinde bulunan α -Kimotripsin, Tripsin ve Papain ve Karboksipeptidaz A enzimlerinin inhibisyon çalışmaları için özütlerin 10 mg/ mL ve 1 mg/mL'lik çözeltileri kullanılmıştır. (Karboksipeptidaz A 254 nm, diğerleri 410 nm'de okunmuştur). Enzim aktivte çalışmalarında DMSO çözücü ve kontrol çözeltisi olarak kullanılmıştır.

0,1 mM PMSF inhibitörü: 17,4 mg PMSF tartılmış, 5 mL 2-propanol de çözülerek hazırlanmıştır.

Tartılan özüt miktarları aşağıda listelenmiştir.

1 mg/mL lik ve 10 mg/mL lik örnekler için:

EtOAc çiçek, yaprak ve meyve özütleri; 500 mg

MeOH çiçek, yaprak ve meyve özütleri; 500 mg

MeOH (maserasyon) meyve özütü; 500 mg

Hekzan çiçek özütü; 500 mg

DCM yaprak özütü: 500 mg

DCM meyve özütü; 300 mg

1 mg/mL ve 10 mg/mL'lik özütlerin α -Kimotripsin, Tripsin ve Papain enzim inhibisyonlarına ait enzim ve substrat hacimleri;

Enzim	Tampon çözelti	Özüt	Substrat	Toplam hacim
50 μ L	40 μ L	10 μ L	100 μ L	200 μ L

Ayrıca papain enzimi için özütlerin 10 mg/mL'lik derişimlerine özüt miktarı artırılarak enzim inhibisyonu bakılmıştır.

Enzim	Tampon çözelti	Özüt	Substrat	Toplam hacim
50 μ L	20 μ L	30 μ L	100 μ L	200 μ L

1. Enzim: α -Kimotripsin, (61 Unit/mg katı), (65 Unit/mg protein)

0,34 mg α –Kimotripsin tartılarak 200 μ L 50 mM Tris-HCl pH = 7,5 tampon çözeltisinde hazırlanmıştır.

Substrat: N-Süksinil-Fenil-p-nitroanilit (2,6 mM)

4,70 mg substrat tartılarak 5 mL 50 mM Tris-HCl pH = 7,5 tampon çözeltisinde hazırlanmıştır.

Tampon çözelti hazırlanması: 50 mM Tris-HCl pH = 7,5 tampon çözeltisi için 1,21 g Tris tartılarak pH metre ile ayarlama yapıldıktan sonra toplam hacim 200 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanmıştır.

2. Enzim: Tripsin, (10000 Unit/mg katı)

0,49 mg Tripsin enzimi tartılarak 1 mL 50 mM Tris-HCl pH = 7,5 tampon çözeltisinde hazırlanmıştır.

Substrat: N α - Benzoil-DL-arjinin-4-nitroanilit hidroklorür

4 mM substrat için 8,7 mg N α - Benzoil-DL-arjinin-4-nitroanilit hidroklorür tartılarak 5 mL 50 mM Tris-HCl pH = 7,5 tampon çözeltisinde hazırlanmıştır.

3. Enzim: Papain (1,5-10 Unit/mg katı)

1 mg Papain tartılarak 250 μ L 50 mM Tris-HCl pH = 7,5 tampon çözeltisinde hazırlanmıştır.

Substrat: N α - Benzoil-DL-arjinin-4-nitroanilit hidroklorür

10 mg N α - Benzoil-DL-arjinin-4-nitroanilit hidroklorür tartılarak 500 mL 50 mM Tris-HCl pH = 7,5 tampon çözeltisinde hazırlanmıştır.

Tampon çözelti hazırlanması: 50 mM Tris-HCl (1,21 g) ve 1 mM L-sisteinyum klorür (0,03 g) ve 2 mM EDTA (0,15 g) tartılarak bir miktar saf suda çözülmüştür. pH metre ile ayarlama yapıldıktan sonra toplam hacim 200 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanmıştır.

4.Enzim: Karboksipeptidaz A, (≥ 50 Unit/mg protein)

20 μ L enzim alınarak 230 μ L LiCl (% 10'luk) çözeltisinde hazırlanmıştır.

Substrat: Hippuril-L-Fenilalanin

4,55 mg Hippuril-L-Fenilalanin tartılarak 2030 μ L 1 M Tris-HCl pH = 7,5 tampon çözeltisinde hazırlanmıştır.

Tampon çözelti hazırlanması: 1 M Tris-HCl (24,23 g) ve 0,5 M sodyum klorür (5,84 g) tartılarak bir miktar saf suda çözülmüştür. pH ayarlamasının ardından toplam hacim 200 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanmıştır.

96 kuyucuklu plakada okuma 254 nm için yapılamadığı için küvet kullanıldı.

3.2.10.2 Tirozinaz İnhibisyonu Çalışması

Enzim: Tirozinaz, (3610 Unit/mg katı)

0,5 mg Tirozinaz tartılarak 1 mL 0,1 M pH = 6,8 fosfat tamponunda hazırlanmıştır.

Substrat: L-Tirozin

6,16.10⁻³ g L-Tirozin tartılarak 0,1 M pH = 6,8 fosfat tamponunda hazırlanmıştır.

Tampon çözelti hazırlanması: 0,56 g NaH₂PO₄.2H₂O ve 0,25 g Na₂HPO₄ tartılarak bir miktar saf suda çözülmüştür. pH ayarlamasının ardından toplam hacim 500 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanmıştır.

Proteaz inhibisyon çalışmasında olduğu gibi toplam hacim 200 µL olacak şekilde enzim, substrat, özüt ve tampon çözeltiler aynı hacimlerde kullanılmıştır. 25 °C’de 10 dakika bekletildikten sonra 475 nm’de soğurmalar okunmuştur.

1 mg/mL ve 10 mg/mL’lik özütlerin Tirozinaz enzim inhibisyonuna ait enzim ve substrat hacimleri;

Enzim	Tampon çözelti	Özüt	Substrat	Toplam hacim
50 µL	40 µL	10 µL	100 µL	200 µL

Ayrıca tirozinaz enzimi için özütlerin 10 mg/mL’lik derişimlerine özüt miktarı artırılarak enzim inhibisyonu bakılmıştır.

Enzim	Tampon çözelti	Özüt	Substrat	Toplam hacim
50 µL	20 µL	30 µL	100 µL	200 µL

3.2.10.3.β-Laktamaz İnhibisyonu Çalışması

Enzim: Penisilinaz, (1,5-3,0 Unit/mg protein)

5,5 mg Penisilinaz tartılarak 1 mL 100 mM fosfat tampon (pH = 7) çözeltisinde hazırlanmıştır.

Substrat: Nitrosefin

1 mg Nitrosefin tartılarak 700 µL DMSO + 4300 µL 100 mM pH = 7 fosfat tamponu çözeltisinde hazırlanarak 30°C’de bekletilmiştir.

Tampon çözelti hazırlanması: 0,68 g potasyum fosfat monobazik (KH₂PO₄) ve 0,34 g sodyum fosfat dibazik dihidrat (Na₂HPO₄.2H₂O) tartılarak bir miktar saf suda çözülmüştür. pH ayarlamasının ardından toplam hacim 50 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanmıştır.

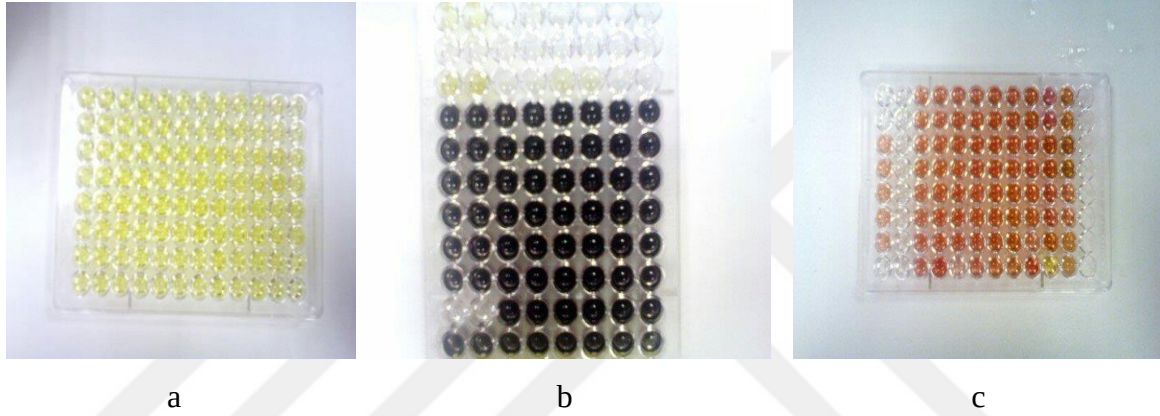
10 dakika bekletildikten sonra 495 nm’de soğurmalar okunmuştur.

1 mg/mL ve 10 mg/mL'lik özütlerin Penisilinaz enzim inhibisyonuna ait enzim ve substrat hacimleri;

Enzim	Tampon çözelti	Özüt	Substrat	Toplam hacim
10 µL	160 µL	10 µL	20 µL	200 µL

Ayrıca penisilinaz enzimi için özütlerin 10 mg/mL' lik derişimlerine özüt miktarı artırılarak enzim inhibisyonu bakılmıştır.

Enzim	Tampon çözelti	Özüt	Substrat	Toplam hacim
10 µL	120 µL	50 µL	20 µL	200 µL



Şekil 3.2. Enzim, özüt ve tampon çözeltilerinin 96 kuyucuklu plakaya ekilişi; a), substrat ekledikten sonra; b), reaksiyon bitiminin ardından gerçekleşen renk değişimi; c)

3.2.11. Yaban Eriği Bitki Özütlerine Uygulanan Sitotoksisite Çalışmaları

3.2.11.1. Hücre Kültürü Ortamının Hazırlanması

Hücre kültürü ortamı DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) içine L-Glutamin son derişimi 0,2 mM ve FCS son derişimi % 10 olacak şekilde ilave edilmiştir. Tüm bileşenler 0,22 µm steril süzgeçten süzülerek steril edilmiştir.

3.2.11.2. FCS Hazırlanması

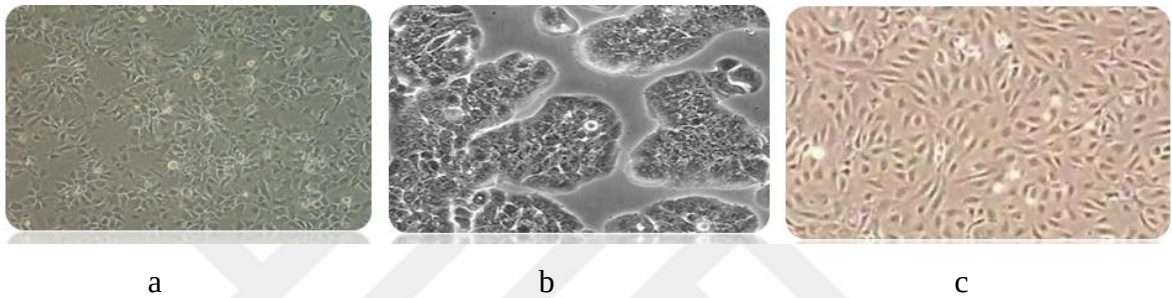
FCS (Fetal Calf Serum) -20 °C'de saklanıp taşınması soğuk zincirle yapılmıştır. Stok serum ilk kullanımdan önce 56 °C'de 1 saat ısı ile etkisizleştirilmiş ve tekrar -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.11.3. PBS Tampon Çözeltisinin Hazırlanması

Tablet şeklinde temin edilen PBS (Fosfat Tampon Tuzu), her tableti 100 mL ddH₂O (çift damıtılmış) ile hazırlanmıştır, otoklavlanıp 2-8 °C’de saklanmıştır.

3.2.11.4. Çalışmada Kullanılan Hücre Soyları

Bu çalışmada İnsan karaciğer karsinomu (Hep3B) hücre hattı, İnsan kolon karsinom (HT-29) hücre hattı ve HUVEC hücre hattı kullanılmıştır. Hücre hatları 15 mL ortamda 75 cm² flasklarda, içerisinde 0,2 mM L-Glutamin ve % 10 FCS içeren DMEM ortamı içerisinde haftada 2 kez rutin pasaj yapılarak üretilmiştir.



Şekil 3.3. a) Hep3B (İnsan hepatoma) hücre hattı, b) HT-29 (İnsan kolon kanseri) hücre hattı, c) HUVEC hücre hattı

3.2.11.5. Hücre Soyunun Başlatılması

Uzun dönemde -80 °C’de saklanan hücre hatlarının büyütülmesi için -80 °C’den çıkarılan hücreler 37 °C sıcaklığındaki su banyosuna alınıp hızlıca çözünmeleri sağlanmıştır. Çözünen hücreler % 10’luk FCS içeren ortama alınıp, alt üst edilmiştir ve 1000 devir/dk hızda 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte kalan çözelti uzaklaştırılıp, oluşan pellet ortamda çözülmüştür ve flasklara ekim yapılmıştır. Flasklar etiketlenip 37 °C, % 5 CO₂ içeren inkübatöre konulmuştur.

3.2.11.6. Hücrelerin Büyütülmesi

Hücreler 15 mL ortamda 75 cm² flasklarda, içerisinde 0,2 mM L-Glutamin ve % 10 FCS içeren DMEM ortamı içerisinde haftada 1 kez rutin pasaj yapılarak üretilmiştir.

3.2.11.7. Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler bulundukları yüzeyi % 80-90 oranında kaplayınca, içerisindeki ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hücreler 2 kez steril PBS ile yıkanıp 75 cm² flasklar için 3 ml Tripsin-

EDTA ile tripsinizasyon yapılmıştır. Hücreler yüzeyden ayrılınca ortam eklenip 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj ile hücreler çöktürülmüştür. Süpernatant uzaklaştırılıp, pellet ortamda çözölmüştür ve flasklara ekim yapılmıştır. Flasklar etiketlenip 37 °C, % 5 CO₂ içeren inkübatöre konulmuştur.

3.2.11.8. Canlı Hücrelerin Belirlenmesi (Trypan Blue Exclusion) ve Hücre Sayımı

Toplam hücre süspansiyonun mililitresindeki hücre sayısı hesaplamak için üzeri 25 küçük kareye ayrılmış, 1mm² alan, 0,1 mm derinliği olan ve böylelikle toplam hacmin hesaplanabildiği hemositometre kullanılmıştır. Canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek için 10 µL hücre süspansiyonu eşit hacimde tripan mavi (1:1 seyrelme oranında) ile 3-5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilip sayım yapılmıştır. Maddelerin uygulamasından önce 96 kuyulu kültür kaplarına her kuyu için 50000 hücre olacak şekilde tripan mavi uygulaması ile sayılarak konulmuş ve hücrelerin bulundukları yüzeye tutunmaları için 24 saat beklenmiştir. Süspansiyonun mililitresindeki toplam hücre sayısı için aşağıda verilen eşitlikten faydalanılır.

$$\text{Toplam canlı hücre sayısı/mL} = \text{hemositometre sayım sonucu} \times 2 \times 10^4 \quad (3.4)$$

3.2.11.9. Maddelerin Uygulanması

Hekzan meyve, çiçek ve yaprak, diklorometan meyve, çiçek ve yaprak, etilasetat meyve, çiçek ve yaprak, metanol meyve çiçek ve yaprak, maserasyon meyve olmak üzere 13 farklı özüt HT-29 ve Hep3B hücre hatlarına uygulanmıştır. Bunun için her bir özüt için 0,1 g tartılarak 2 mL DMSO ilave edilmiştir. Her bir özüt için sırasıyla;

50 mg/mL 25 mg/mL 12,5 mg/mL 6,25 mg/mL 3,125 mg/ mL

olmak üzere beş farklı derişimde çözeltiler elde edilmiştir. Bu çözeltileri her birinden 4 µL alınarak HT-29, HUVEC ve Hep3B hücre hatlarına uygulanmıştır. 200 µL lik kuyucuklardaki derişimin sırasıyla ;

1 mg/ mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/ mL, 0,125 mg/ mL, 0,0625 mg/ mL lik olmaları sağlanmıştır.

Belirlenen derişimlerdeki örnekler ortamında büyütölen ve her bir kuyucuğa enjekte edilen HT-29, HUVEC ve Hep3B hücrelerinin üzerine eklenmiştir. 24 ve 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Örnekler 3 tekrar çalışılarak, 24 ve 48 saat bekleme süresi sonunda MTT denemesi yapılmıştır.

3.2.11.10. MTT denemesi

20 µL MTT çözeltisi her bir kuyuya uygulanmış ve hücrelerin MTT'yi metabolize etmeleri için 37 °C'de 4 saat beklenmiştir. Ortam uzaklaştırılmıştır. 0,004 M HCl içeren isopropanol uygulanarak oluşan Formazan kristalleri çözülmesi için kuyucuklar çalkalanmış ve hücrelerin 550 nm dalga boyunda soğurma değerleri alınmıştır.

3.2.11. GC/MS Analizi

Hekzan meyve, çiçek ve yaprak özütlerinin GC/MS bileşen analizi aşağıda verilen koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Kolon: 30 m x 250 µm x 0,25 µm

Akış hızı: 1 mL/dak He için

Toplam tutulan zaman: 44 dk

Sıcaklık programı:

Sıcaklık	Tutulan zaman (dk)
----------	--------------------

40 °C	5
-------	---

230 °C	20
--------	----

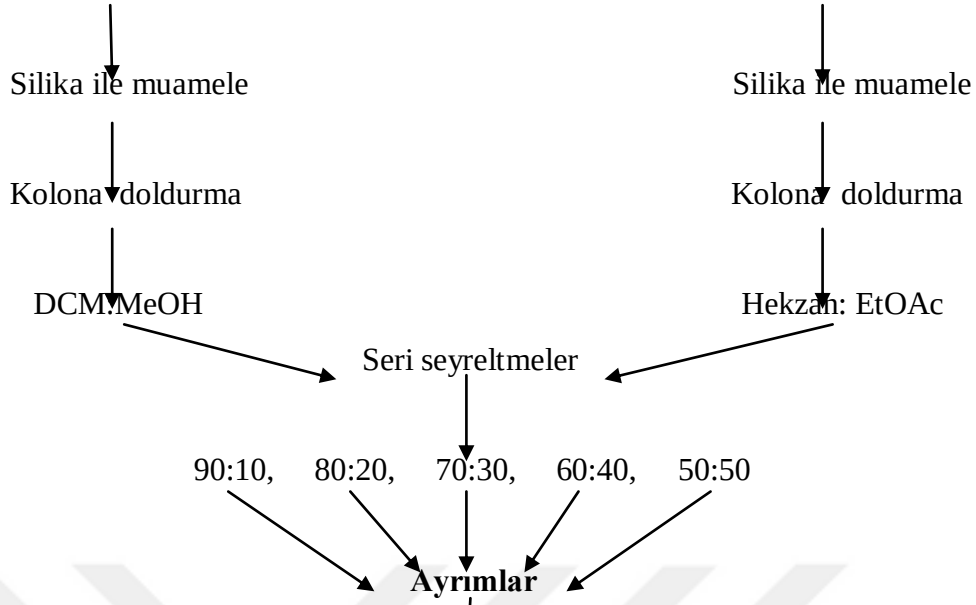
10 °C/dk hızla 40 °C 'den 230° C ' ye yükselmiştir.

3.2.13. Kromatografik Ayırma İşlemleri

Kolon kromatografisi yardımıyla saf bileşen elde etmek için antioksidan, enzim ve sitotoksikite denemelerinde aktif özütler olan etilasetat meyve, çiçek ve yaprak özütleri ile metanol meyve, çiçek ve yaprak özütleri analiz için kullanılmıştır.

Kolon ile ayırma etilasetat meyve, çiçek, yaprak özütleri için 0,5 g, metanol meyve, çiçek, yaprak özütleri için ise 0,1 g tartım alınmıştır. Etilasetat meyve, çiçek ve yaprak özütleri için DCM:MeOH çözücü karışımı 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50 olacak şekilde seyreltmeler yapılmış, daha sonra MeOH ile yıkama yapılmıştır. MeOH meyve, çiçek ve yaprak için ise Hekzan: EtOAc çözücü sistemi kullanılarak 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50 olacak şekilde seyreltmeler yapılmıştır. Bu şekilde elde edilen ayrımlar, İTK plakalarına seryum (IV) sülfat belirteci püskürtülerek 105 °C'lik etüvde 5 dakika bekletilip belirlenen lekeler vasıtasıyla birleştirilmiştir. İşlem basamakları aşağıdaki gibidir.

Seryum (IV) sülfat çözeltisinin hazırlanması: 5 g seryum (IV) sülfat 25 mL % 98'lik sülfürik asit içerisinde çözülerek saf su ile 250 mL'ye tamamlanmıştır.

Etilasetat özütleri (0,5 g numune)**MeOH özütleri (0,1 g numune)**

Seryum (IV) sülfat belirteci ile lekeleri belirginleştirme ve ayrımları birleştirme

DPPH ile aktifliği belirlenen ham özütlerden saf bileşene gitmek için kolon kromatografisi yardımıyla içerisindeki bileşen sayısı azaltılarak aktif özütler elde edilmiştir. Elde edilen aktif özütlerin DPPH ile İTK incelemesi sonucunda bileşen aktifliği nitel olarak belirlenmiştir. Etilasetat meyve, çiçek özütleri ile MeOH meyve ve çiçek özütleri içerisindeki bileşen sayısı 2 yada 3 olarak azaltılarak aktif özütlerdeki bileşenler karışım halinde elde edilmiştir. Nitel olarak belirlenen aktiflik denemesinde MeOH çiçek, etilasetat çiçek ve yaprak özütlerinde sarı renkte, MeOH ve etilasetat meyve özütlerinde ise kırmızı ve beyaz renkte aktif bileşen olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalar göz önünde bulundurularak MeOH çiçek, etilasetat çiçek ve yaprak özütlerinde sarı renkte olan bileşenlerin flavonoid grubu, MeOH ve etilasetat meyve özütlerinde kırmızı renkte olan bileşenin antosiyanin grubu, beyaz renkte olan bileşenin ise kumarin grubu bileşik olduğu düşünülmektedir (Harborne, 1998).

Yapılan çalışmalara bakıldığında meyve özütlerinde antosiyanin, flavonoid, fenolik bileşen, kumarin, karotenoid; çiçekte ve yaprakta flavonoidler bulunduğu belirtildiğinden bu aktif bileşen gruplarına yönelik etken bileşikler elde etmek amacıyla CombiFlash, HPLC vb.ile saflaştırma çalışmalarına devam edilmesi düşünülmektedir (Stefova ve ark., 2001).

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. DPPH (Serbest Radikal Süpürücü Kapasite) Sonuçları

Antioksidan ile DPPH•'in oluşturduğu reaksiyon karışımının gösterdiği soğurma ne kadar düşük ise antioksidanın serbest radikal giderme kapasitesi o kadar yüksek demektir. Negatif olarak hesaplanan % inhibisyon değerleri ‘-’ şeklinde belirtilmiştir.

Çizelge 4.1. 517 nm’de özütlerin % inhibisyon değerleri ve % 50 inhibisyona yakın olan derişimin (1 mg/mL) soğurma değerleri

<i>Derişim (mg/mL)/ Özüt</i>	<i>1</i>	<i>0,1</i>	<i>0,01</i>	<i>0,001</i>	Soğurma değerleri
EtOAc çiçek	% 82,94	% 21,03	% 7,19	% 2,59	0,2191
EtOAc meyve	% 78,22	% 16,78	% 6,06	% 5,06	0,2926
EtOAc yaprak	% 67,16	% 9,95	-	-	0,4890
Hekzan meyve	% 1,64	-	% 0,95	% 2,71	-
Hekzan çiçek	% 2,33	%1,25	-	-	-
Hekzan yaprak	% 35,74	%7,23	% 2,44	% 0,59	0,8610
DKM meyve	% 62,71	% 13,67	-	% 0,53	0,5120
DKM çiçek	% 23,48	% 7,20	% 4,83	% 7,31	1,2025
DKM yaprak	% 38,64	-	-	-	0,8850
MeOH çiçek	% 80,17	% 20,04	% 0,22	% 1,21	0,3015
MeOH yaprak	% 79,77	% 40,02	% 8,96	% 2,43	0,3720
MeOH meyve	% 38,73	% 11,08	% 5,096	% 4,36	1,0195
MeOH meyve/maserasyon	% 13,17	% 6,50	% 3,86	-	-

DPPH analizi sonucunda inhibisyonu % 50 veya % 50'den büyük özütlerin 1 mg/mL'lik örnekleri için seri seyreltmeler yapılarak IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca inhibisyonu % 50 den düşük fakat % 50 ye yakın olan 1 mg/mL'lik örneklerin depo çözeltileri (10 mg/mL) için DPPH analizi yapılmıştır. Bunun sonucunda hekzan çiçek (% 68,70) ve metanol meyvenin (% 74,42) inhibisyonları % 50 den fazla bulunmuştur.

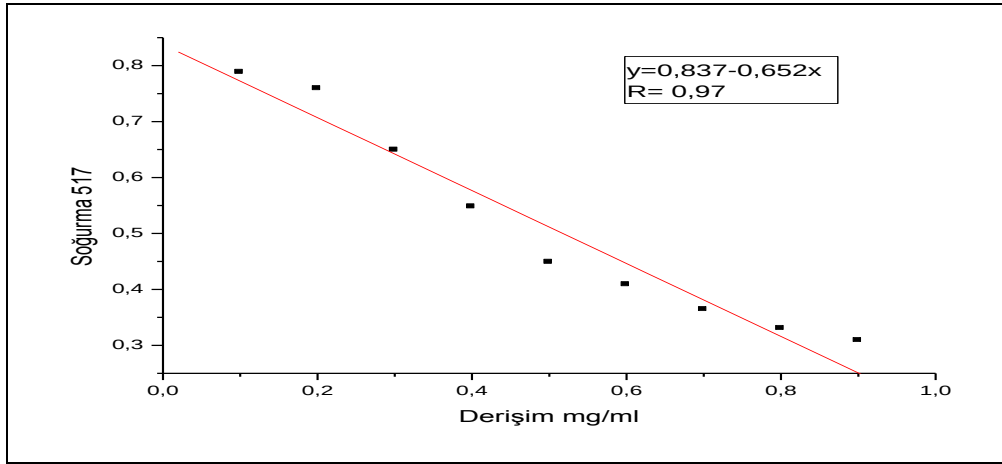
IC₅₀ değeri bulmak için; 0,001-0,009 mg/mL derişim aralığı soğurmaları grafiğe geçirildiğinde elde edilen $y = mx+n$ denkleminde y yerine ölçülen en yüksek soğurmanın yarısı yazılıp denklemden x çekildiğinde çıkan değer IC₅₀ değeri olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 4.2. Özütlerin DPPH analizi sonucunda elde edilen IC₅₀ değerleri

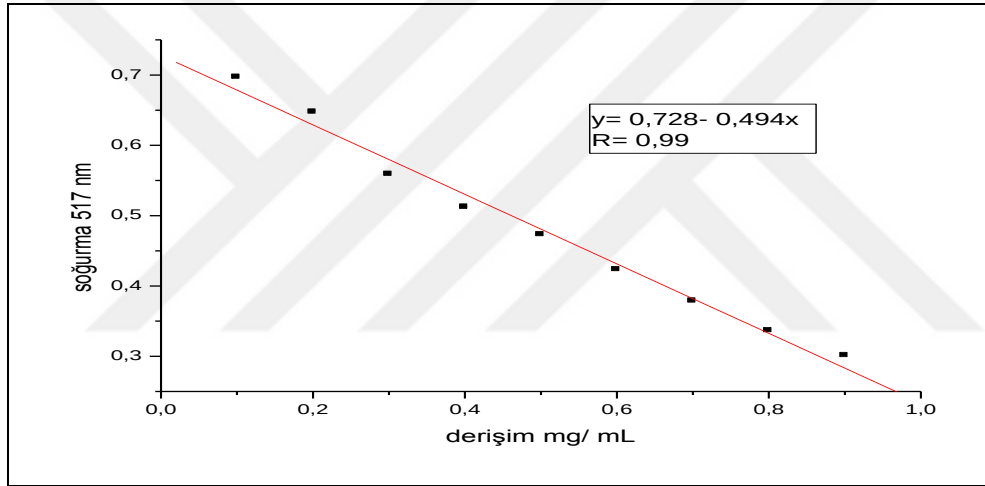
Özütler (1 mg/mL)	IC ₅₀ değerleri (mg/mL)
MeOH çiçek	0,476 ± 0,060
MeOH yaprak	0,480 ± 0,050
MeOH meyve	0,83± 0,02
EtOAc yaprak	0,463 ± 0,080
EtOAc çiçek	0,387± 0,080
EtOAc meyve	0,327± 0, 130
DCM yaprak	0,800 ± 0,016
DCM çiçek	0,580 ± 0,009
DCM meyve	0,67 ± 0,04
Hekzan yaprak	0,970 ± 0,026
Hekzan çiçek	0,850 ± 0,011
Hekzan meyve	1,000 ± 0,024
Maserasyon meyve	1,770 ± 0,005

DPPH geçerliliği sağlanan özütlerin (1 mg/mL) seri seyreltmeleri için yapılan DPPH analiz sonuçları:

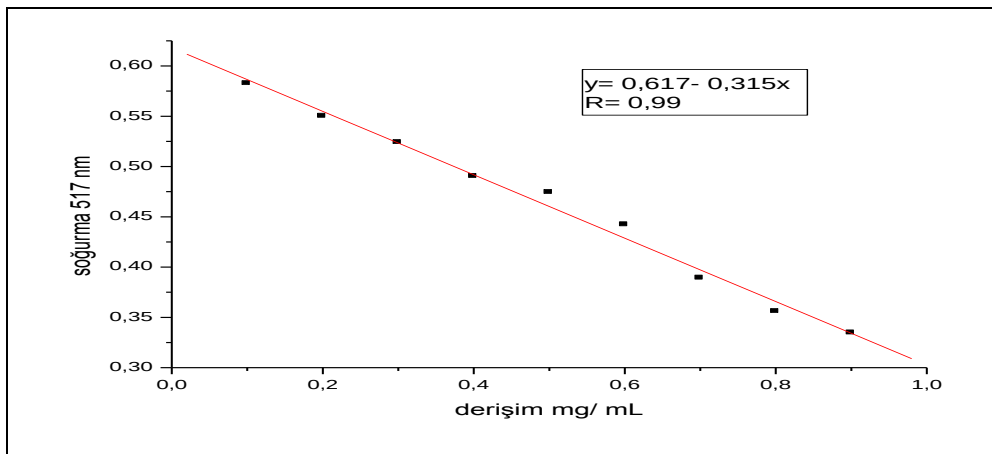
Antiosidan aktivite ölçümlerine ait en yüksek soğurma değerini yarıya düşüren numune derişimi (IC₅₀) olarak ifade edilmiştir. Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.



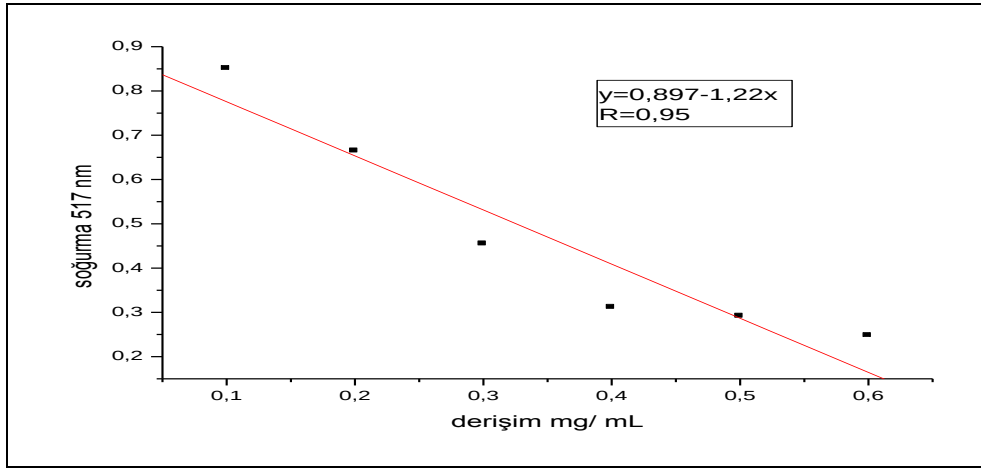
Şekil 4.1. Yaban eriği DCM meyve özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi



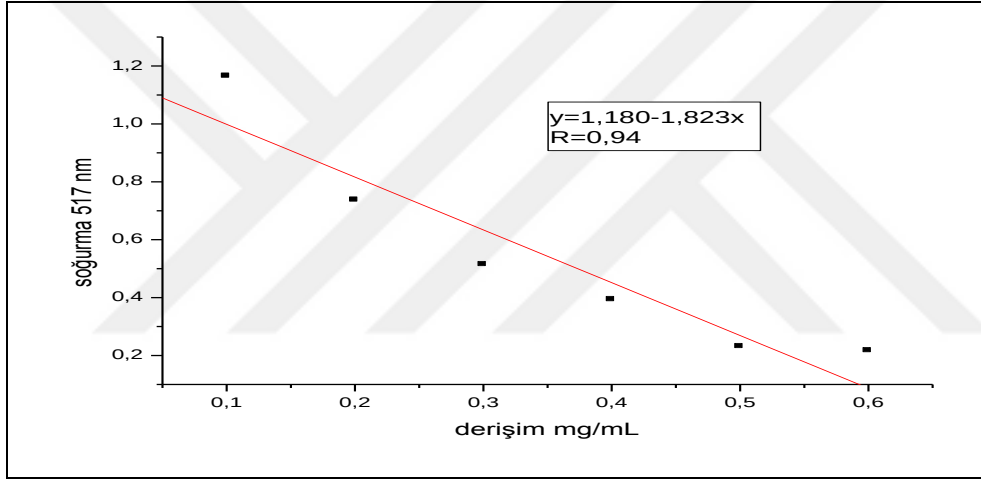
Şekil 4.2. Yaban eriği DCM yaprak özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi



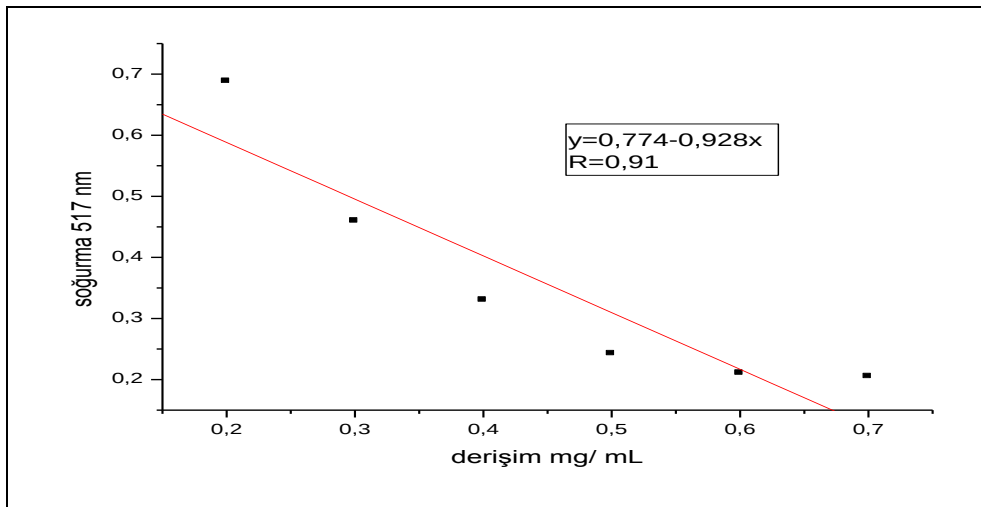
Şekil 4.3. Yaban eriği DCM çiçek özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi



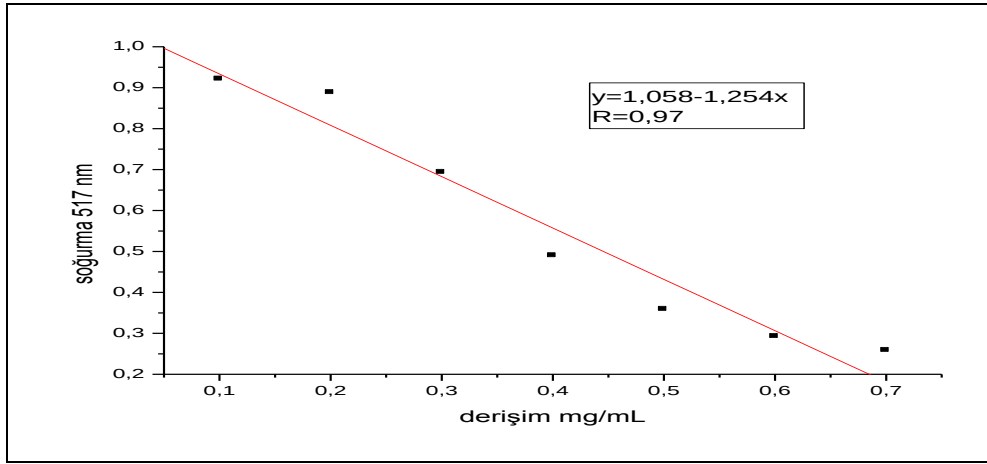
Şekil 4.4. Yaban eriği etilasetat çiçek özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi



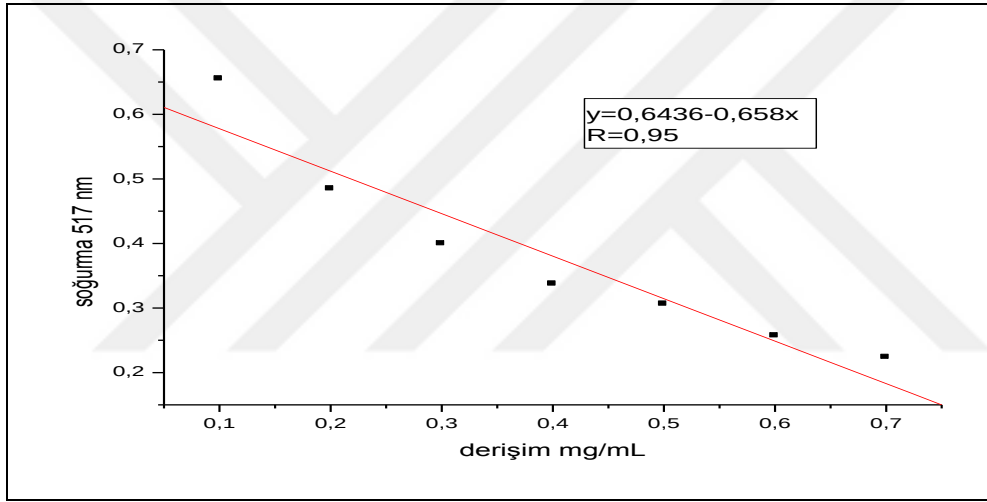
Şekil 4.5. Yaban eriği etilasetat meyve özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi



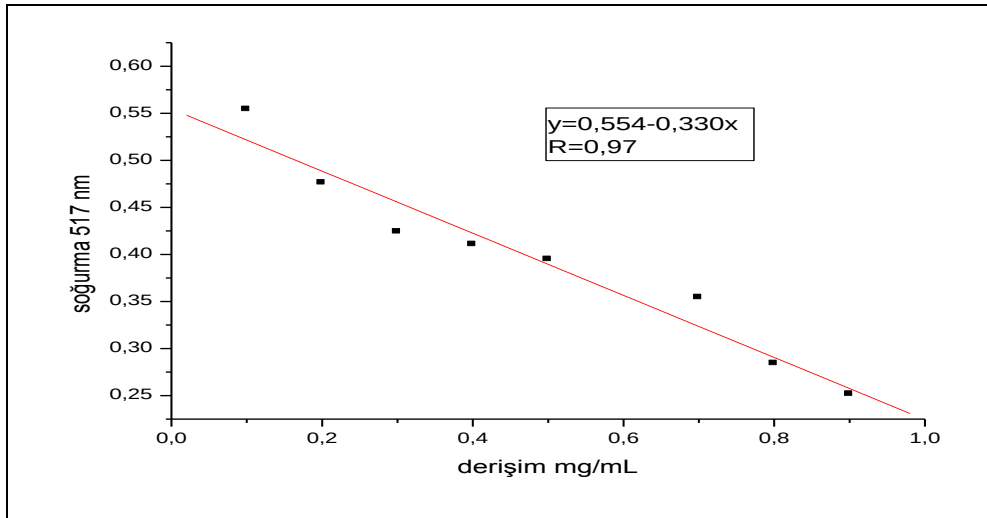
Şekil 4.6. Yaban eriği etilasetat yaprak özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi



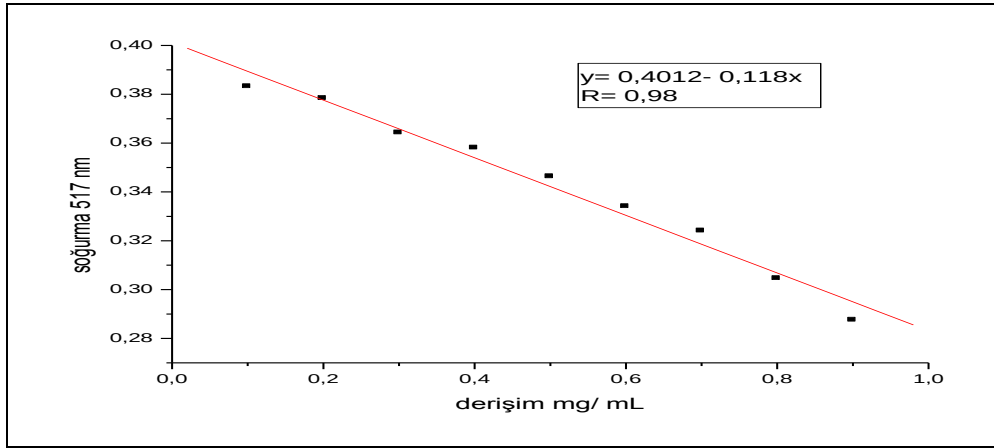
Şekil 4.7. Yaban eriği MeOH çiçek özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi



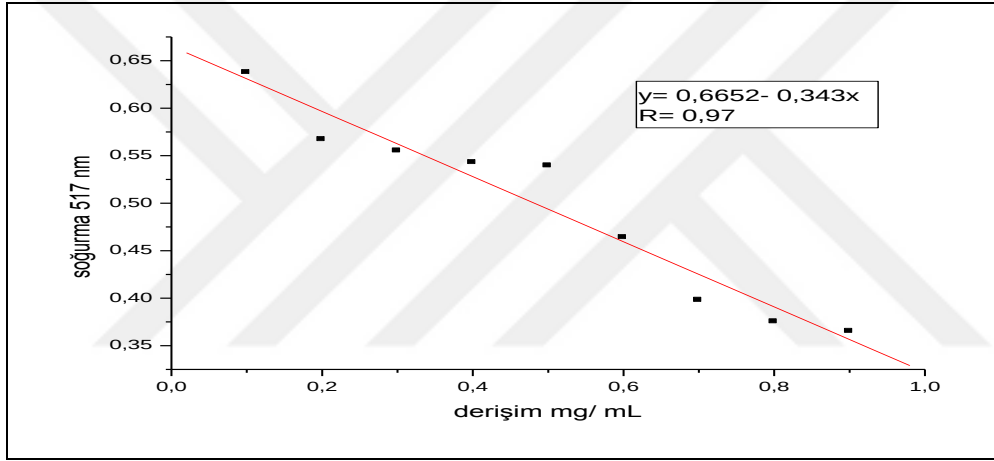
Şekil 4.8. Yaban eriği MeOH yaprak özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi



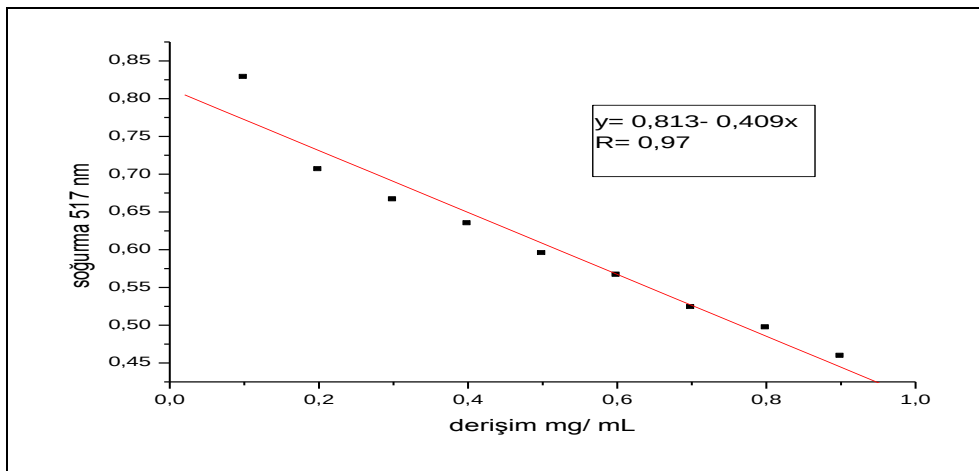
Şekil 4.9. Yaban eriği MeOH meyve özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi



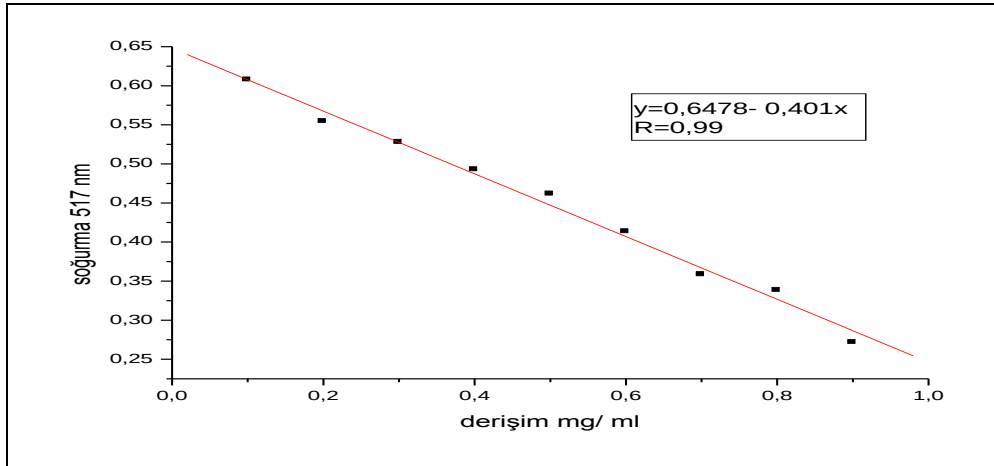
Şekil 4.10. Yaban eriği maserasyon meyve özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi



Şekil 4.11. Yaban eriği hekzan meyve özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi



Şekil 4.12. Yaban eriği hekzan yaprak özütünün DPPH• radikali temizleme kapasite



Şekil 4.13. Yaban eriği hekzan çiçek özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi

DPPH analizi ile sonucunda diklorometan çiçek ve meyve özütü, hekzan çiçek özütü, etilasetat meyve, çiçek ve yaprak özütleri, metanol yaprak, çiçek ve meyve özütlerinde antioksidan aktiflik bulunmuştur. DPPH analizi sonucunda en aktif özütler etil asetat meyve (DPPH-IC₅₀= 0,327 mg/mL), etilasetat çiçek (DPPH-IC₅₀= 0,387 mg/mL), etilasetat yaprak (DPPH-IC₅₀= 0,463 mg/mL), metanol çiçek (DPPH-IC₅₀= 0,476 mg/mL) ve metanol yaprak (DPPH-IC₅₀= 0,48 mg/mL) özütleri bulunmuştur.

Bu yöntemde bir antioksidan için ölçülen IC₅₀ değeri artıka antioksidan etkisi azalacağından; etil asetat meyve özütünün 1 mg/mL çözeltisinde antioksidan etkisi metanol meyve ve diklorometan meyve özütlerine göre daha yüksek bulunmuştur. DPPH analizinde en etkin meyve özütü olarak; etil asetat meyve özütü (1 mg/mL) (DPPH- IC₅₀= 0,327 mg/mL), en etkin çiçek özütü olarak; etil asetat çiçek özütü (1 mg/mL) (DPPH- IC₅₀= 0,387 mg/mL), en etkin yaprak özütü olarak ise; etilasetat (1 mg/mL) (DPPH- IC₅₀= 0,463 mg/mL) ve metanol yaprak (DPPH-IC₅₀= 0,48 mg/mL) özütleri belirlenmiştir.

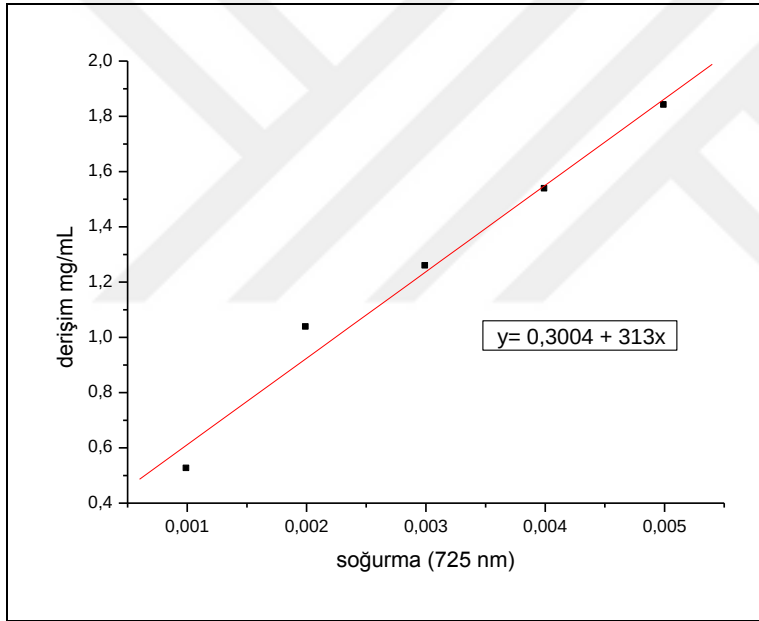
4.2. Toplam Fenolik Bileşen Miktar Tayini

Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak yapılan toplam fenolik bileşik tayininde en sık kullanılan standart bileşik gallik asittir. Toplam fenolik bileşen miktarı için bu yöntemde standart olarak ferulik asit kullanılmıştır.

Çizelge 4.3. Ferulik asit standardına ait derişim ve soğurma değeri.

Derişim (mg/mL)	Soğurma değeri
0,001	0,523
0,002	1,035
0,003	1,256
0,004	1,535
0,005	1,838

$y = 0,3004 + 313x$ eşitliğinden 1 mg/mL'lik özütlerin fenolik bileşen miktarı mg ferulik asit / 100 g cinsinden hesaplanmıştır.



Şekil 4.14. Toplam fenolik bileşen tayininde kullanılan Ferulik asit standardı çalışma grafiği

Çizelge 4.4. Ferulik asit cinsinden Fenolik bileşen miktarları

Özütler	Soğurma değerleri	Fenolik bileşen miktarı mg ferulik asit/100 g
MeOH çiçek	0,711	12,7 mg
MeOH yaprak	0,473	9,0 mg
MeOH meyve	0,572	19,0 mg
EtOAc yaprak	0,931	12,5 mg
EtOAc çiçek	1,353	15,0 mg
EtOAc meyve	1,082	4,5 mg
DCM yaprak	0,714	0,4 mg
DCM çiçek	0,564	0,4 mg
DCM meyve	1,180	2,5 mg
Hekzan yaprak	0,494	3,8 mg
Hekzan çiçek	0,498	0,8 mg
Hekzan meyve	0,391	0,8 mg

Yapılan analiz sonucunda toplam fenolik bileşen içeriği en yüksek meyve özütü olarak; metanol meyve =19 mg, çiçek özütü olarak; etil asetat çiçek = 15 mg, yaprak özütü olarak ise; etil asetat yaprak = 12,5 mg belirlenmiştir.

4.3. CUPRAC Analiz Sonuçları

CUPRAC analizi için meyve, çiçek ve yaprak özütlerinin 0,1 mg'lık derişimine ait örnekleri kullanılmıştır. Standart olarak ise kersetin kullanılmıştır.

Kersetin standart grafiğinden;

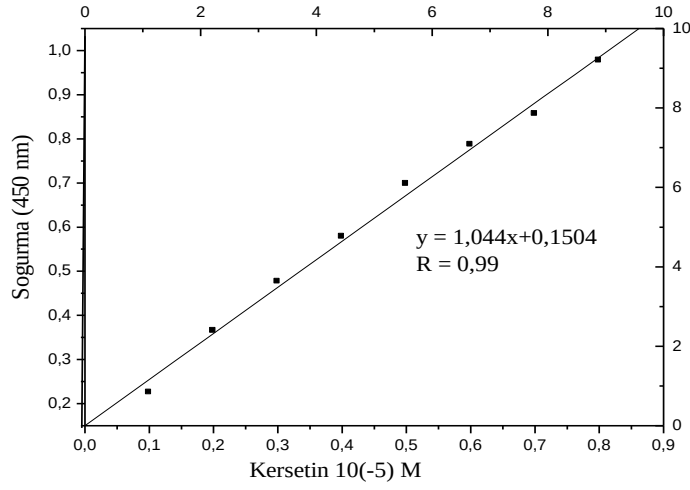
$$y = A + Bx$$

$$R = 0,9943$$

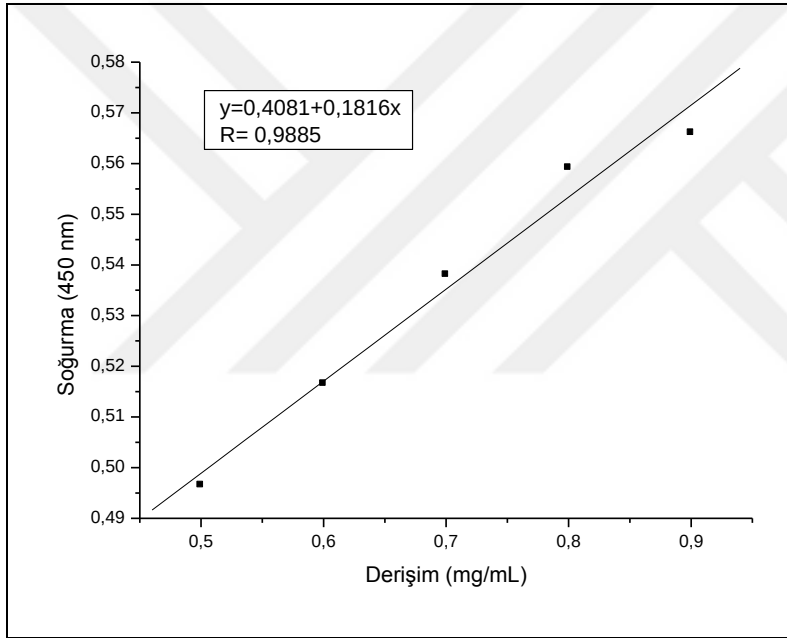
$$y = 1,0439x + 0,1504$$

$$\epsilon \text{ (Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{)} = 1,0439$$

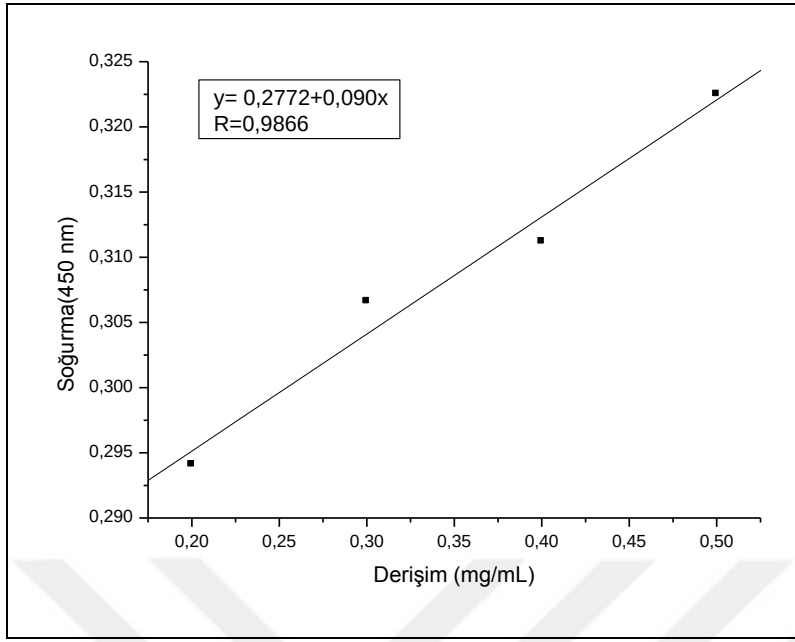
$$\text{QREFC} = \epsilon \text{ (Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{)} \text{ örnek} / \epsilon \text{ (Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{)} \text{ kersetin}$$



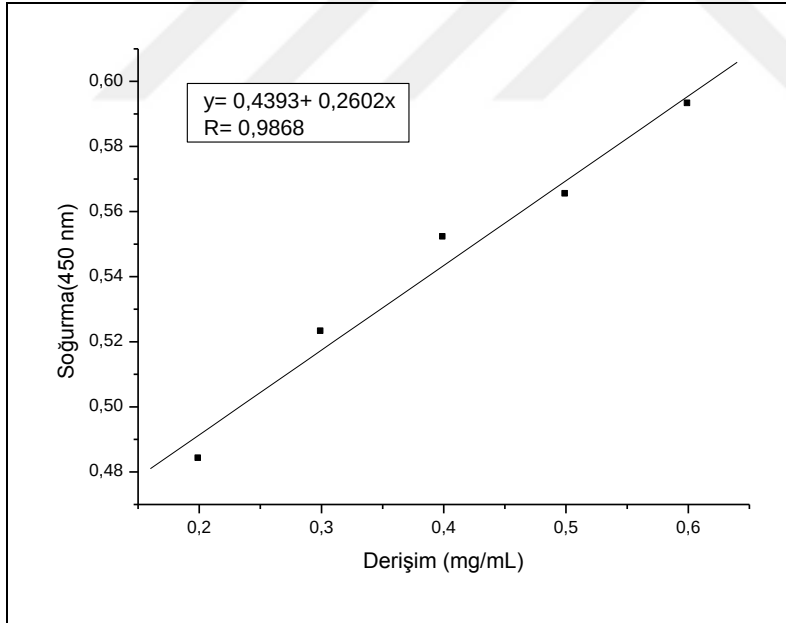
Şekil 4.15. CUPRAC tayininde kullanılan kersetin standardı çalışma grafiği



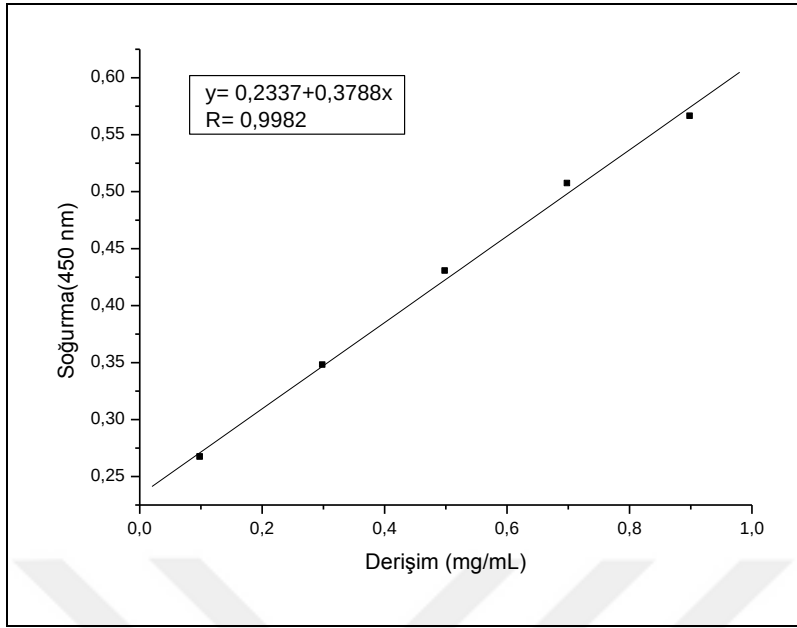
Şekil 4.16. DCM yaprak özütü ve standart olarak kullanılan kersetinin farklı derişimlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları



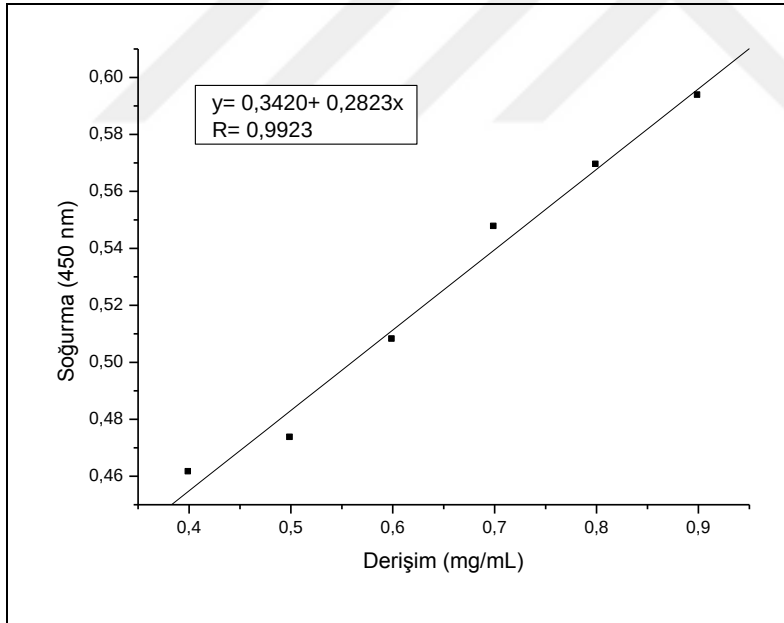
Şekil 4.17. DCM meyve özütü ve standart olarak kullanılan kersetinin farklı derişimlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları



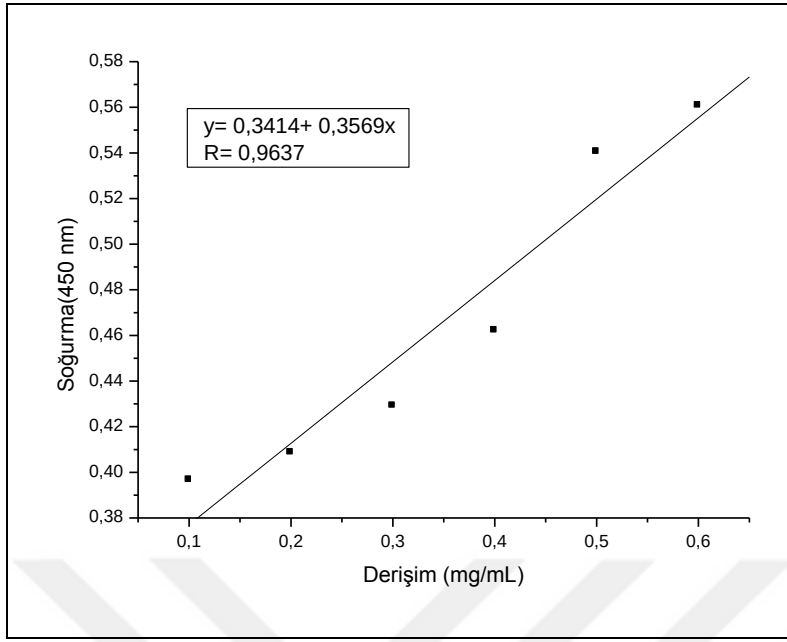
Şekil 4.18. Etilasetat çiçek özütü ve standart olarak kullanılan kersetinin farklı derişimlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları



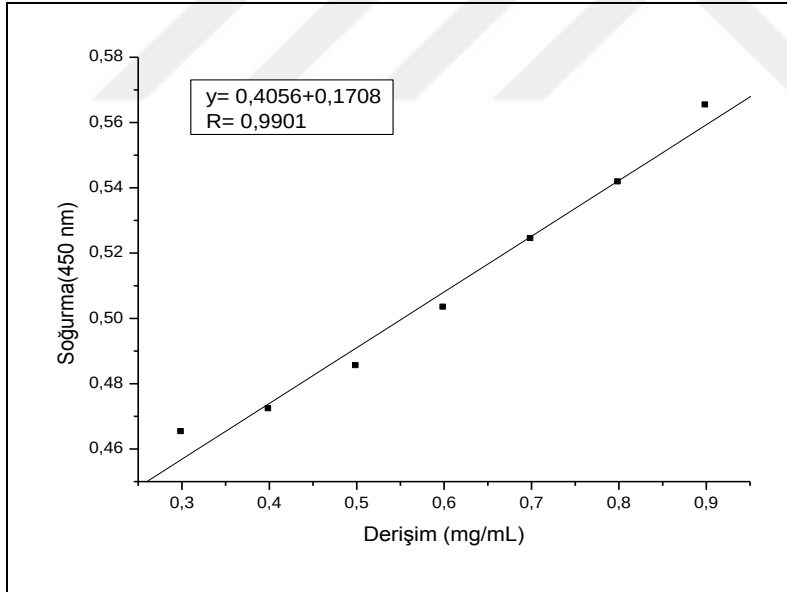
Şekil 4.19. Etüasetat meyve özü ve standart olarak kullanılan kersetinin farklı derişimlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları



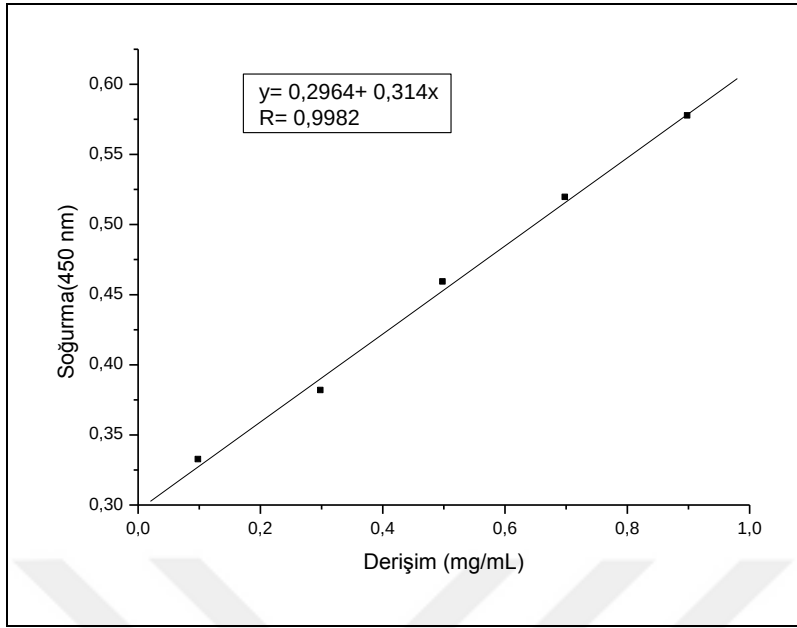
Şekil 4.20. Etüasetat yaprak özü ve standart olarak kullanılan kersetinin farklı derişimlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları



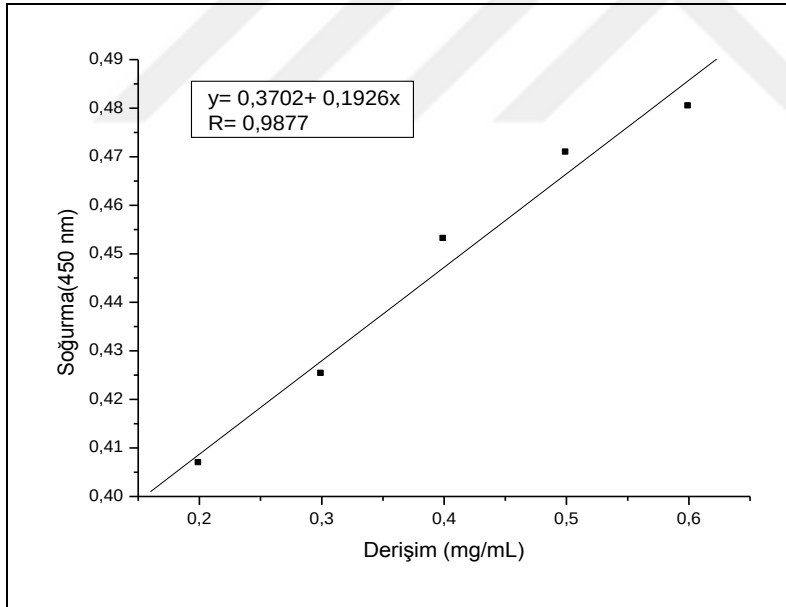
Şekil 4.21. Hekzan çiçek özütü ve standart olarak kullanılan kersetinin farklı derişimlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları



Şekil 4.22. MeOH çiçek özütü ve standart olarak kullanılan kersetinin farklı derişimlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları



Şekil 4.23. MeOH yaprak özütü ve standart olarak kullanılan kersetinin farklı derişimlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları



Şekil 4.24. MeOH meyve özütü ve standart olarak kullanılan kersetinin farklı derişimlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları

Çizelge 4.5. Özütlarin CUPRAC analizi sonucunda elde edilen QREFC (Kersetin eşdeğeri flavonoid derişimi) değeri.

Özütlar (0,1 mg/mL)	QREFC (Kersetin eşdeğeri flavonoid derişimi)
MeOH çiçek	0,164
MeOH yaprak	0,300
MeOH meyve	0,184
EtOAc yaprak	0,270
EtOAc çiçek	0,250
EtOAc meyve	0,363
DCM yaprak	0,174
DCM meyve	0,086
Hekzan çiçek	0,342

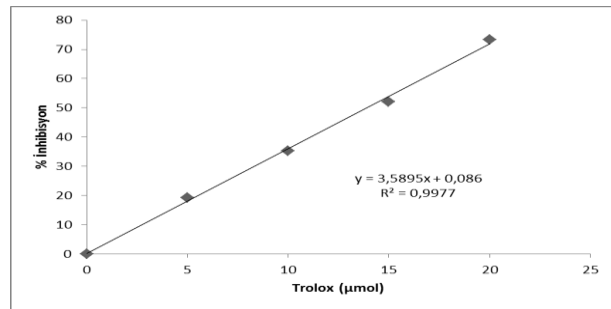
CUPRAC analizinde (0,1 mg/mL) QREFC (Kersetin eşdeğeri flavonoid derişimi) değeri en yüksek özütlar; etil asetat meyve= 0,363, metanol yaprak= 0,300 ve hekzan çiçek= 0,342 özütlari bulunmuştur.

4.4. TEAC Analiz sonuçları

TEAC değerinin tayininde Troloks standart antioksidanının ABTS•+ radikalini süpürme etkisi ölçülerek standart çalışma grafiğı çizilmiştir.

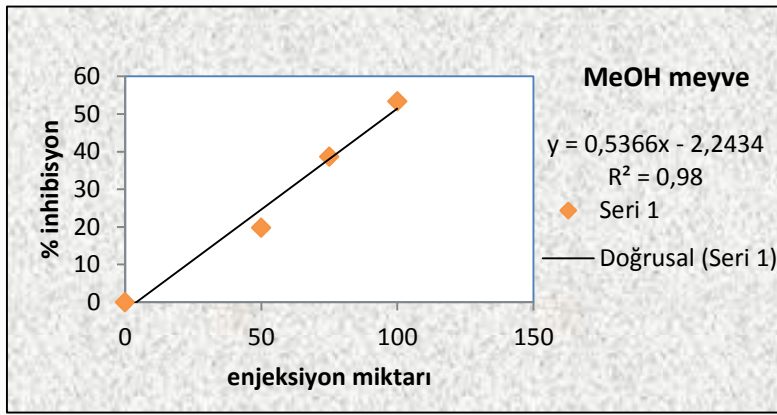
Çizelge 4.6. Trolox standardı için % inhibisyon değeri ve çalışma grafiğı

Trolox standart	
µmol derişim	% inhibisyon
0	0
5	19,23
10	35,27
15	52,10
20	73,30



Çizelge 4.7. MeOH meyve özütü (1 mg/mL)'nden eklenen miktar ve % inhibisyonları

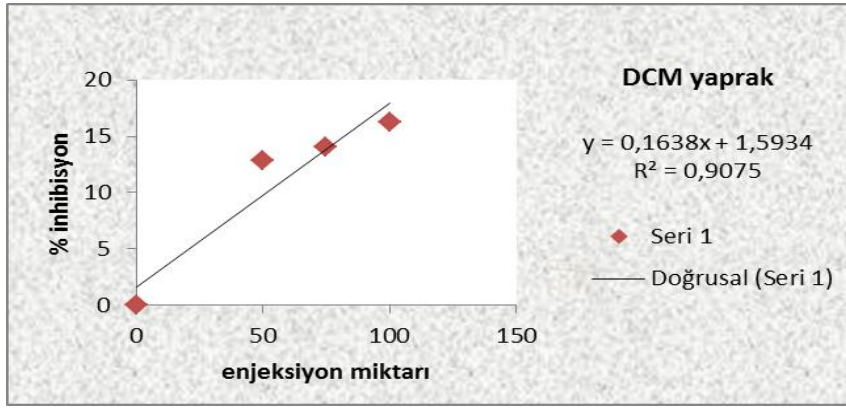
1 mg/ mL MeOH meyve	
μmol derişim	% inhibisyon
0	0
150	19,79
75	38,62
100	53,35



Şekil 4.25. Yaban eriği MeOH meyve özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS^{•+} radikalini süpürme etkisi

Çizelge 4.8. DCM yaprak özütü (1 mg/mL)'nden eklenen miktar ve % inhibisyonları

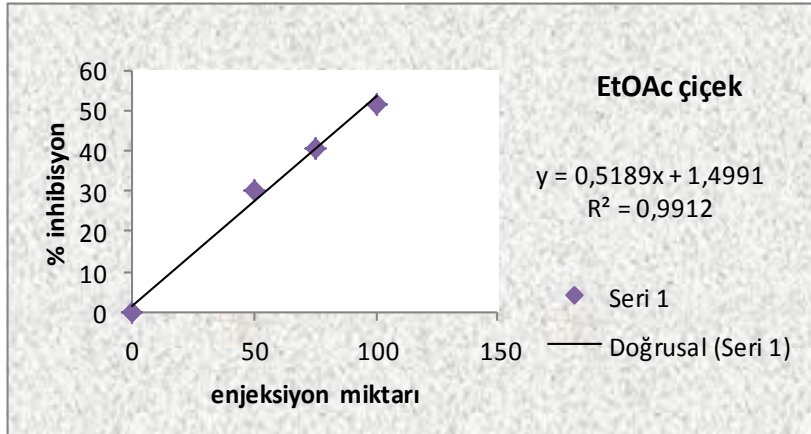
1 mg/ mL DCM yaprak	
μmol derişim	% inhibisyon
0	0
50	12,86
75	14,1
100	16,27



Şekil 4.26. Yaban eriği DCM yaprak özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS^{•+} radikalini süpürme etkisi

Çizelge 4.9. Etilasetat çiçek özütü (1 mg/mL)'nden eklenen miktar ve % inhibisyonları

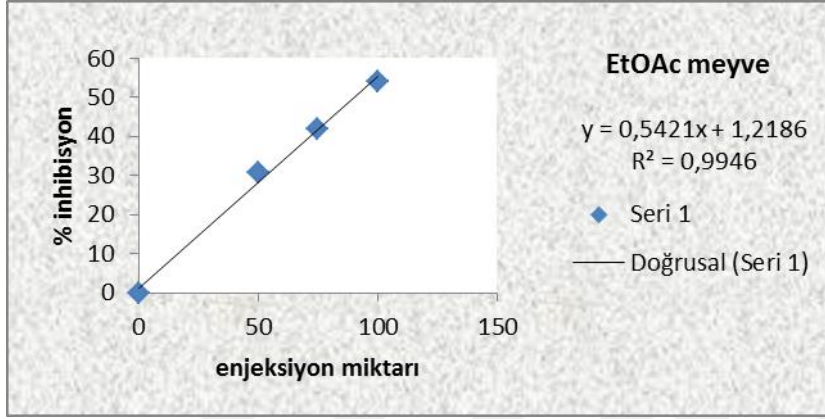
1 mg/ mL EtOAc çiçek	
μmol derişim	% inhibisyon
0	0
50	30,27
75	40,77
100	51,72



Şekil 4.27. Yaban eriği etilasetat çiçek özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS^{•+} radikalini süpürme etkisi.

Çizelge 4.10. Etilasetat meyve özütü (1 mg/mL)'nden eklenen miktar ve % inhibisyonları

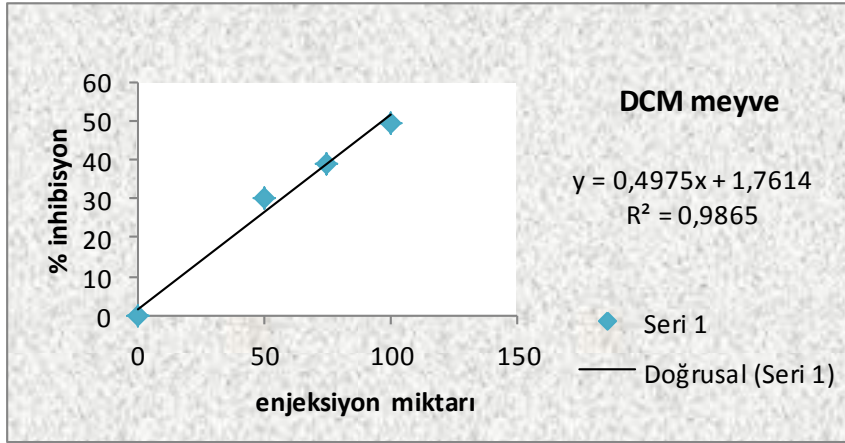
1 mg/ mL EtOAc meyve	
μmol derişim	% inhibisyon
0	0
50	30,71
75	41,98
100	54,16



Şekil 4.28. Yaban eriği etilasetat meyve özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS^{•+} radikalini süpürme etkisi

Çizelge 4.11. DCM meyve özütü (1 mg/mL)'nden eklenen miktar ve % inhibisyonları

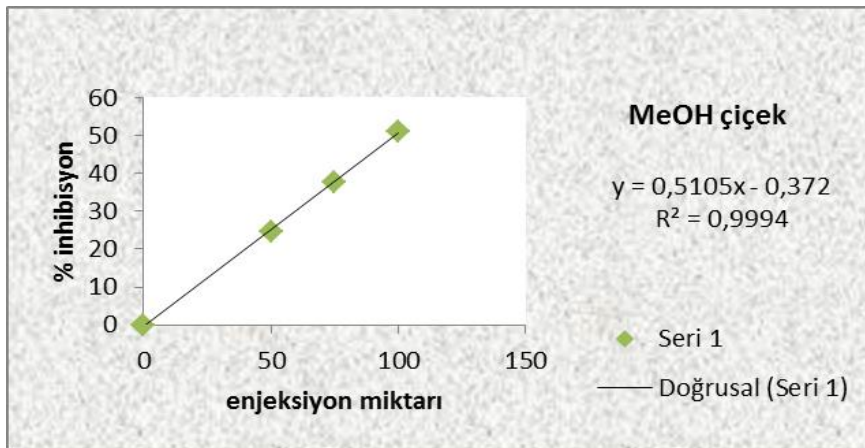
1 mg/ mL DCM meyve	
μmol derişim	% inhibisyon
0	0
50	30,12
75	39,15
100	49,71



Şekil 4.29. Yaban eriği DCM meyve özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS^{•+} radikalini süpürme etkisi

Çizelge 4.12. MeOH çiçek özütü (1 mg/mL)'nden eklenen miktar ve % inhibisyonları

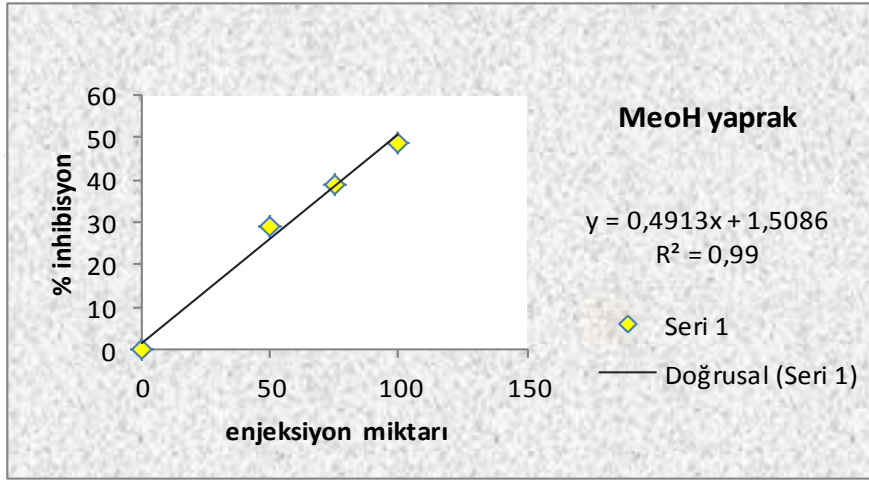
1 mg/ mL MeOH çiçek	
µmol derişim	İnhibisyon
0	0
50	24,48
75	37,77
100	51,12



Şekil 4.30. Yaban eriği MeOH çiçek özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS^{•+} radikalini süpürme etkisi

Çizelge 4.13. MeOH yaprak özütü (1 mg/mL)'nden eklenen miktar ve % inhibisyonları

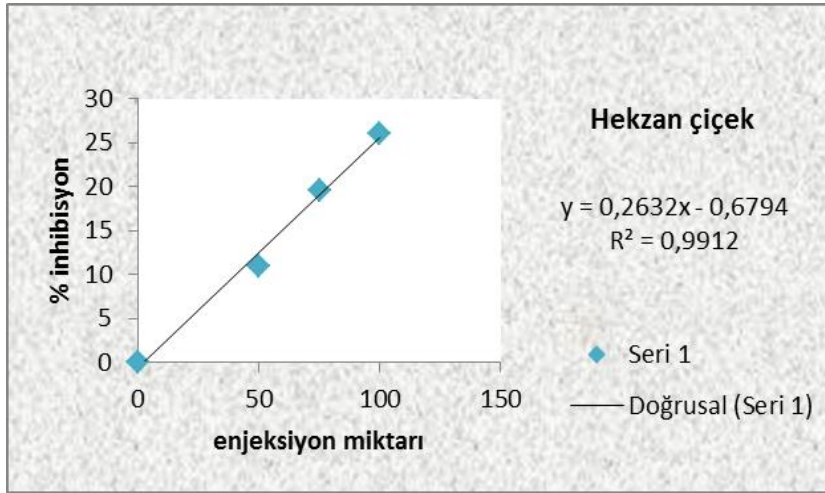
1 mg/ mL MeOH yaprak	
μmol derişim	% inh
0	0
50	28,9
75	38,74
100	48,94



Şekil 4.31. Yaban eriği MeOH yaprak özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS^{•+} radikalini süpürme etkisi

Çizelge 4.14. Hekzan çiçek özütü (1 mg/mL)'nden eklenen miktar ve % inhibisyonları

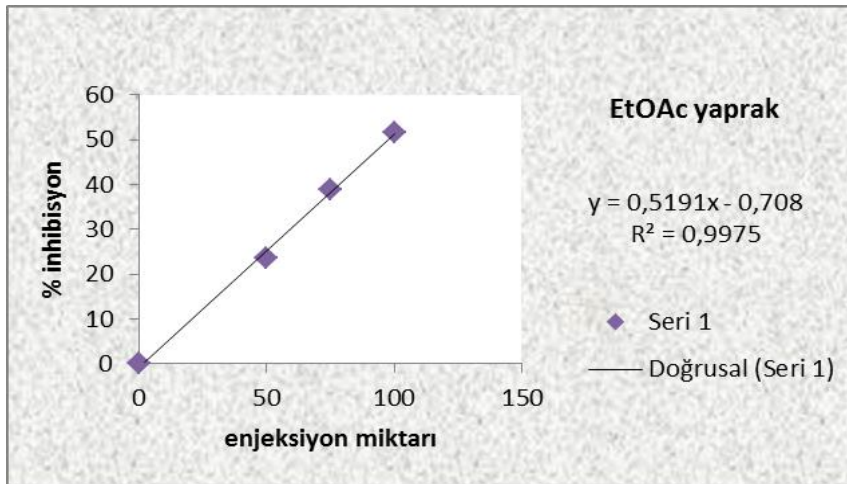
1 mg/ mL Hekzan çiçek	
μmol derişim	% inhibisyon
0	0
50	10,9
75	19,51
100	26,1



Şekil 4.32. Yaban eriği hekzan çiçek özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS^{•+} radikalini süpürme etkisi

Çizelge 4.15. Etilasetat yaprak özütü (1 mg/mL)'nden eklenen miktar ve % inhibisyonları

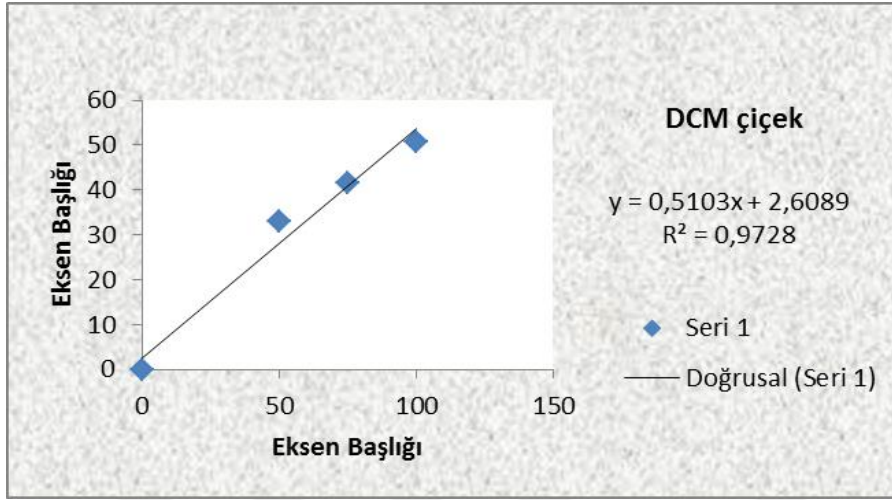
1 mg/ mL EtOAc yaprak	
μmol derişim	% inhibisyon
0	0
50	23,58
75	38,73
100	51,66



Şekil 4.33. Yaban eriği etilasetat yaprak özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS^{•+} radikalini süpürme etkisi

Çizelge 4.16. DCM çiçek özütü (1 mg/mL)'nden eklenen miktar ve % inhibisyonları

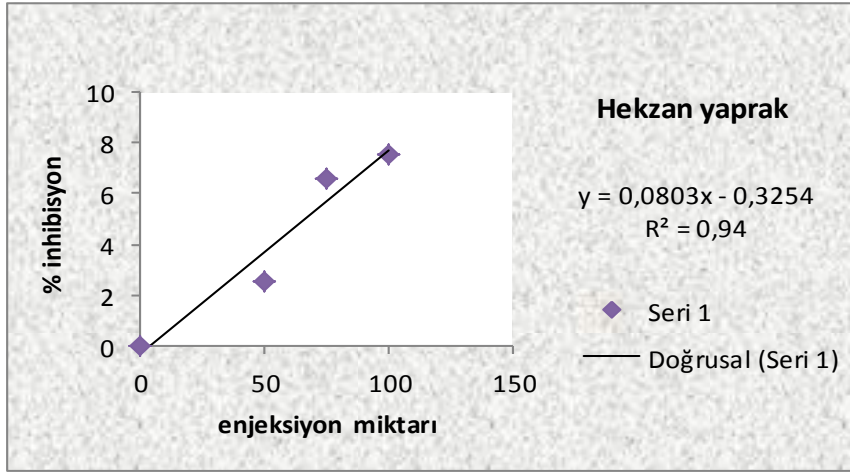
1 mg/ mL DCM çiçek	
μmol derişim	% inhibisyon
0	0
50	33,06
75	41,45
100	50,75



Şekil 4.34. Yaban eriği DCM çiçek özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS^{•+} radikalini süpürme etkisi

Çizelge 4.17. Hekzan yaprak özütü (1 mg/mL)'nden eklenen miktar ve % inhibisyonları

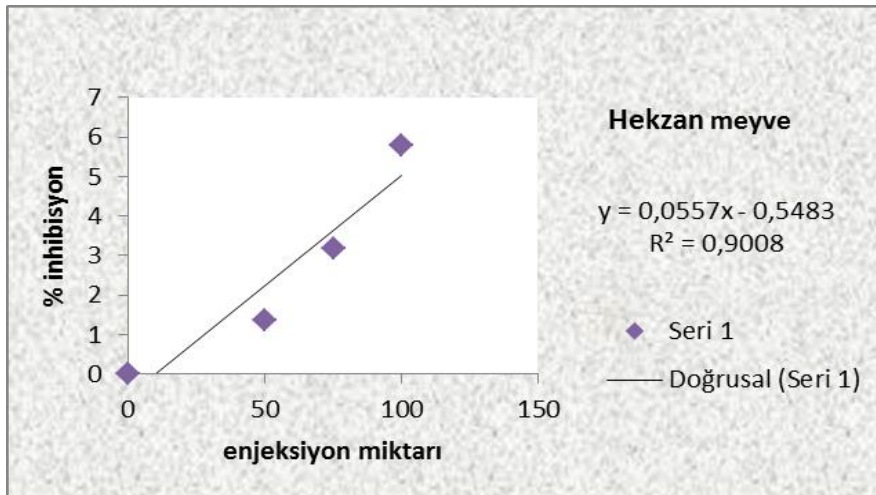
1 mg/mL Hekzan yaprak	
μmol derişim	% inh
0	0
50	2,57
75	6,63
100	7,56



Şekil 4.35. Yaban eriği hekzan yaprak özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS^{•+} radikalini süpürme etkisi

Çizelge 4.18. Hekzan meyve özütü (1 mg/mL)’nden eklenen miktar ve % inhibisyonları

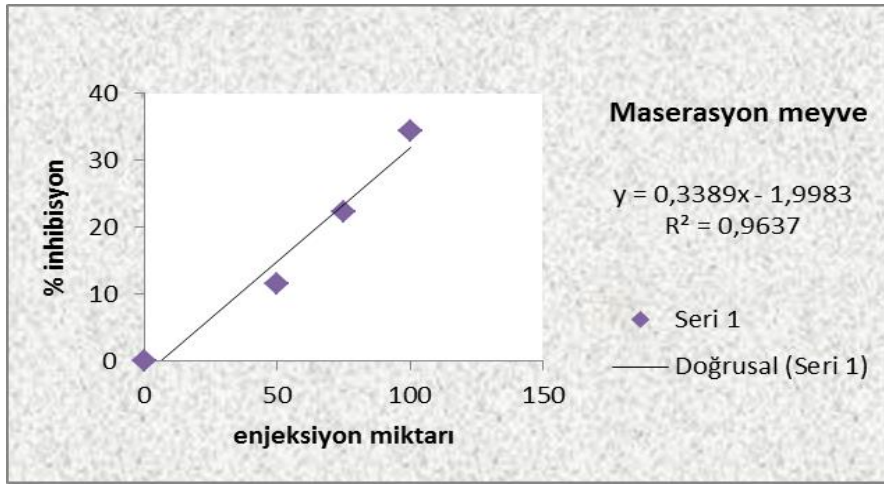
1 mg/mL Hekzan meyve	
µmol derişim	% inhibisyon
0	0
50	1,37
75	3,17
100	5,8



Şekil 4.36. Yaban eriği hekzan meyve özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS^{•+} radikalini süpürme etkisi

Çizelge 4.19. Maserasyon meyve özütü (1 mg/mL)'nden eklenen miktar ve % inhibisyonları

1 mg/mL Maserasyon meyve	
μmol derişim	% inhibisyon
0	0
50	11,53
75	22,26
100	34,47



Şekil 4.37. Yaban eriği maserasyon meyve özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS^{•+} radikalini süpürme etkisi

(SF1/ Madde miktarı)*(Eğim örnek/Eğim trolox)= mMol trolox / g özüt (TEAC DEĞERİ)

Çizelge 4.20. Özütlerin TEAC değerleri

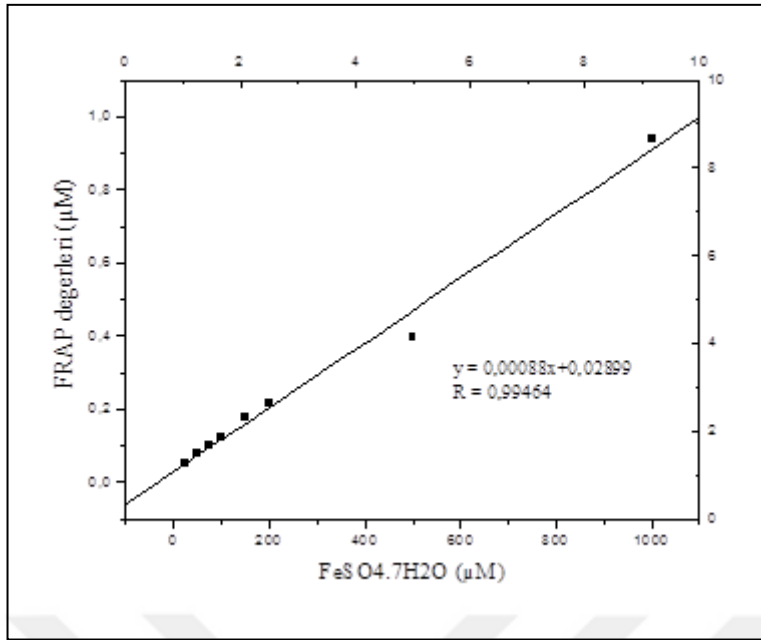
Örnek (1 mg/mL)	Madde miktarı	Seyreltme faktörü SF1 (1 g örnek)	PBS ile seyreltme faktörü (SF2)	Eğim örnek	Eğim örnek/ Eğim trolox (TEAC ABTS ⁺) DEĞERİ	mmol trolox/ g extract (TEAC DEĞERİ)
MeOH meyve	0,5	23	1	0,5366	0,149	6,854
DCM yaprak	0,1	19	1	0,1638	0,045	8,550
EtOAc çiçek	0,5	23	1	0,5189	0,145	6,670
EtOAc meyve	0,1	19	1	0,5421	0,151	28,69
DCM meyve	0,1	19	1	0,4975	0,138	26,22
MeOH çiçek	0,5	23	1	0,5105	0,142	6,532
MeOH yaprak	0,5	23	1	0,4913	0,136	6,256
Hekzan çiçek	0,1	19	1	0,2632	0,073	13,87
EtOAc yaprak	0,3	21	1	0,5191	0,144	10,08
DCM çiçek	0,1	19	1	0,5103	0,142	26,98
Hekzan meyve	0,5	23	1	0,0557	0,015	0,690
Hekzan yaprak	0,3	21	1	0,0803	0,022	1,540
Maserasyon meyve	0,5	23	1	0,3389	0,094	4,324

Özütlerin TEAC değerlerinin karşılaştırılması;

Etil asetat meyve > DCM çiçek > DCM meyve > Hekzan çiçek > Etil asetat yaprak
>DCM yaprak > Metanol meyve > Etil asetat çiçek >Metanol çiçek> Metanol yaprak>
Maserasyon meyve > Hekzan yaprak > Hekzan meyve

4.5. FRAP (Demir İyon İndirgeyici Antioksidan Güç) Analiz Sonuçları

TEAC ve FRAP yöntemleri genellikle özütlerin içeriğindeki vitaminler ile ilişkilidir. Bu yöntemde Fe⁺³'i, Fe⁺²'ye indirgeyen antioksidanların hangi özütte daha etkin olduğu belirlenmiş olup, 1 mg/mL örnek çözeltilere göre sonuçlandırılmıştır. Standart olarak 50-1000 µM arasındaki FeSO₄.7H₂O derişimleri kullanılmıştır. Örneklerin FRAP değerleri FeSO₄ mM/g özüt şeklinde hesaplanmıştır.



Şekil 4.38. FRAP yönteminde kullanılan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ standart grafiği. SS (hata değeri): 0,03302; ($P < 0,0001$)

Çizelge 4.21. Özütlere FRAP değerleri (mM FeSO_4/g özütle)

Özütle	Soğurma değeri	FRAP değeri (mM FeSO_4/g özütle)
DCM yaprak	0,285	320,0
DCM meyve	0,602	651,0
Etil asetat çiçek	0,401	423,3
Etil asetat meyve	0,531	570,9
Etil asetat yaprak	0,362	378,5
Metanol çiçek	0,485	518,2
Metanol yaprak	0,615	666,3
Metanol meyve	0,270	273,8
Hekzan çiçek	0,236	235,5

FRAP değerlerinin karşılaştırılması:

Metanol yaprak > DCM meyve > Etil asetat meyve > Metanol çiçek > Etil asetat çiçek > Etil asetat yaprak > DCM yaprak > Metanol meyve > Hekzan çiçek

4.6. Enzim Aktivite Sonuçları

Yaban eriği özütlerinin enzim inhibisyon çalışmaları 2 tekrarlı olarak çalışılmıştır. İnhibitör olarak PMSF inhibitörü kontrol olarak ise DMSO çözücüsü kullanılmıştır. Eğer özütler enzimleri büyük oranda inhibe etmiş olsalardı elde edilen spektrumlar kullanılan inhibitörün spektrumu ile aynı olması gerekirdi. Kontrol ve aktif özütlerin enzim, substrat ve tampon çözelti ile verdiği reaksiyon grafiğinden V_{maks} değerleri elde edilmiştir. Enzim inhibisyon çalışmaları 2 tekrarlı çalışıldığından elde edilen iki V_{maks} değerinin ortalaması alınmış, kontrol ve özütlerin V_{maks} 'ları arasındaki fark belirlenip özütleri kıyaslamak amacıyla en yüksek % inhibisyon değeri 100 olarak kabul edilerek bunun üzerinden % inhibisyon değerleri belirlenmiştir.

Tekrarlanan ölçümlere bakıldığında 410 nm'de soğurmalarına karşı elde edilen V_{maks} 'lar (mili-units per min) arasındaki farktan yararlanılarak % inhibisyonları hesaplanmıştır. Negatif olarak hesaplanan % inhibisyon değerleri '-' şeklinde belirtilmiştir.

$$\text{İnhibisyon (\%)} = [(Soğurma(kontrol)) - (Soğurma (test))] / Soğurma (kontrol)] \times 100 \quad (4.1)$$

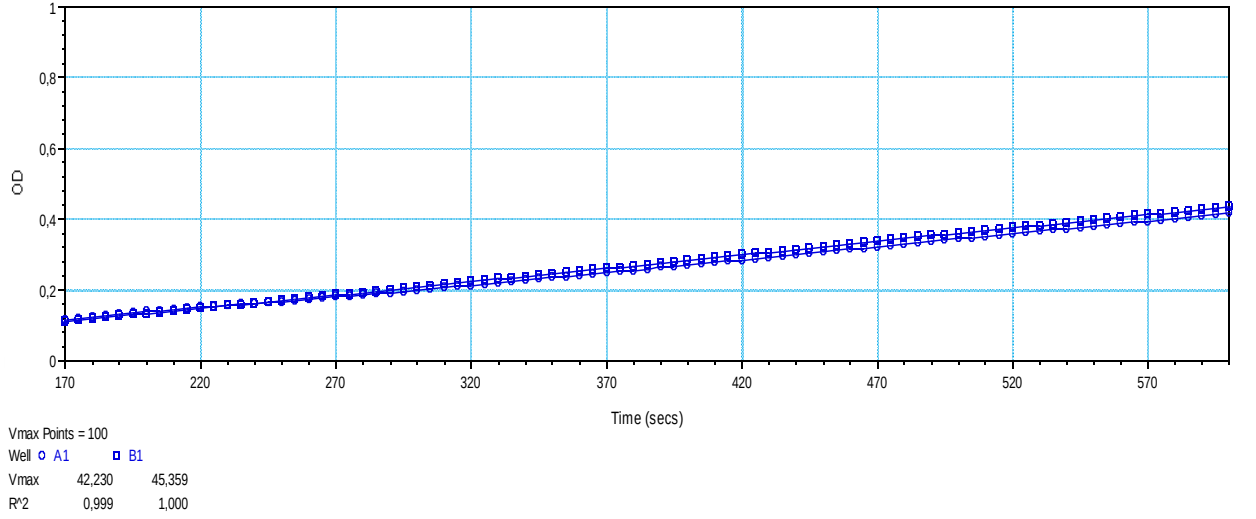
4.6.1. Proteaz İnhibisyonu

Çizelge 4.22. α -Kimotripsin enzimi % inhibisyon değerleri

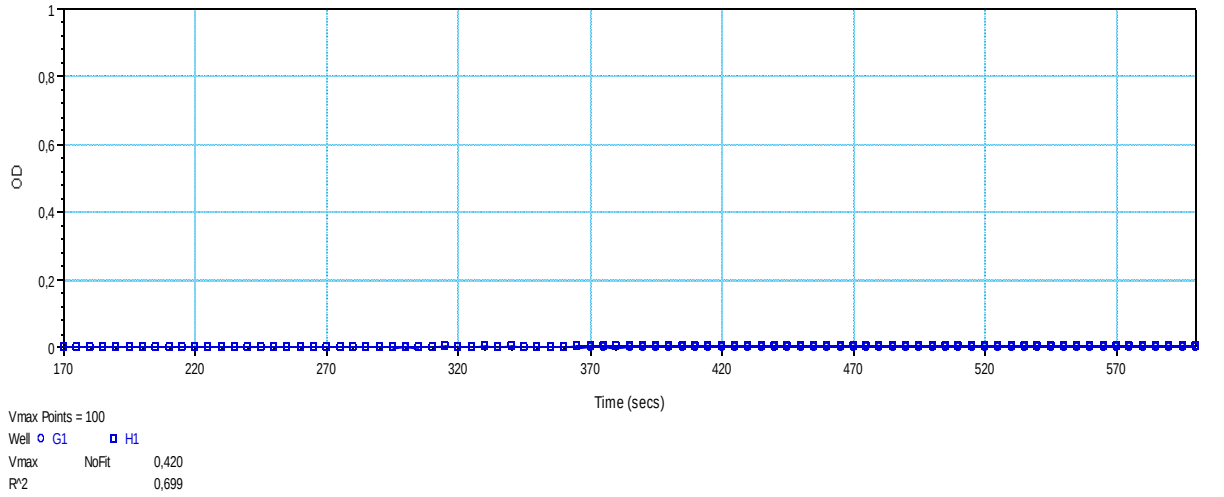
	1 mg/mL		10 mg/mL	
Özütler	V_{max}	% inhibisyon	V_{max}	% inhibisyon
Metanol yaprak	30,40	20,77	71,55	11,78
Metanol meyve	36,31	5,34	69,54	14,25
Metanol çiçek	38,20	0,39	43,60	22,67
DCM yaprak	33,60	12,40	42,90	23,93
DCM meyve	36,83	3,98	53,29	5,48
Etilasetat meyve	36,60	4,61	21,15	22,24
Etilasetat çiçek	39,32	-	21,66	20,36
Etil asetat yaprak	38,88	-	21,60	20,58
Maserasyon meyve (MeOH)	49,03	-	25,67	5,60
Hekzan çiçek	47,22	-	24,75	9,00

α -Kimotripsin enziminin inhibisyon sonuçlarına bakıldığında; metanol yaprak özütü dışındaki diğer meyve, yaprak ve çiçek özütlerinde özüt derişimi artırıldığında % inhibisyon değerlerinin de arttığı görülmektedir. Özütlerin % inhibisyon değerleri

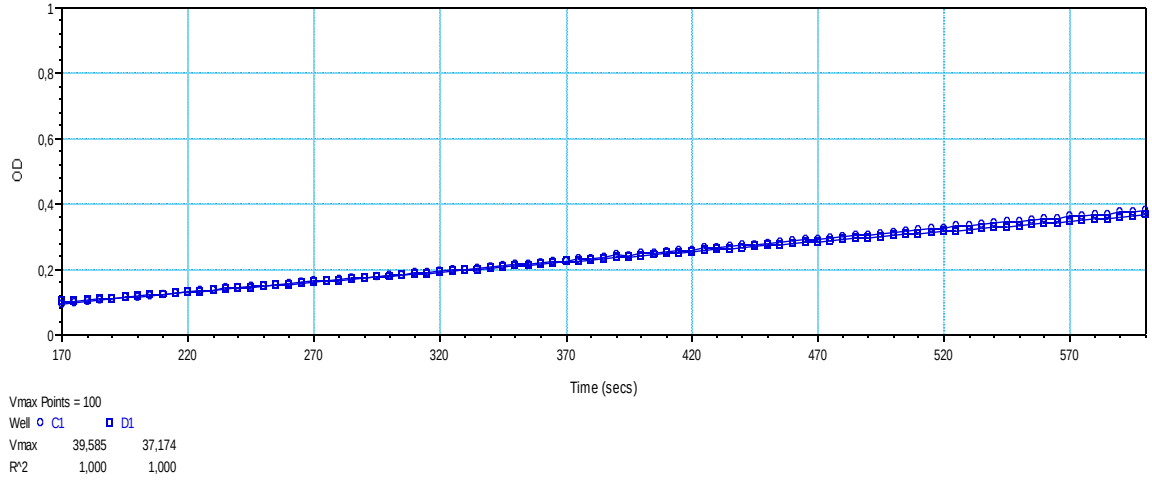
karşılaştırıldığında; 10 mg /mL lik derişimlerde yaban eriğı etil asetat meyve özütünün, çiçeğinde metanol çiçek özütünün, yaprağında ise diklorometan yaprak özütünün daha yüksek inhibisyona sahip olduğı belirlenmiştir.



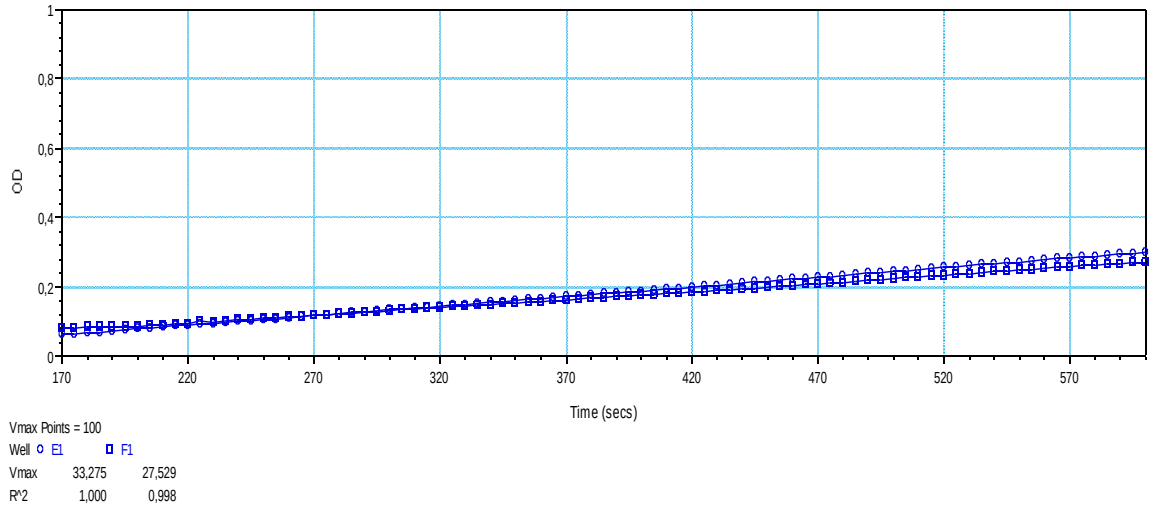
Şekil 4.39. Substrat+ Enzim (α -kimotripsin)+ Tampon çözeltinin verdiğı reaksiyon grafiğı



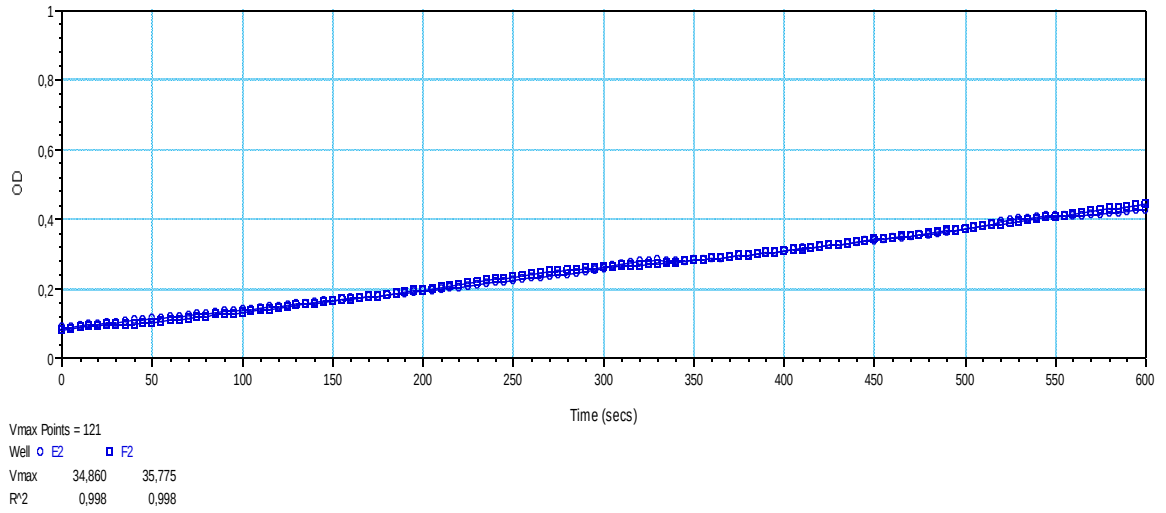
Şekil 4.40. PMSF+ Substrat+ Enzim (α -kimotripsin)+ Tampon çözeltinin verdiğı reaksiyon grafiğı



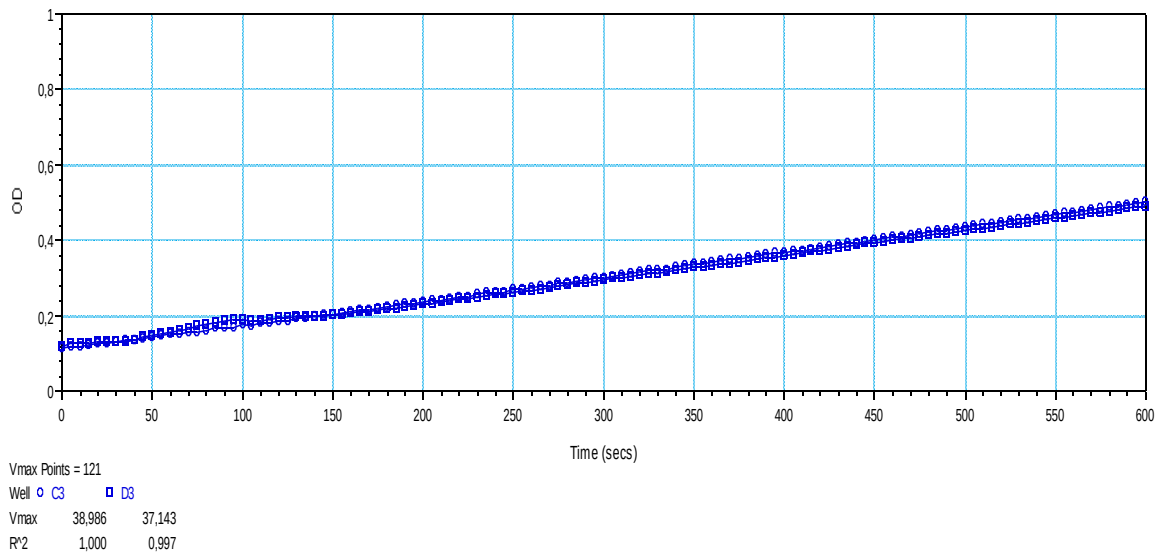
Şekil 4.41. DMSO+ Substrat+ Enzim (α -kimotripsin)+ Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon grafiği



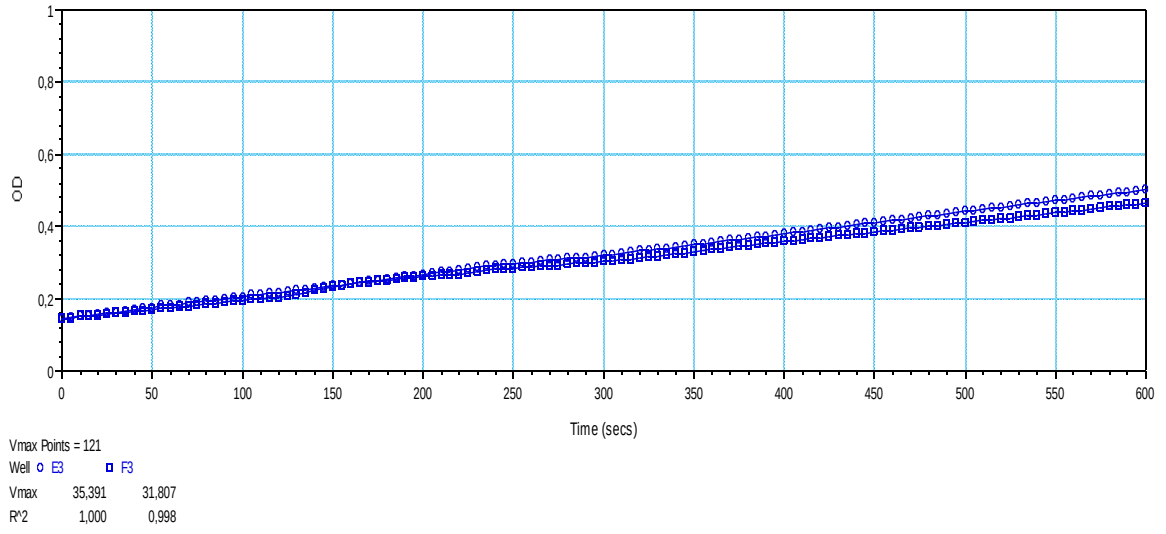
Şekil 4.42. Yaban eriğinin MeOH yaprak özütünün (1 mg/ mL'lik özütler) α -kimotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



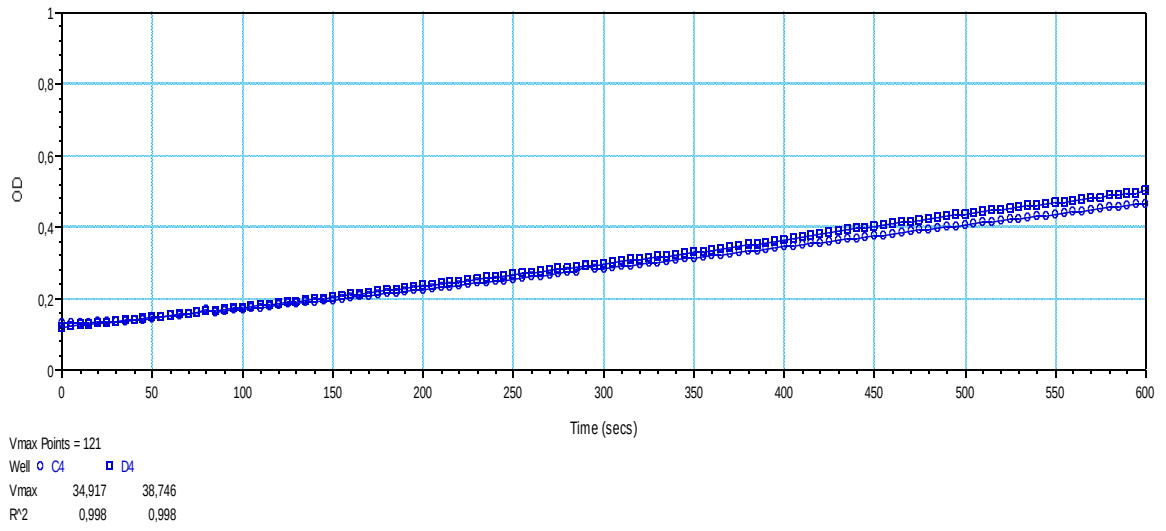
Şekil 4.43. Yaban eriğinin MeOH meyve özütünün (1 mg/ mL’lik özütler) α -kimotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



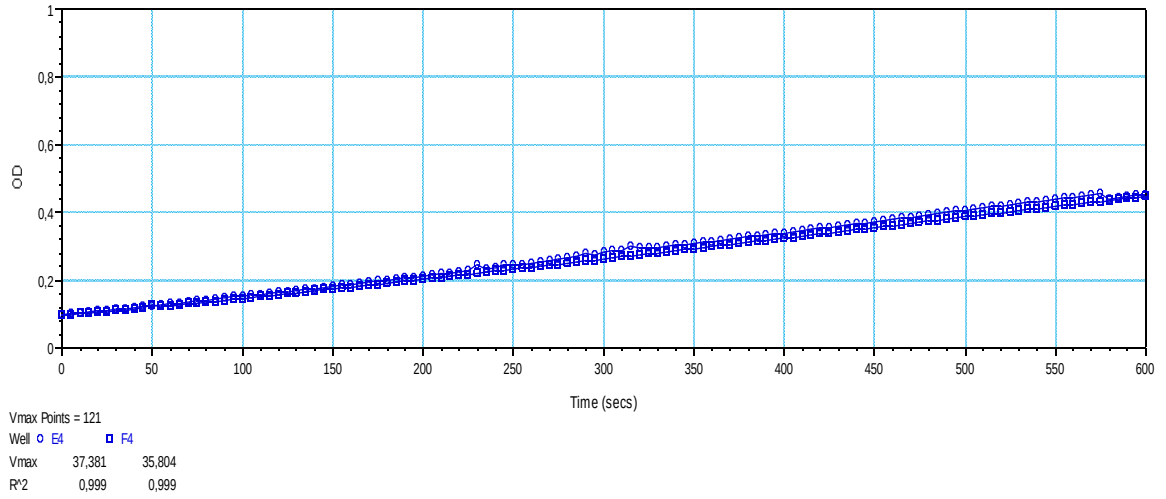
Şekil 4.44. Yaban eriğinin MeOH çiçek özütünün (1 mg/ mL’lik özütler) α -kimotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



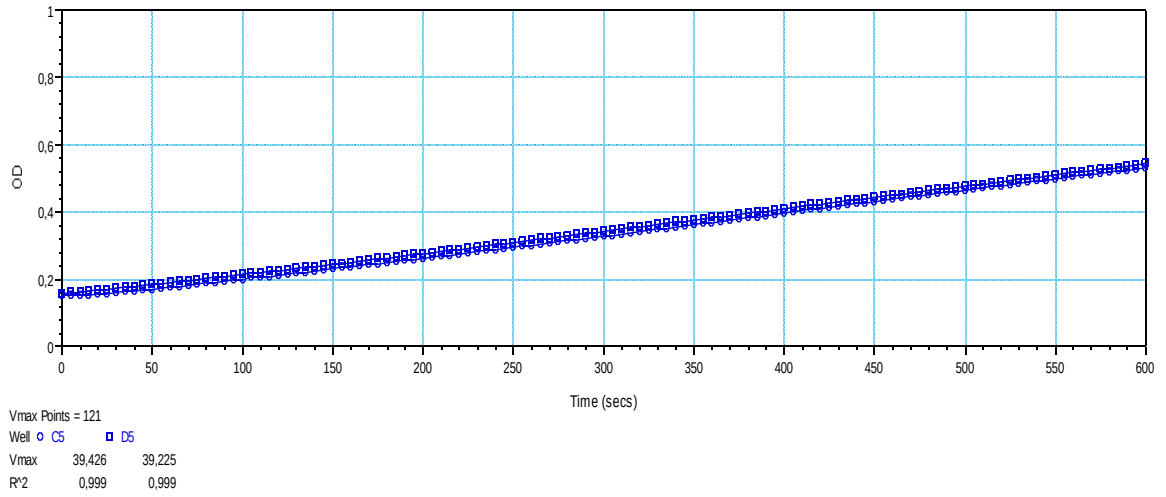
Şekil 4.45. Yaban eriğinin DCM yaprak özütünün (1 mg/ mL'lik özütler) α -kimotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



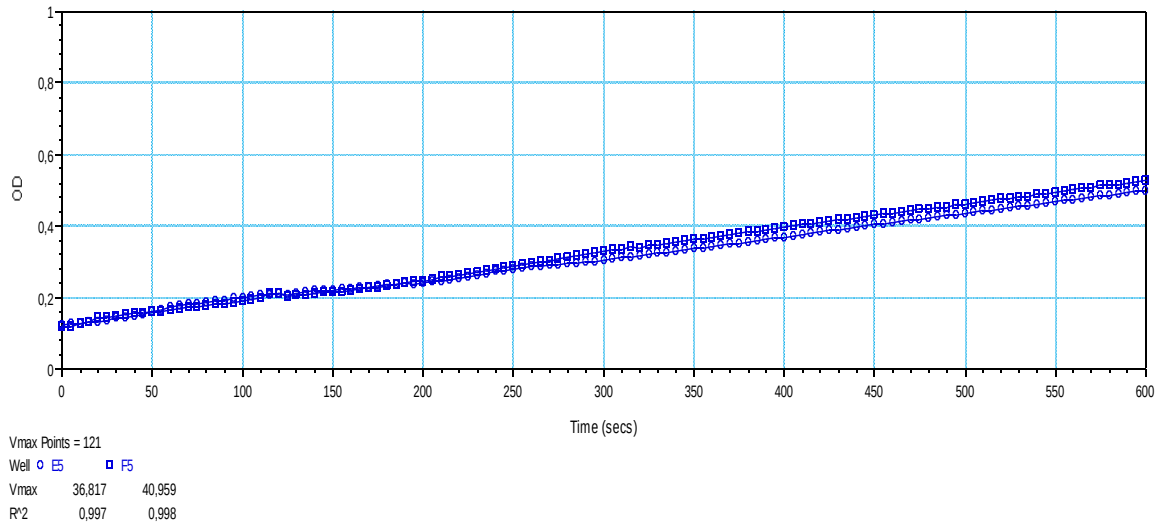
Şekil 4.46. Yaban eriğinin DCM meyve özütünün (1 mg/ mL'lik özütler) α -kimotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



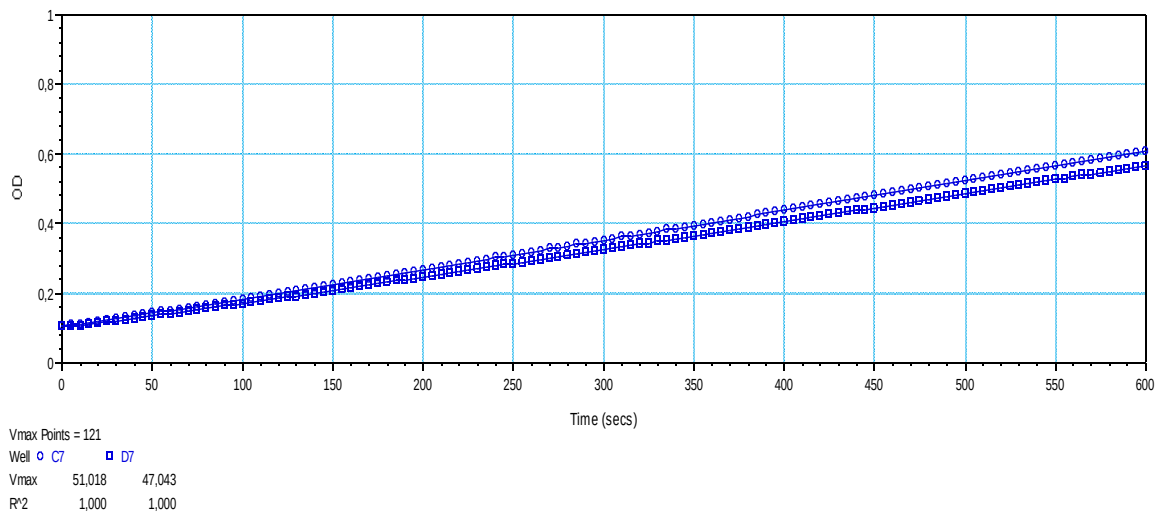
Şekil 4.47. Yaban eriğinin etilasetat meyve özütünün (1 mg/ mL'lik özütler) α -kimotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



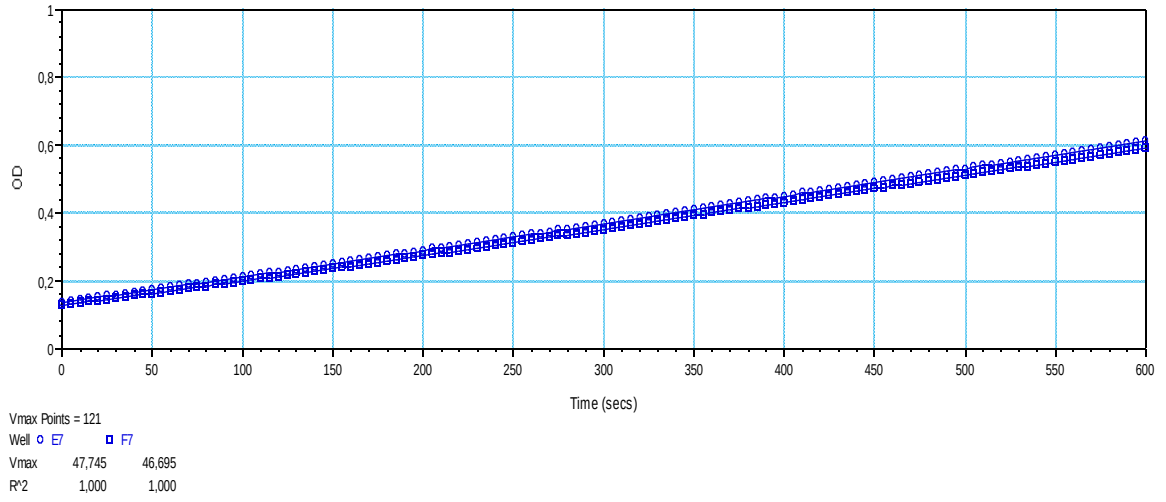
Şekil 4.48. Yaban eriğinin etilasetat çiçek özütünün (1 mg/ mL'lik özütler) α -kimotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



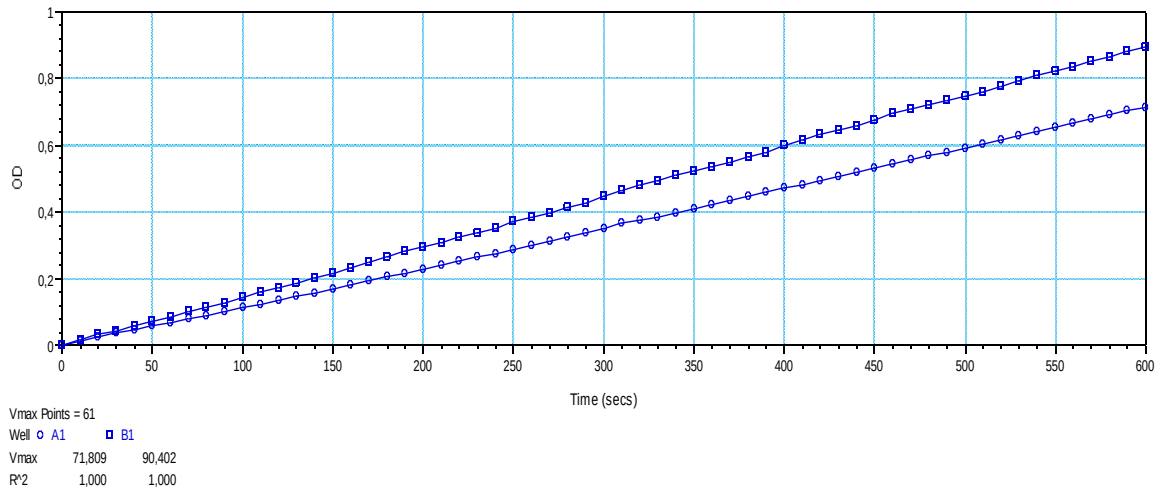
Şekil 4.49. Yaban eriğinin etilaseat yaprak özütünün (1 mg/ mL'lik özütler) α -kimotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



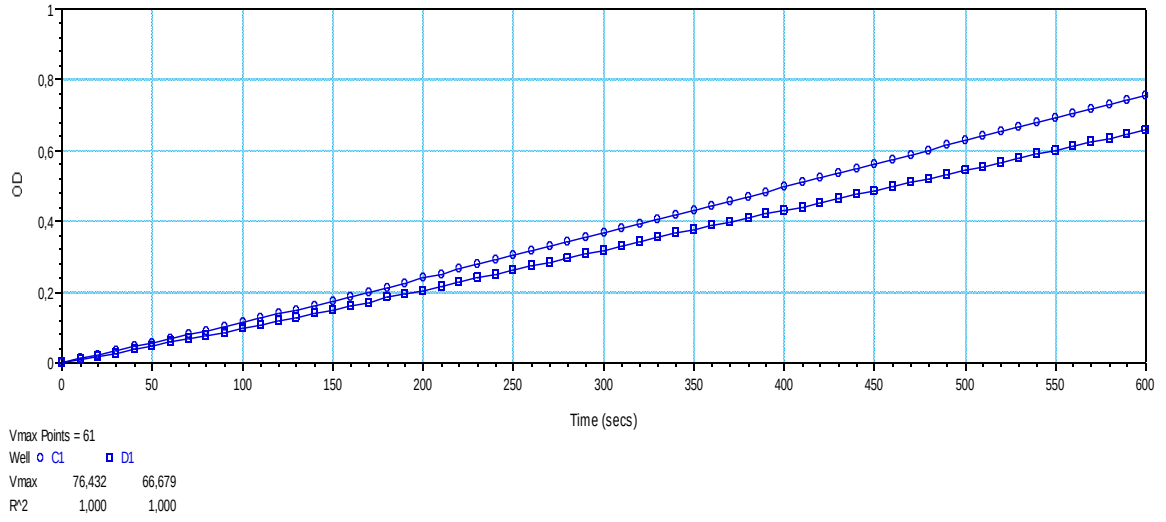
Şekil 4.50. Yaban eriğinin maserasyon meyve özütünün (1 mg/ mL'lik özütler) α -kimotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



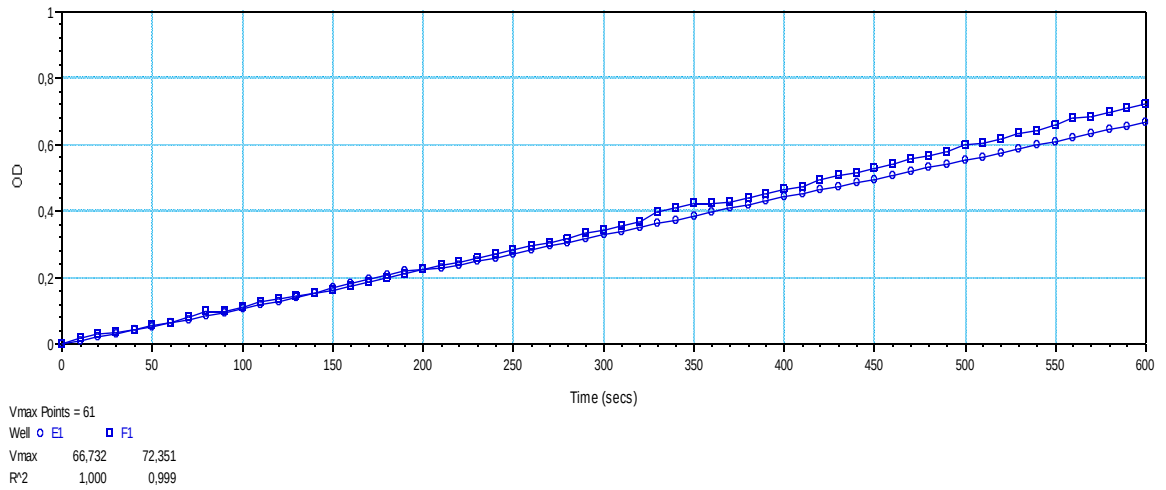
Şekil 4.51. Yaban eriğinin hekzan çiçek özütünün (1 mg/mL'lik özütler) a-kimotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



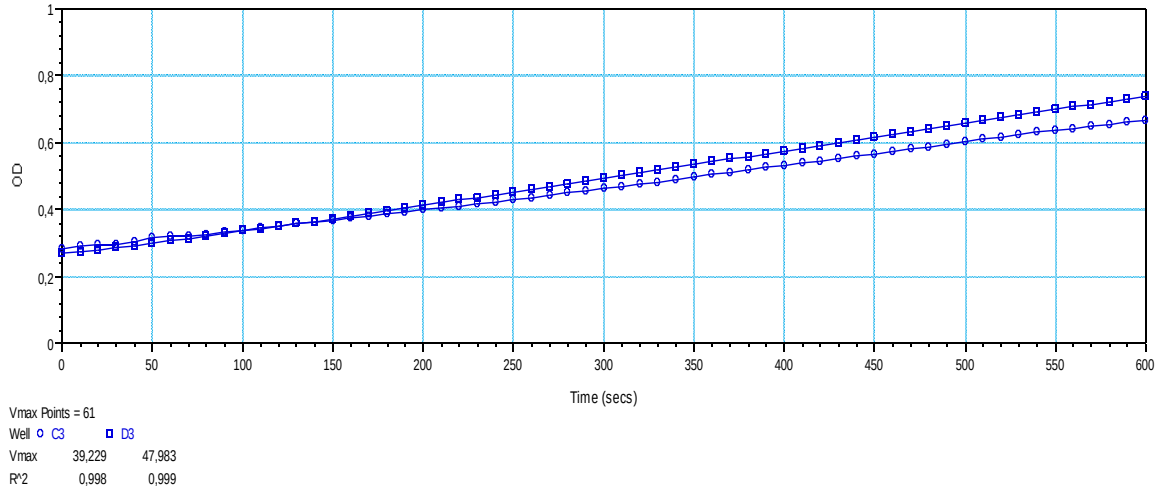
Şekil 4.52. DMSO+ Substrat+ Enzim (α -kimotripsin)+ Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon grafiği (10 mg/mL'lik özütler için)



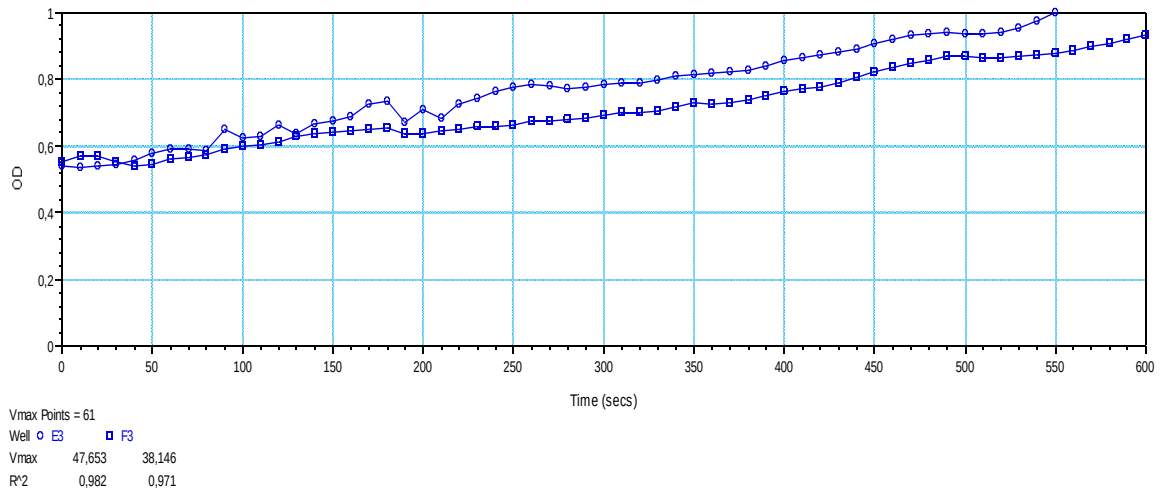
Şekil 4.53. Yaban eriğinin MeOH yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özütler) α -kimotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



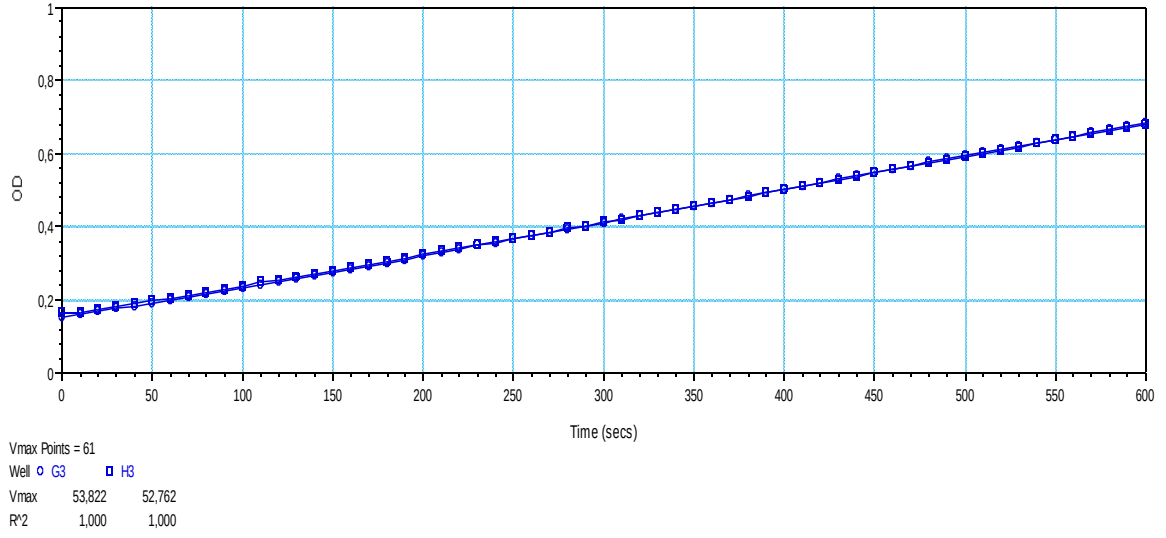
Şekil 4.54. Yaban eriğinin MeOH meyve özütünün (10 mg/mL’lik özütler) α -kimotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



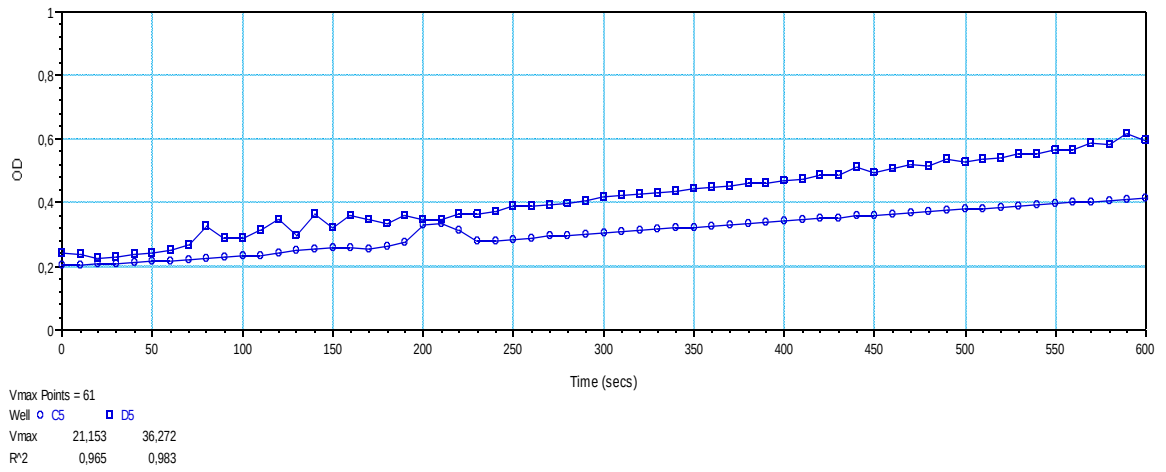
Şekil 4.55. Yaban eriğinin MeOH çiçek özütünün (10 mg/mL’lik özütler) α -kimotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



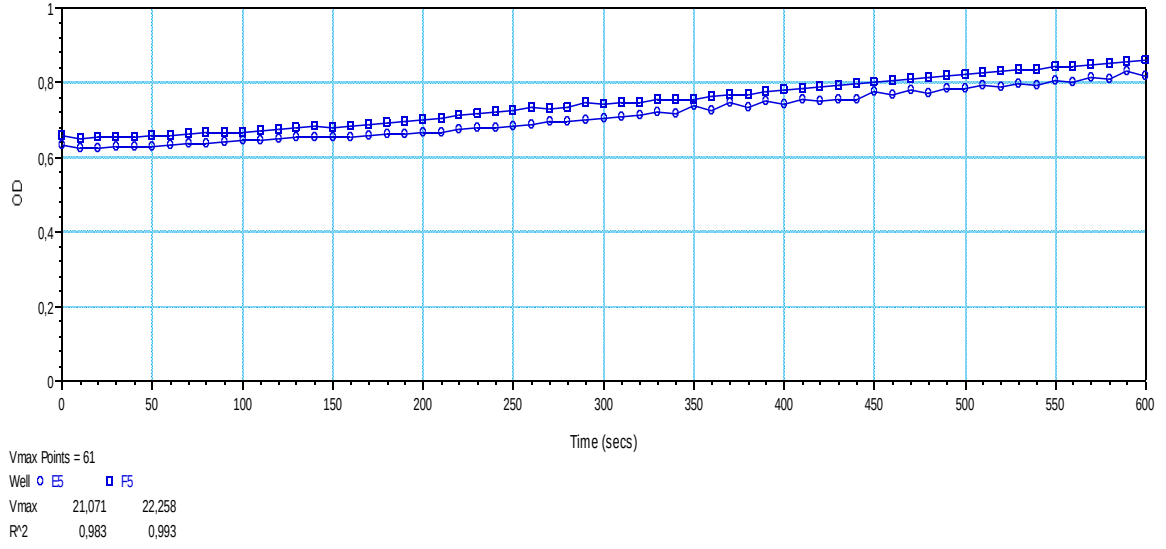
Şekil 4.56. Yaban eriğinin DCM yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özütler) α -kimotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



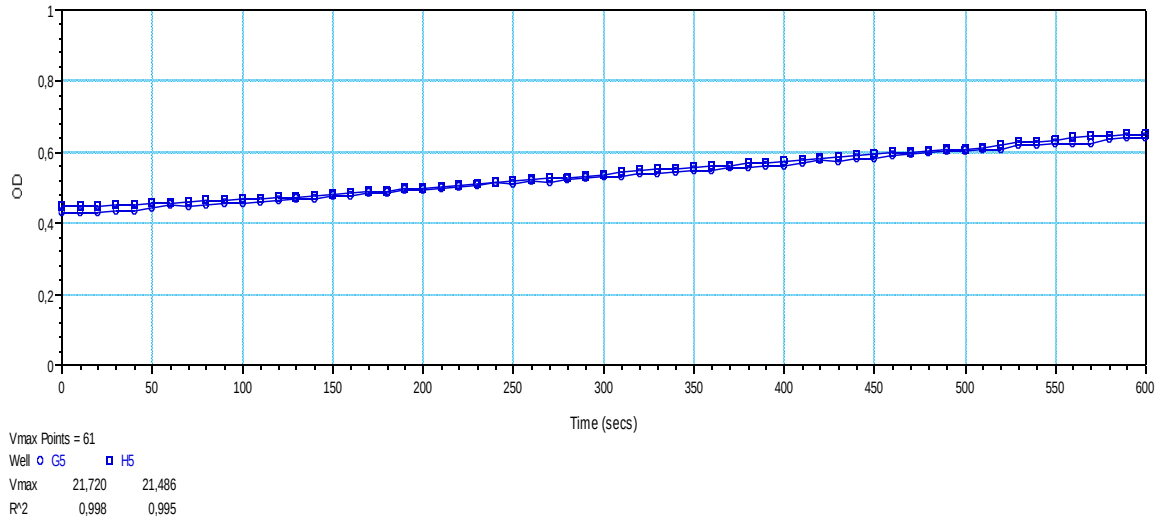
Şekil 4.57. Yaban eriğinin DCM meyve özütünün (10 mg/mL’lik özütler) α -kimotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



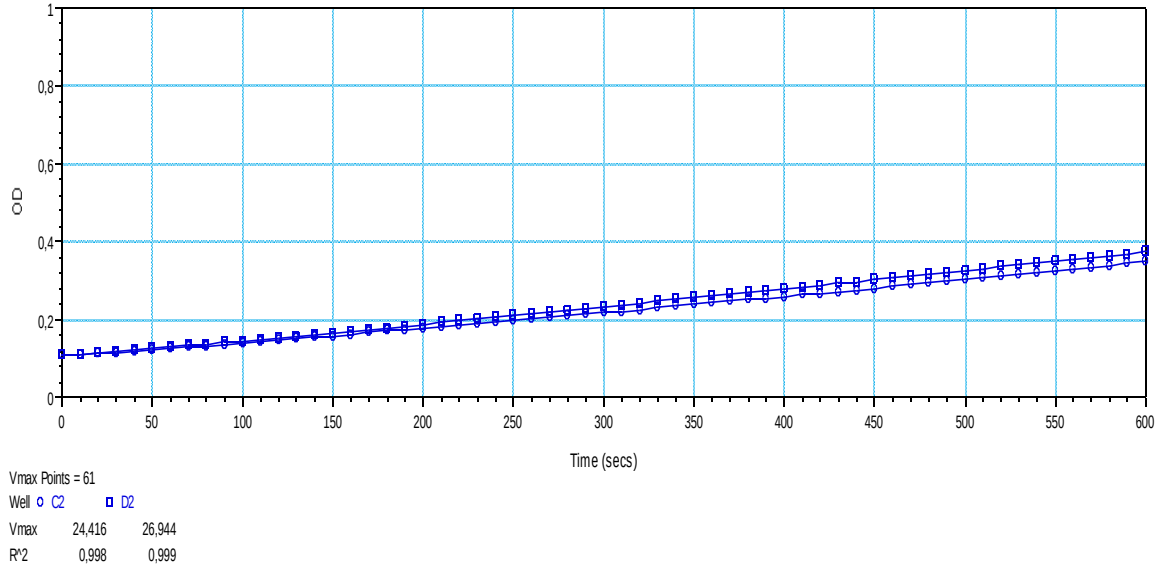
Şekil 4.58. Yaban eriğinin etilasetat meyve özütünün (10 mg/mL’lik özütler) α -kimotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



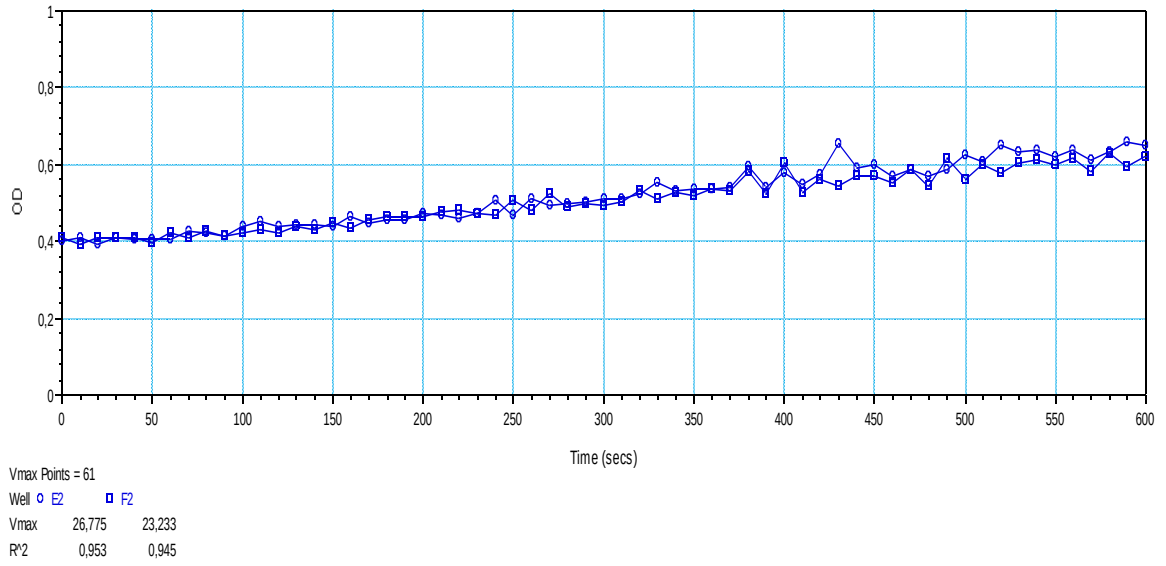
Şekil 4.59. Yaban eriğinin etilasetat çiçek özütünün (10 mg/mL’lik özütler) α -kimotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



Şekil 4.60. Yaban eriğinin etilasetat yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özütler) α -kimotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



Şekil 4.61. Yaban eriğinin maserasyon meyve özütünün (10 mg/mL'lik özütler) α -kimotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği

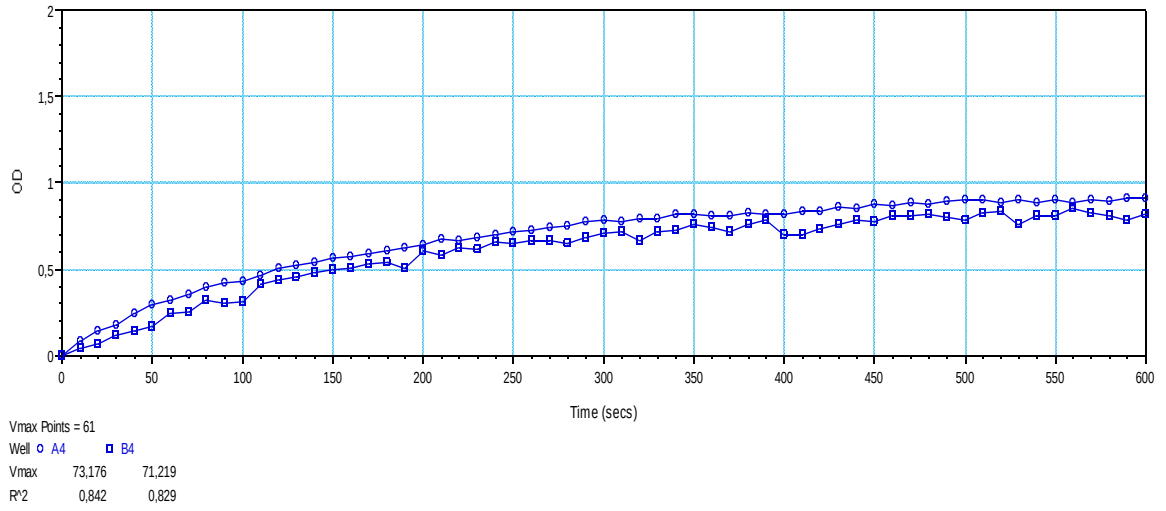


Şekil 4.62. Yaban eriğinin hekzan çiçek özütünün (10 mg/mL'lik özütler) α -kimotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği

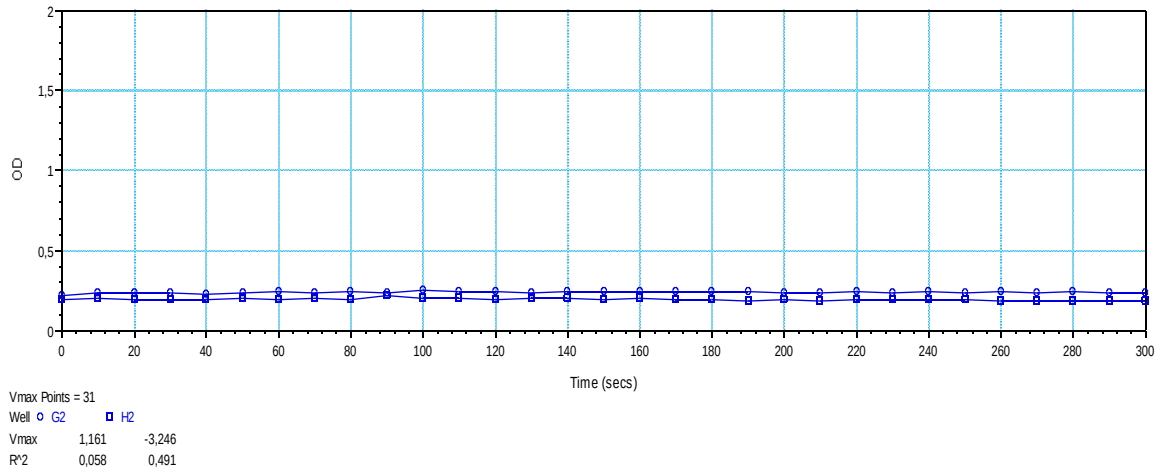
Çizelge 4.23. Tripsin enzimi % inhibisyon değerleri

Özütler	1 mg/mL		10 mg/Ml	
	V_{max}	% inhibisyon	V_{max}	% inhibisyon
Metanol yaprak	76,62	6,58	289,0	-
Metanol meyve	80,64	1,68	285,0	-
Metanol çiçek	74,22	9,50	359,0	-
DCM yaprak	77,57	5,42	198,8	41,19
DCM meyve	105,41	-	240,3	14,37
Etilasetat meyve	94,08	-	220,7	21,34
Etilasetat çiçek	77,45	5,57	183,3	34,70
Etil asetat yaprak	89,00	-	221,2	21,20
Maserasyon meyve (MeOH)	69,76	14,94	243,8	13,15
Hekzan çiçek	86,00	-	199,9	28,78

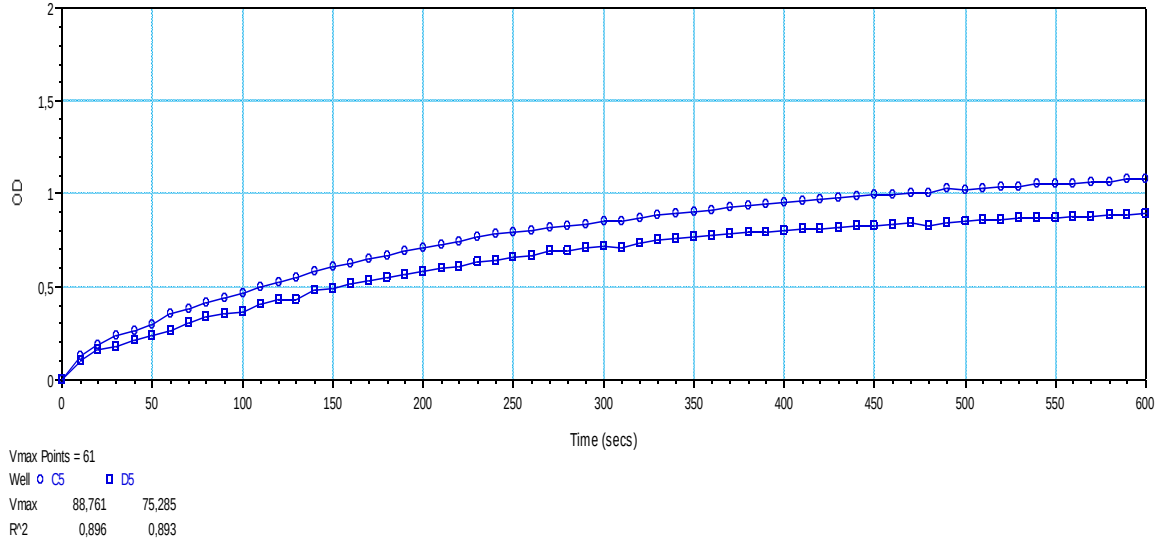
Tripsin enziminin inhibisyon sonuçlarına bakıldığında; meyve, yaprak ve çiçek özütlerinde özüt derişimi artırıldığında maserasyon meyve özütü (MeOH) ile metanol yaprak, meyve ve çiçek özütlerinin inhibisyon değerlerinde azalma, hekzan çiçek özütü, diklorometan yaprak ve meyve özütü ile etil asetat yaprak, meyve ve çiçek özütlerinde inhibisyon değerlerinde artma olduğu görülmektedir. Özütlerin % inhibisyon değerleri karşılaştırıldığında; 10 mg /mL lik derişimlerde yaban eriğı meyvesinde etil asetat meyve özütünün, çiçeğinde etil asetat çiçek özütünün, yaprağında ise diklorometan yaprak özütünün daha yüksek inhibisyona sahip olduğu belirlenmiştir.



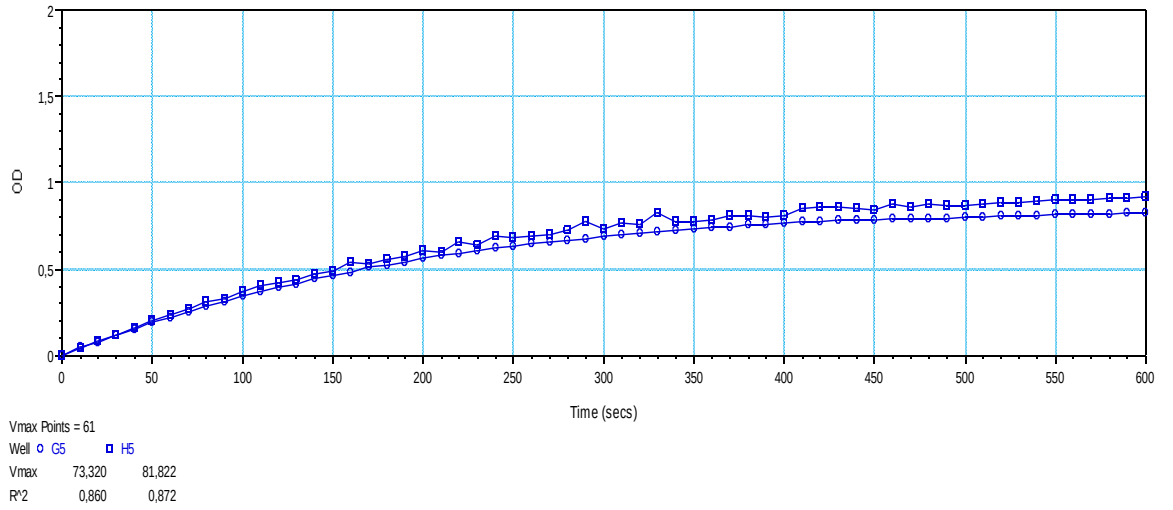
Şekil 4.63. Enzim (Trypsin) + Substrat+ Tampon çözeltinin reaksiyon grafiği



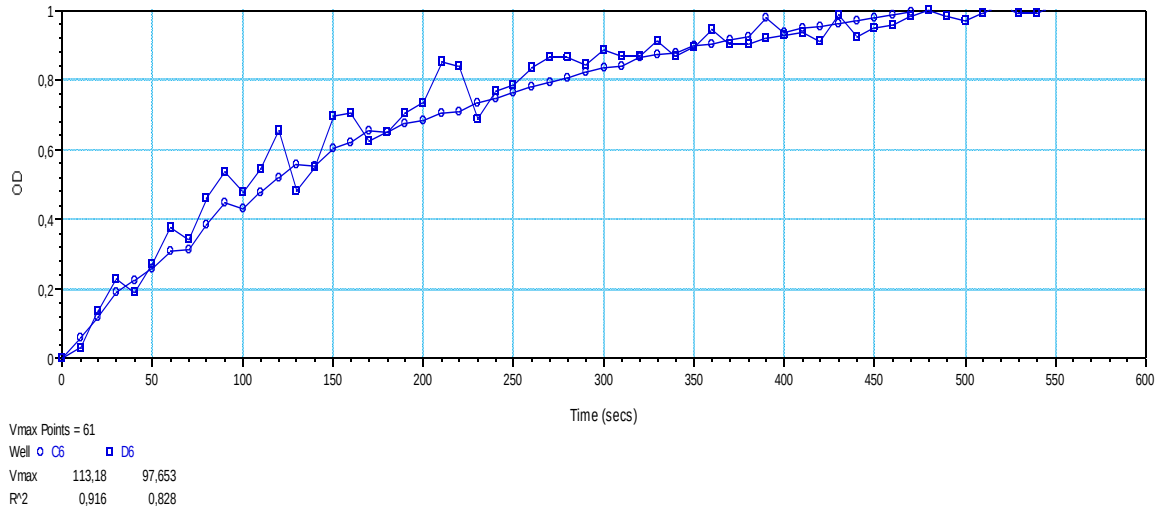
Şekil 4.64. PMSF + Enzim (Trypsin) + Substrat+ Tampon çözeltinin reaksiyon grafiği



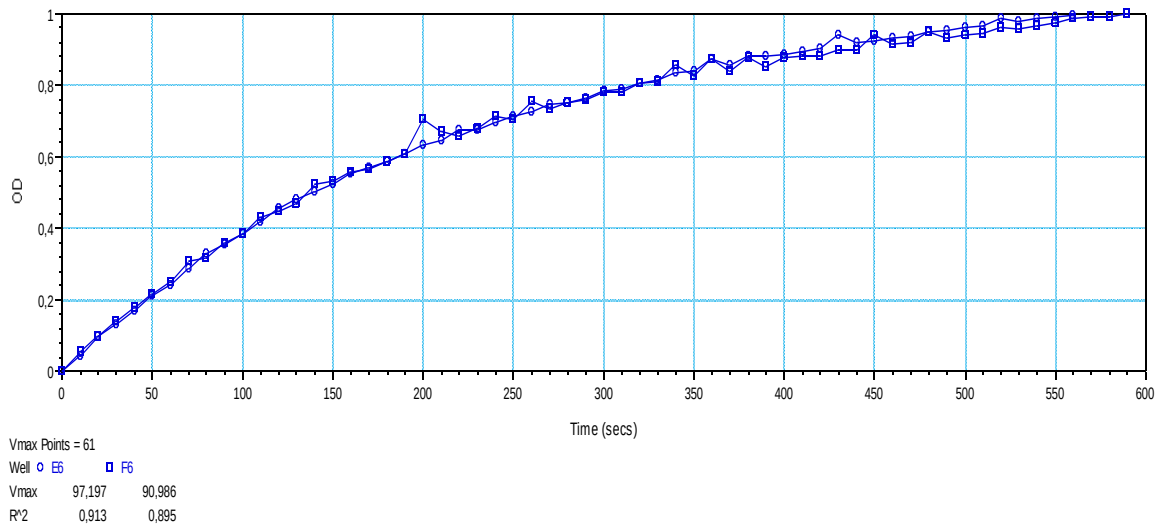
Şekil 4.65. DMSO+ Enzim (Tripsin) + Substrat+ Tampon çözeltinin reaksiyon grafiği



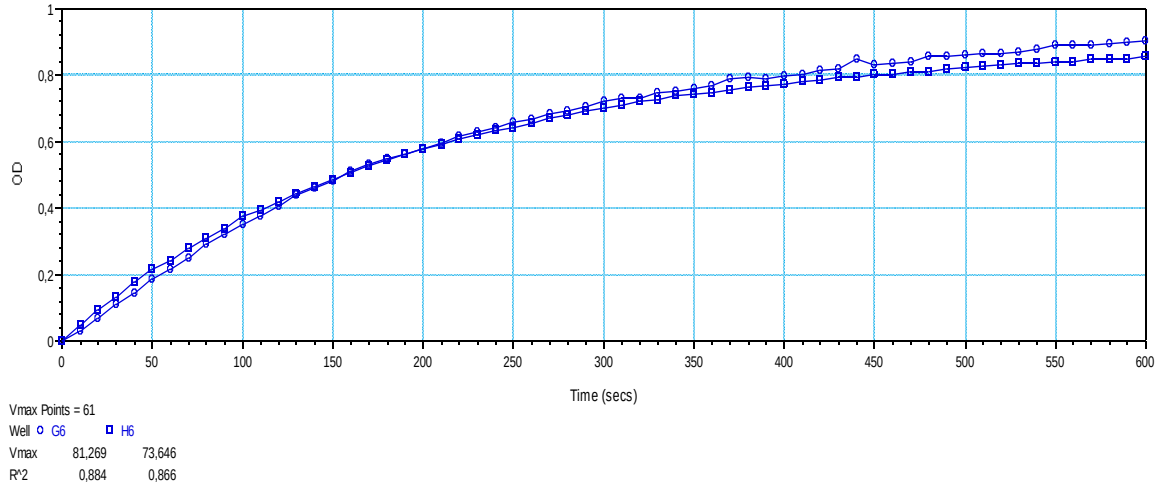
Şekil 4.66. Yaban eriğinin DCM yaprak özütünün (1 mg/ mL'lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



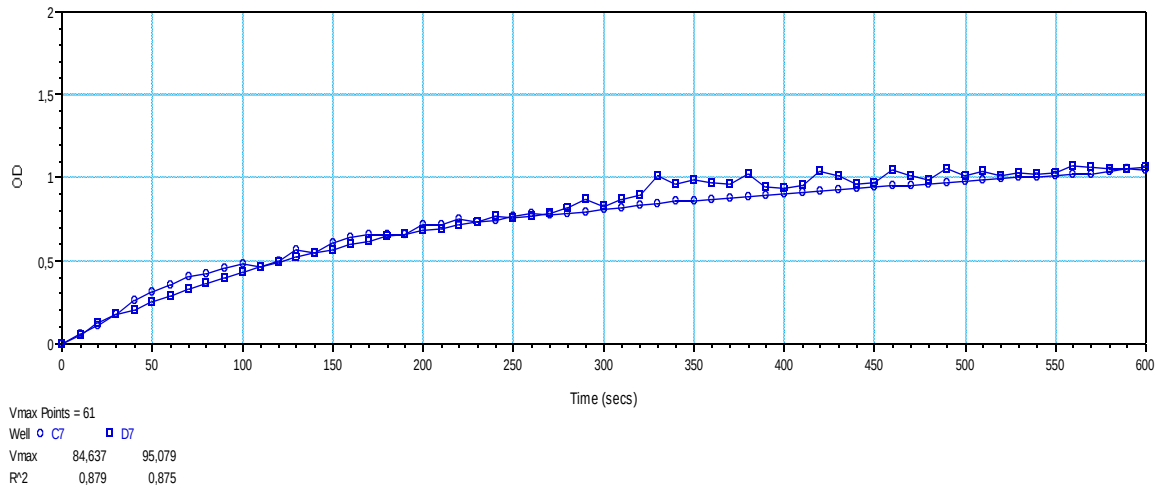
Şekil 4.67. Yaban eriğinin DCM meyve özütünün (1 mg/mL'lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



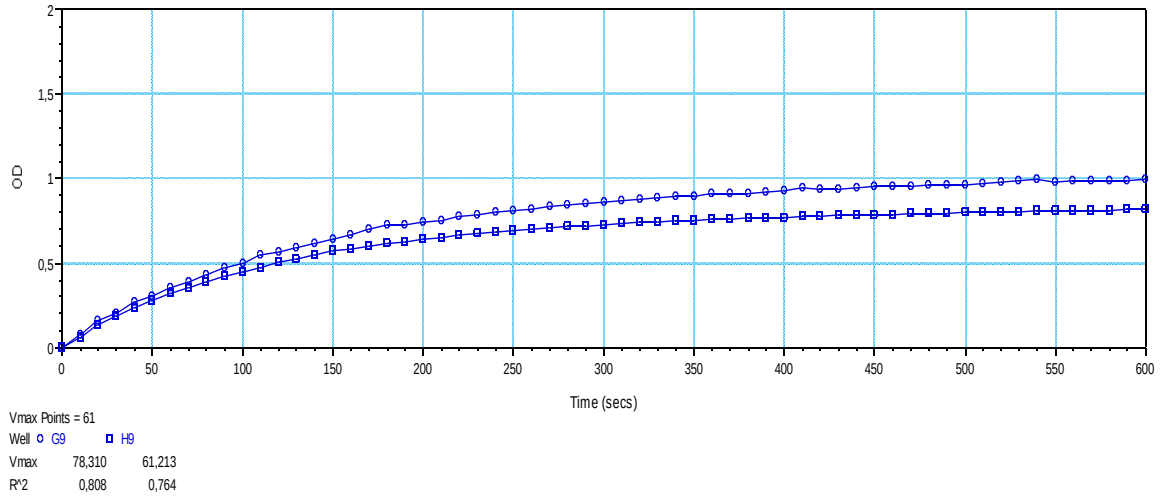
Şekil 4.68. Yaban eriğinin etilasetat meyve özütünün (1 mg/mL'lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



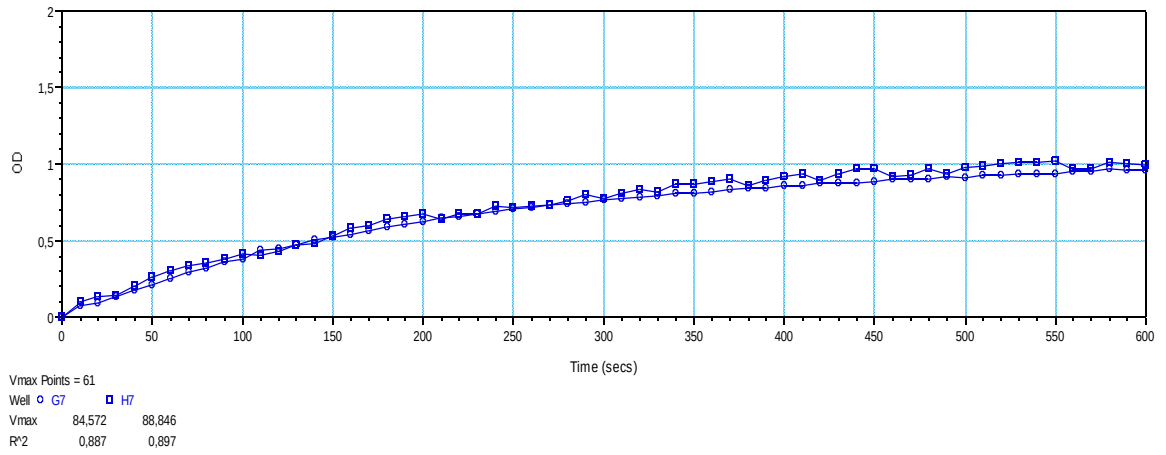
Şekil 4.69. Yaban eriğinin etilasetat çiçek özütünün (1 mg/mL’lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



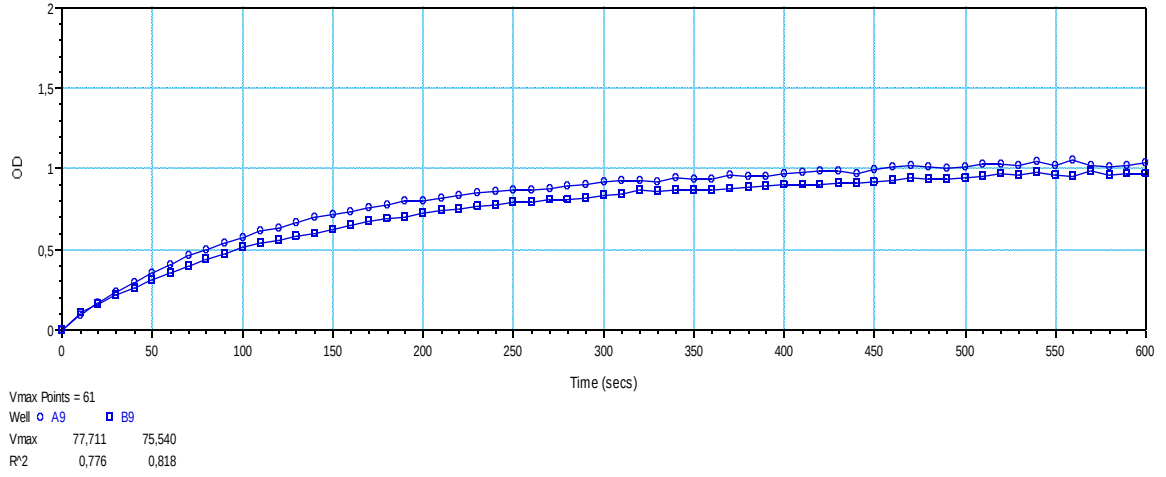
Şekil 4.70. Yaban eriğinin etilasetat yaprak özütünün (1 mg/mL’lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



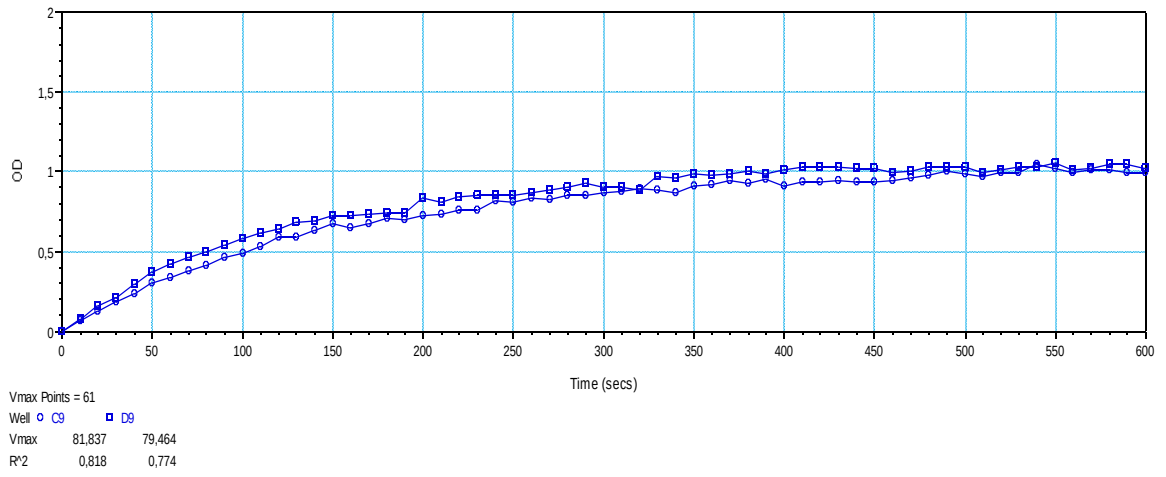
Şekil 4.71. Yaban eriğinin maserasyon meyve özütünün (1 mg/mL’lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



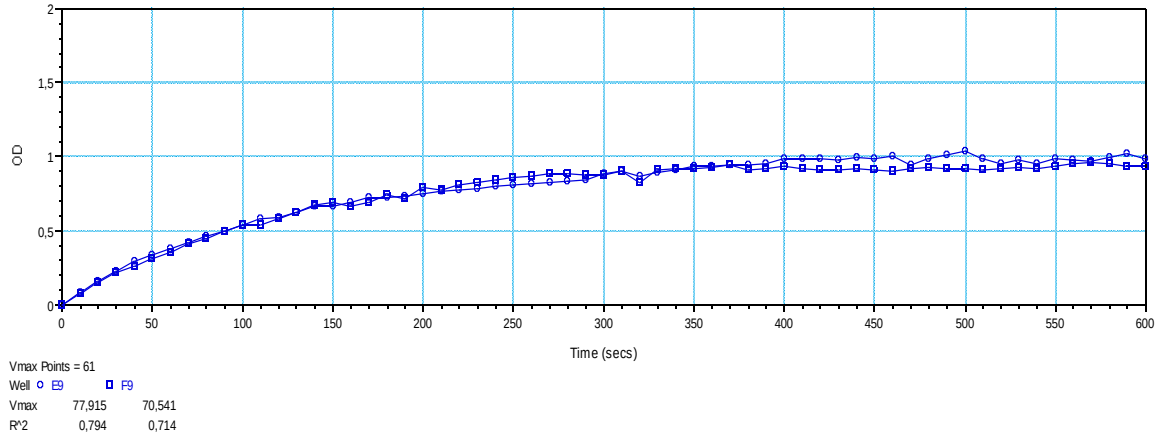
Şekil 4.72. Yaban eriğinin hekzan çiçek özütünün (1 mg/mL’lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



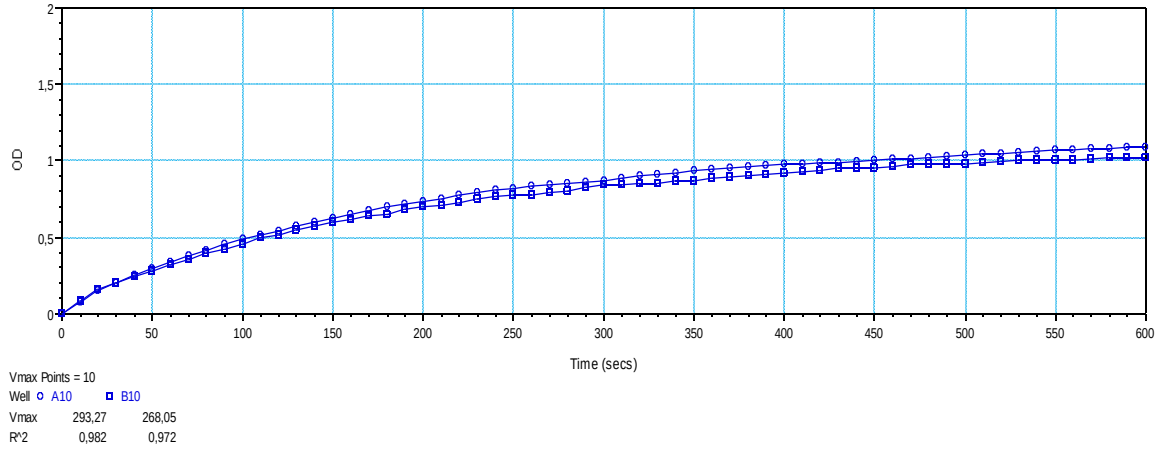
Şekil 4.73. Yaban eriğinin MeOH yaprak özütünün (1 mg/mL'lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



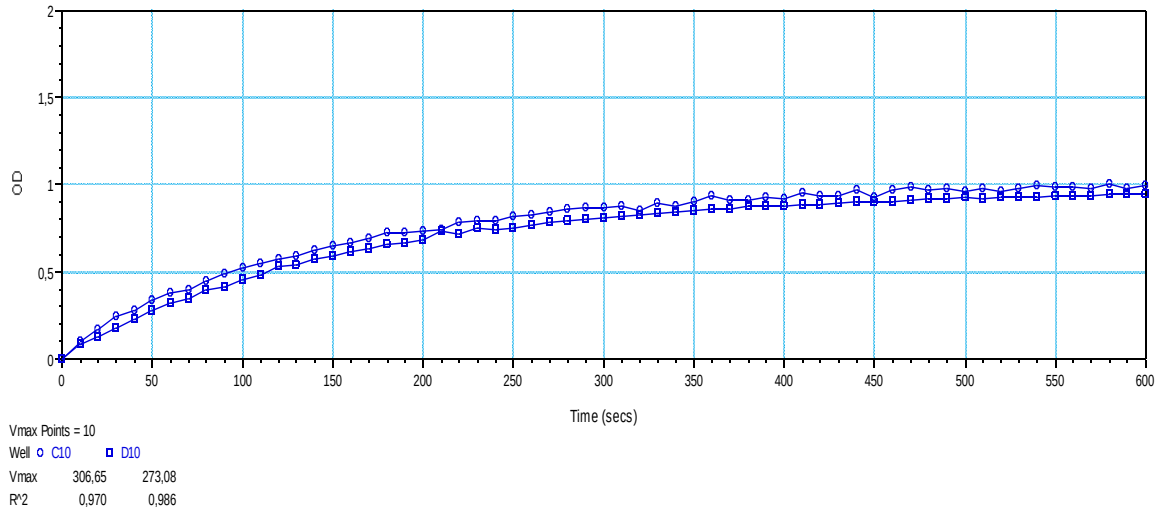
Şekil 4.74. Yaban eriğinin MeOH meyve özütünün (1 mg/mL'lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



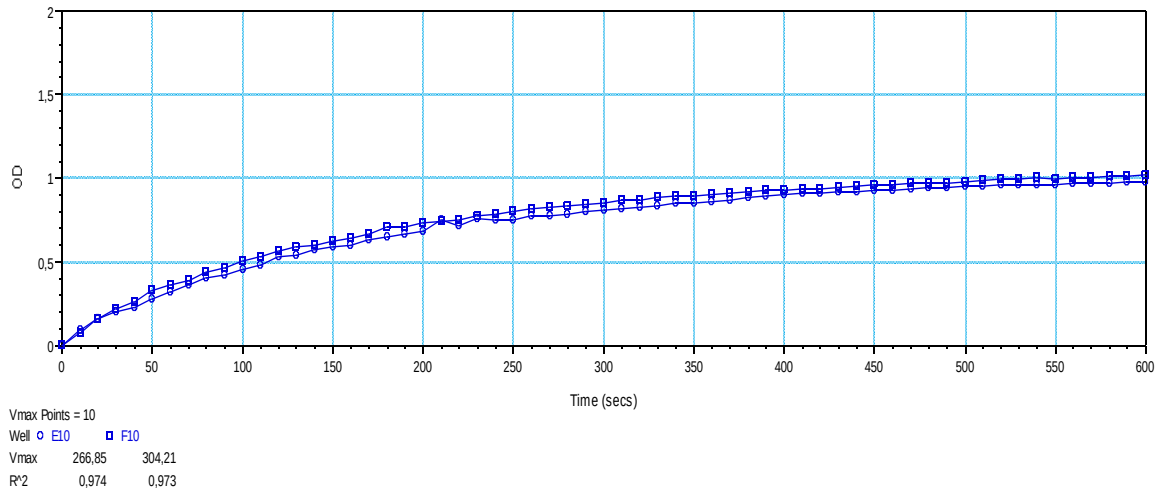
Şekil 4.75. Yaban eriğinin MeOH çiçek özütünün (1 mg/mL'lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



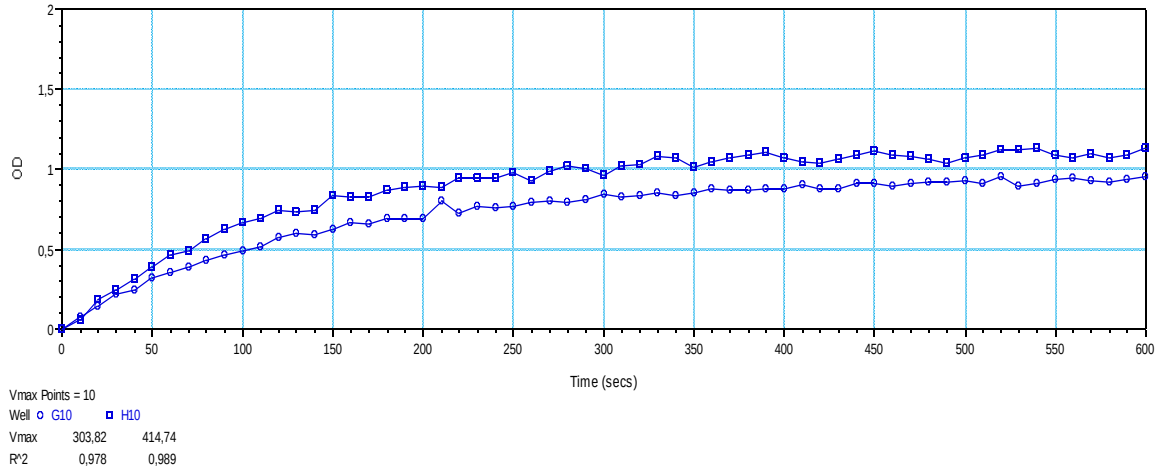
Şekil 4.76. DMSO+ Enzim (Tripsin) + Substrat+ Tampon çözeltinin reaksiyon grafiği (10 mg/mL'lik örnekler için)



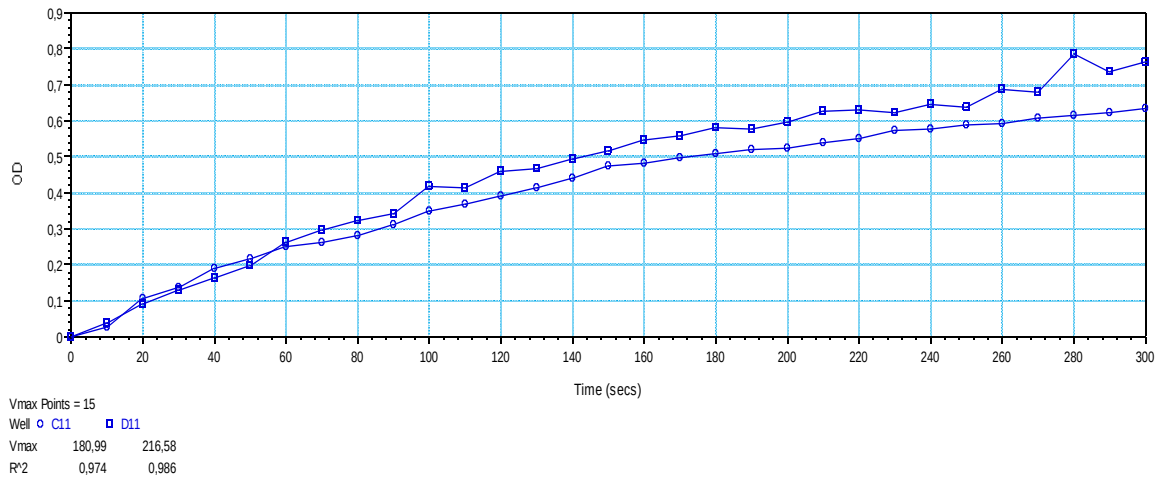
Şekil 4.77. Yaban eriğinin MeOH yaprak özütünün (10 mg/ mL’lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



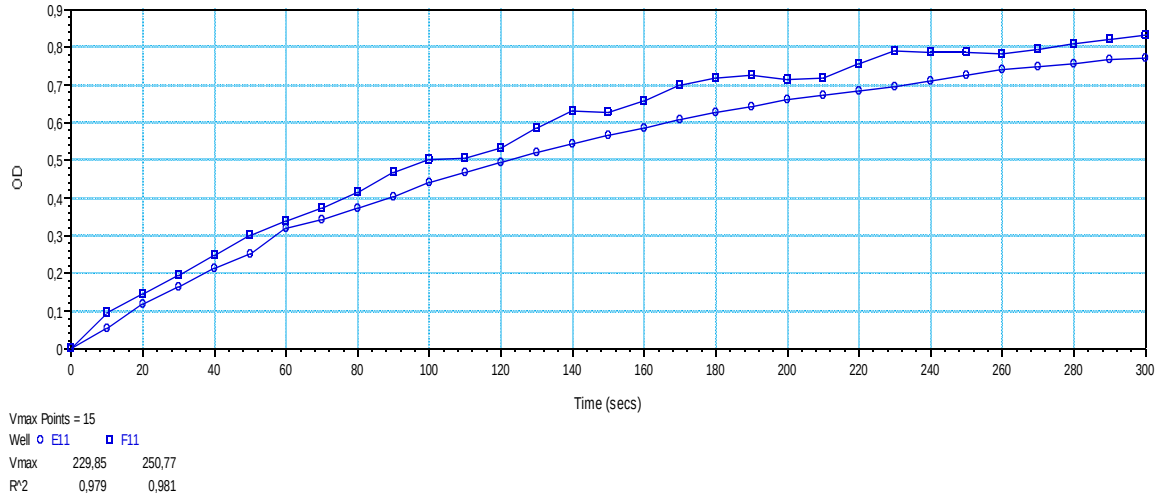
Şekil 4.78. Yaban eriğinin MeOH meyve özütünün (10 mg/mL’lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



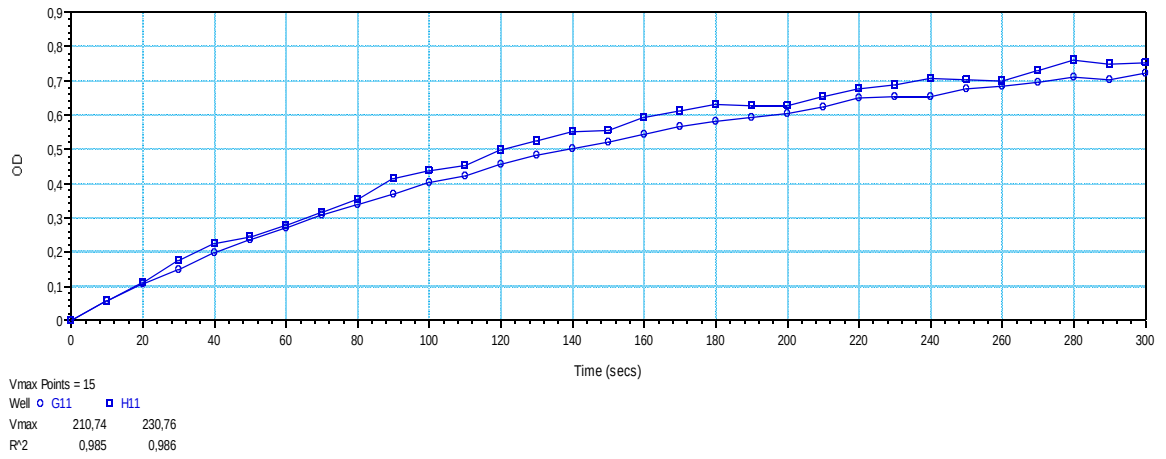
Şekil 4.79. Yaban eriğinin MeOH çiçek özütünün (10 mg/mL'lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



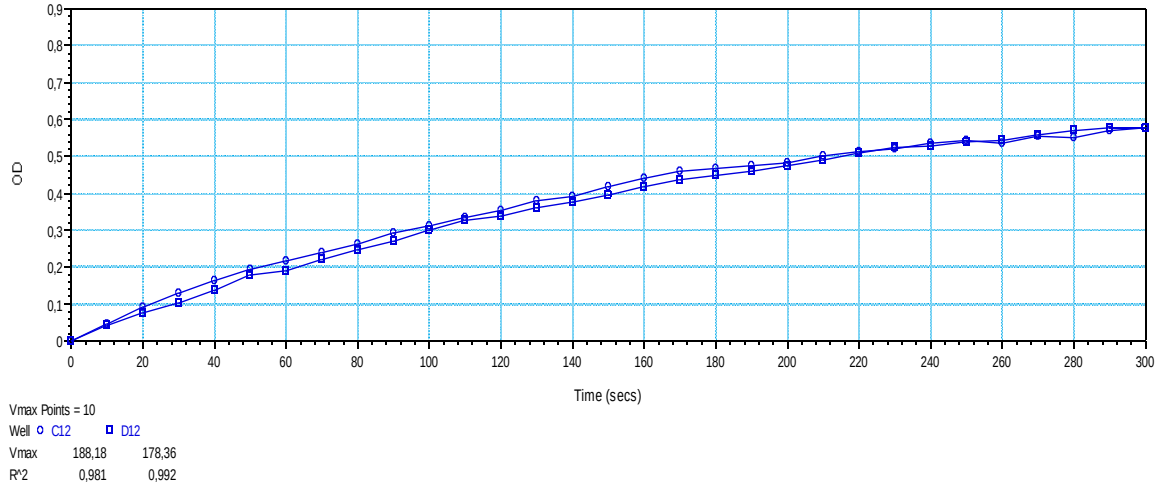
Şekil 4.80. Yaban eriğinin DCM yaprak özütünün (10 mg/mL'lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



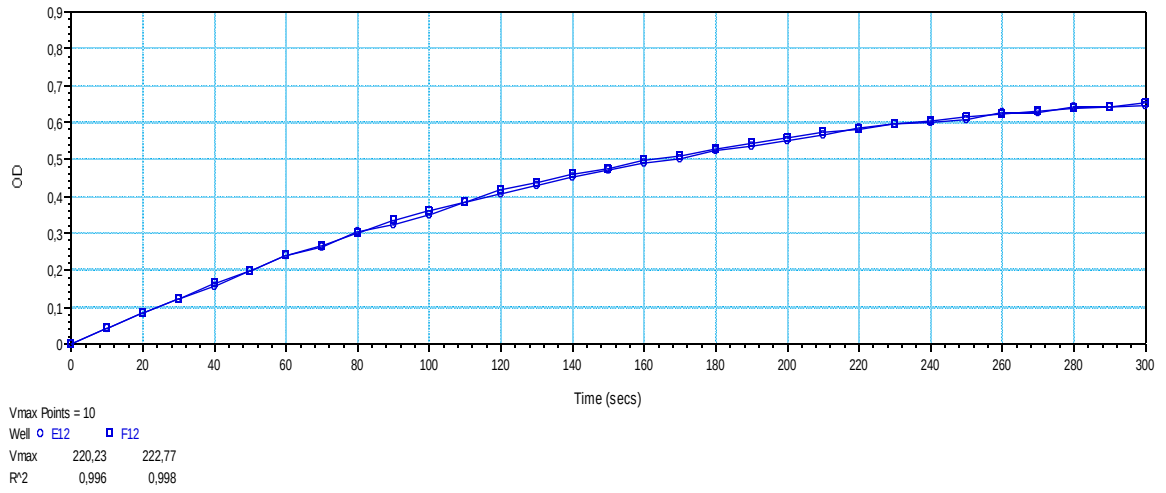
Şekil 4.81. Yaban eriğinin DCM meyve özütünün (10 mg/mL'lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



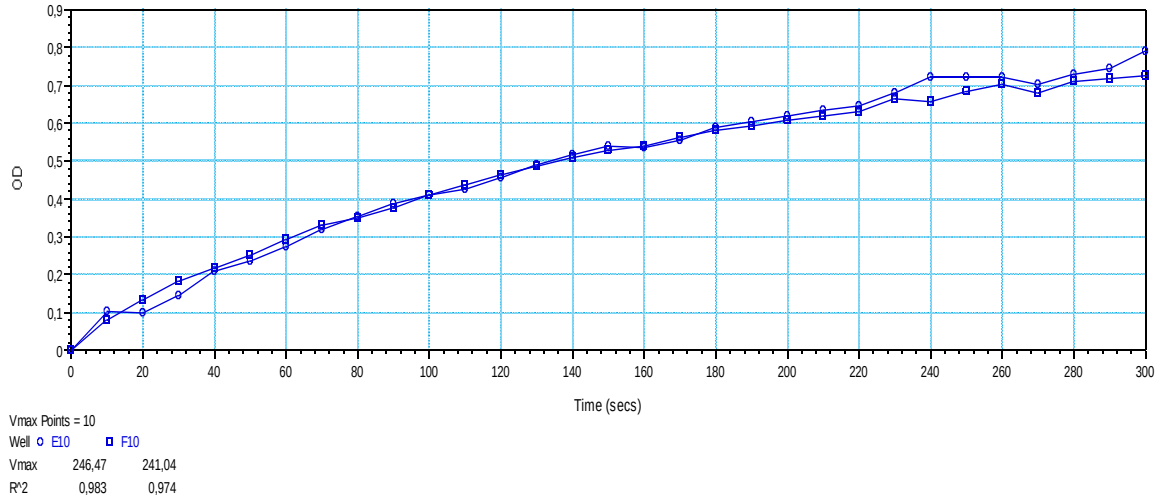
Şekil 4.82. Yaban eriğinin etilasetat meyve özütünün (10 mg/mL'lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



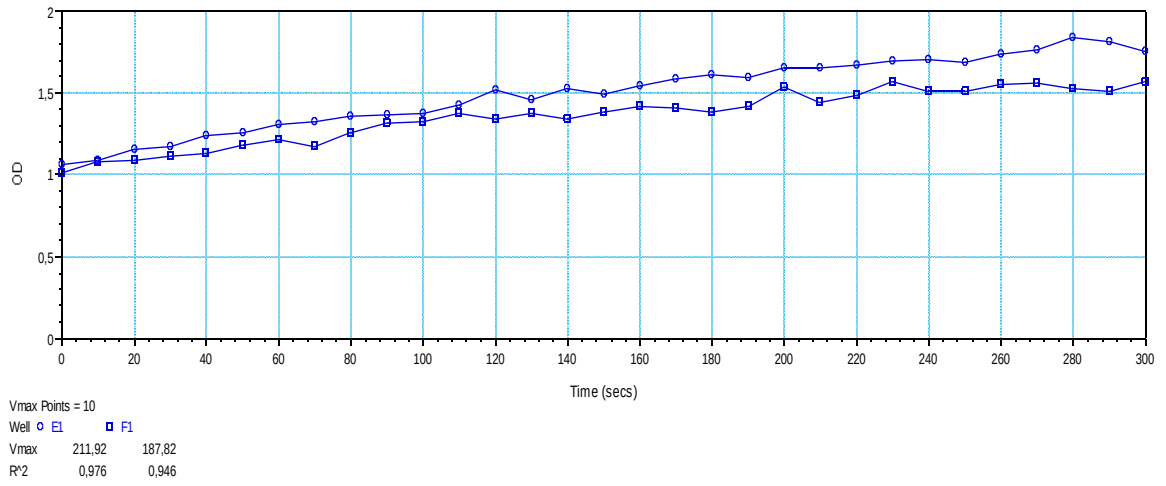
Şekil 4.83. Yaban eriğinin etilasetat çiçek özütünün (10 mg/mL’lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



Şekil 4.84. Yaban eriğinin etilasetat yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



Şekil 4.85. Yaban eriğinin maserasyon meyve özütünün (10 mg/mL'lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği

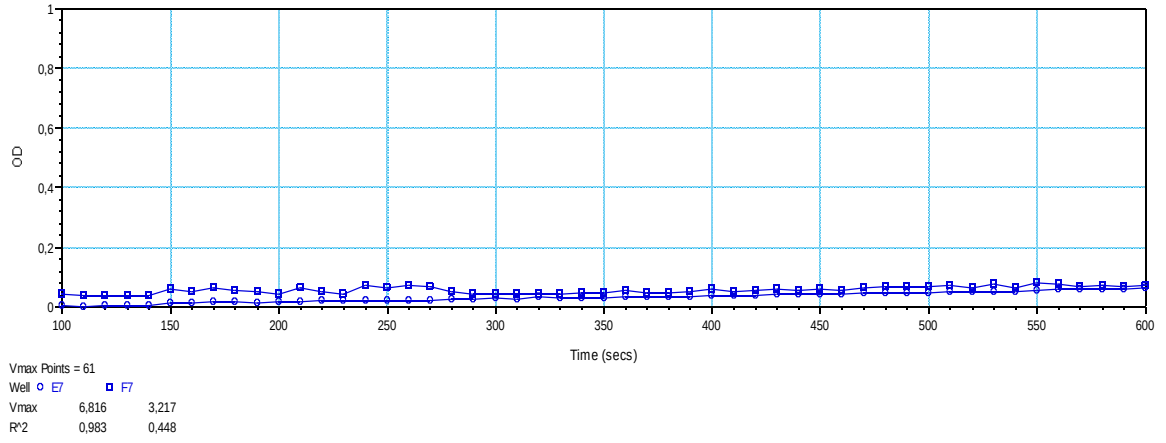


Şekil 4.86. Yaban eriğinin hekzan çiçek özütünün (10 mg/mL'lik özütler) tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği

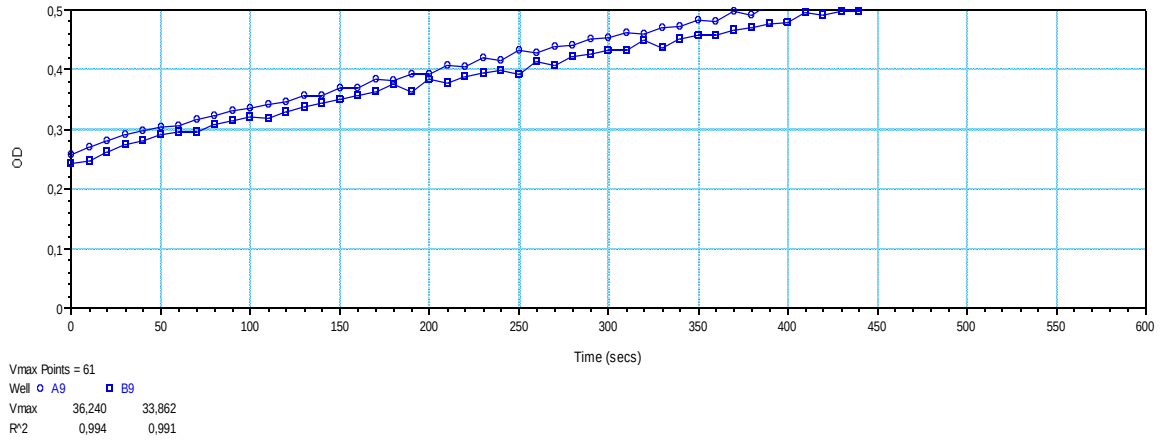
Çizelge 4.24. Papain enzimi % inhibisyon değerleri

Özütler	1 mg/mL' lik örnekler		10 mg/mL' lik örnekler			
	V_{max}	% inhibisyon	V_{max}	10 μ L için % inhibisyon ($V_{toplam} = 200 \mu$ L)	V_{max}	30 μ L için % inhibisyon ($V_{toplam} = 200 \mu$ L)
Metanol yaprak	27,01	22,18	40,55	23,12	19,29	66,58
Metanol meyve	21,07	39,29	43,85	16,87	34,95	39,45
Metanol çiçek	32,92	5,15	37,33	29,23	13,08	77,34
DCM yaprak	19,61	43,50	41,95	20,47	26,75	53,66
DCM meyve	25,11	27,65	44,34	15,94	25,99	54,98
Etil asetat meyve	32,52	6,30	41,06	22,16	20,67	64,19
Etil asetat çiçek	28,29	18,49	38,76	26,52	-0,34	95,21
Etil asetat yaprak	27,55	20,62	34,84	33,95	4,56	92,10
Maserasyon meyve (MeOH)	29,23	15,78	44,49	15,65	32,55	43,61
Hekzan çiçek	32,05	7,66	28,19	46,55	-89,76	-

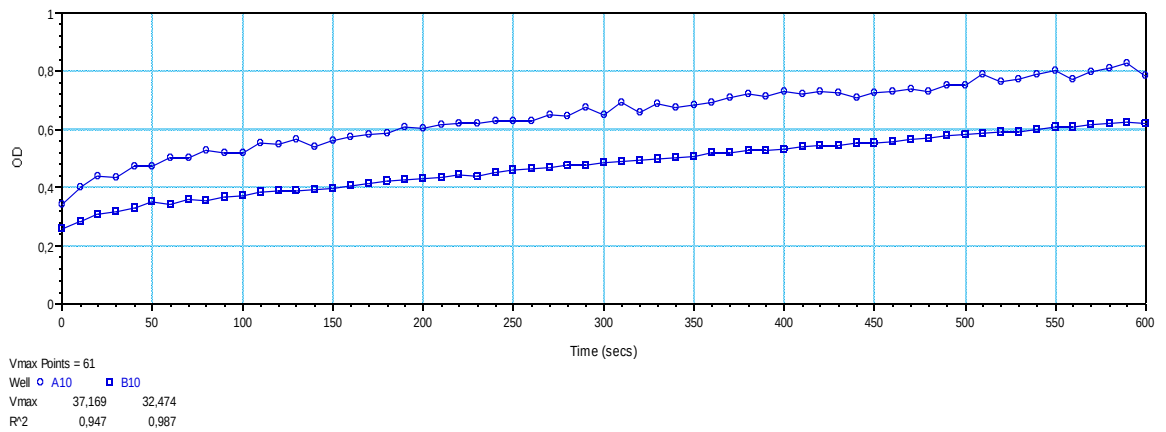
Papain enziminin inhibisyon sonuçlarına bakıldığında; meyve, yaprak ve çiçek özütlerinde özüt derişimi artırıldığında özütlerin genel olarak inhibisyon değerlerinde artma olduğu görülmektedir. 10 mg/mL' lik özütlerde derişim artırıldığında yaban eriğı meyvesinde etil asetat meyve özütünün, çiçeğinde etil asetat çiçek özütünün, yaprağında ise etil asetat yaprak özütünün daha yüksek inhibisyona sahip olduğu belirlenmiştir.



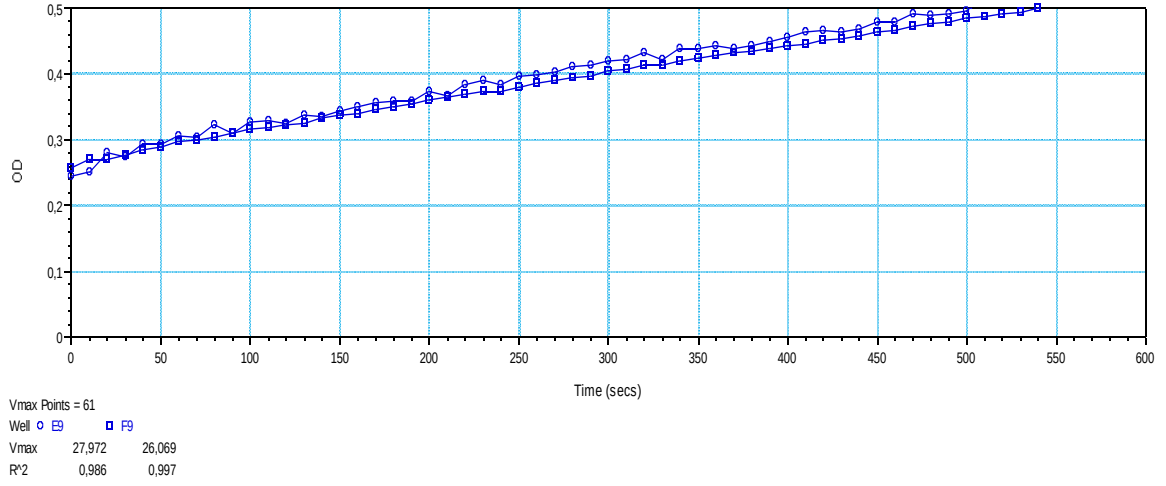
Şekil 4.87. PMSF+ Substrat+ Enzim (Papain)+ Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon grafiği



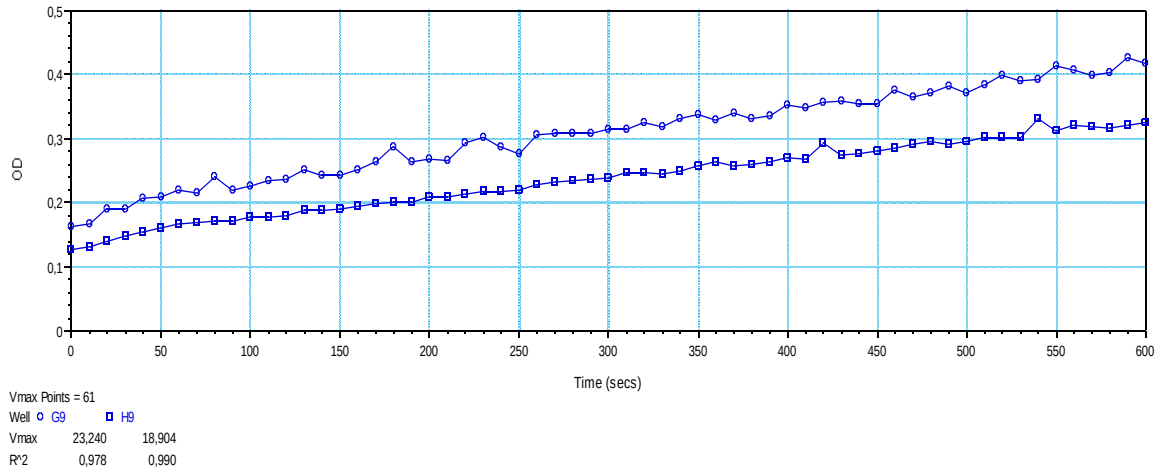
Şekil 4.88. Substrat+ Enzim (Papain)+ Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon grafiği



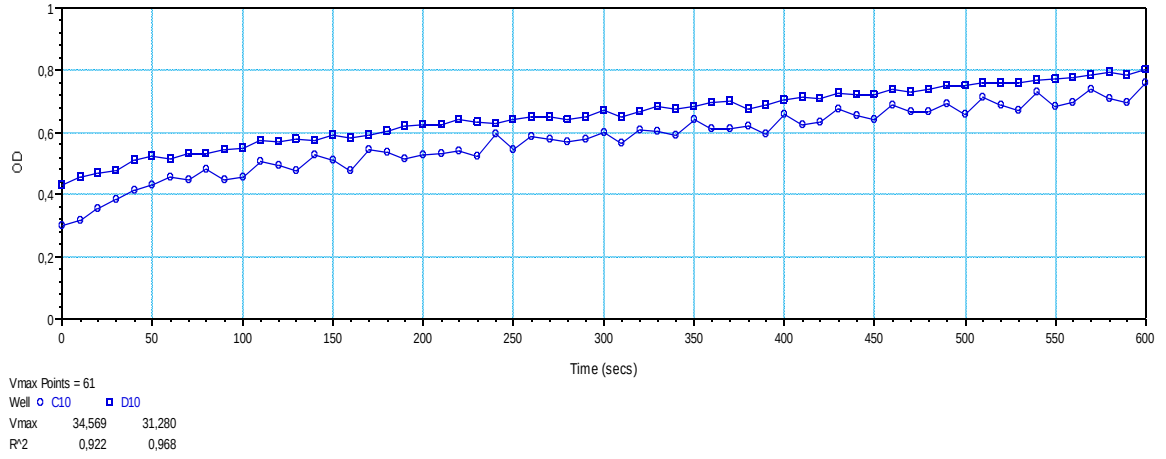
Şekil 4.89. DMSO+ Substrat+ Enzim (Papain)+ Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon grafiği



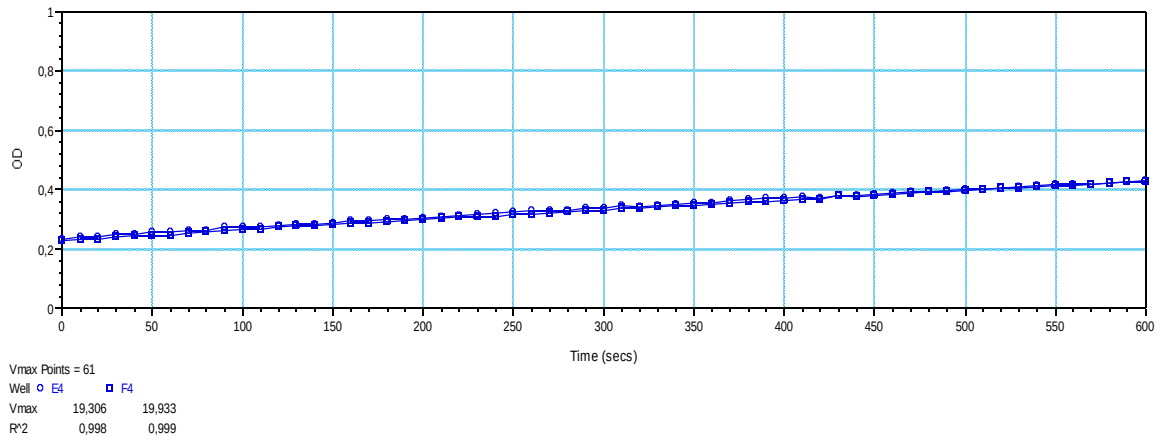
Şekil 4.90. Yaban eriğinin metanol yaprak özütünün (1 mg/mL'lik özütler) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



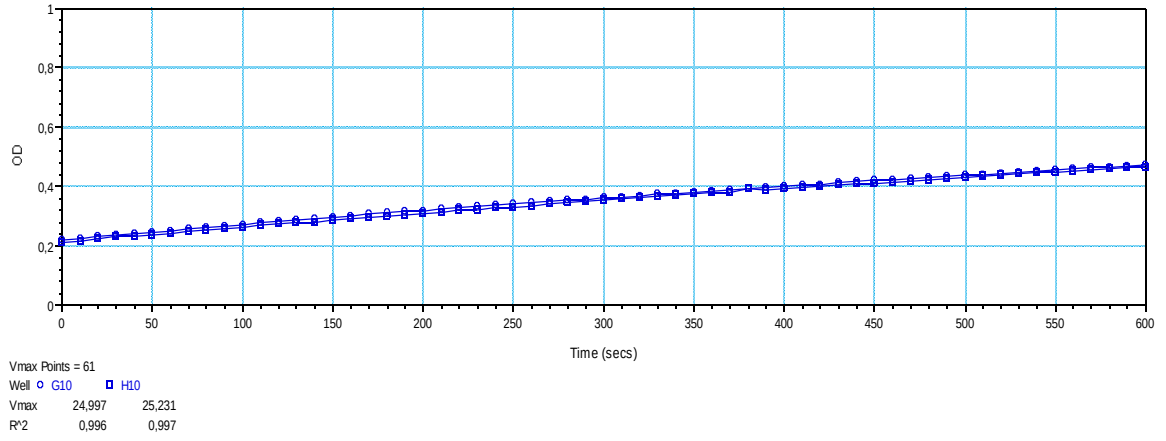
Şekil 4.91. Yaban eriğinin metanol meyve özütünün (1 mg/mL'lik özütler) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



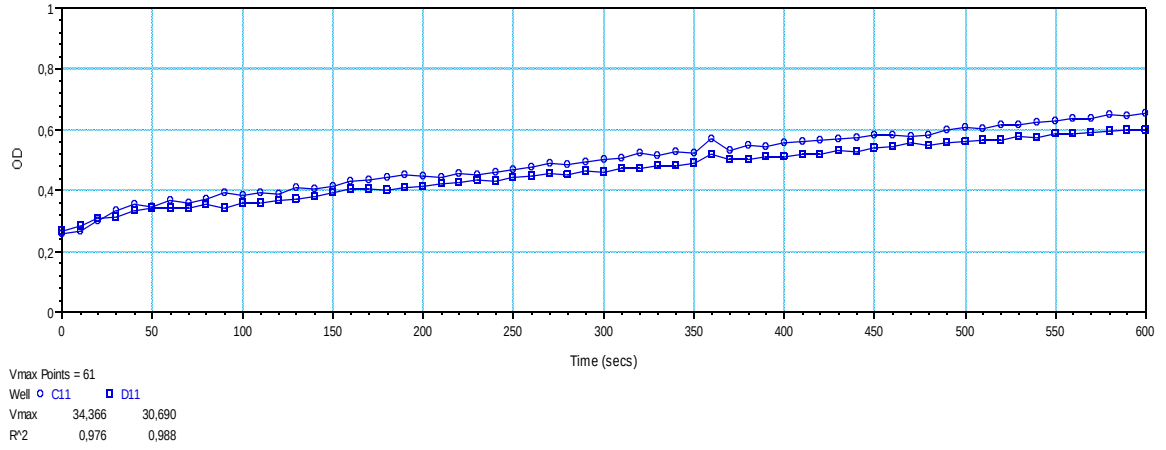
Şekil 4.92. Yaban eriğinin metanol çiçek özütünün (1 mg/mL’lik özütler) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



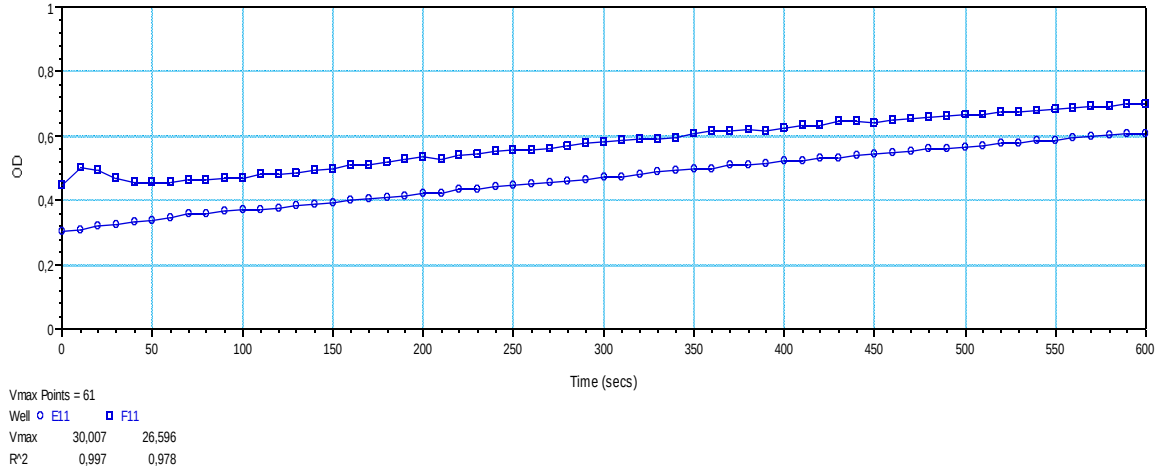
Şekil 4.93. Yaban eriğinin DCM yaprak özütünün (1 mg/mL’lik özütler) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



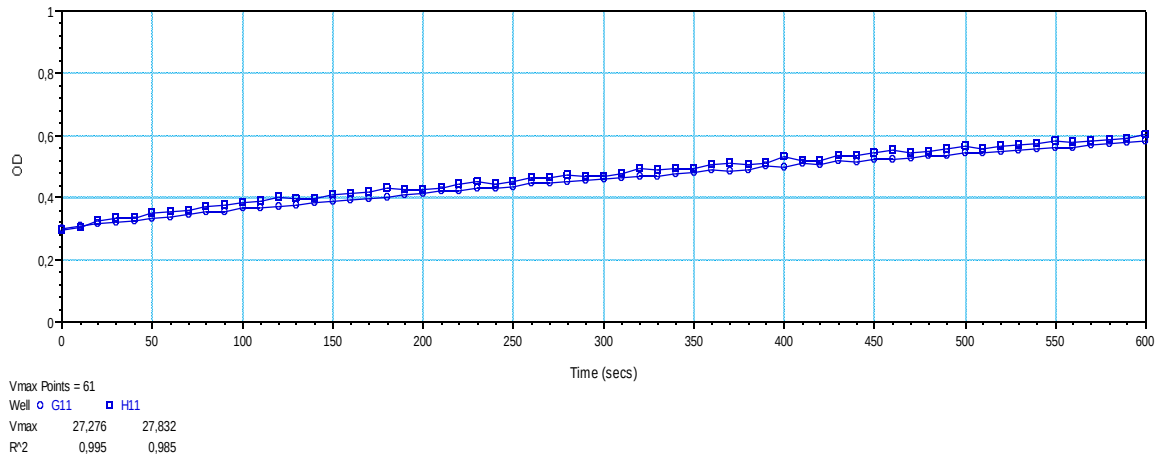
Şekil 4.94. Yaban eriğinin DCM meyve özütünün (1 mg/mL’lik özütler) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



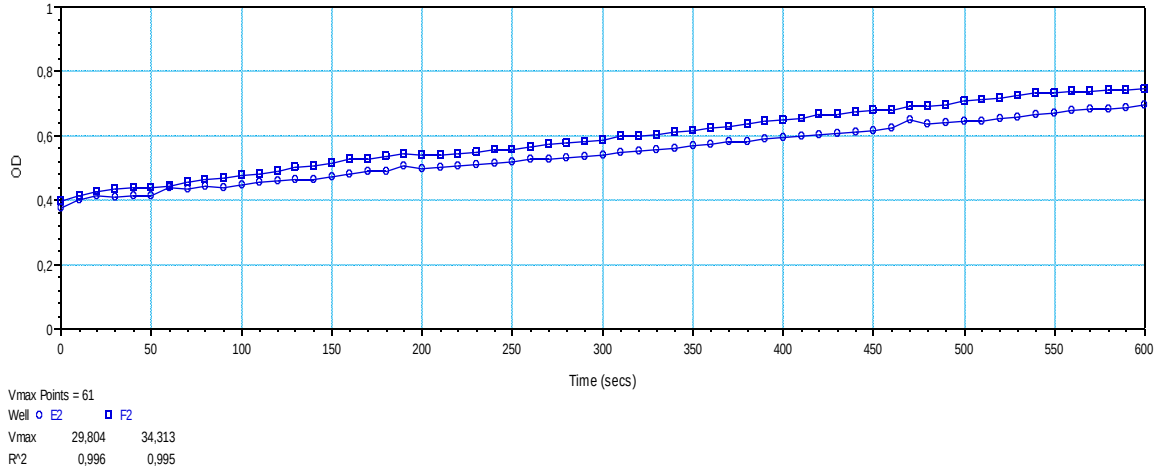
Şekil 4.95. Yaban eriğinin etilasetat meyve özütünün (1 mg/mL’lik özütler) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



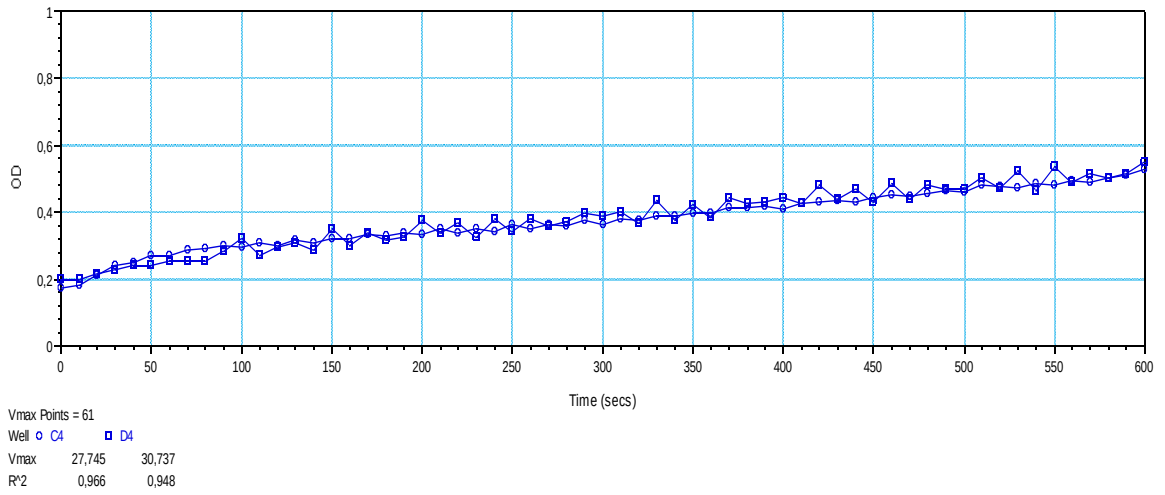
Şekil 4.96. Yaban eriğinin etilasetat çiçek özütünün (1 mg/mL’lik özütler) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



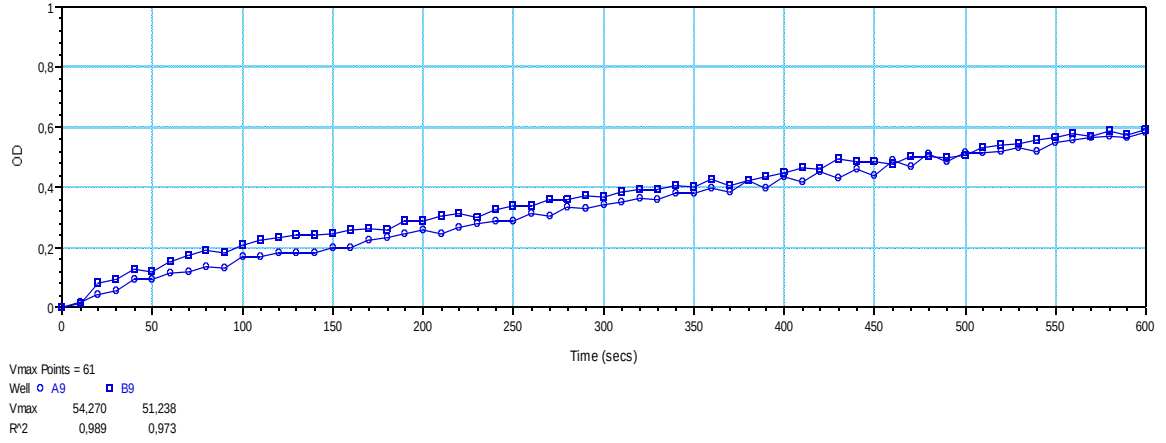
Şekil 4.97. Yaban eriğinin etilasetat yaprak özütünün (1 mg/mL’lik özütler) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



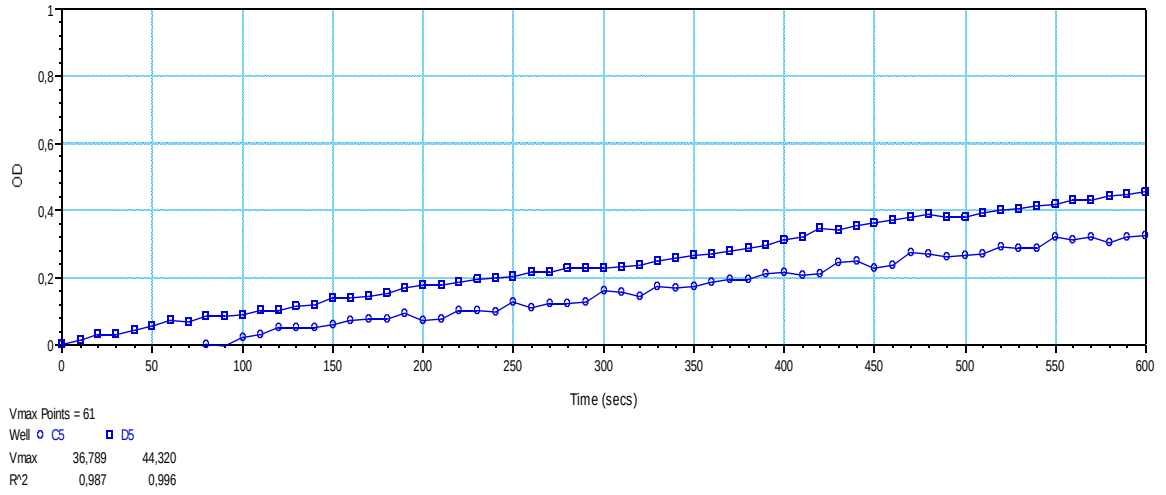
Şekil 4.98. Yaban eriğinin hekzan çiçek özütünün (1 mg/ mL’lik özütler) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



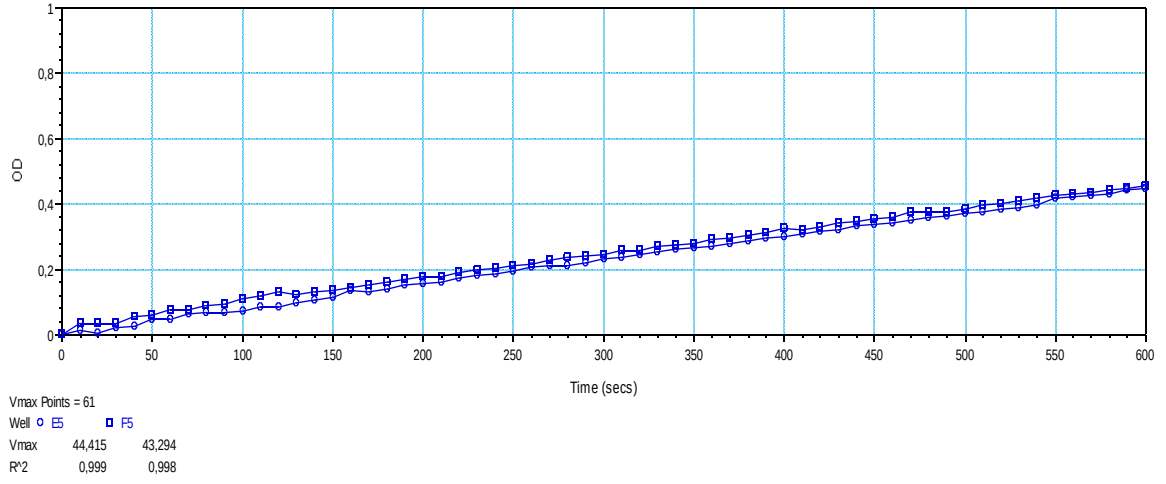
Şekil 4.99. Yaban eriğinin maserasyon meyve özütünün (1 mg/mL’lik özütler) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



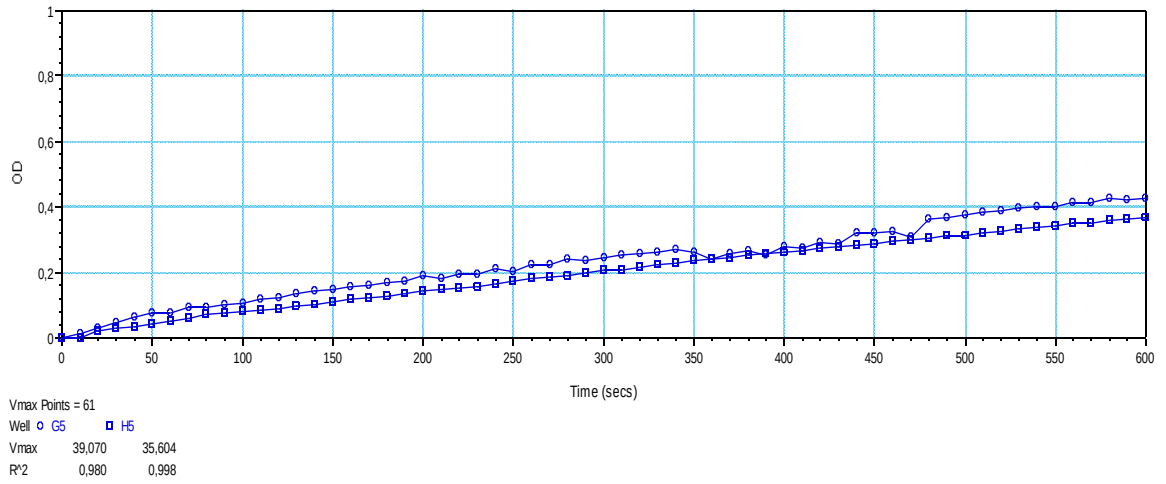
Şekil 4.100. DMSO+ Substrat+ Enzim (Papain)+ Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon grafiği (10 mg/mL’lik örneklerden alınan 10 µL hacimler için)



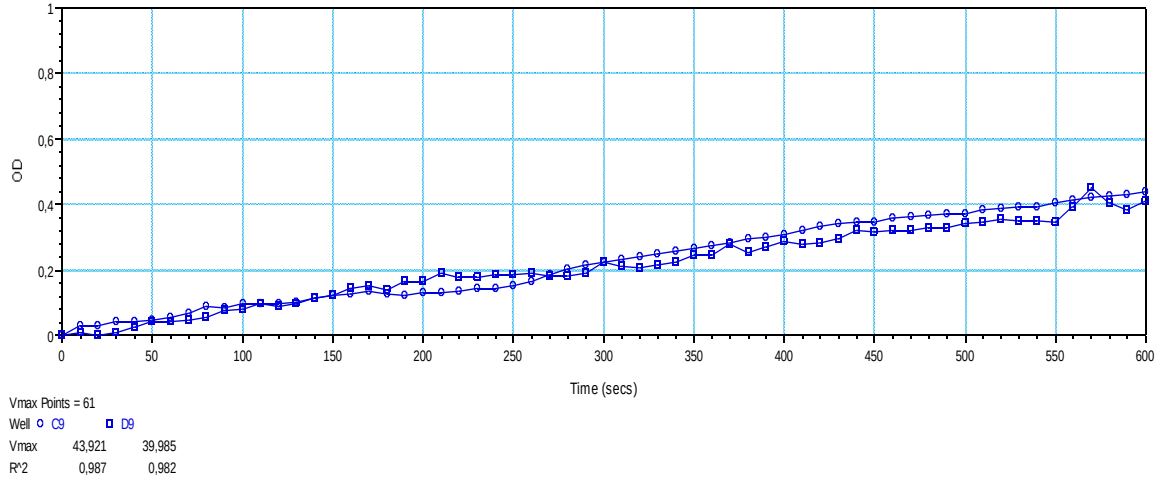
Şekil 4.101. Yaban eriğinin metanol yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL ‘lik örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



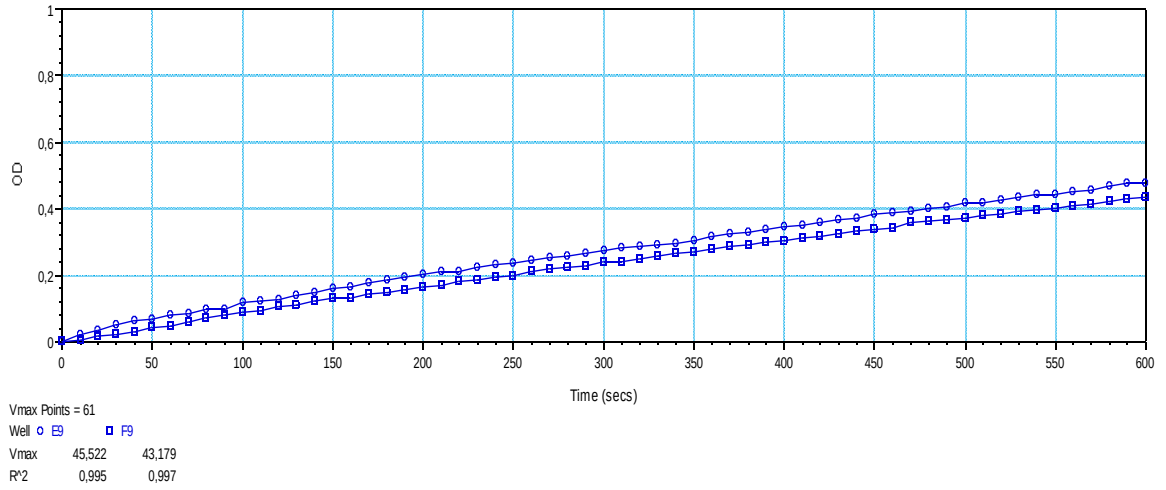
Şekil 4.102. Yaban eriğinin metanol meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



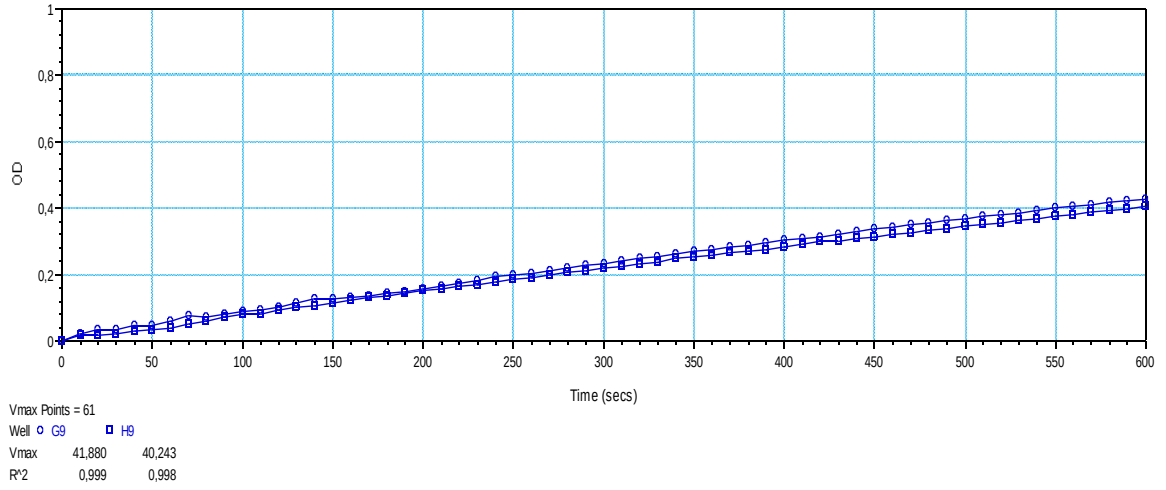
Şekil 4.103. Yaban eriğinin metanol çiçek özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



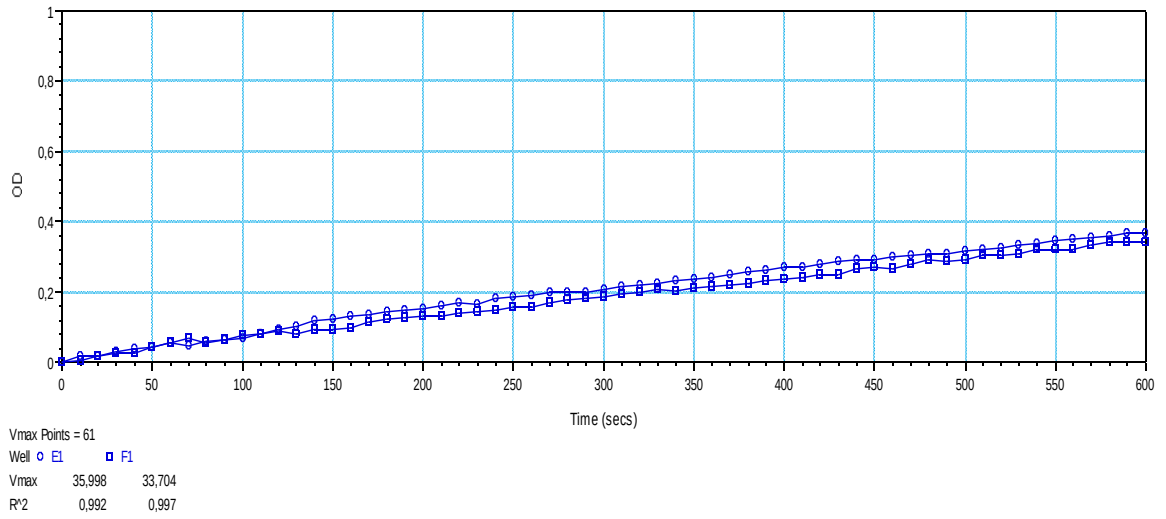
Şekil 4.104. Yaban eriğinin DCM yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 μ L’ lik örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



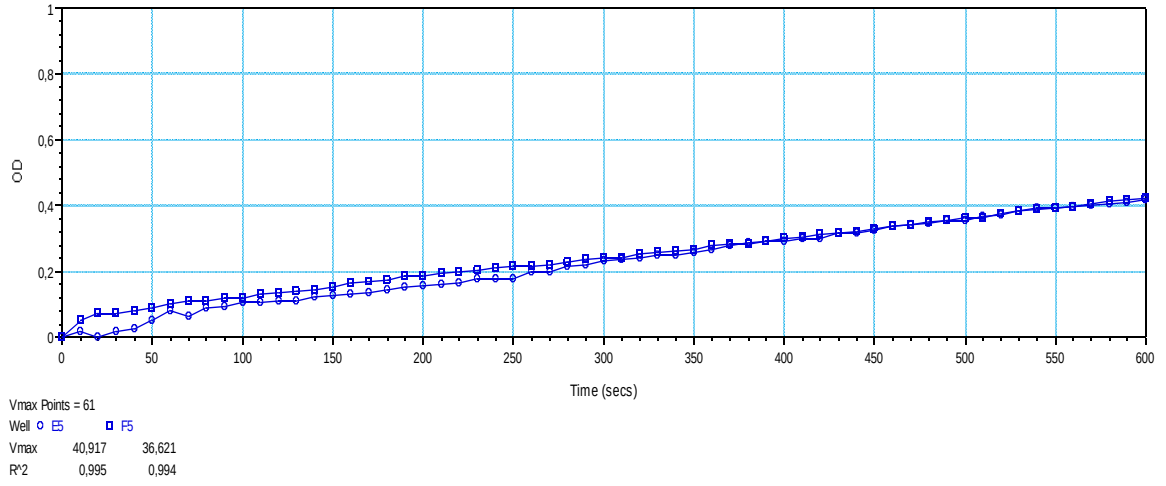
Şekil 4.105. Yaban eriğinin DCM meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 μ L’ lik örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



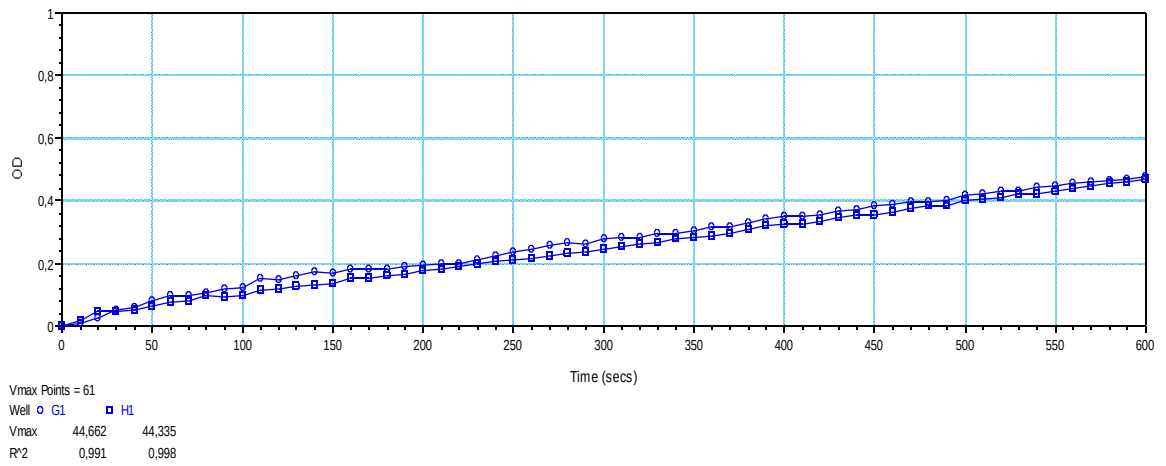
Şekil 4.106. Yaban eriğinin etilasetat meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



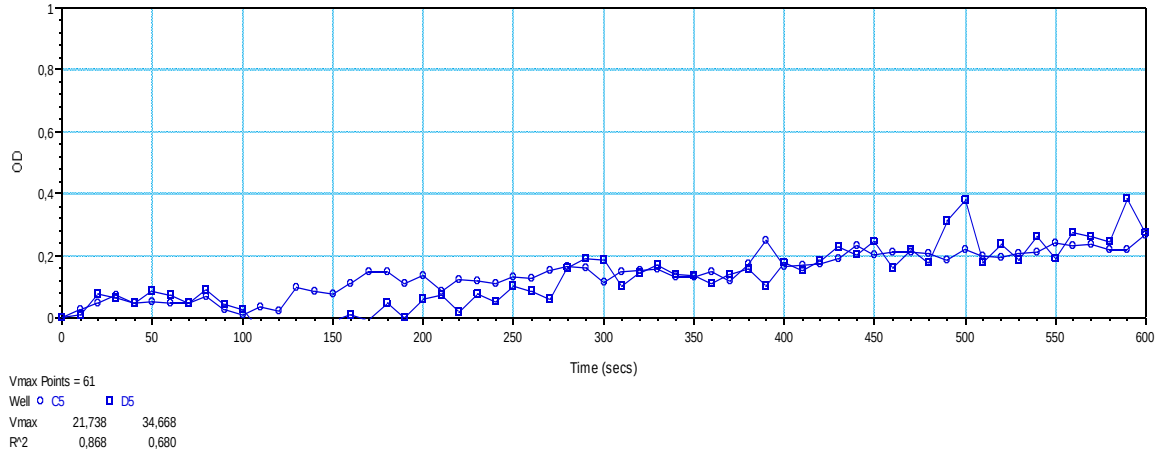
Şekil 4.107. Yaban eriğinin etilasetat yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



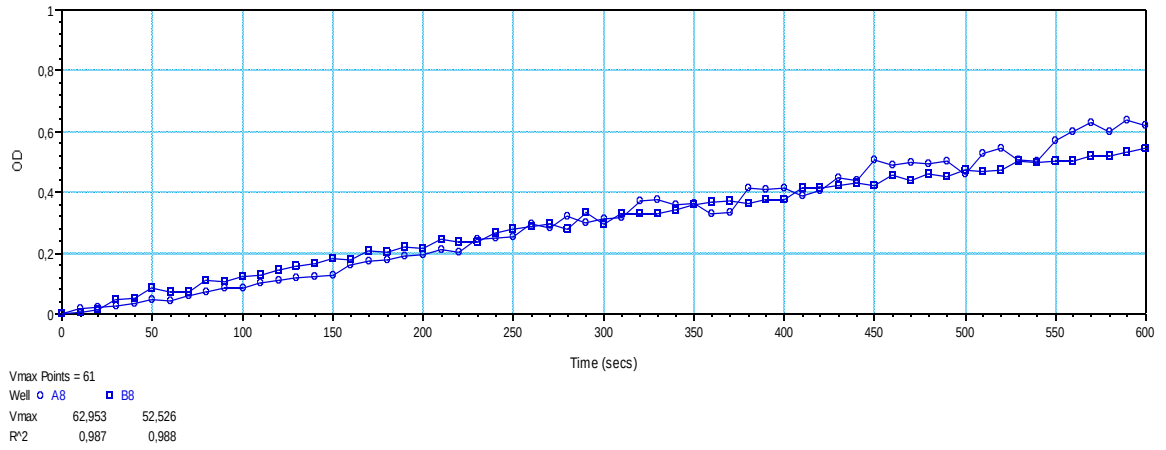
Şekil 4.108. Yaban eriğinin etilasetat çiçek özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



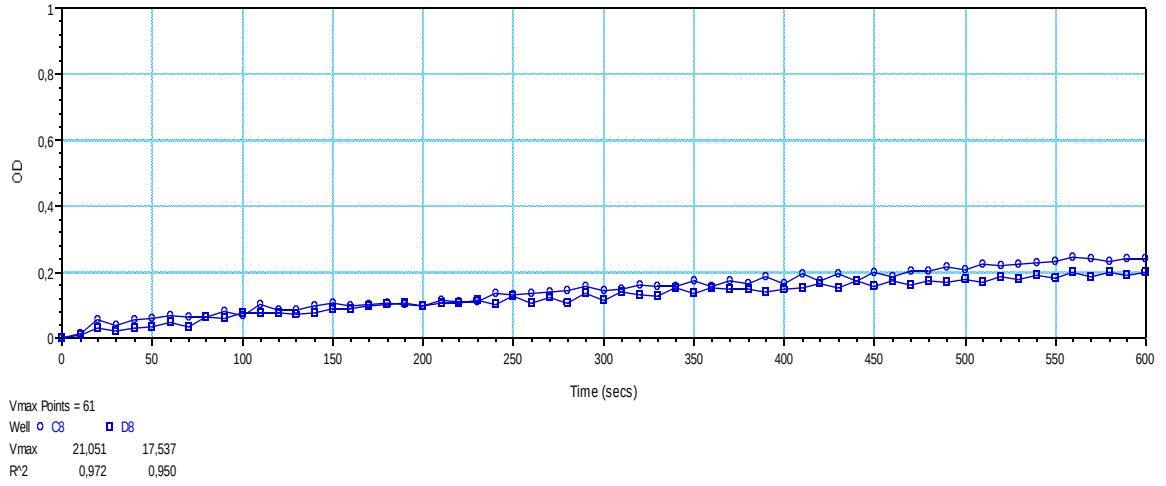
Şekil 4.109. Yaban eriğinin maserasyon meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL ‘lik örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



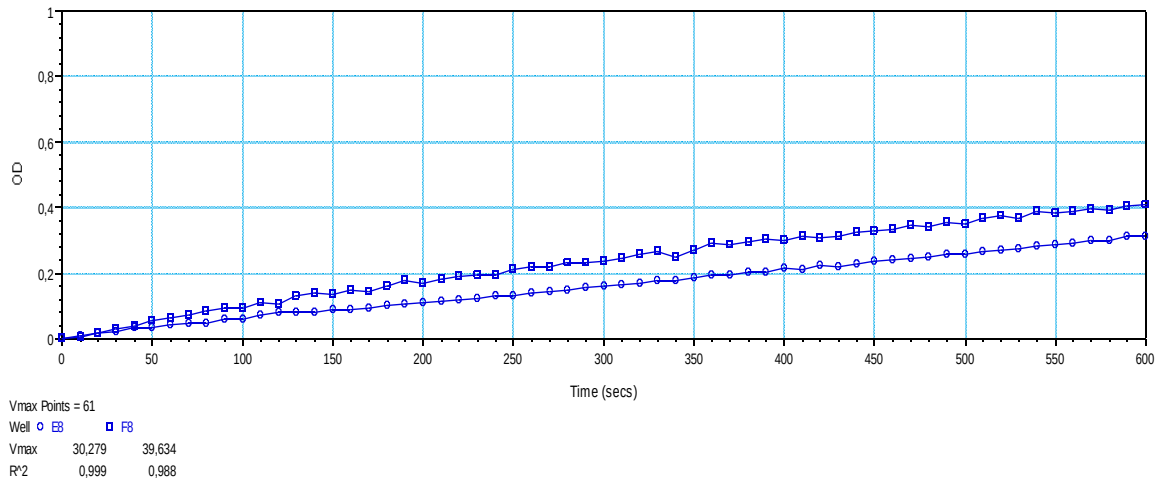
Şekil 4.110. Yaban eriğinin hekzan çiçek özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 μ L’ lik örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



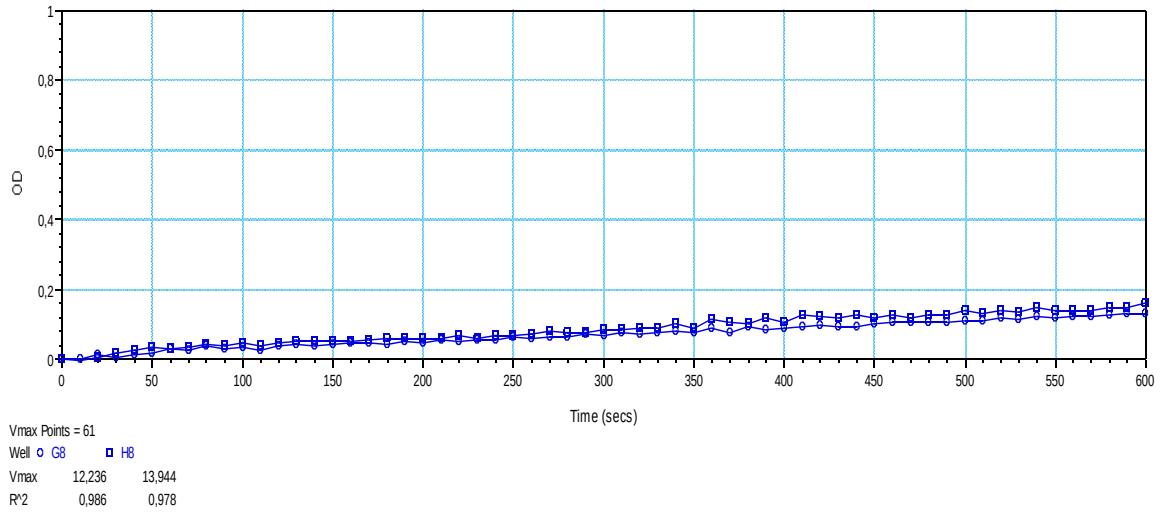
Şekil 4.111. DMSO+ Substrat+ Enzim (Papain)+ Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon grafiği (10 mg/mL’lik örneklerden alınan 30 μ L’lik hacimler için)



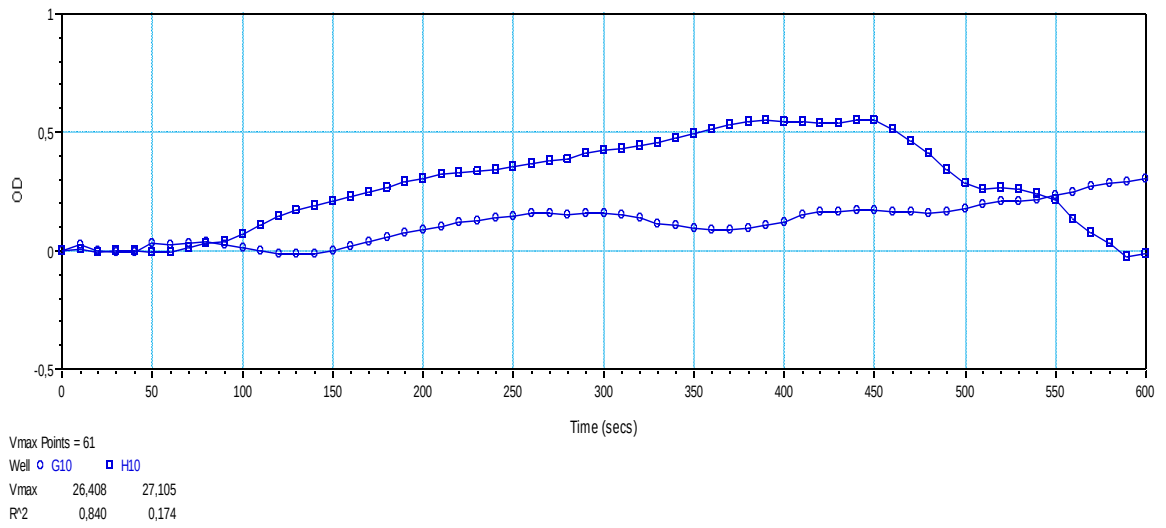
Şekil 4.112. Yaban eriğinin metanol yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 30 µL’ lik örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



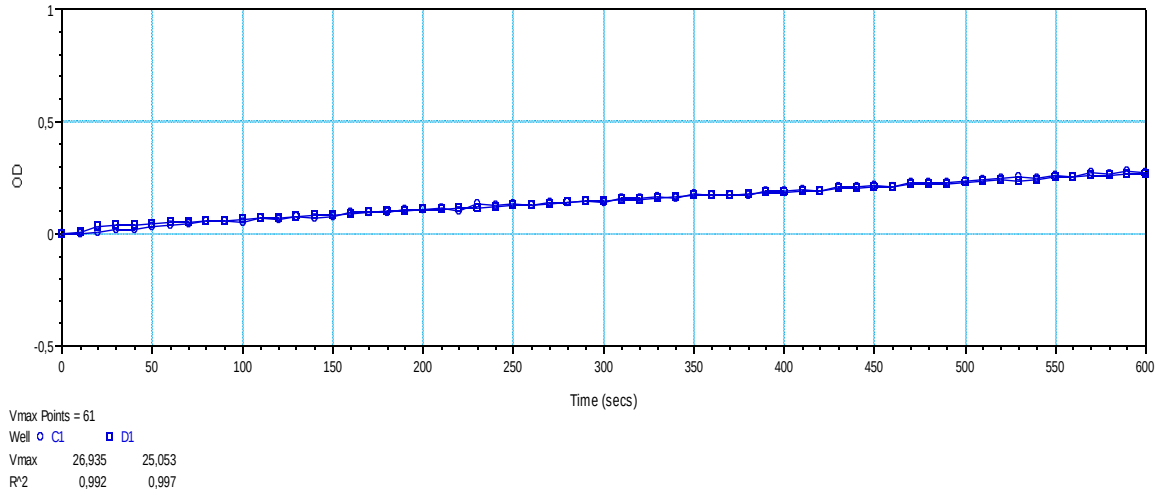
Şekil 4.113. Yaban eriğinin metanol meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 30 µL’ lik örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



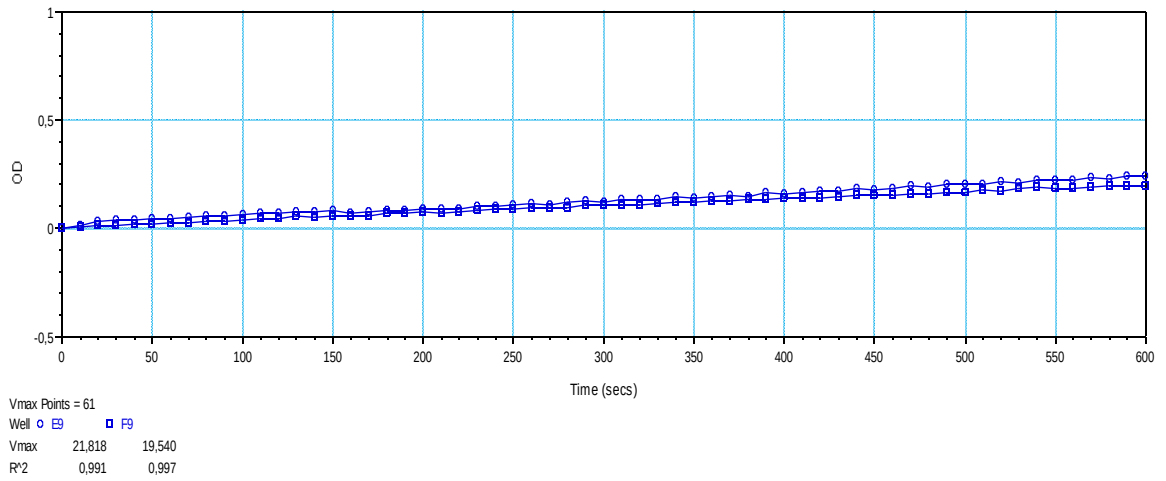
Şekil 4.114. Yaban eriğinin metanol çiçek özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 30 μ L’ lik örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



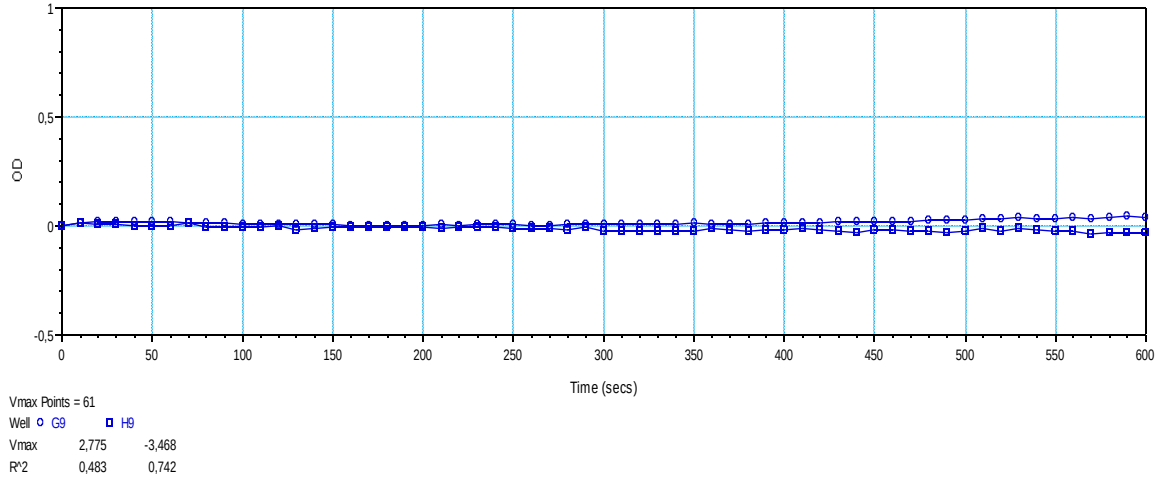
Şekil 4.115. Yaban eriğinin DCM yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 30 μ L’ lik örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



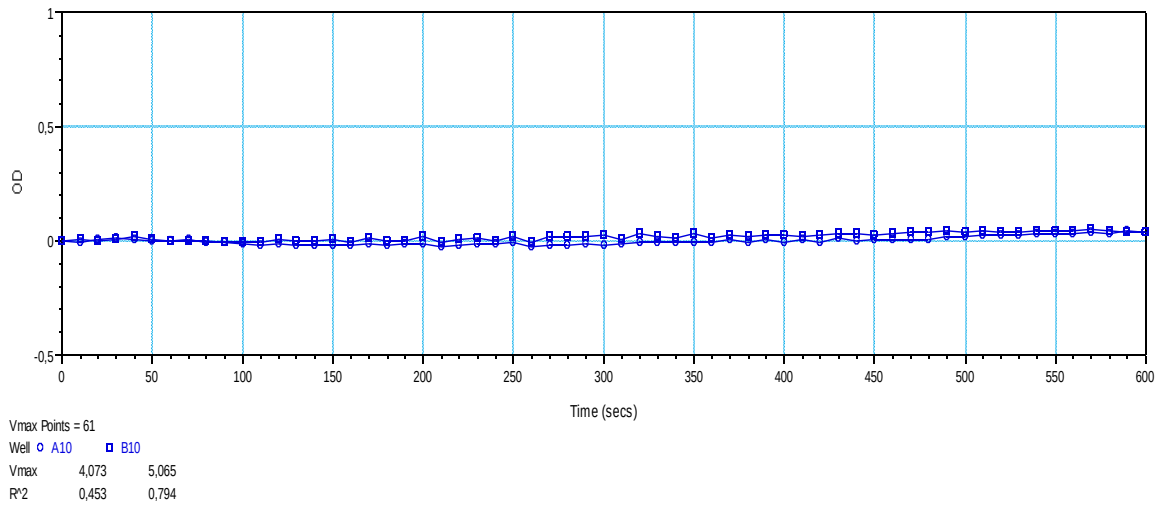
Şekil 4.116. Yaban eriğinin DCM meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 30 μ L ‘lik örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



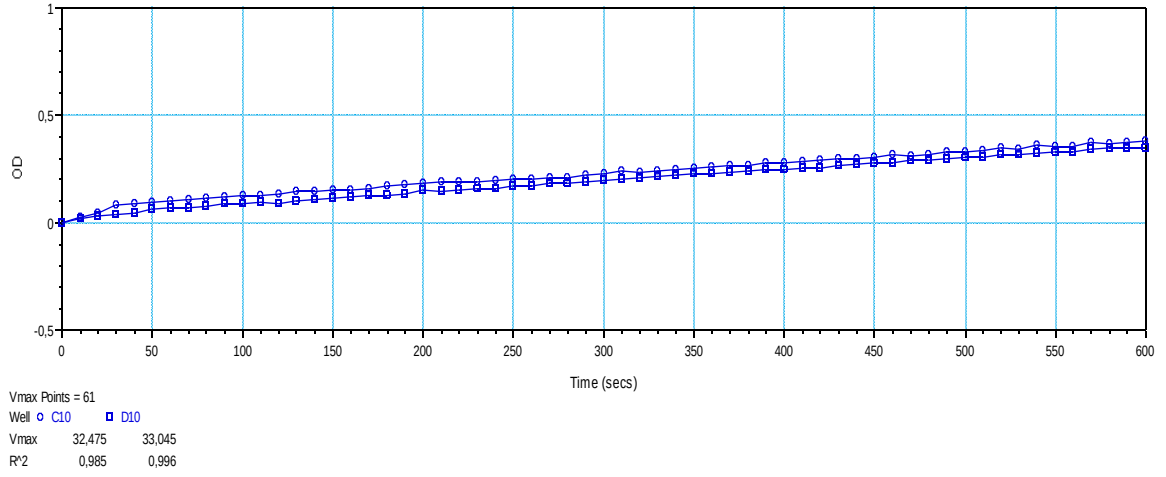
Şekil 4.117. Yaban eriğinin etilasetat meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 30 μ L’ lik örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



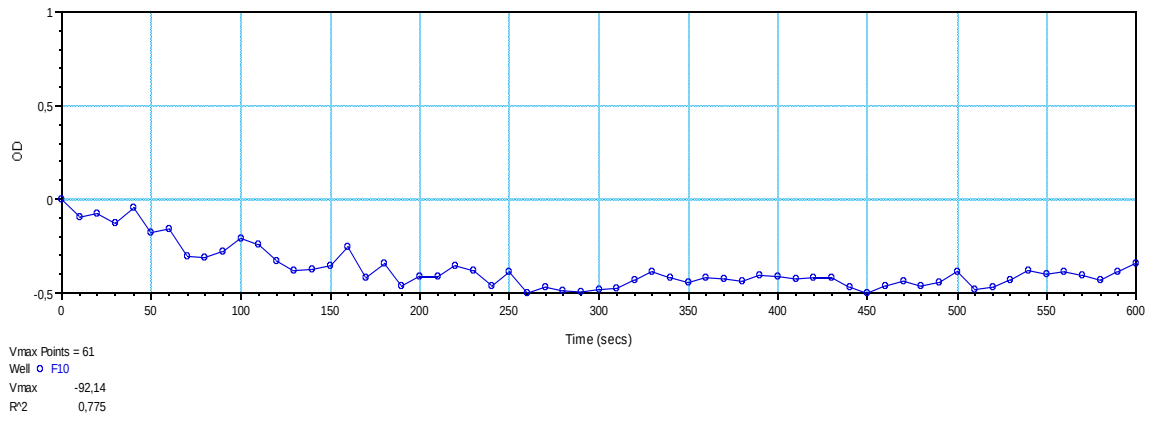
Şekil 4.118. Yaban eriğinin etilasetat çiçek özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 30 μ L’lik örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



Şekil 4.119. Yaban eriğinin etilasetat yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 30 μ L’lik örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



Şekil 4.120. Yaban eriğinin maserasyon meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 30 μ L’ lik örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



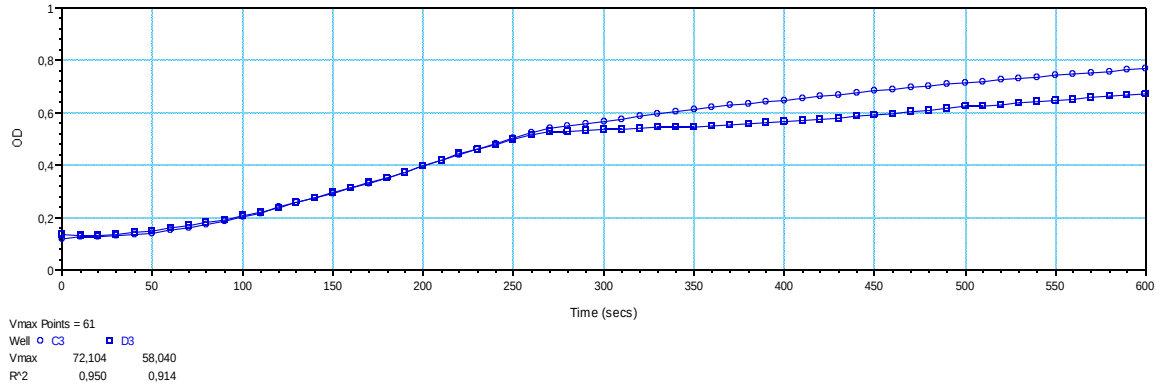
Şekil 4.121. Yaban eriğinin hekzan çiçek özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 30 μ L’ lik örnek) papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği

4.6.2. Tirozinaz İnhibisyonu

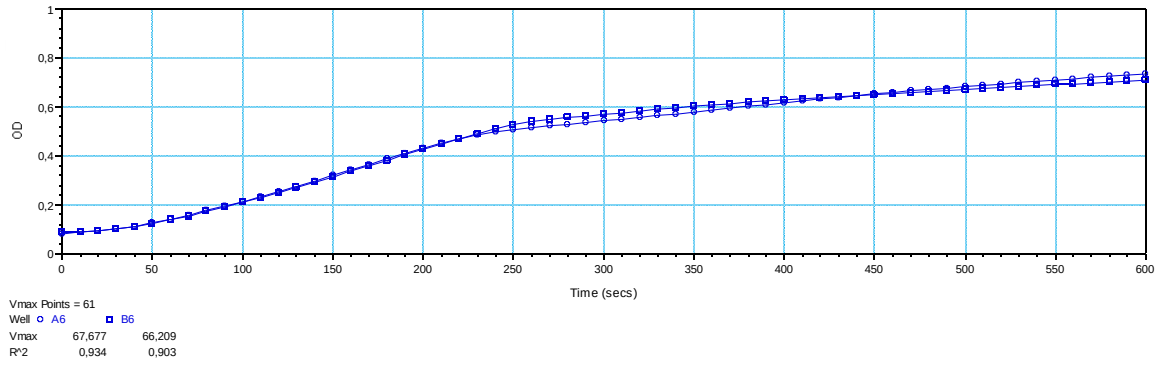
Çizelge 4.25. Tirozinaz enzimi % inhibisyon değerleri

Özütler	1 mg/mL' lik örnekler		10 mg/mL' lik örnekler			
	V_{max}	% inhibisyon	V_{max}	10 μ L için % inhibisyon ($V_{toplaml} = 200 \mu$ L)	V_{max}	30 μ L için % inhibisyon ($V_{toplaml} = 200 \mu$ L)
Metanol yaprak	61,33	8,36	51,16	21,29	33,02	37,28
Metanol meyve	57,87	13,53	56,35	13,30	43,36	17,64
Metanol çiçek	73,01	-	56,19	13,55	44,15	16,14
DCM yaprak	64,46	3,69	59,70	8,15	43,85	16,71
DCM meyve	59,06	11,75	62,73	3,49	45,60	13,39
Etil asetat meyve	61,55	8,03	57,15	12,08	39,38	25,20
Etil asetat çiçek	61,42	8,23	42,19	35,09	36,31	31,03
Etil asetat yaprak	64,67	3,38	51,57	20,66	36,82	30,06
Maserasyon meyve (MeOH)	63,33	5,38	50,96	2,16	32,31	38,63
Hekzan çiçek	62,21	7,05	70,05	-	56,86	-

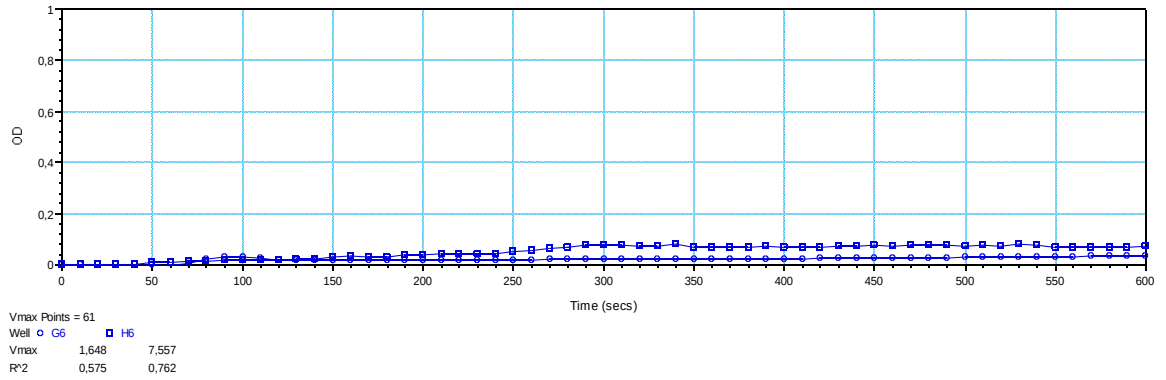
Tirozinaz enziminin inhibisyon sonuçlarına bakıldığında; meyve, yaprak ve çiçek özütlerinde özüt derişimi artırıldığında özütlerin genel olarak inhibisyon değerlerinde artma olduğu görülmektedir. Özütlerin 10 mg/mL'lik örneklerde derişim artırıldığında yaban eriğı meyvesinde etil asetat meyve ve maserasyon meyve (MeOH) özütünün, çiçeğinde etil asetat çiçek özütünün, yaprağında ise metanol yaprak özütünün daha yüksek inhibisyona sahip görülmektedir.



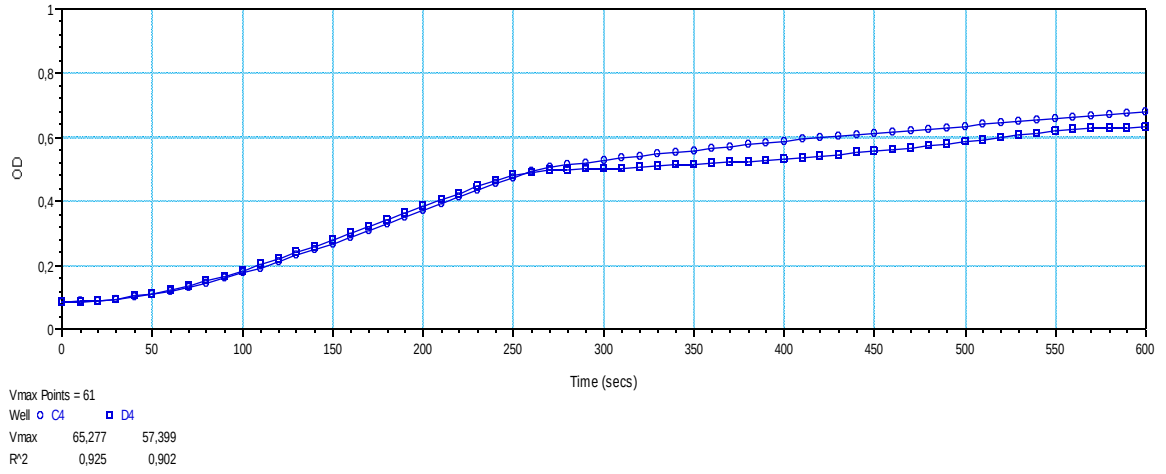
Şekil 4.122. Substrat+ Enzim (Tirozinaz)+ Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon grafiği



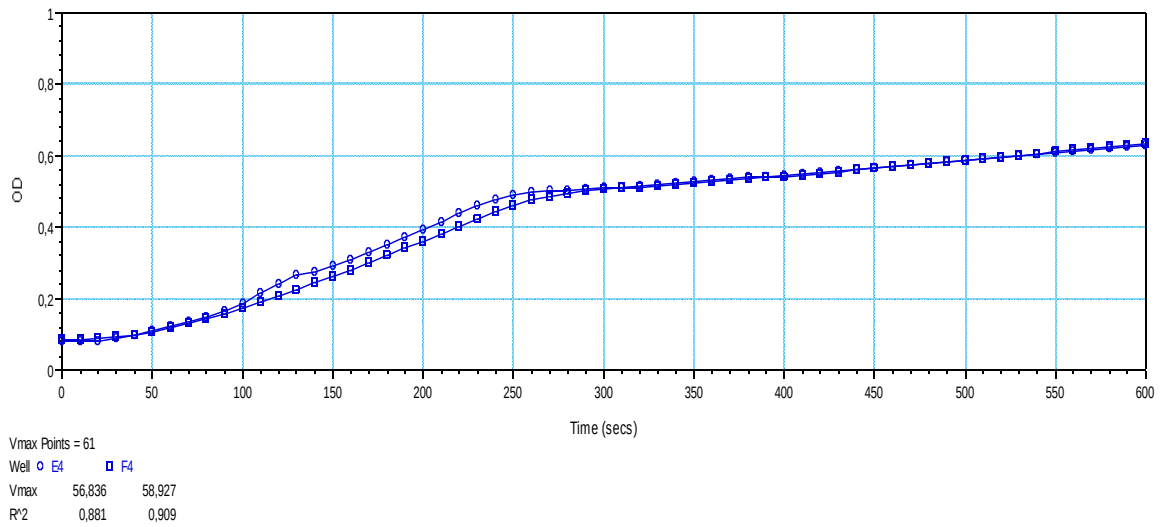
Şekil 4.123. DMSO + Substrat+ Enzim (Tirozinaz)+ Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon grafiği



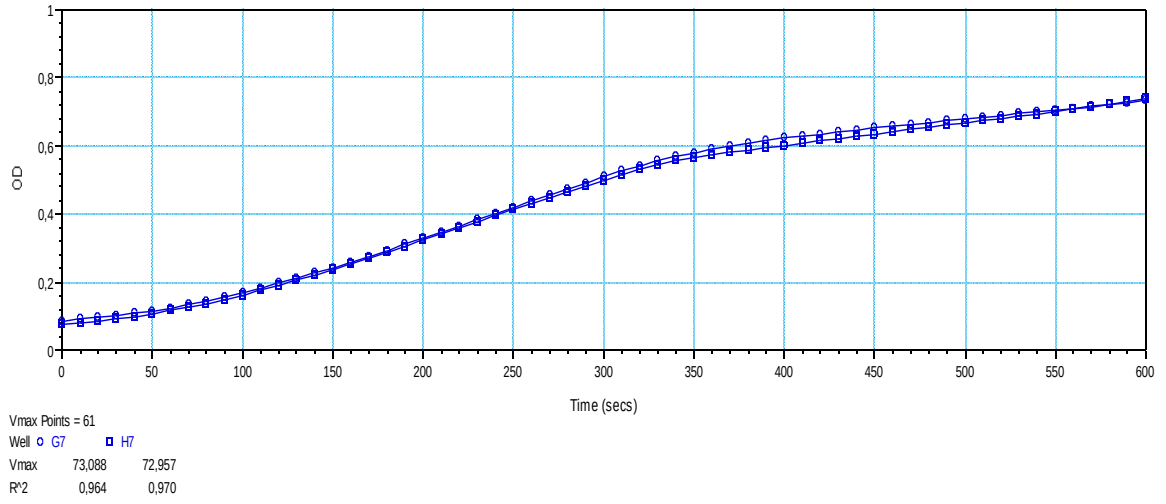
Şekil 4.124. PMSF+Substrat+ Enzim (Tirozinaz)+ Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon grafiği



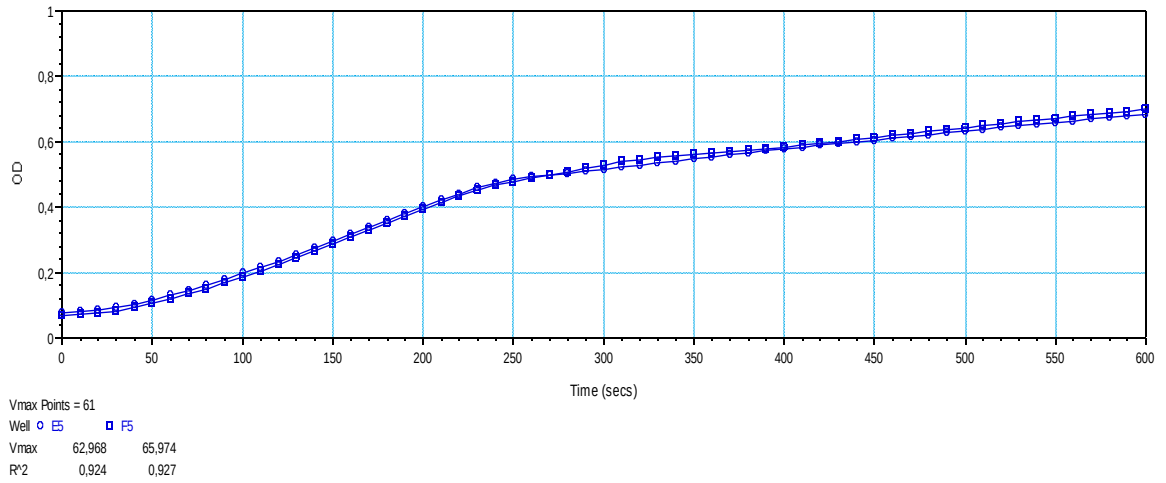
Şekil 4.125. Yaban eriğinin metanol yaprak özütünün (1 mg/mL’lik özüt) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



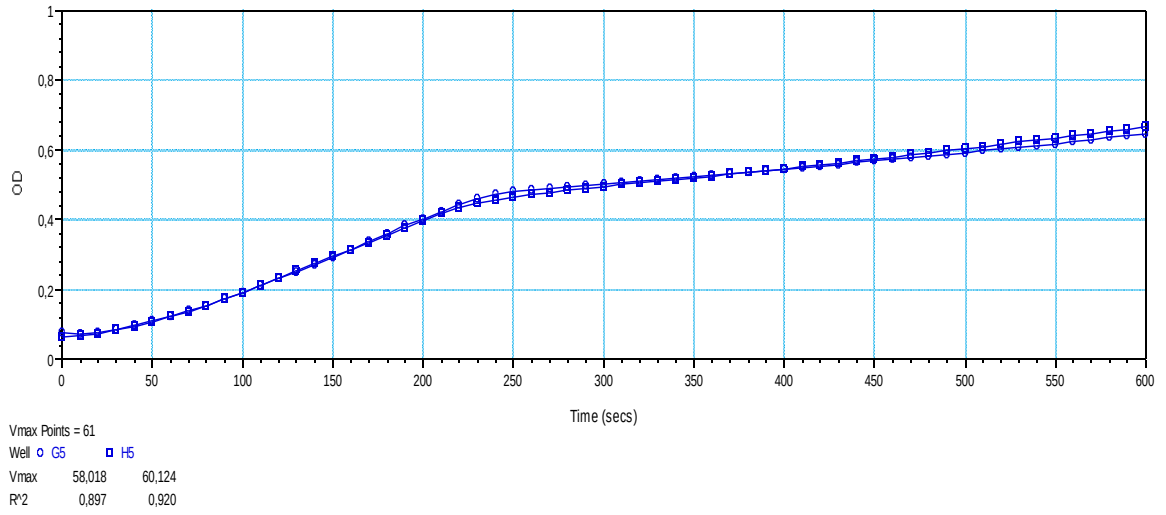
Şekil 4.126. Yaban eriğinin metanol meyve özütünün (1 mg/mL’lik özüt) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



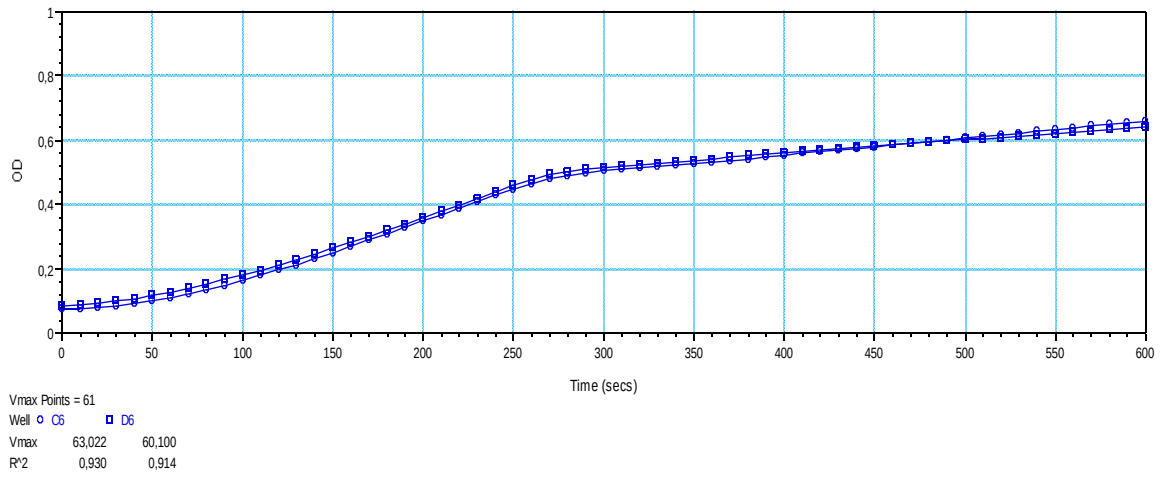
Şekil 4.127. Yaban eriğinin metanol çiçek özütünün (1 mg/mL’lik özüt) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



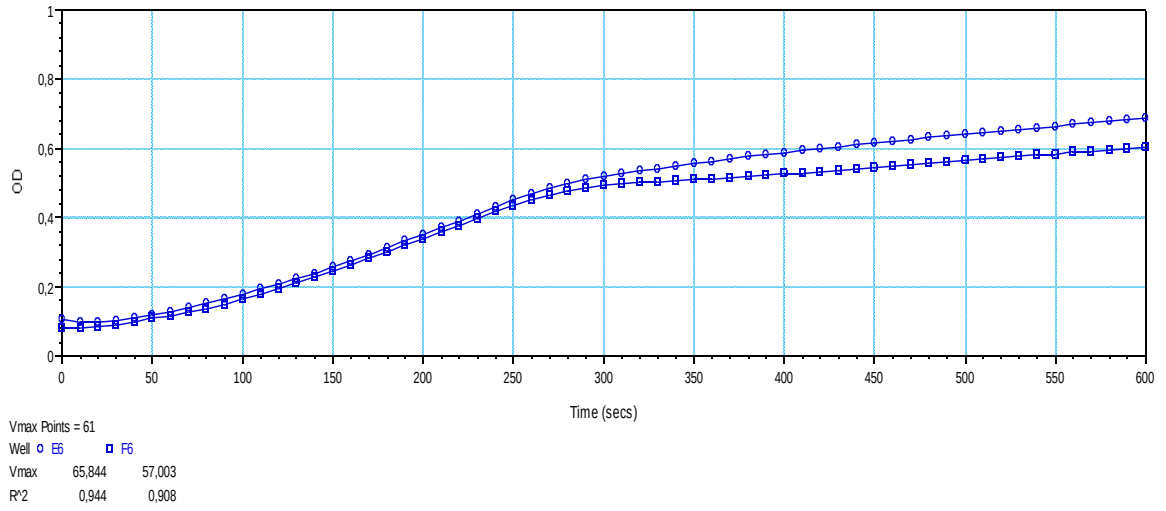
Şekil 4.128. Yaban eriğinin DCM yaprak özütünün (1 mg/mL’lik özüt) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



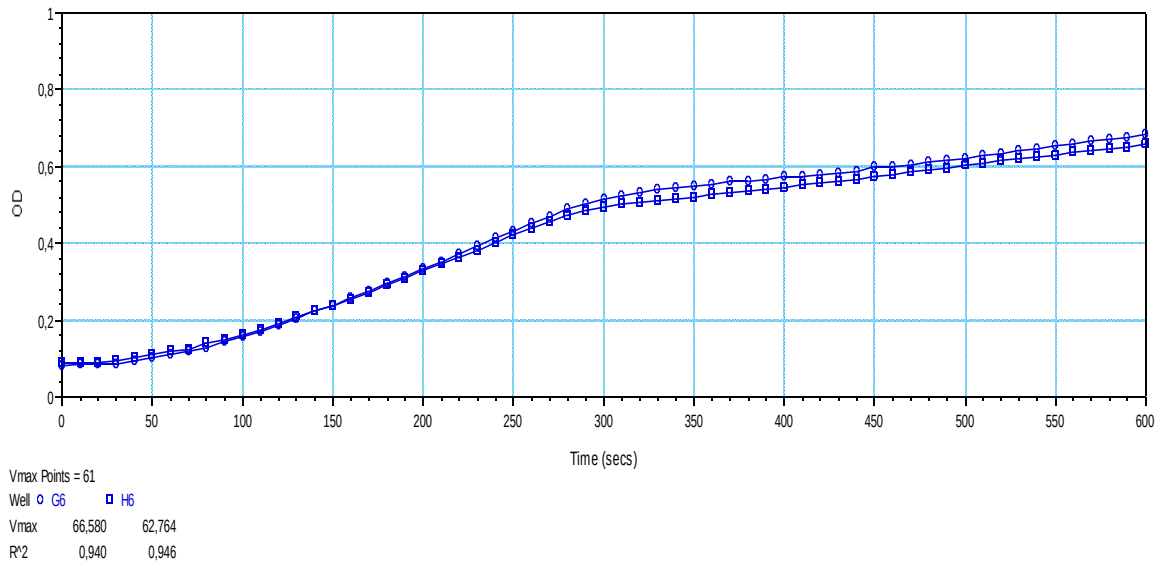
Şekil 4.129. Yaban eriğinin DCM meyve özütünün (1 mg/mL’lik özüt) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



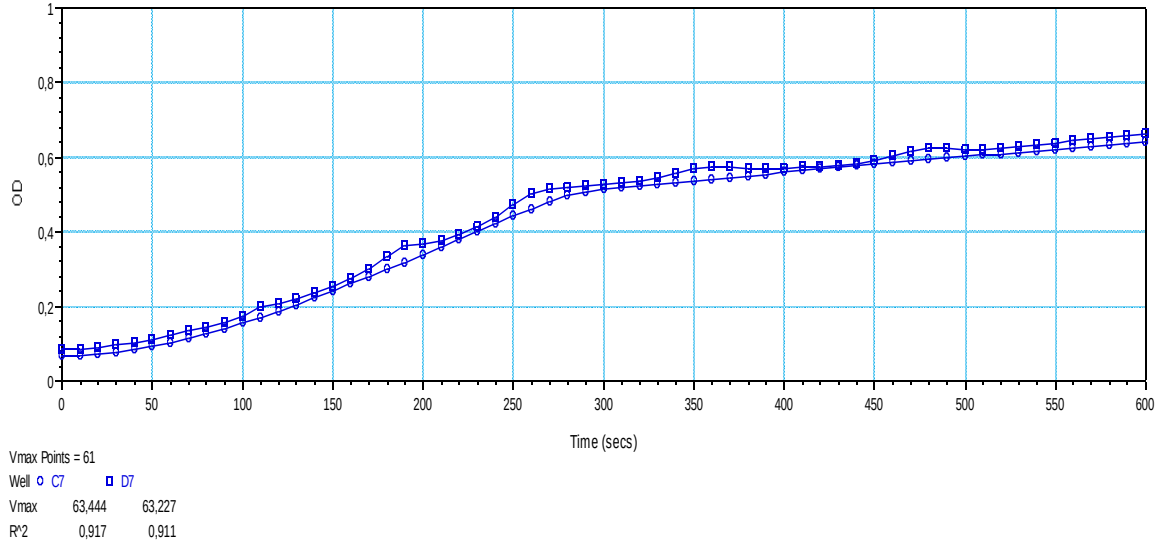
Şekil 4.130. Yaban eriğinin etilasetat meyve özütünün (1 mg/mL’lik özüt) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



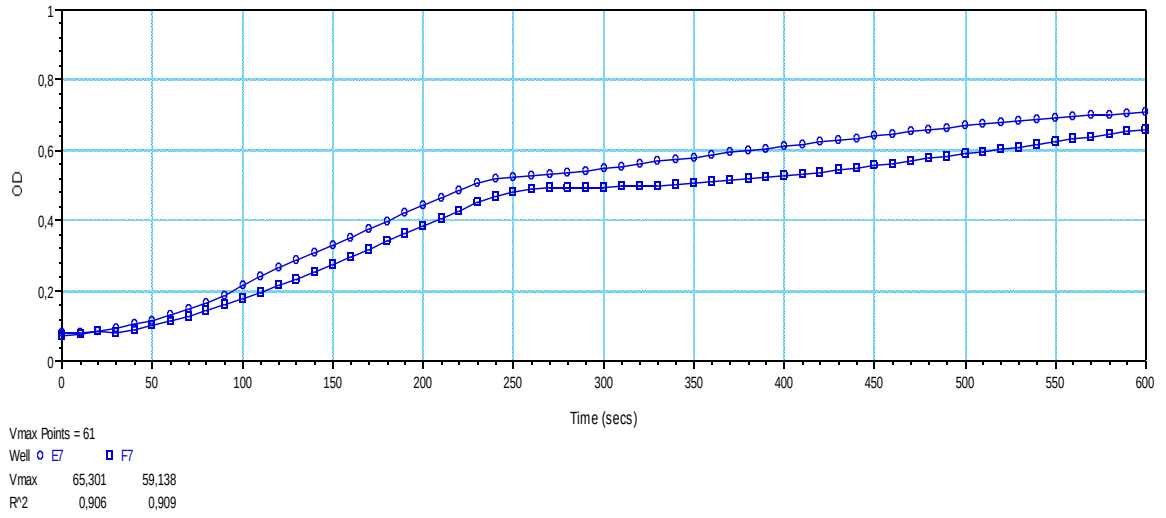
Şekil 4.131. Yaban eriğinin etilasetat çiçek özütünün (1 mg/mL’lik özüt) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



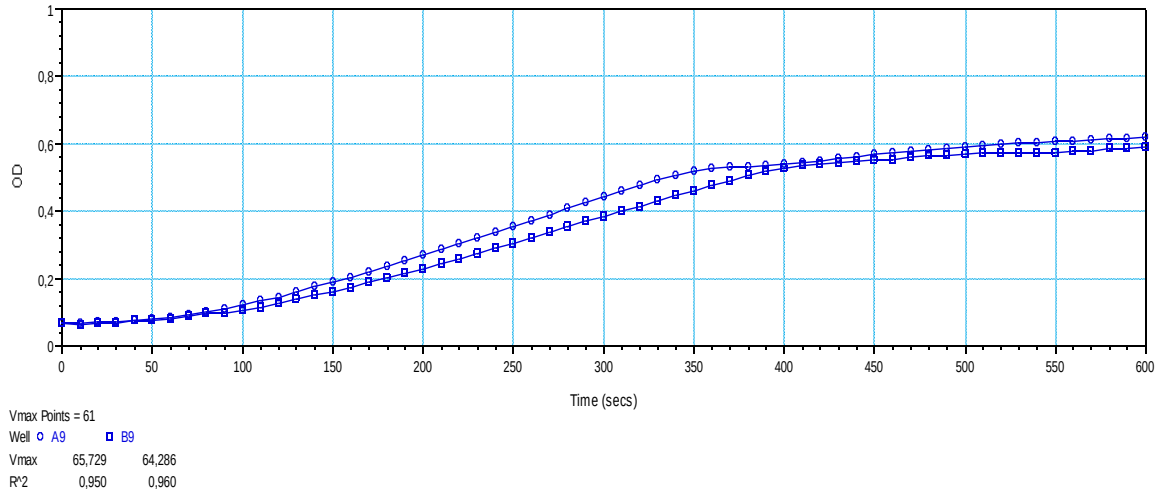
Şekil 4.132. Yaban eriğinin etilasetat yaprak özütünün (1 mg/mL’lik özüt) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



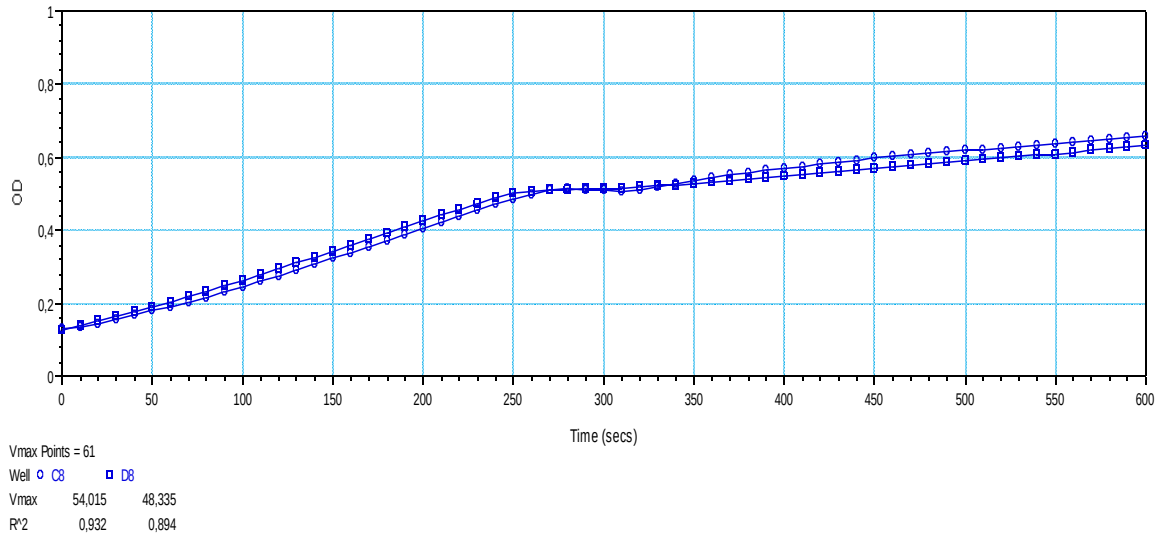
Şekil 4.133. Yaban eriğinin maserasyon meyve özütünün (1 mg/mL'lik özüt) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



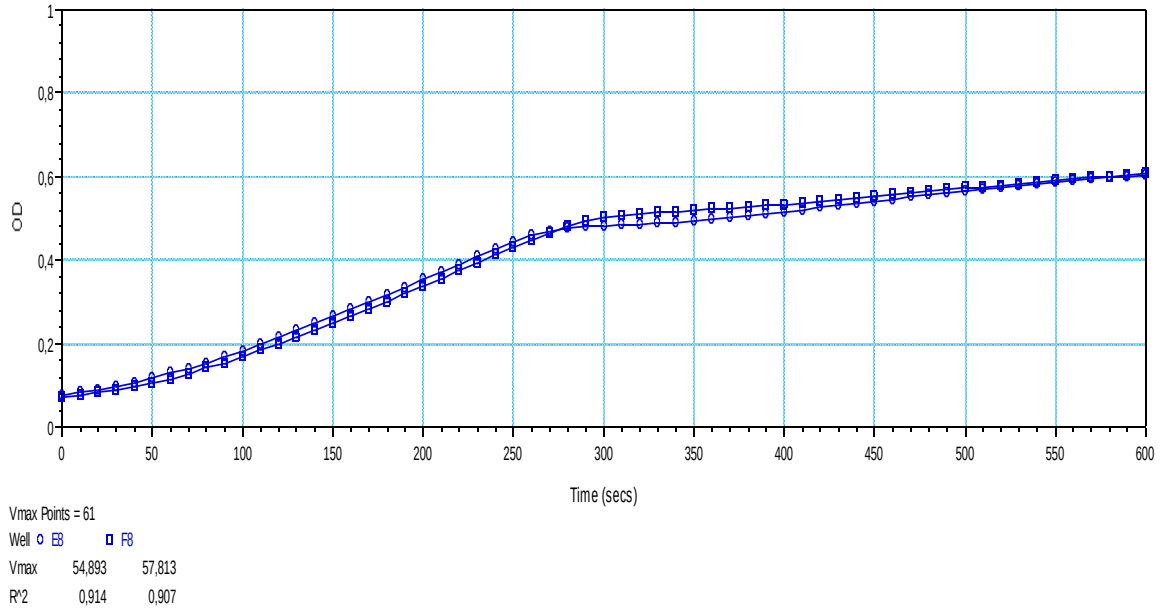
Şekil 4.134. Yaban eriğinin hekzan çiçek özütünün (1 mg/mL'lik özüt) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



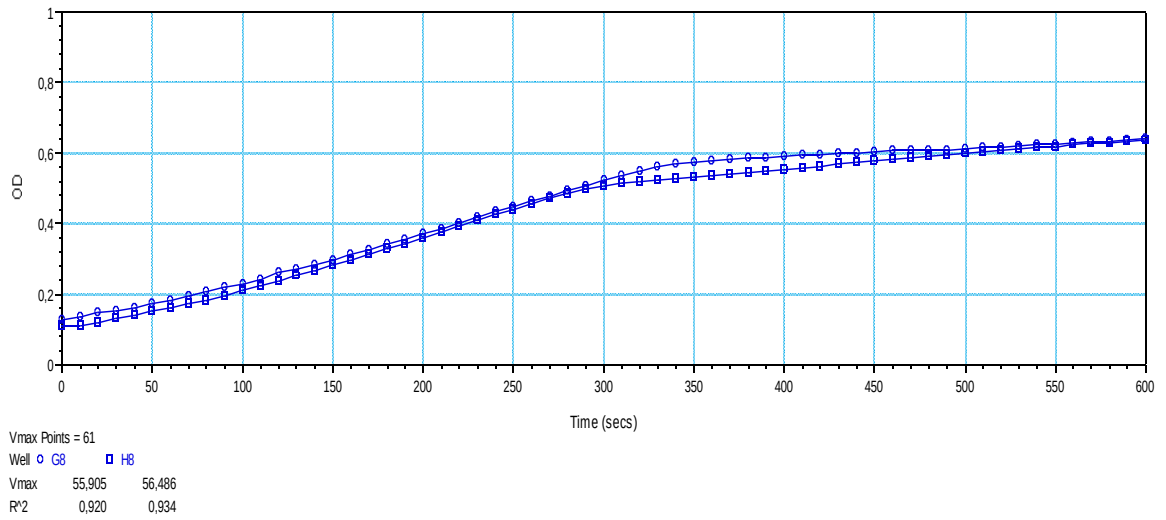
Şekil 4.135. DMSO+ Substrat+ Enzim (Tirozinaz)+ Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon grafiği (10 mg/mL’lik örneklerden alınan 10 µL hacimler için)



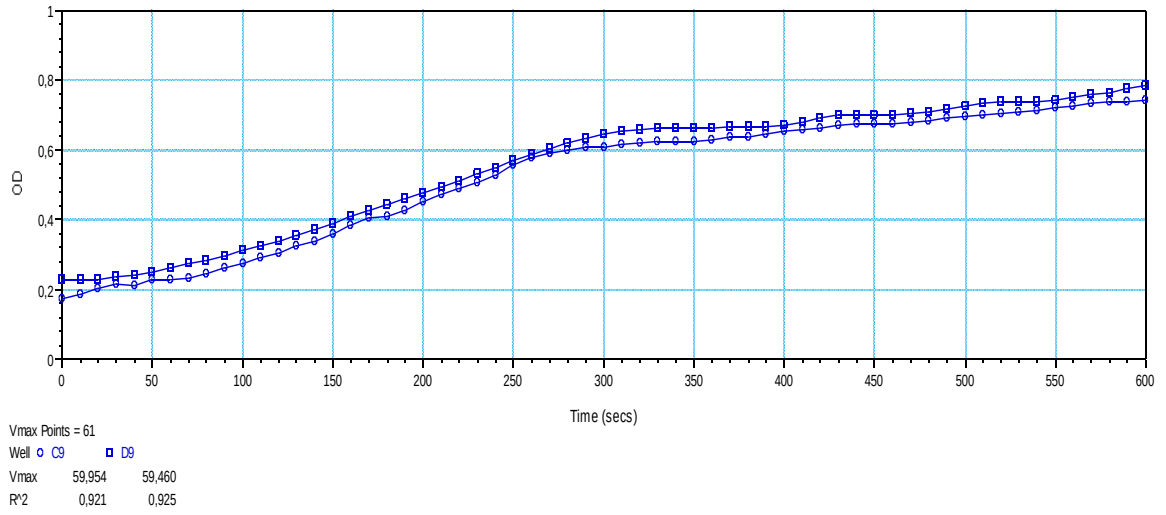
Şekil 4.136. Yaban eriğinin metanol yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



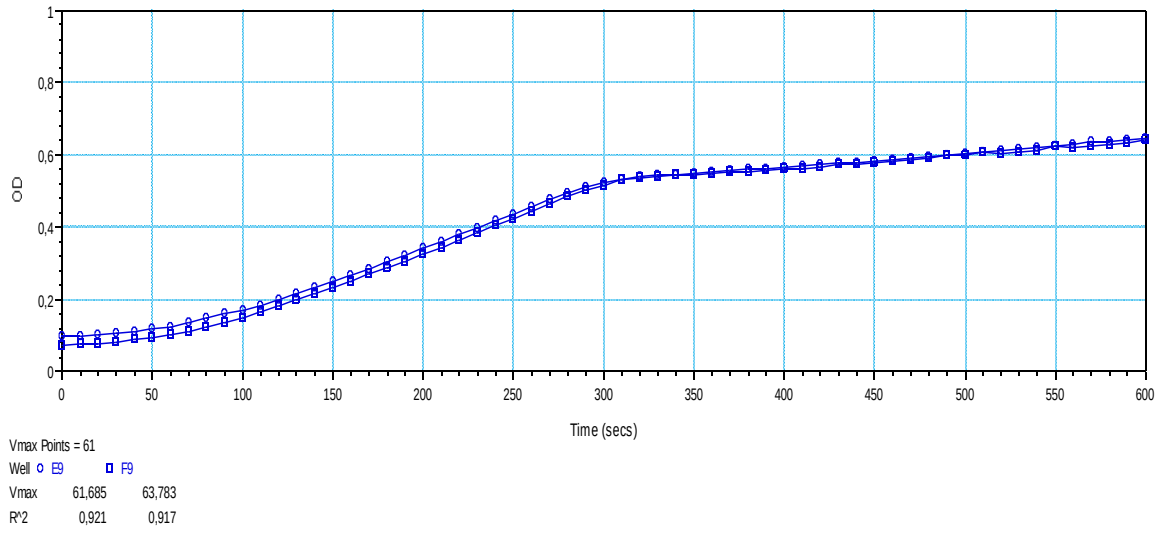
Şekil 4.137. Yaban eriğinin metanol meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL ‘lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



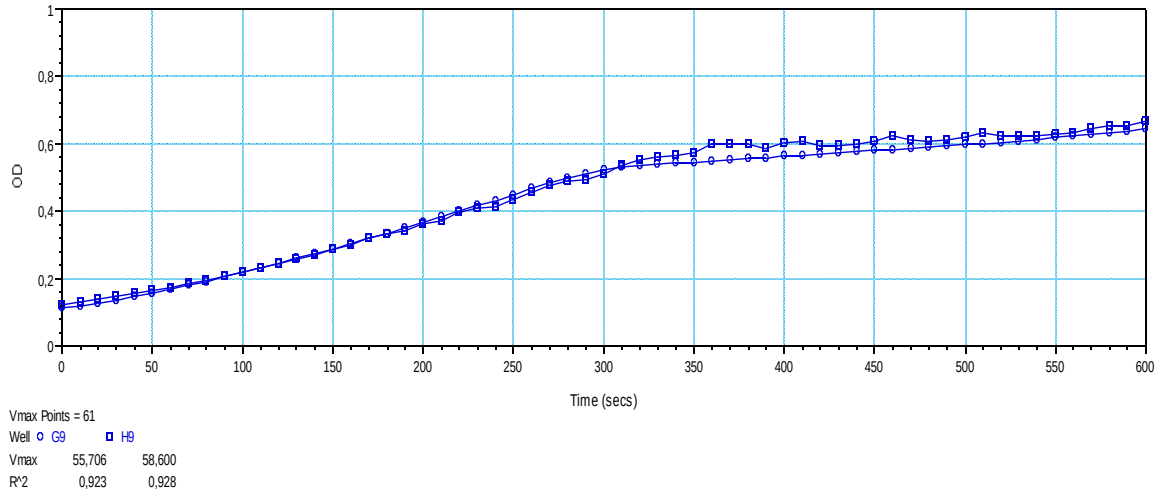
Şekil 4.138. Yaban eriğinin metanol çiçek özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL ‘lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



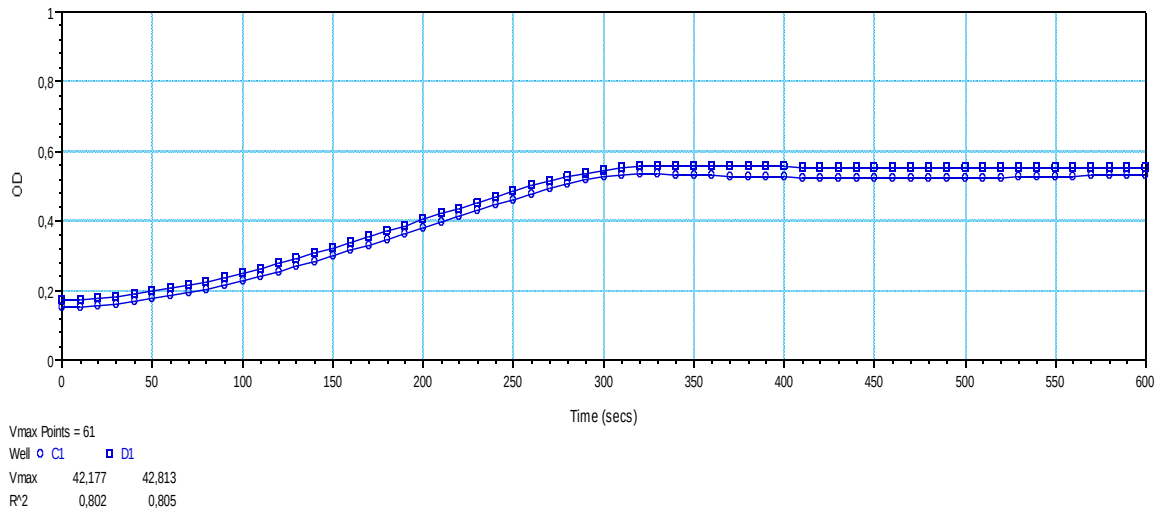
Şekil 4.139. Yaban eriğinin DCM yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 μ L’lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



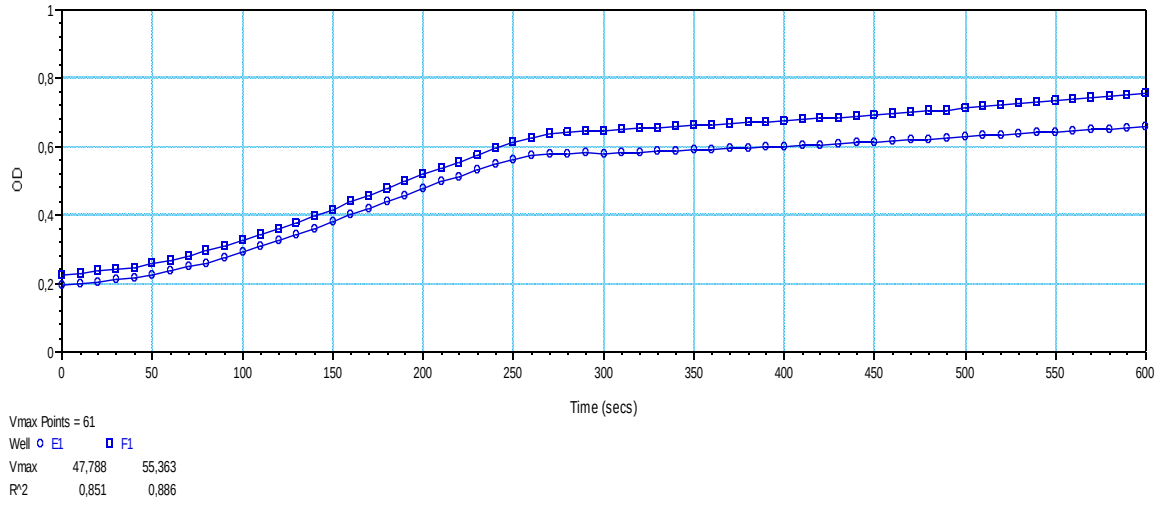
Şekil 4.140. Yaban eriğinin DCM meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 μ L’lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



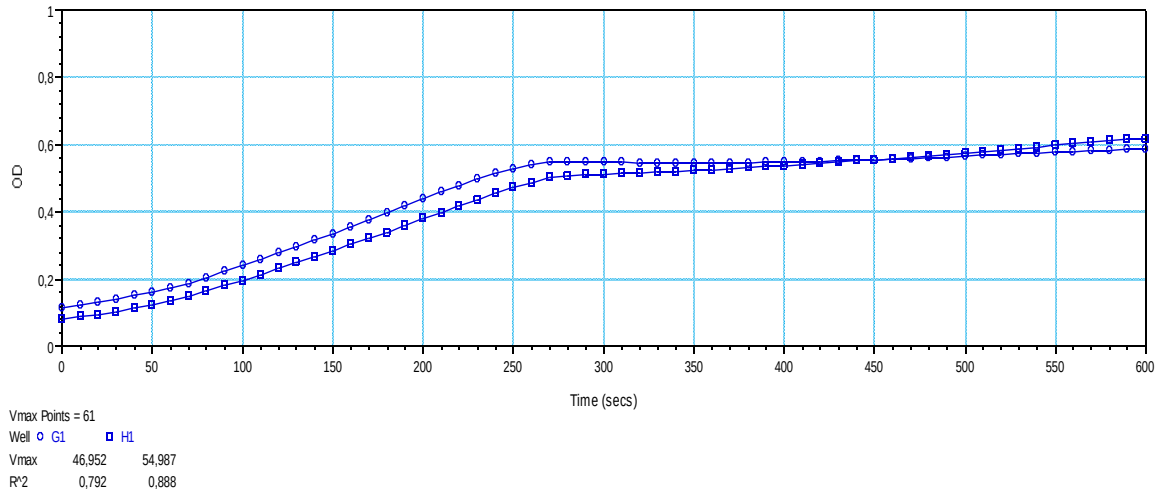
Şekil 4.141. Yaban eriğinin etilasetat meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL ‘lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



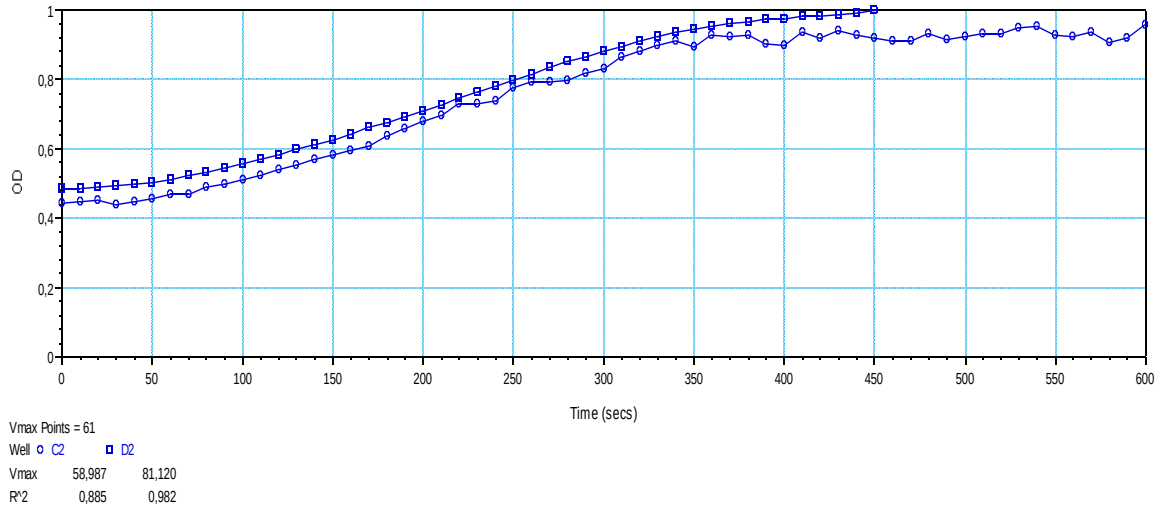
Şekil 4.142. Yaban eriğinin etilasetat çiçek özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



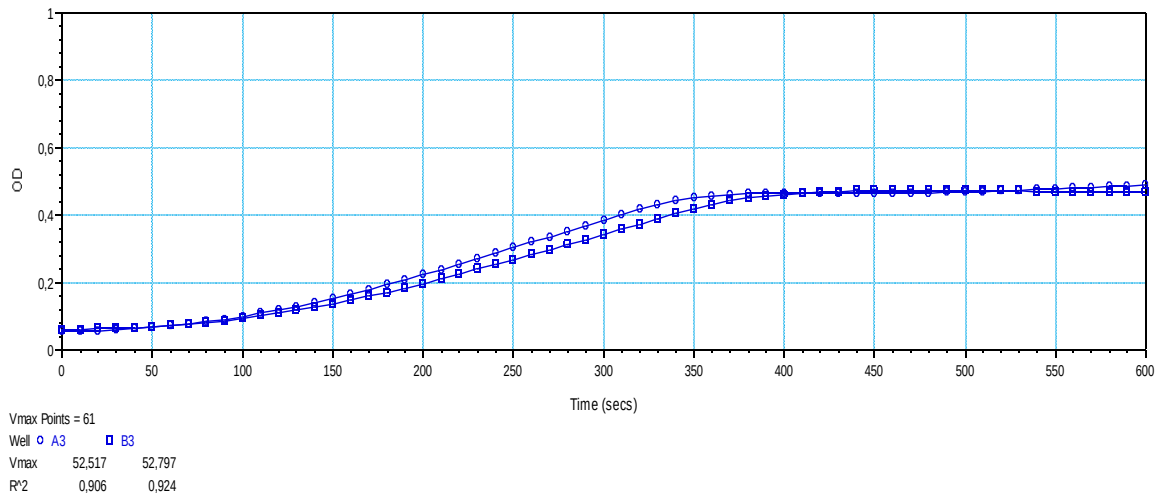
Şekil 4.143. Yaban eriğinin etilasetat yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



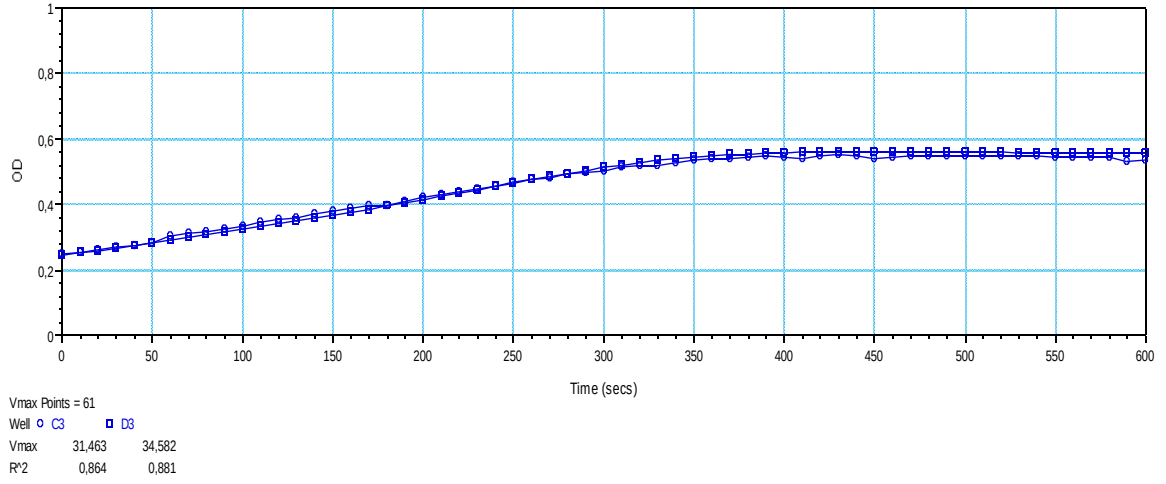
Şekil 4.144. Yaban eriğinin maserasyon meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



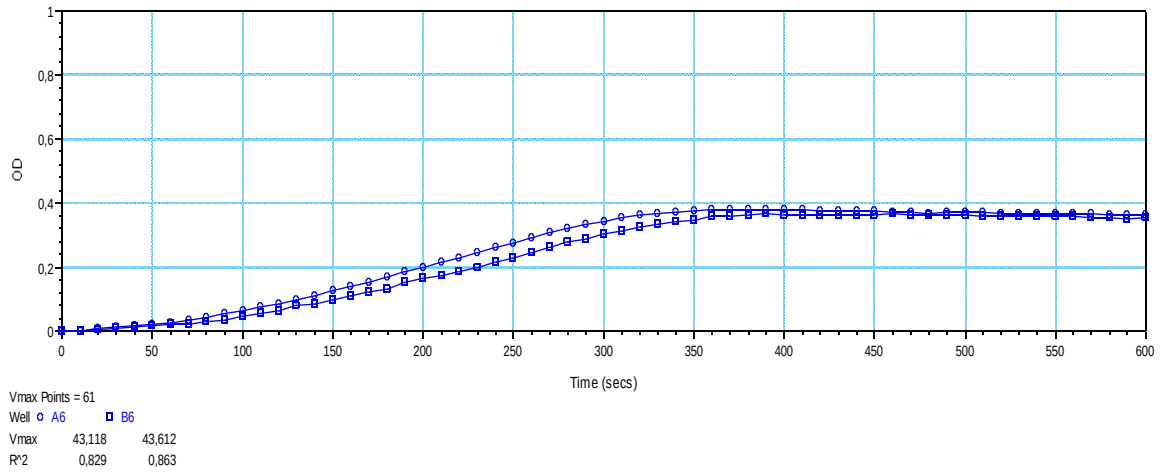
Şekil 4.145. Yaban eriğinin hekzan çiçek özütünün (10 mg/mL'lik özüt- 10 µL' lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



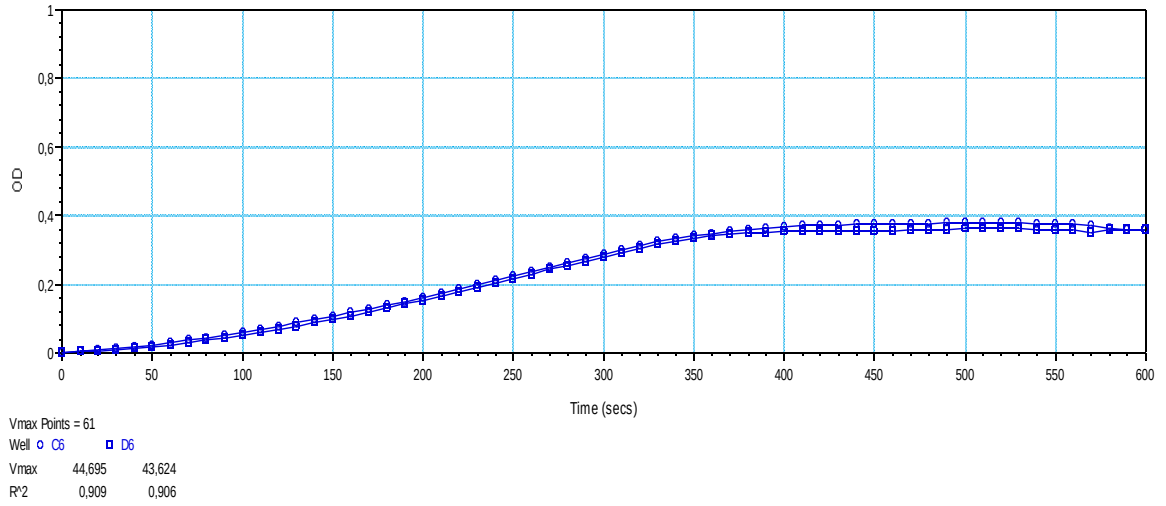
Şekil 4.146. DMSO+ Substrat+ Enzim (Tirozinaz)+ Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon grafiği (10 mg/mL'lik örneklerden alınan 30 µL'lik hacimler için)



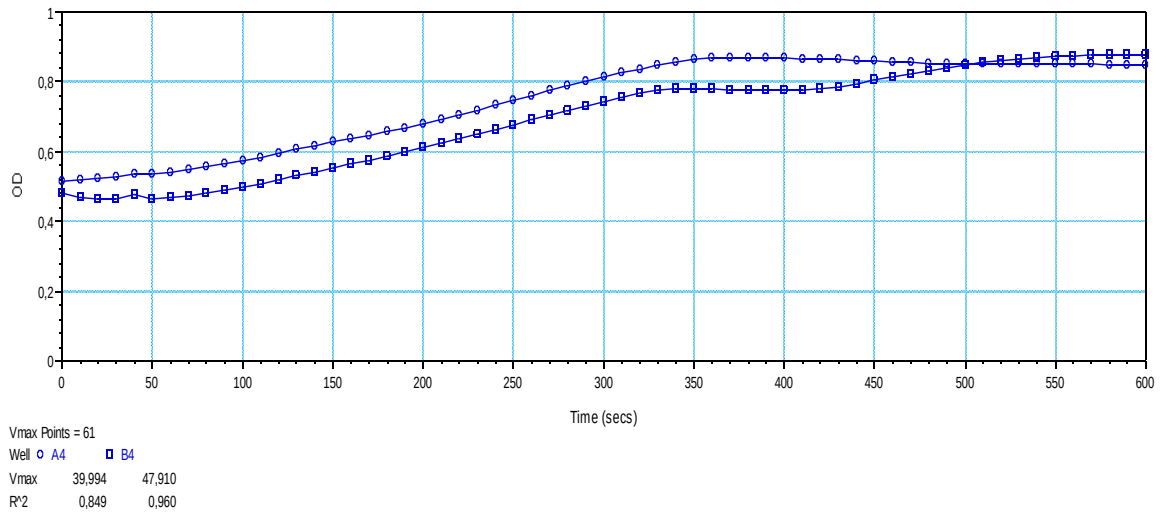
Şekil 4.147. Yaban eriğinin metanol yaprak özütünün (10 mg/mL'lik özüt- 30 μ L' lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



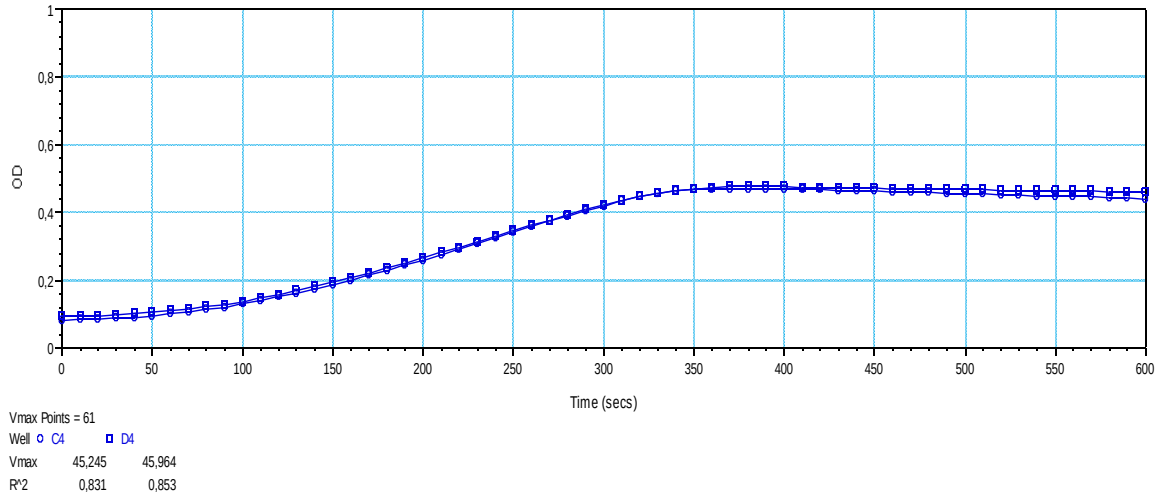
Şekil 4.148. Yaban eriğinin metanol meyve özütünün (10 mg/mL'lik özüt- 30 μ L' lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



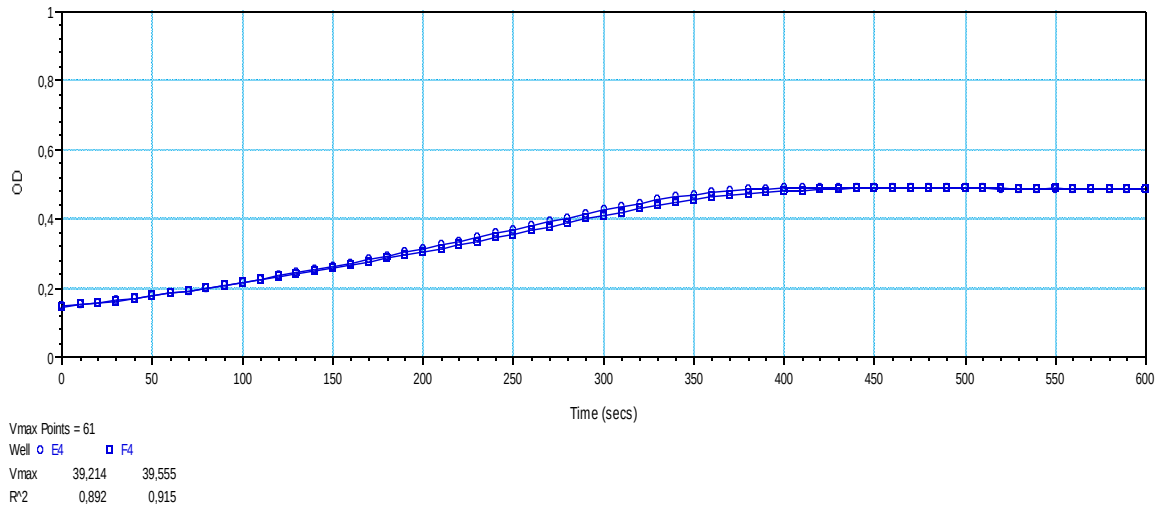
Şekil 4.149. Yaban eriğinin metanol çiçek özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 30 μ L’ lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



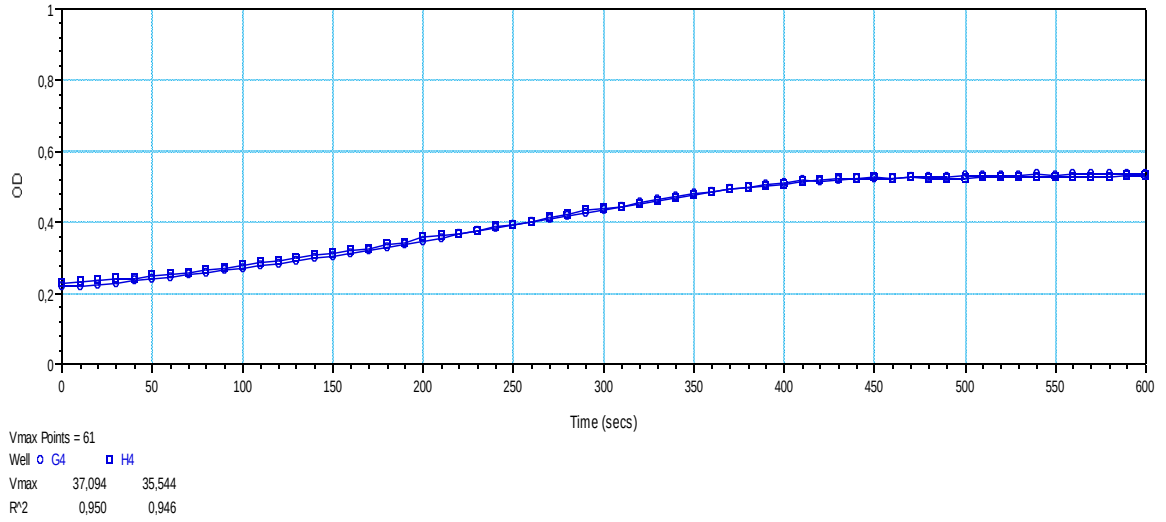
Şekil 4.150. Yaban eriğinin DCM yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 30 μ L’ lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



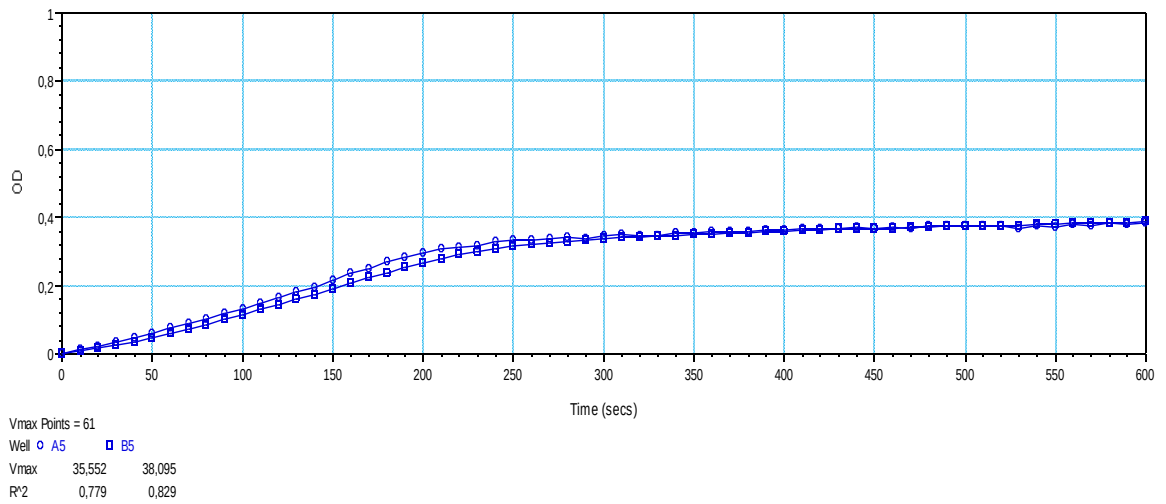
Şekil 4.151. Yaban eriğinin DCM meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 30 µL’ lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



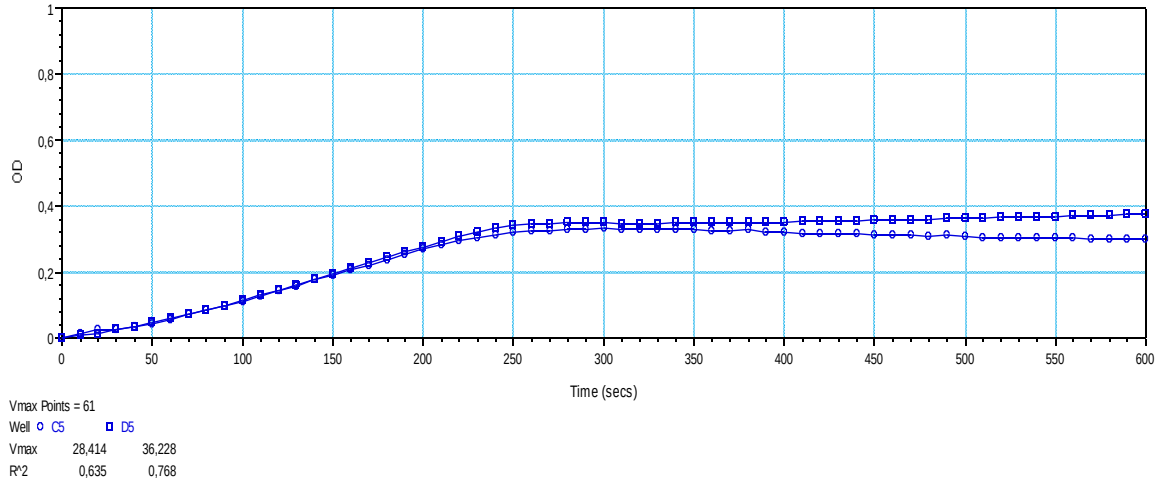
Şekil 4.152. Yaban eriğinin etilasetat meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 30 µL’ lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



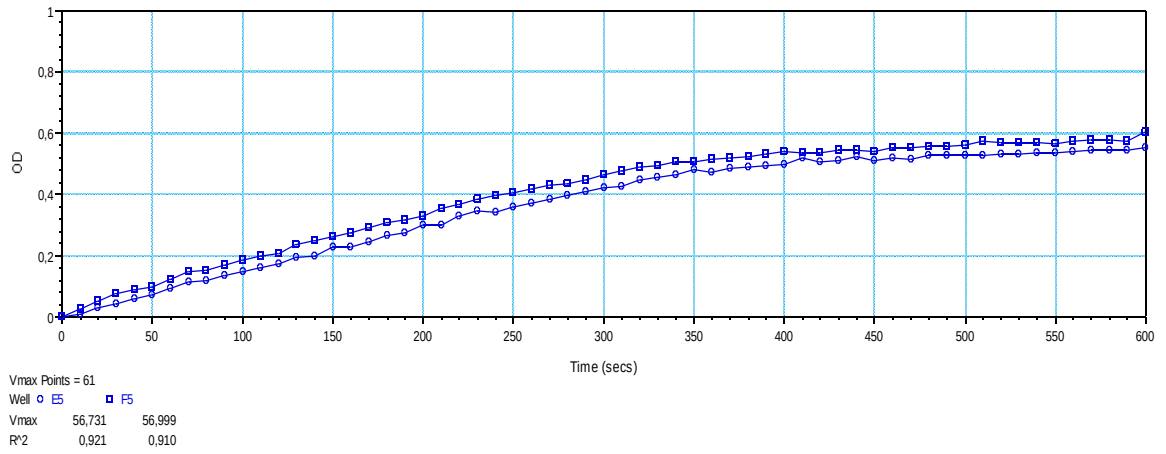
Şekil 4.153. Yaban eriğinin etilasetat çiçek özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 30 µL’ lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



Şekil 4.154.. Yaban eriğinin etilasetat yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 30 µL’ lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



Şekil 4.155. Yaban eriğinin maserasyon meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 30 μ L’ lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



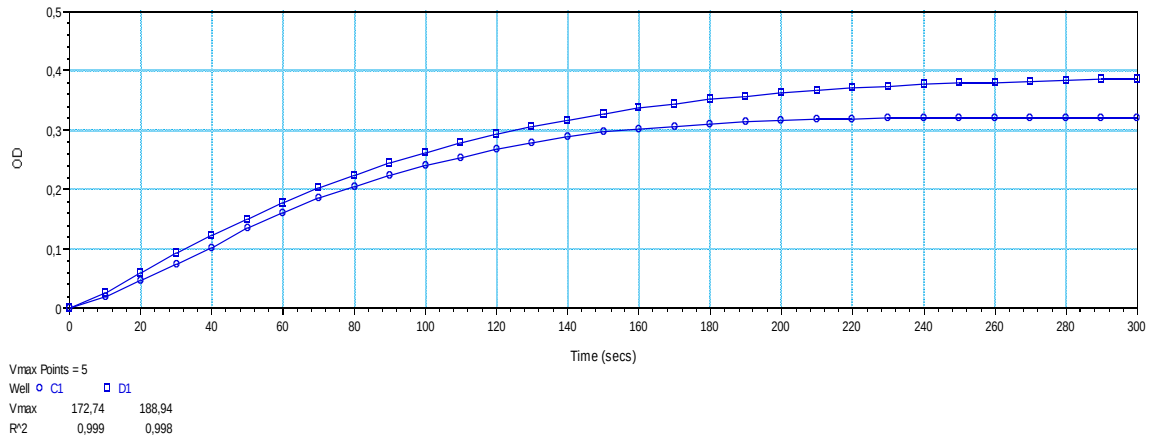
Şekil 4.156. Yaban eriğinin hekzan çiçek özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 30 μ L’ lik örnek) tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği

4.6.3. β - Laktamaz İnhibisyonu

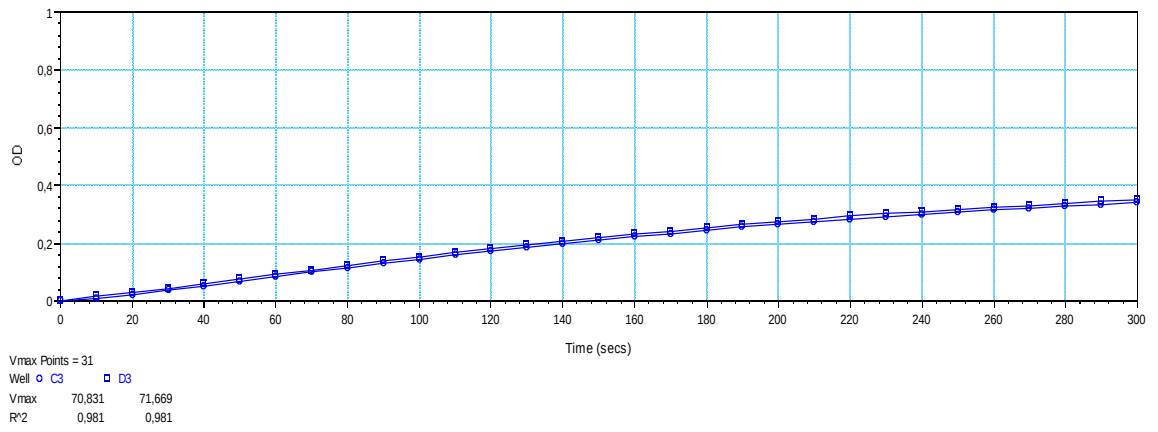
Çizelge 4.26. Penisilinaz enzimi % inhibisyon değerleri

Özütler	1 mg/mL' lik örnekler		10 mg/mL' lik örnekler			
	V_{max}	% inhibisyon	V_{max}	10 μ L için % inhibisyon ($V_{toplam} = 200 \mu$ L)	V_{max}	50 μ L için % inhibisyon ($V_{toplam} = 200 \mu$ L)
Metanol yaprak	76,19	-	67,86	9,32	50,98	2,59
Metanol meyve	80,99	-	67,68	9,56	51,54	1,52
Metanol çiçek	68,63	3,66	68,59	8,35	57,94	-
DCM yaprak	71,14	0,14	63,67	14,92	46,31	11,52
DCM meyve	75,15	-	70,03	6,42	62,00	-
Etil asetat meyve	73,68	-	66,82	10,71	58,01	-
Etil asetat çiçek	69,15	2,93	65,22	12,85	52,32	0,04
Etil asetat yaprak	72,11	-	69,01	7,79	55,82	-
Maserasyon meyve (MeOH)	70,95	0,40	68,98	7,83	56,10	-
Hekzan çiçek	72,60	-	79,15	-	44,38	15,20

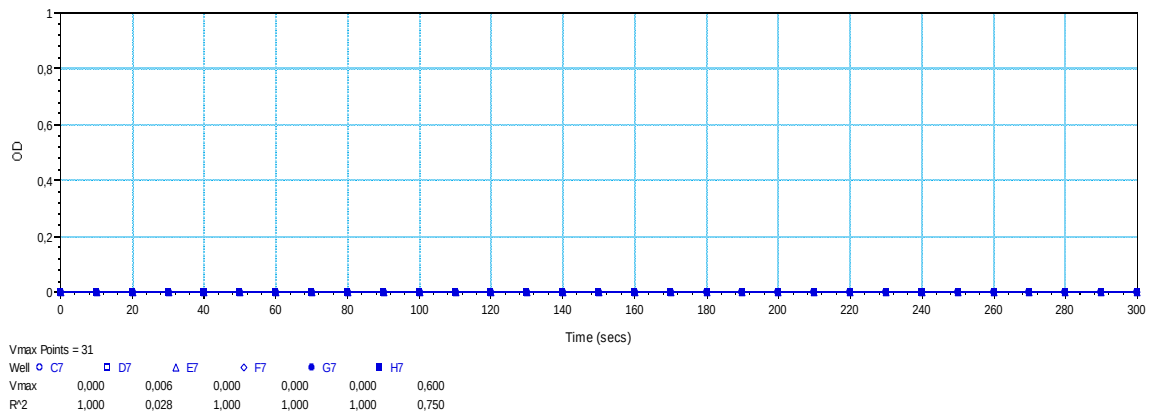
Penisilinaz enziminin inhibisyon sonuçlarına bakıldığında; meyve, yaprak ve çiçek özütlerinde özüt derişimi artırıldığında 10 μ L için yaprak, meyve ve çiçek özütlerinin inhibisyon değerlerinde artma, 50 μ L için ise özütlerin inhibisyon değerlerinde azalma olduğu görülmektedir. Özütlerin 10 mg/mL 'lik örnekleri için derişim artırıldığında; yaban eriğı meyvesinde etil asetat meyve özütünün, çiçeğinde etil asetat çiçek özütünün, yaprağında ise diklorometan yaprak özütünün daha yüksek inhibisyona sahip olduğu belirlenmiştir.



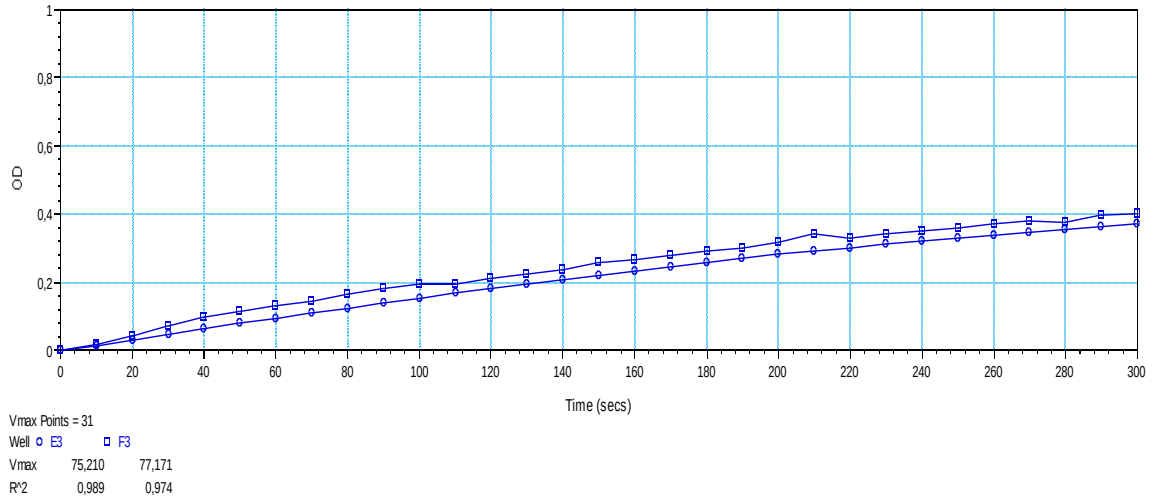
Şekil 4.157. Substrat+ Enzim (Penisilinaz)+ Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon grafiği



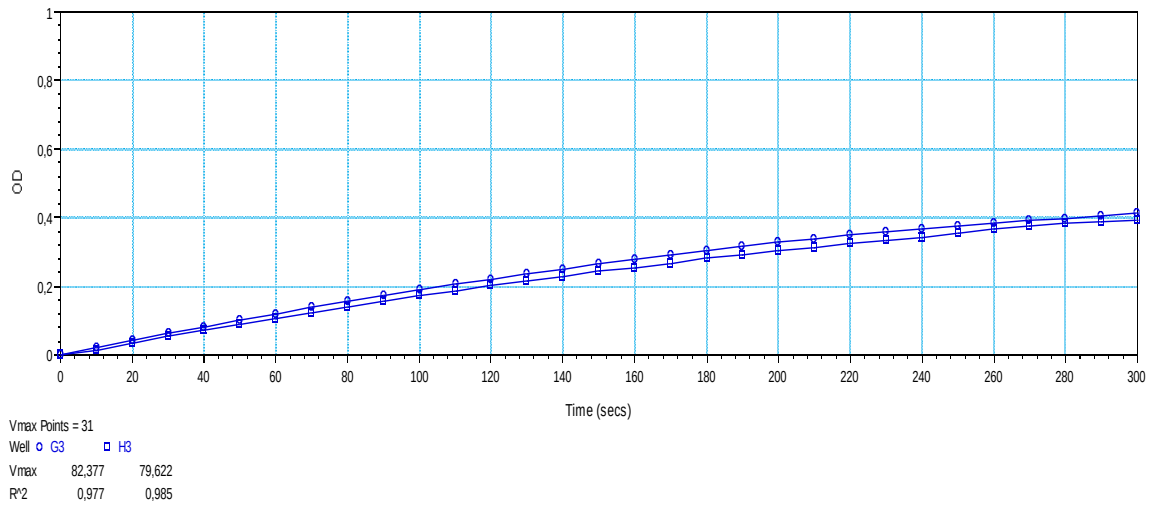
Şekil 4.158. DMSO+ Substrat+ Enzim (Penisilinaz)+ Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon grafiği



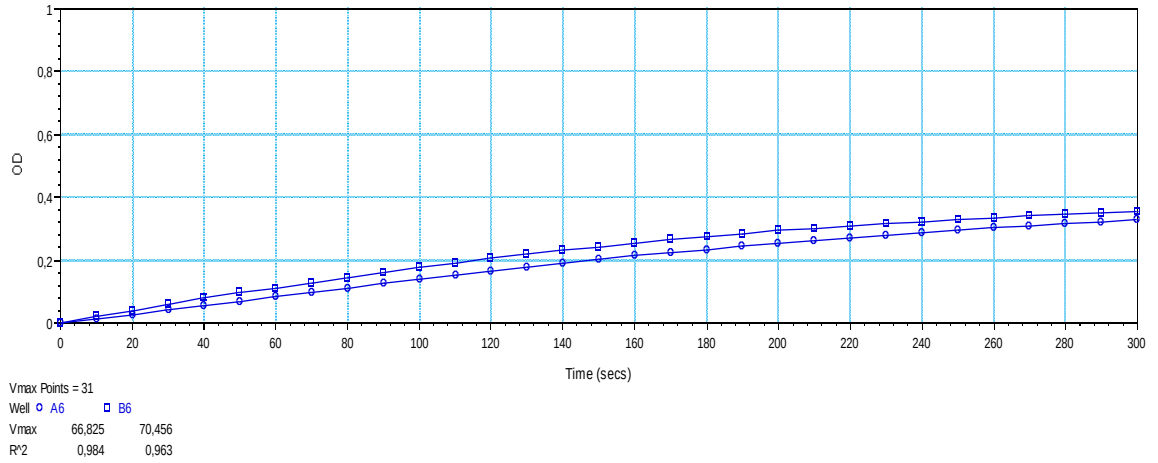
Şekil 4.159. PMSF+ Substrat+ Enzim (Penisilinaz)+ Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon grafiği



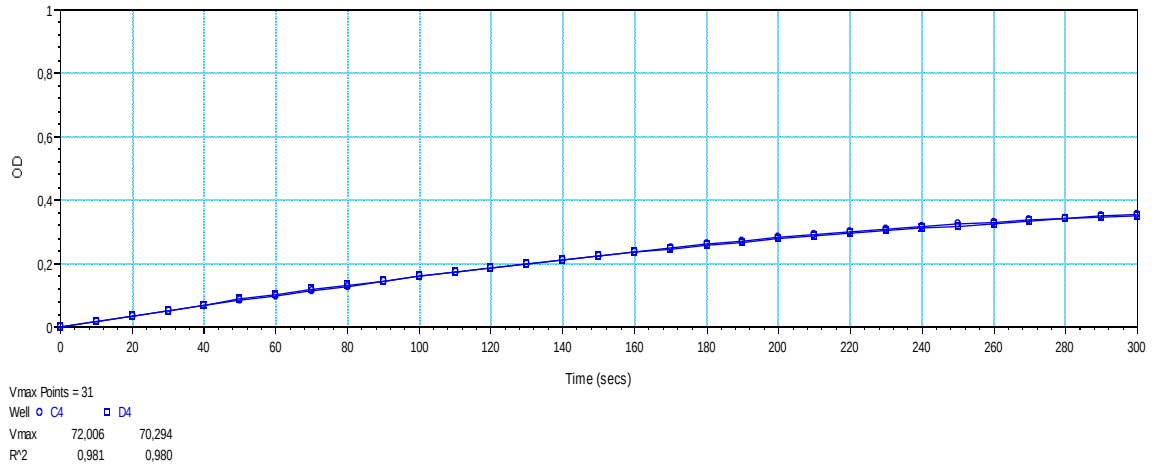
Şekil 4.160. Yaban eriğinin metanol yaprak özütünün (1 mg/mL'lik özüt) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



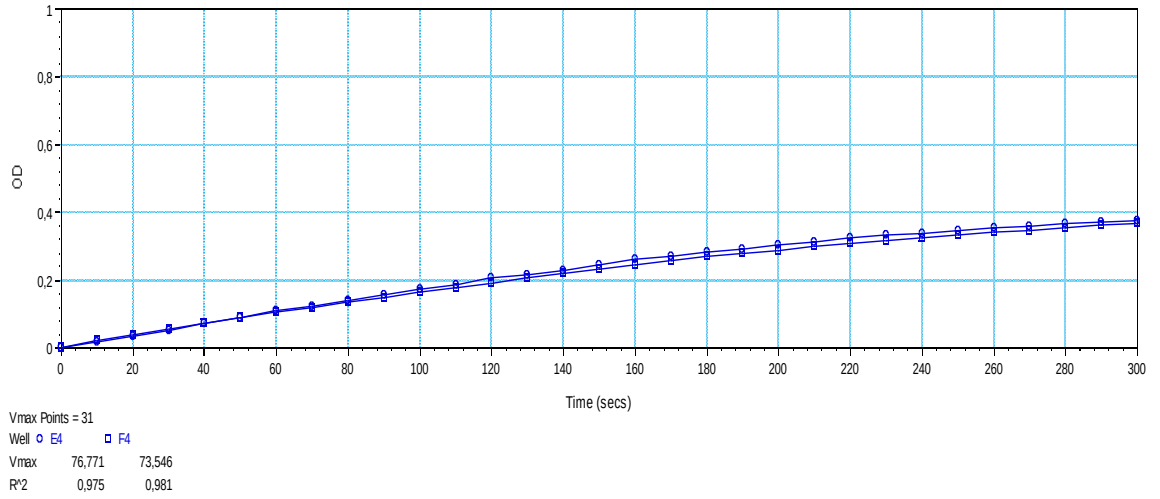
Şekil 4.161. Yaban eriğinin metanol meyve özütünün (1 mg/mL'lik özüt) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



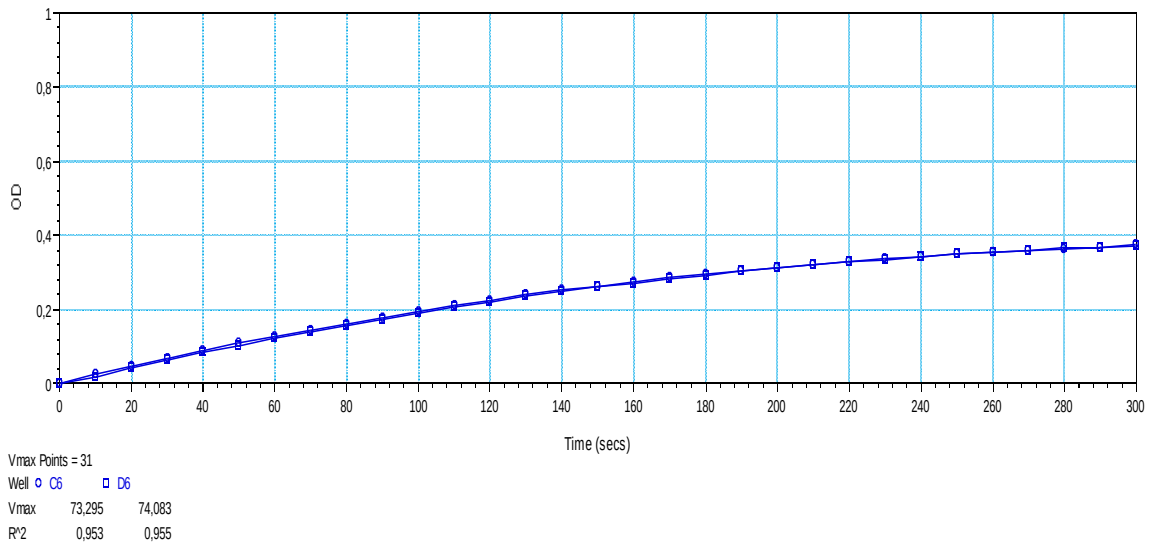
Şekil 4.162. Yaban eriğinin metanol çiçek özütünün (1 mg/mL'lik özüt) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



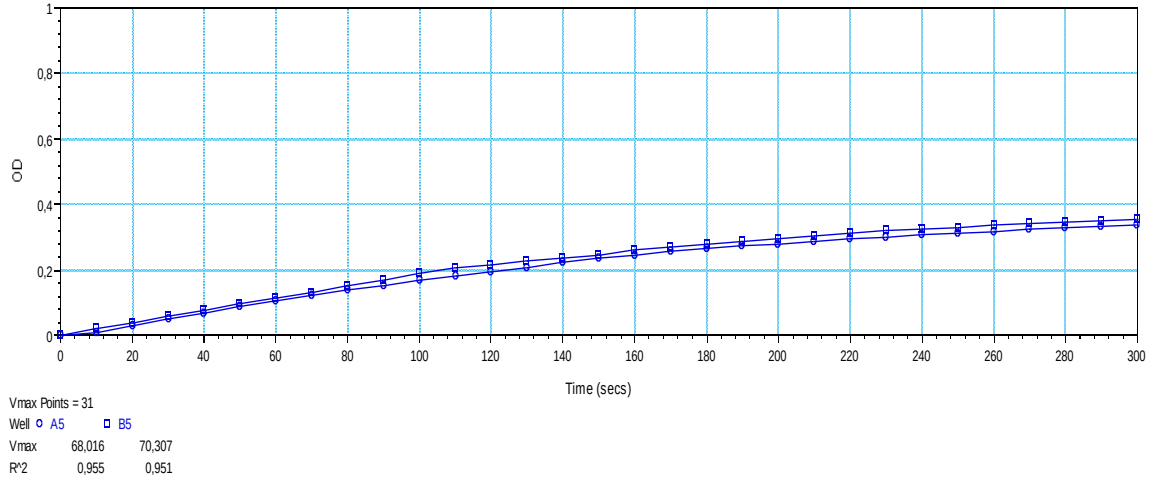
Şekil 4.163. Yaban eriğinin DCM yaprak özütünün (1 mg/mL'lik özüt) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



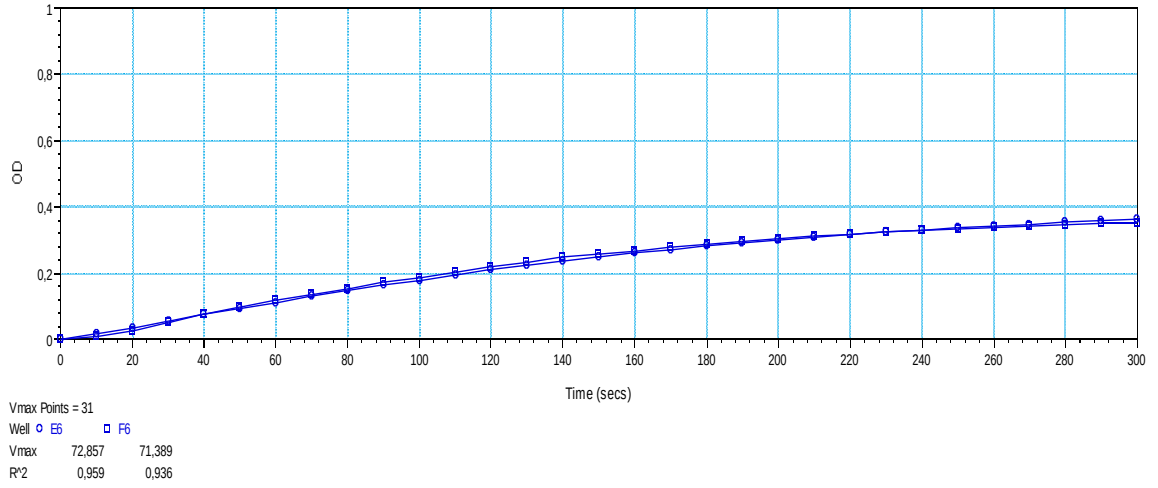
Şekil 4.164. Yaban eriğinin DCM meyve özütünün (1 mg/mL'lik özüt) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



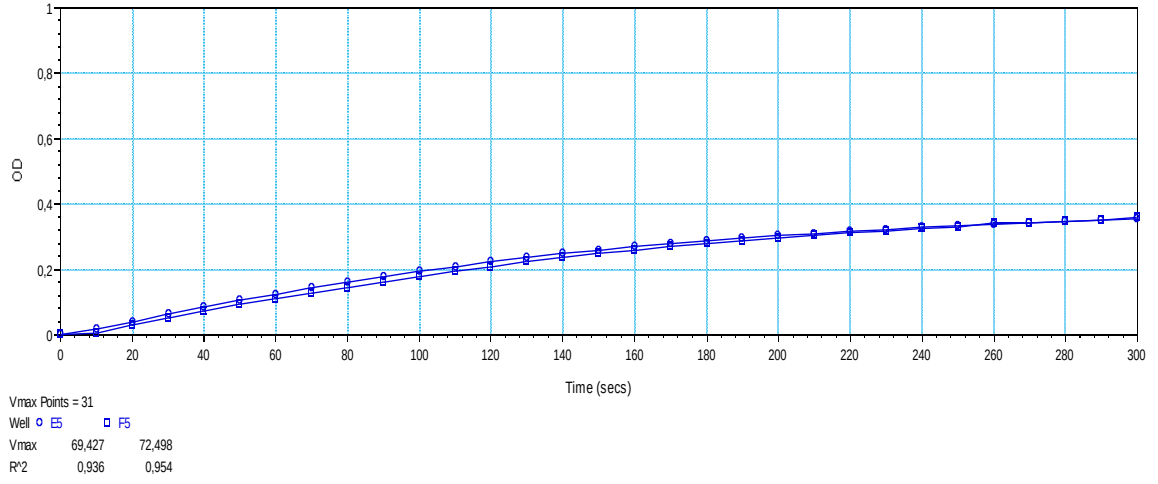
Şekil 4.165. Yaban eriğinin etilasetat meyve özütünün (1 mg/mL'lik özüt) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



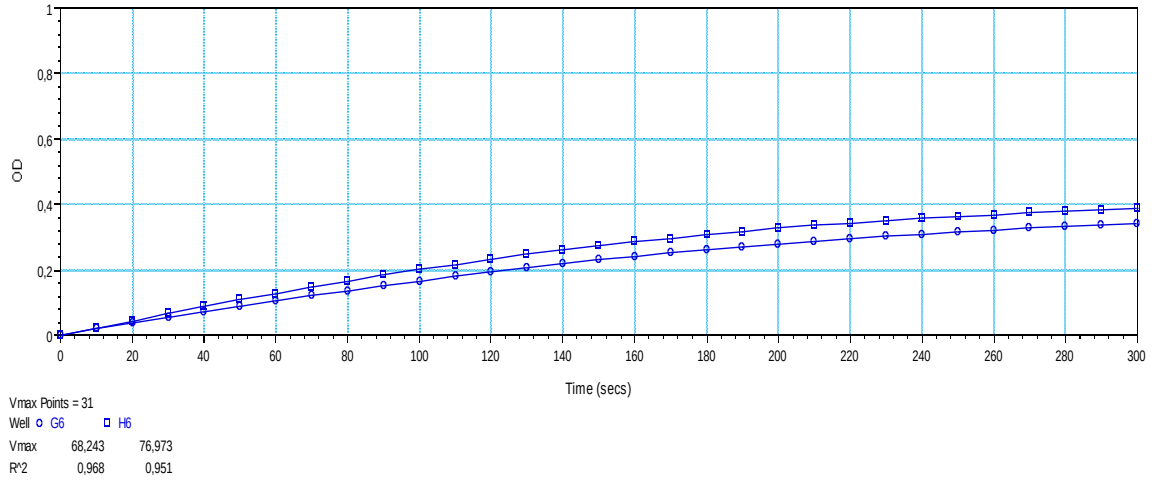
Şekil 4.166. Yaban eriğinin etilasetat çiçek özütünün (1 mg/mL’lik özüt) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



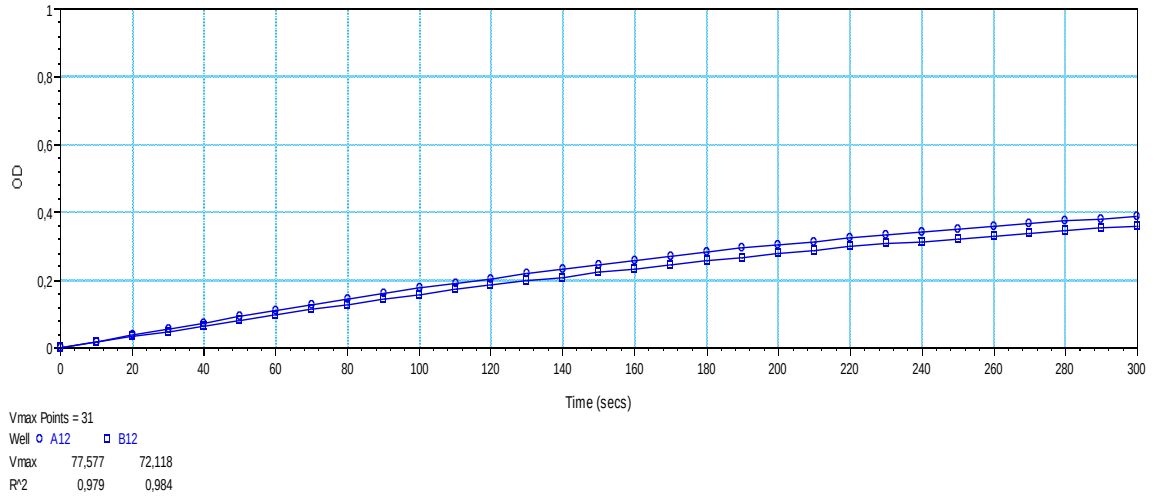
Şekil 4.167. Yaban eriğinin etilasetat yaprak özütünün (1 mg/mL’lik özüt) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



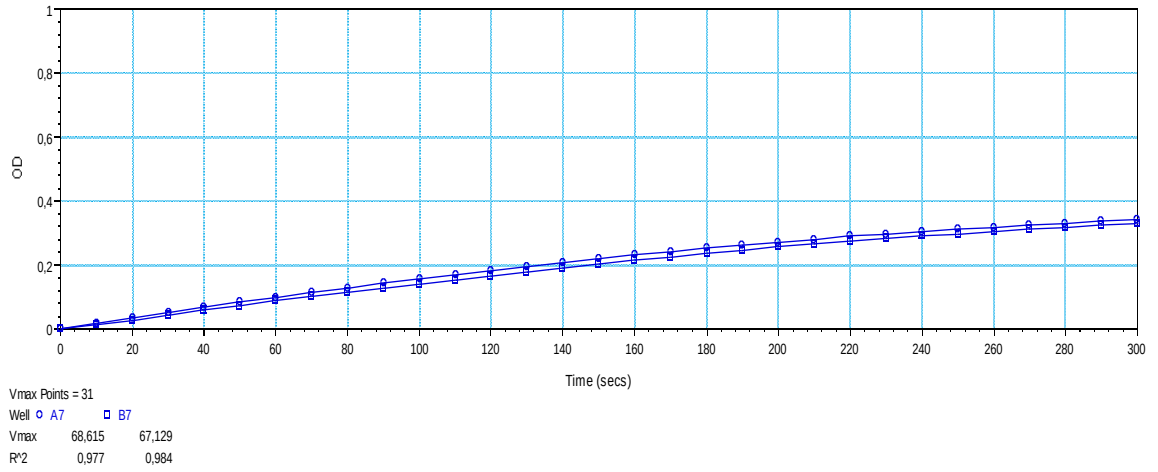
Şekil 4.168. Yaban eriğinin maserasyon meyve özütünün (1 mg/mL'lik özüt) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



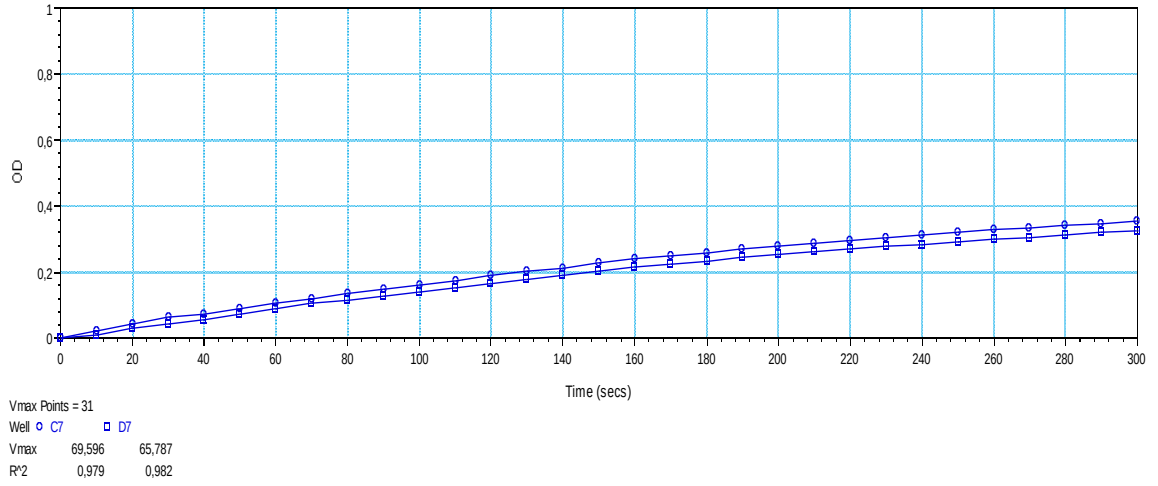
Şekil 4.169. Yaban eriğinin hekzan çiçek özütünün (1 mg/mL'lik özüt) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



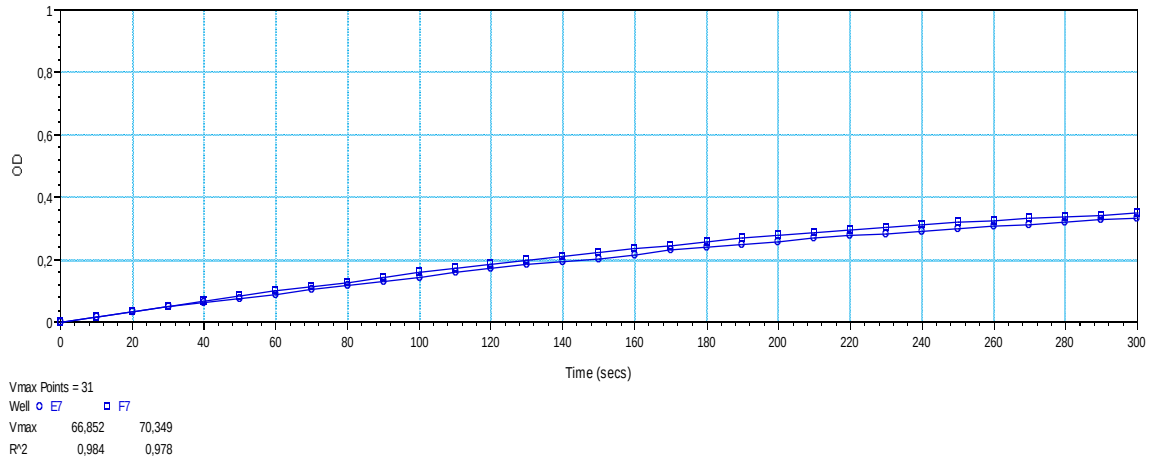
Şekil 4.170. DMSO+ Substrat+ Enzim (Penisilinaz)+ Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon grafiği (10 mg/mL’lik örneklerden alınan 10 µL’lik hacimler için)



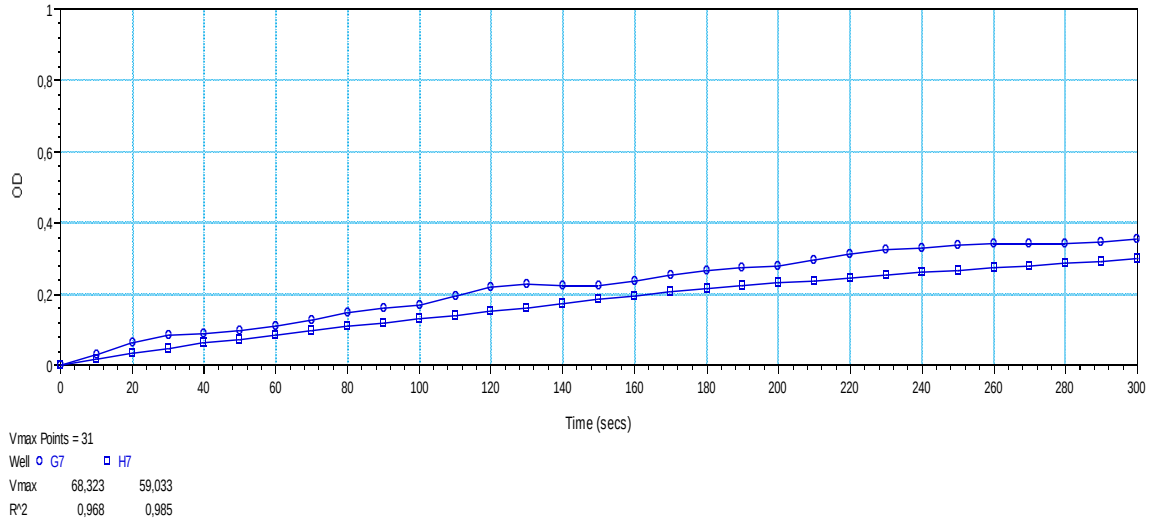
Şekil 4.171. Yaban eriğinin metanol yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



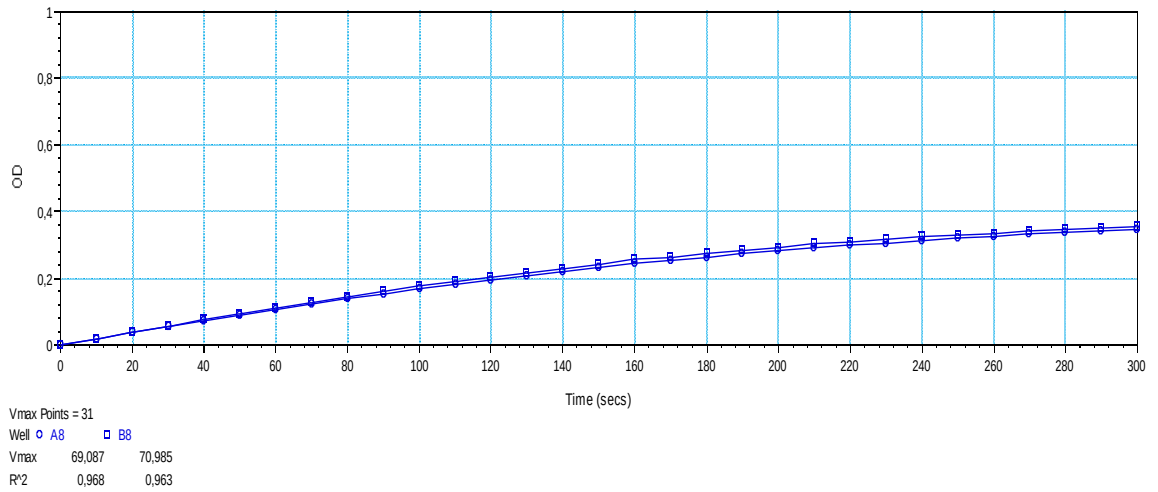
Şekil 4.172. Yaban eriğinin metanol meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL ‘lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



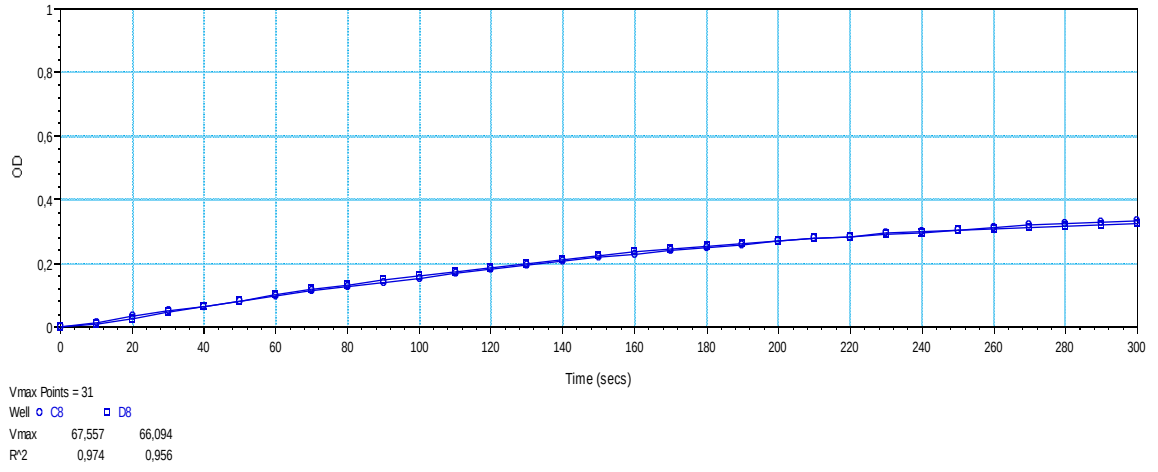
Şekil 4.173. Yaban eriğinin metanol çiçek özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



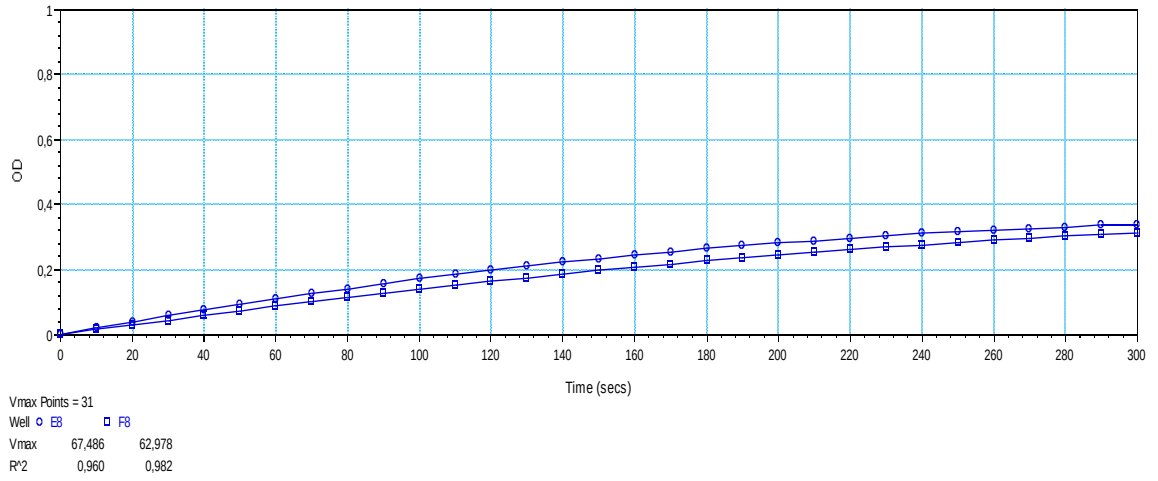
Şekil 4.174. Yaban eriğinin DCM yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



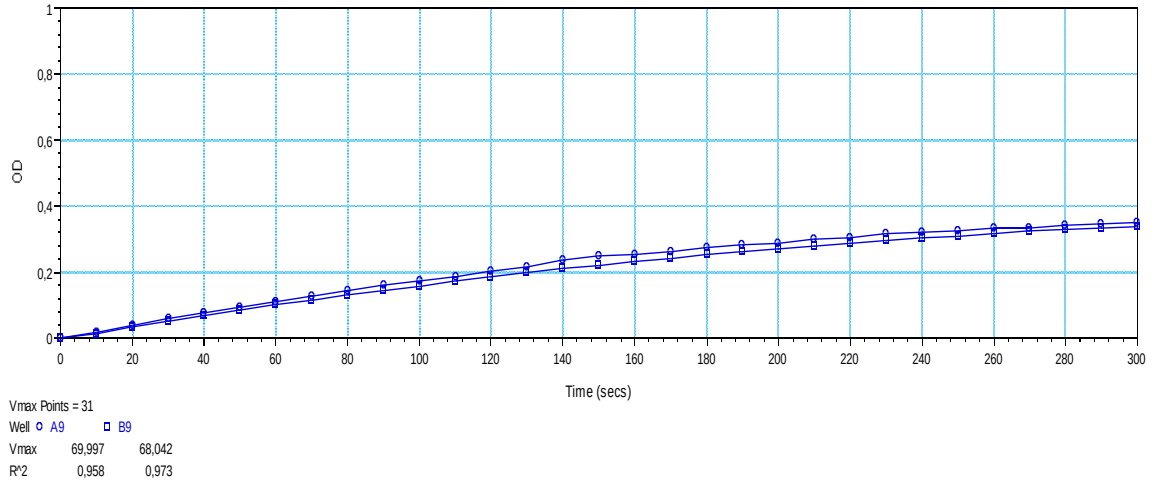
Şekil 4.175. Yaban eriğinin DCM meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



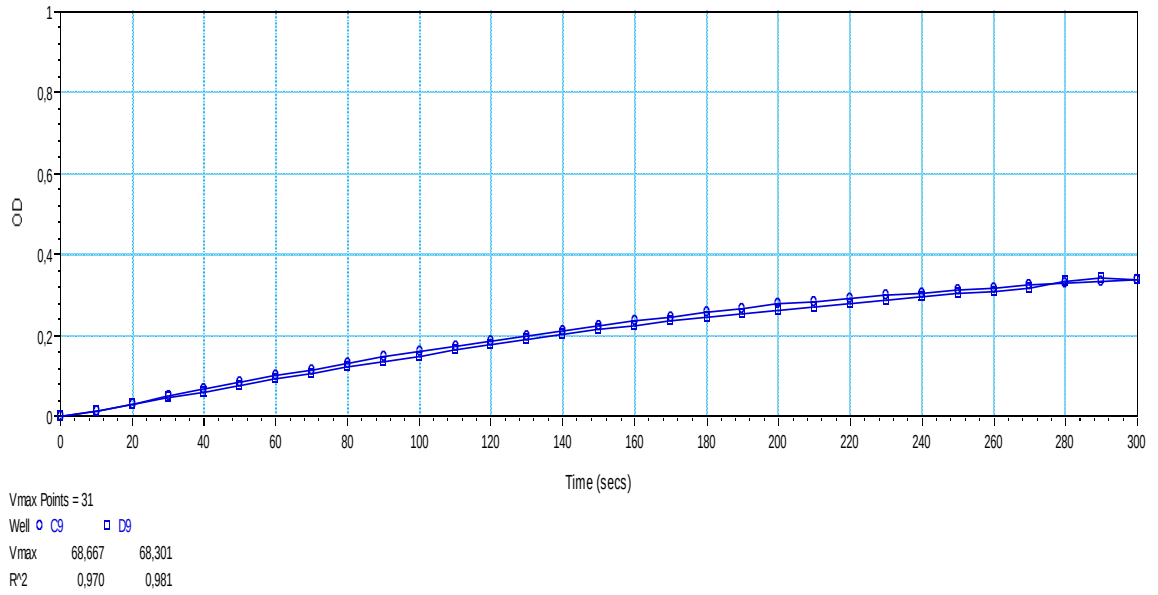
Şekil 4.176. Yaban eriğinin etilasetat meyve özütünün (10 mg/mL'lik özüt- 10 µL 'lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



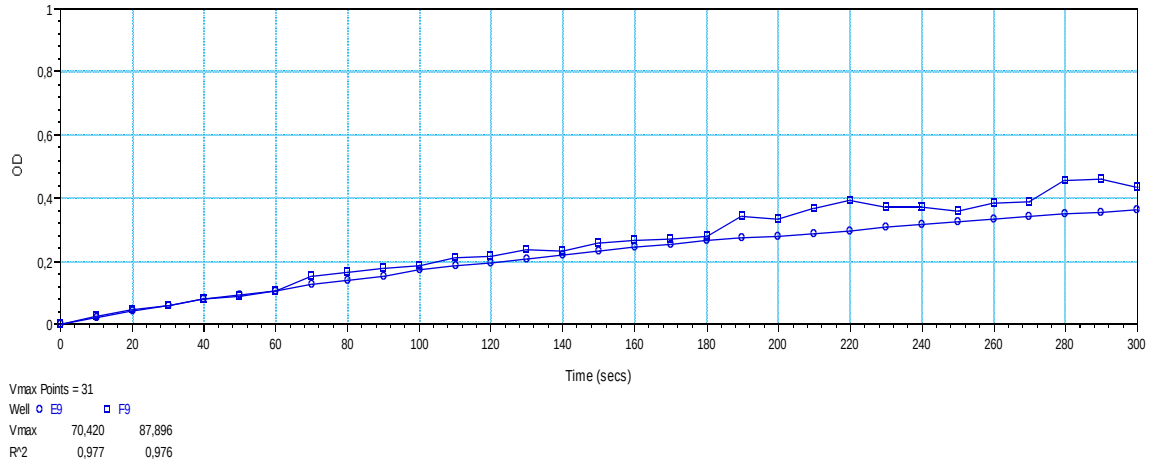
Şekil 4.177. Yaban eriğinin etilasetat çiçek özütünün (10 mg/mL'lik özüt- 10 µL 'lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



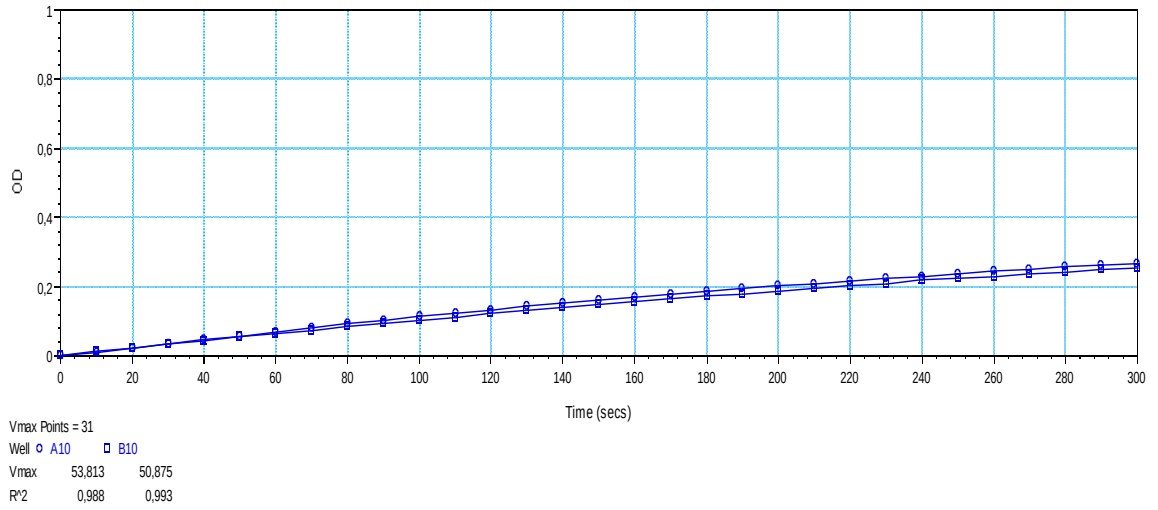
Şekil 4.178. Yabancı etilasetat yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



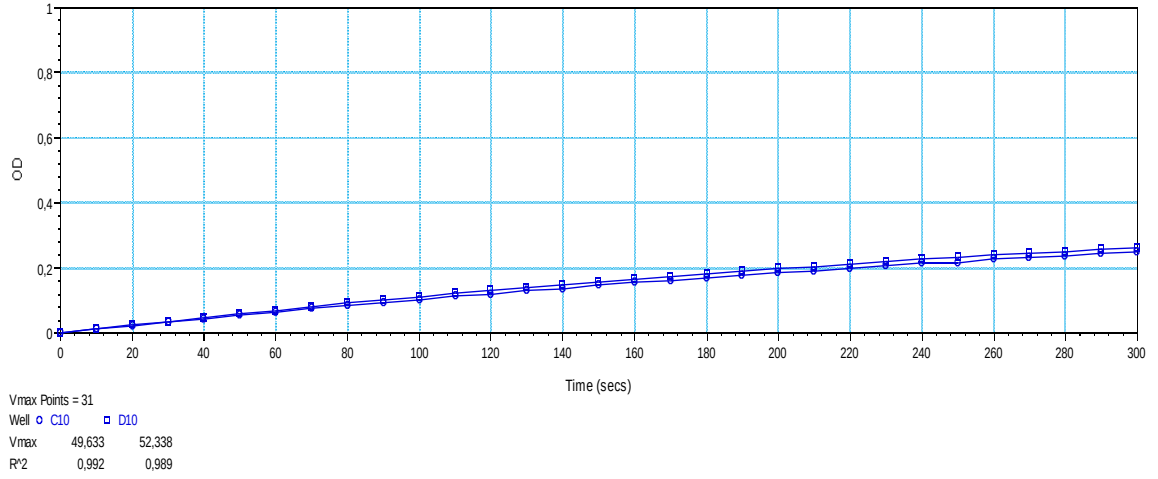
Şekil 4.179. Yabancı maserasyon meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 10 µL’ lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



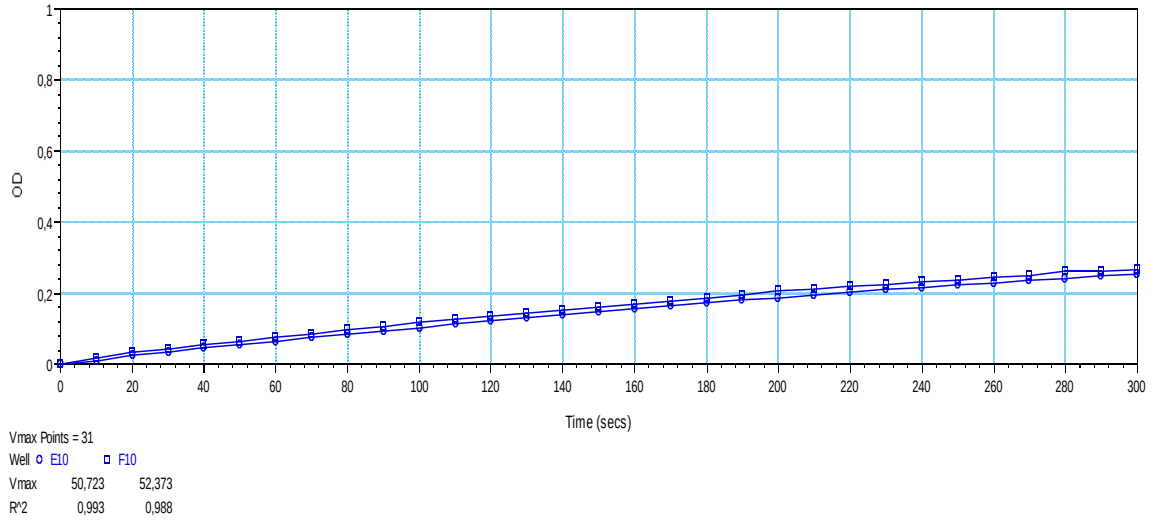
Şekil 4.180. Yaban eriğinin hekzan çiçek özütünün (10 mg/mL'lik özüt- 10 µL' lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



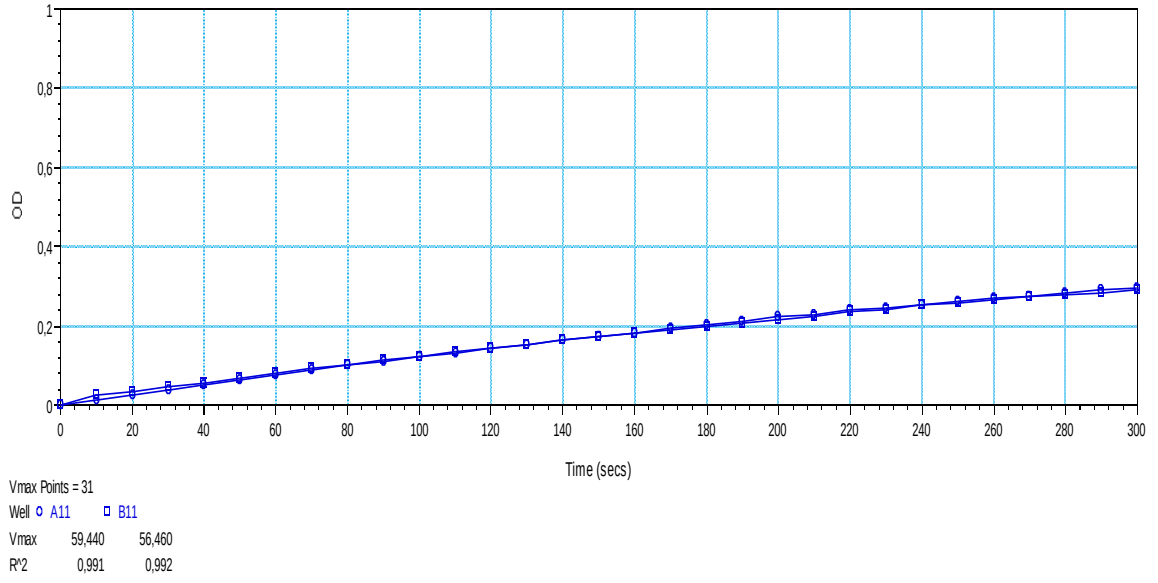
Şekil 4.181. DMSO+ Substrat+ Enzim (Penisilinaz)+ Tampon çözeltinin verdiği reaksiyon grafiği (10 mg/mL'lik örneklerden alınan 50 µL'lik hacimler için)



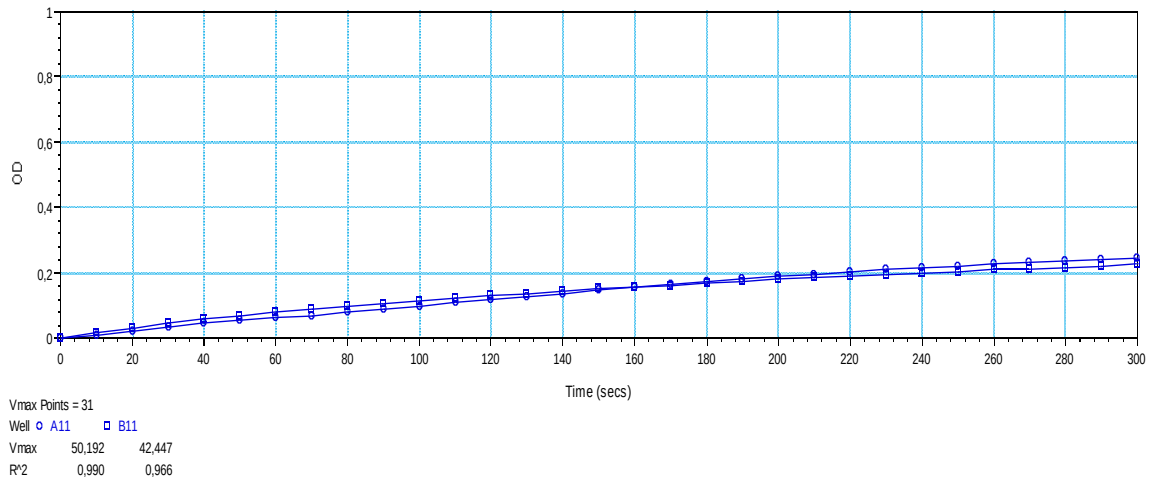
Şekil 4.182. Yaban eriğinin metanol yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 50 µL’ lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



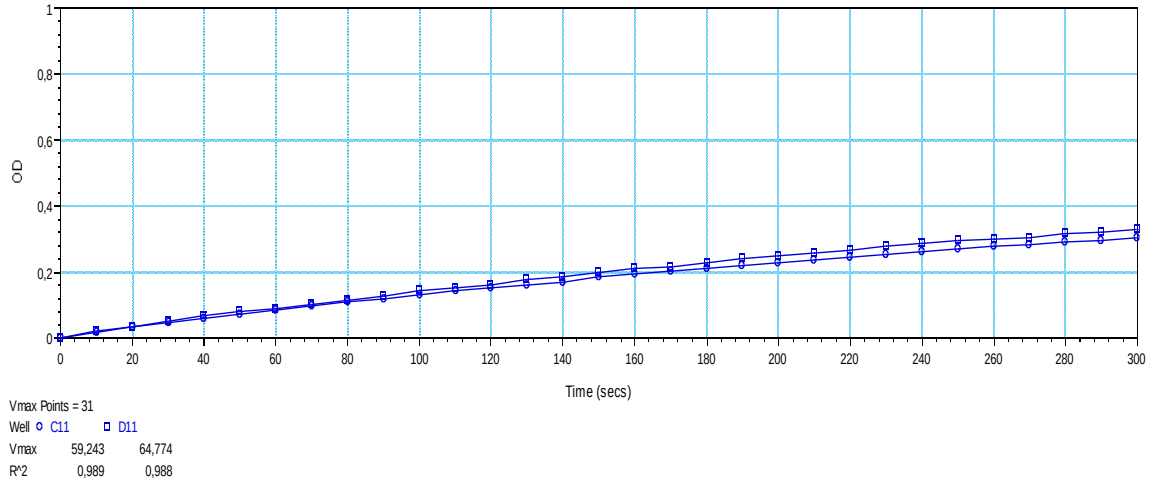
Şekil 4.183. Yaban eriğinin metanol meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 50 µL’ lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



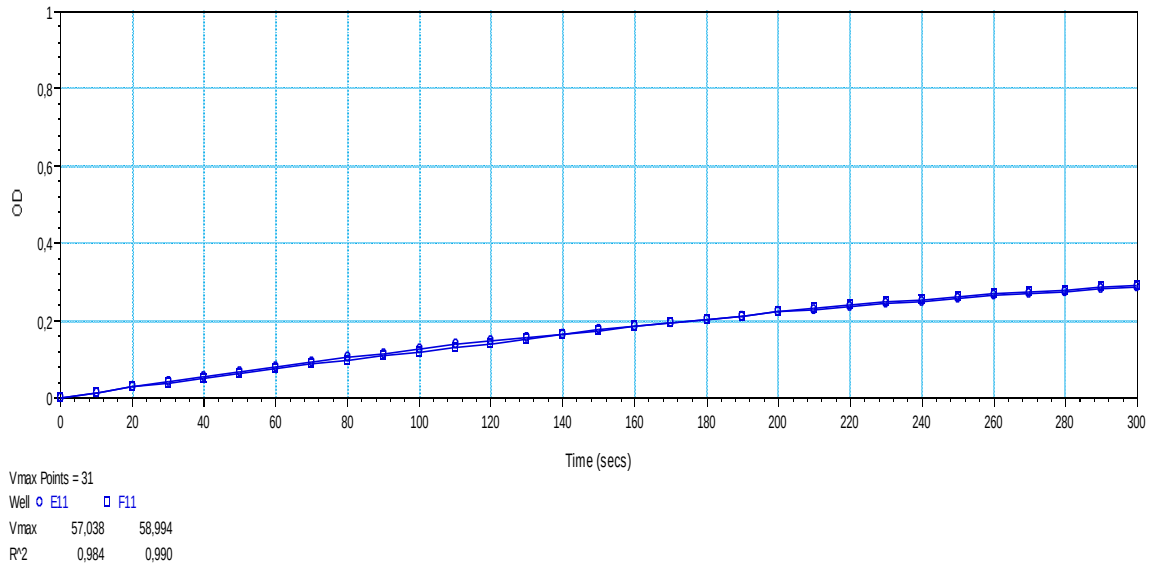
Şekil 4.184. Yaban eriğinin metanol çiçek özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 50 µL ‘lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



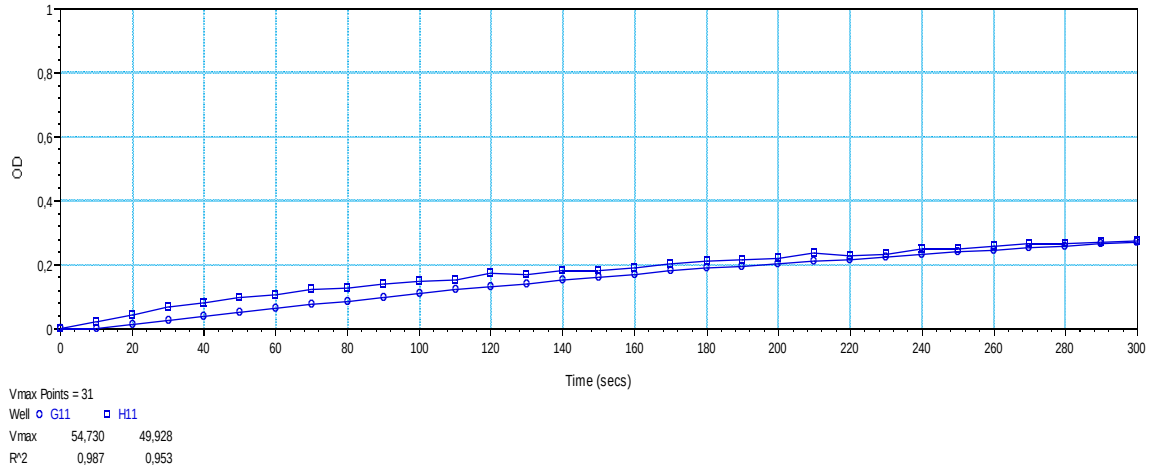
Şekil 4.185. Yaban eriğinin DCM yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 50 µL’ lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



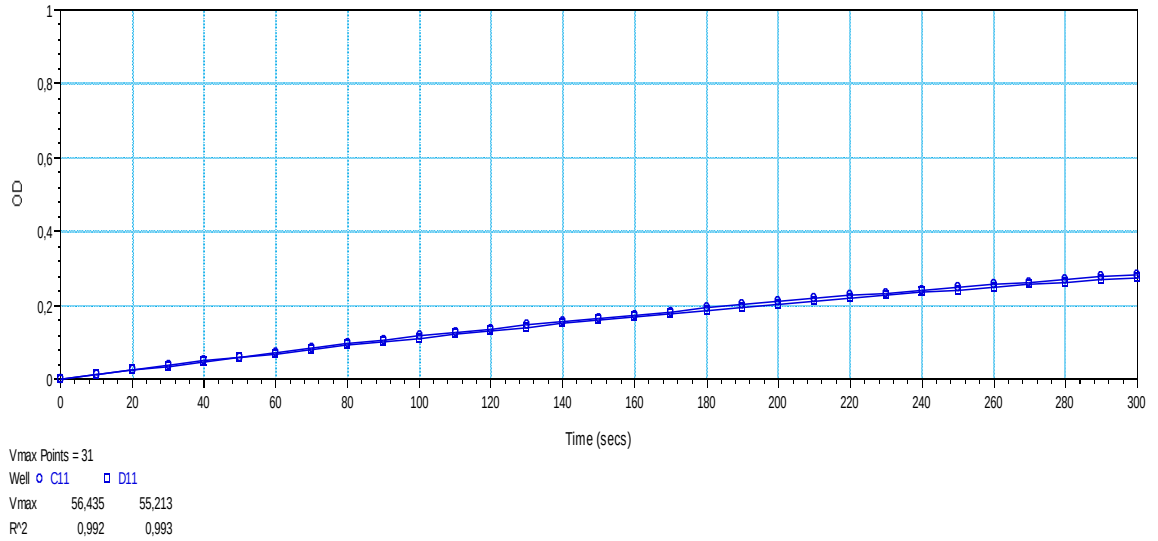
Şekil 4.186. Yaban eriğinin DCM meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 50 μ L’ lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



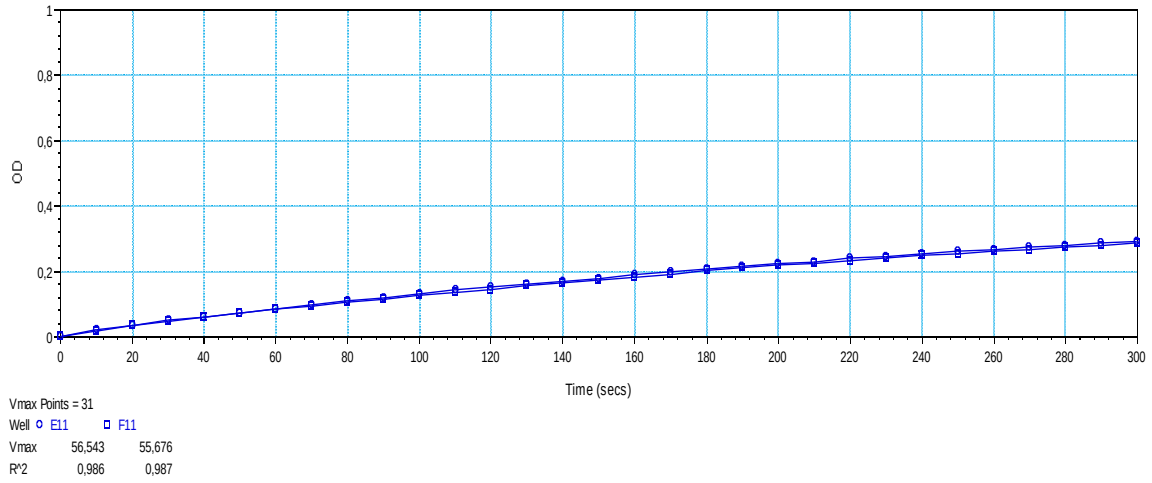
Şekil 4.187. Yaban eriğinin etilasetat meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 50 μ L’ lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



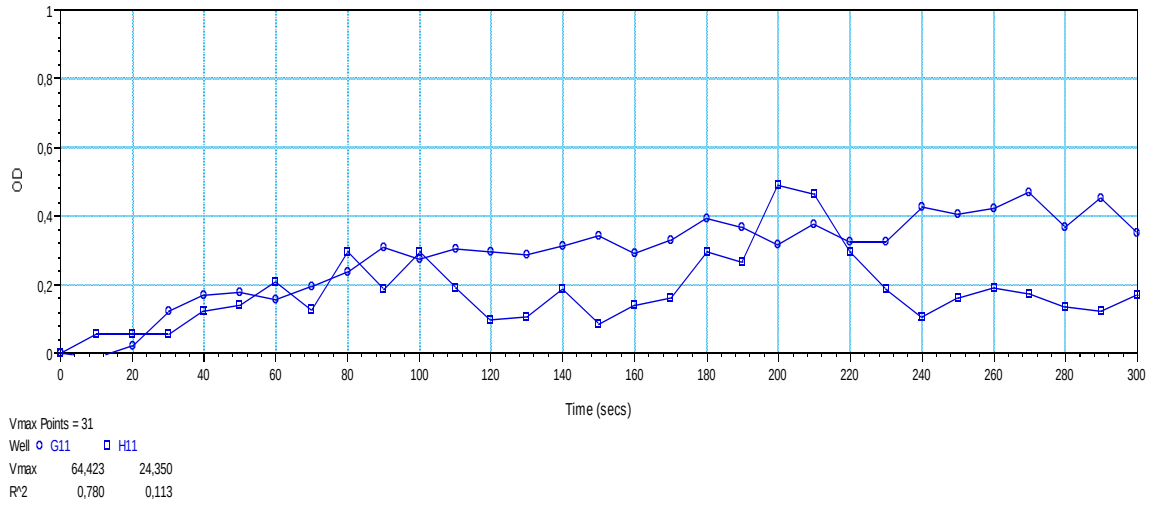
Şekil 4.188. Yaban eriğinin etilasetat çiçek özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 50 µL’ lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



Şekil 4.189. Yaban eriğinin etilasetat yaprak özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 50 µL’ lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



Şekil 4.190. Yaban eriğinin maserasyon meyve özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 50 µL’ lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği



Şekil 4.191. Yaban eriğinin hekzan çiçek özütünün (10 mg/mL’lik özüt- 50 µL’ lik örnek) penisilinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği

Çizelge 4.27. Farklı enzimler için maksimum % inhibisyona sahip özütler ve inhibisyon değerleri

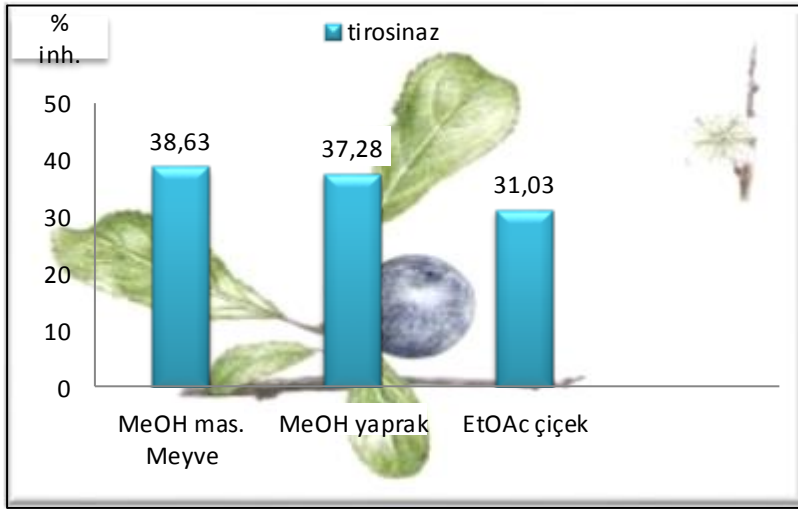
<i>α-Kimotripsin için max % inhibisyon değerleri</i>			
<i>Özüt/Derişim</i>	<i>1 mg/mL</i>	<i>Özüt/Derişim</i>	<i>10 mg/mL</i>
Metanol yaprak	20,77	DCM yaprak	23,93
Metanol meyve	5,34	Etilasetat meyve	22,67
Metanol çiçek	0,39	Metanol çiçek	22,24

<i>Tripsin için max % inhibisyon değerleri</i>			
<i>Özüt/Derişim</i>	<i>1 mg/mL</i>	<i>Özüt/Derişim</i>	<i>10 mg/mL</i>
Metanol yaprak	6,58	DCM yaprak	41,19
Maserasyon meyve	14,94	Etilasetat meyve	21,34
Metanol çiçek	9,50	Etilasetat çiçek	34,70

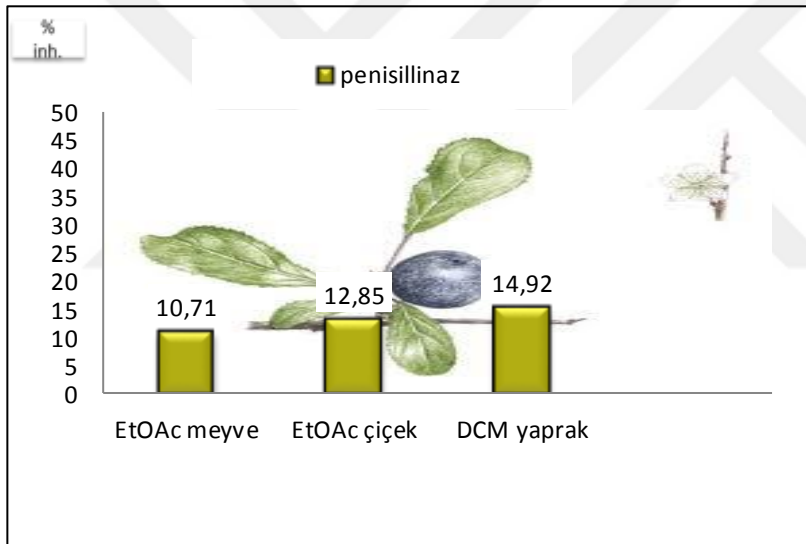
<i>Papain için max % inhibisyon değerleri</i>					
<i>Özüt/Derişim</i>	<i>1 mg/mL</i>	<i>Özüt/Derişim</i>	<i>10 mg/mL</i> <i>10 µL 'lik örnek</i>	<i>Özüt/Derişim</i>	<i>10 mg/mL</i> <i>30 µL 'lik örnek</i>
DCM yaprak	43,50	Etilasetat yaprak	34,84	Etilasetat yaprak	92,10
Metanol meyve	39,29	Etilasetat meyve	22,16	Etilasetat meyve	64,19
Etilasetat çiçek	18,49	Hekzan çiçek	46,55	Etilasetat çiçek	95,21

<i>Tirozinaz için max % inhibisyon değerleri</i>					
<i>Özüt/Derişim</i>	<i>1 mg/mL</i>	<i>Özüt/Derişim</i>	<i>10 mg/mL</i> <i>10 µL 'lik örnek</i>	<i>Özüt/Derişim</i>	<i>10 mg/mL</i> <i>30 µL 'lik örnek</i>
Metanol yaprak	8,36	Metanol yaprak	21,29	Metanol yaprak	37,28
Metanol meyve	13,53	Metanol meyve	13,30	Maserasyon meyve	38,63
Etilasetat çiçek	8,23	Etilasetat çiçek	35,09	Etilasetat çiçek	31,03

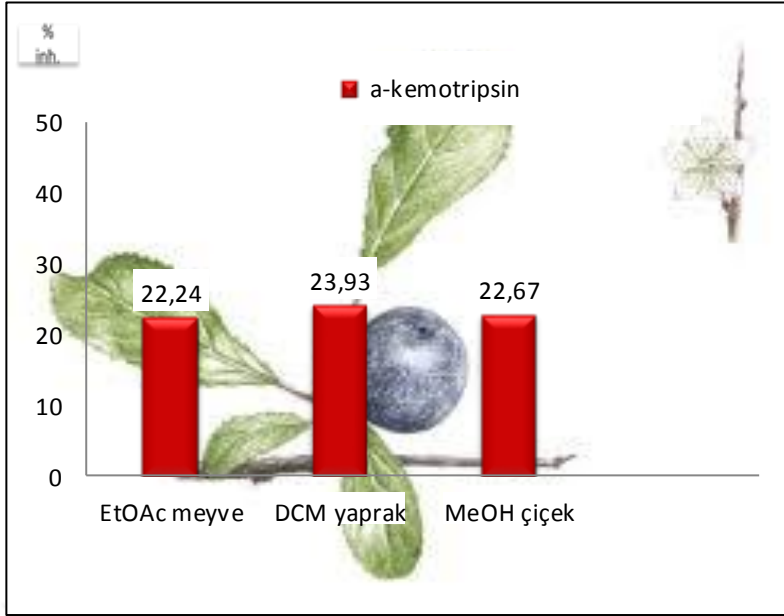
<i>Penisilinaz için max % inhibisyon değerleri</i>					
<i>Özüt/Derişim</i>	<i>1 mg/mL</i>	<i>Özüt/Derişim</i>	<i>10 mg/mL</i> <i>10 µL 'lik örnek</i>	<i>Özüt/Derişim</i>	<i>10 mg/mL</i> <i>50 µL 'lik örnek</i>
DCM yaprak	0,14	DCM yaprak	14,92	DCM yaprak	11,52
Maserasyon meyve	0,40	Etilasetat meyve	10,71	Metanol meyve	1,52
Metanol çiçek	3,66	Etilasetat çiçek	12,85	Hekzan çiçek	15,20



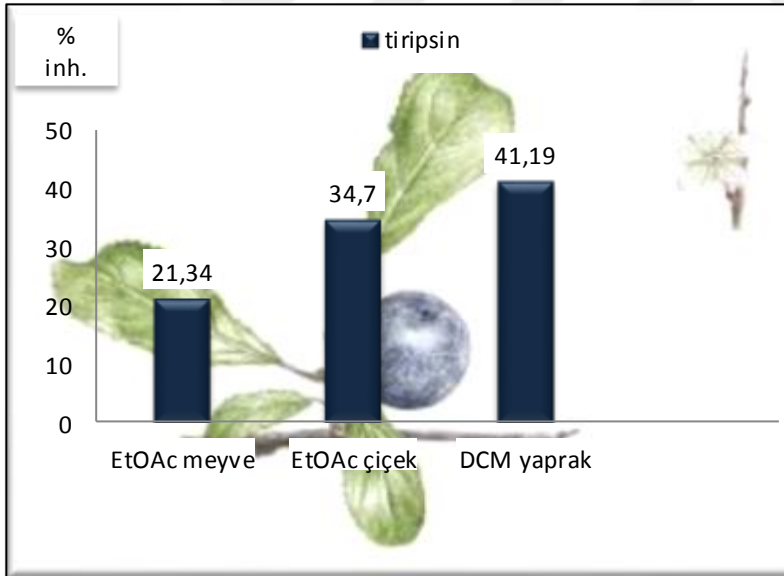
Şekil 4.192. Tirozinaz enzimi için yüksek % inhibisyon değerlerine sahip meyve, çiçek ve yaprak özütləri



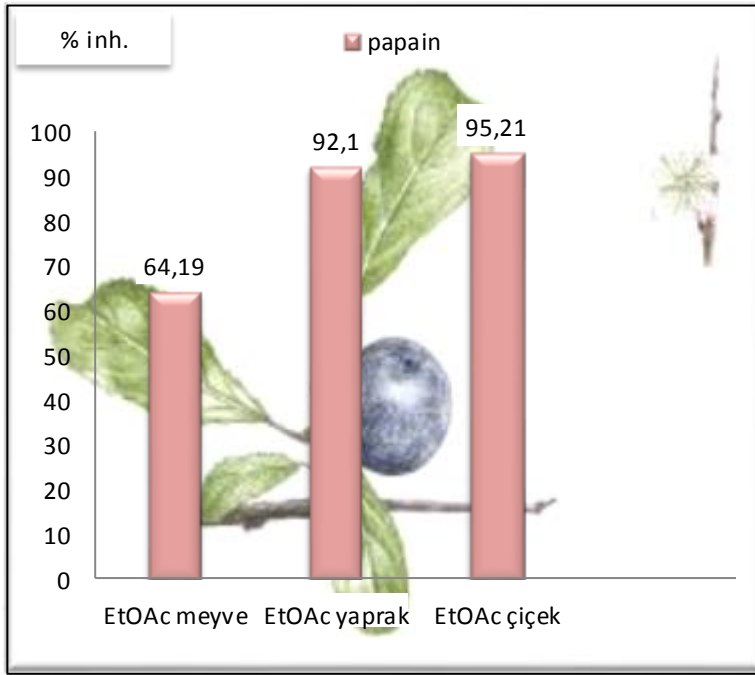
Şekil 4.193. Penisilinaz enzimi için yüksek % inhibisyon değerlerine sahip meyve, çiçek ve yaprak özütləri



Şekil 4.194. α -kemotripsin enzimi için yüksek % inhibisyon değerlerine sahip meyve, çiçek ve yaprak özütleri



Şekil 4.195. Tripsin enzimi için yüksek % inhibisyon değerlerine sahip meyve, çiçek ve yaprak özütleri



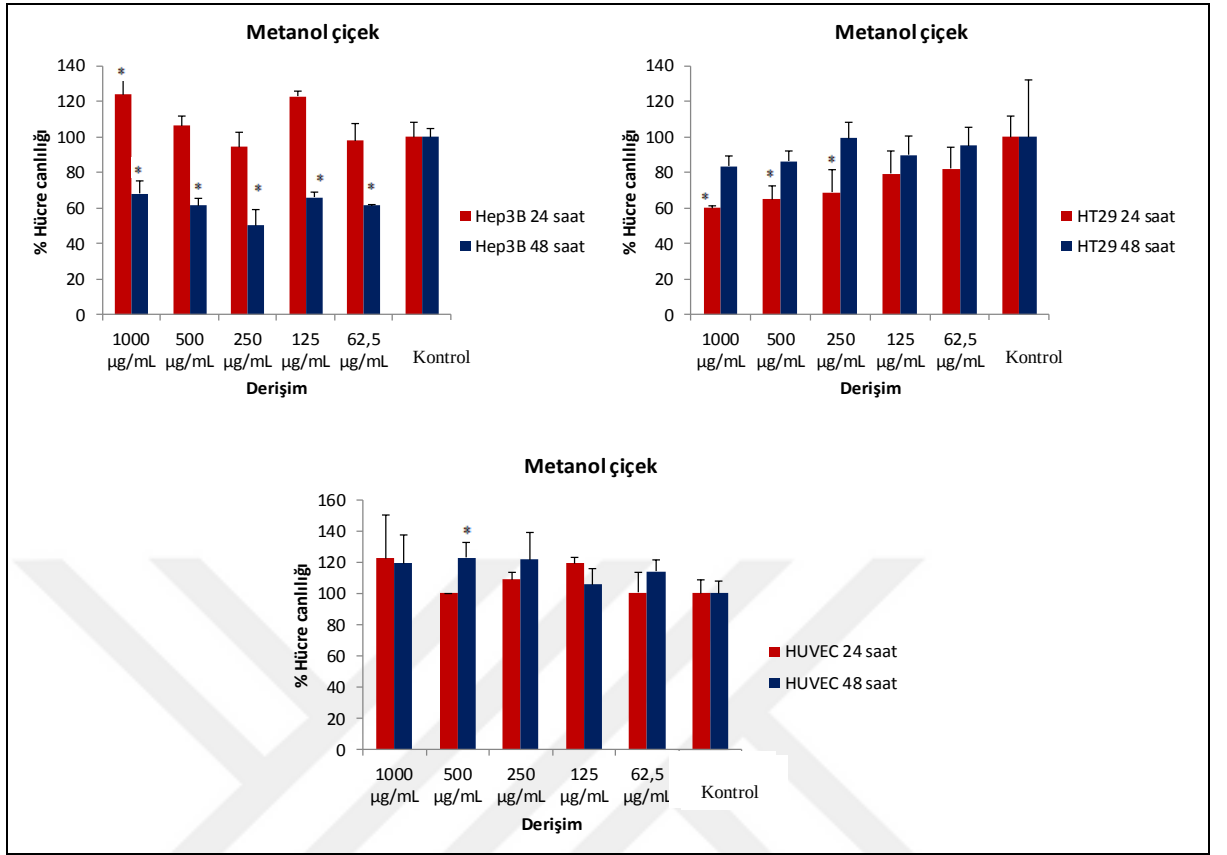
Şekil 4.196. Papain enzimi için yüksek % inhibisyon değerlerine sahip meyve, çiçek ve yaprak özütleri

4.7. Sitotoksikite Çalışmalarının Sonuçları

Hekzan (meyve, çiçek, yaprak), diklorometan (meyve, çiçek, yaprak), etilasetat (meyve, çiçek, yaprak), metanol (meyve, çiçek, yaprak) ve maserasyon meyve olmak üzere 13 farklı özütün HT-29, HUVEC ve Hep3B hücreleri üzerine sitotoksik etkileri 24 ve 48 saat inkübasyon süresince MTT denemesi ile incelenmiştir. Hücrelerin 550 nm dalga boyunda soğurma değerleri alınarak alınarak % hücre canlılığı belirlenmiş ve ANOVA programı ile istatistik açıdan anlamlı olup olmadığı tespit edilmiştir.

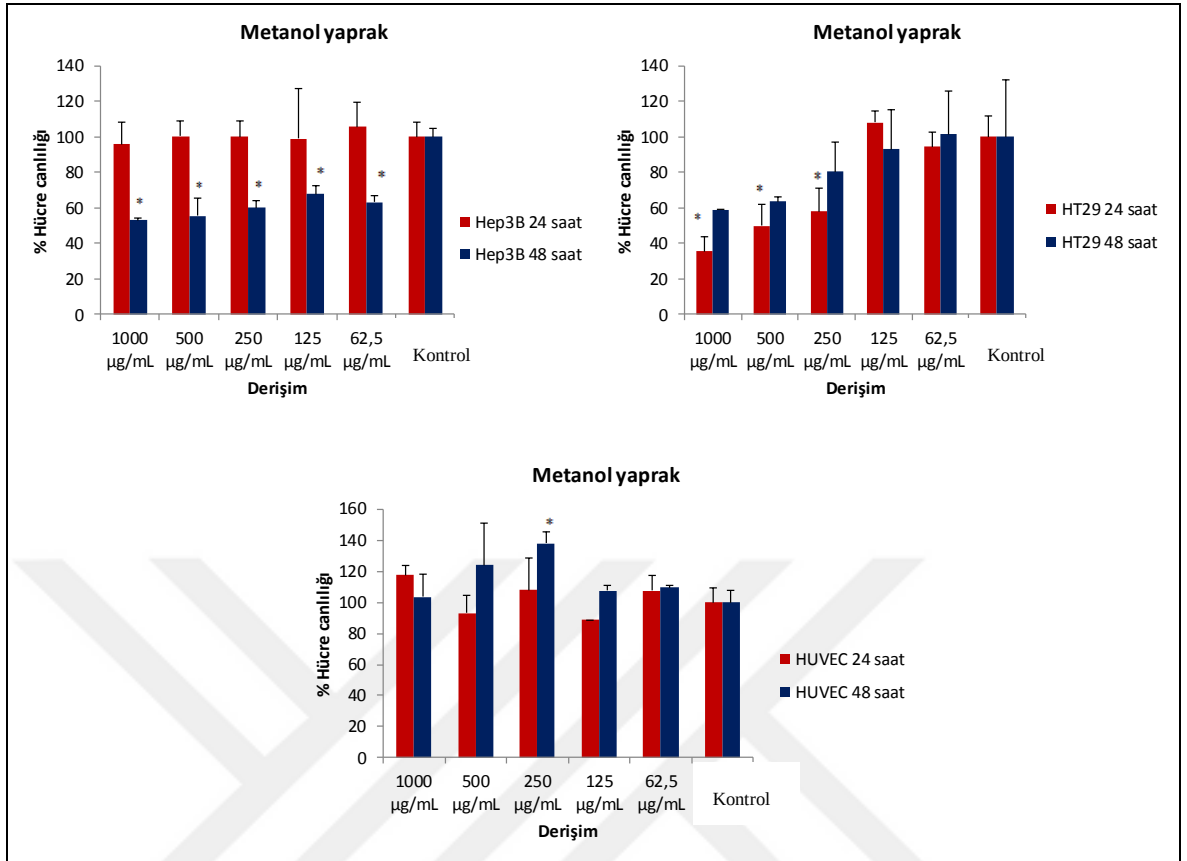
$$\text{Hücre canlılığı} = (\text{Soğurma değeri} / \text{Kontrol ait soğurma değeri}) \times 100$$

$p < 0,05$ olan değerler istatistiksel açıdan anlamlı olarak belirlenerek ‘*’ şeklinde gösterilmiştir.



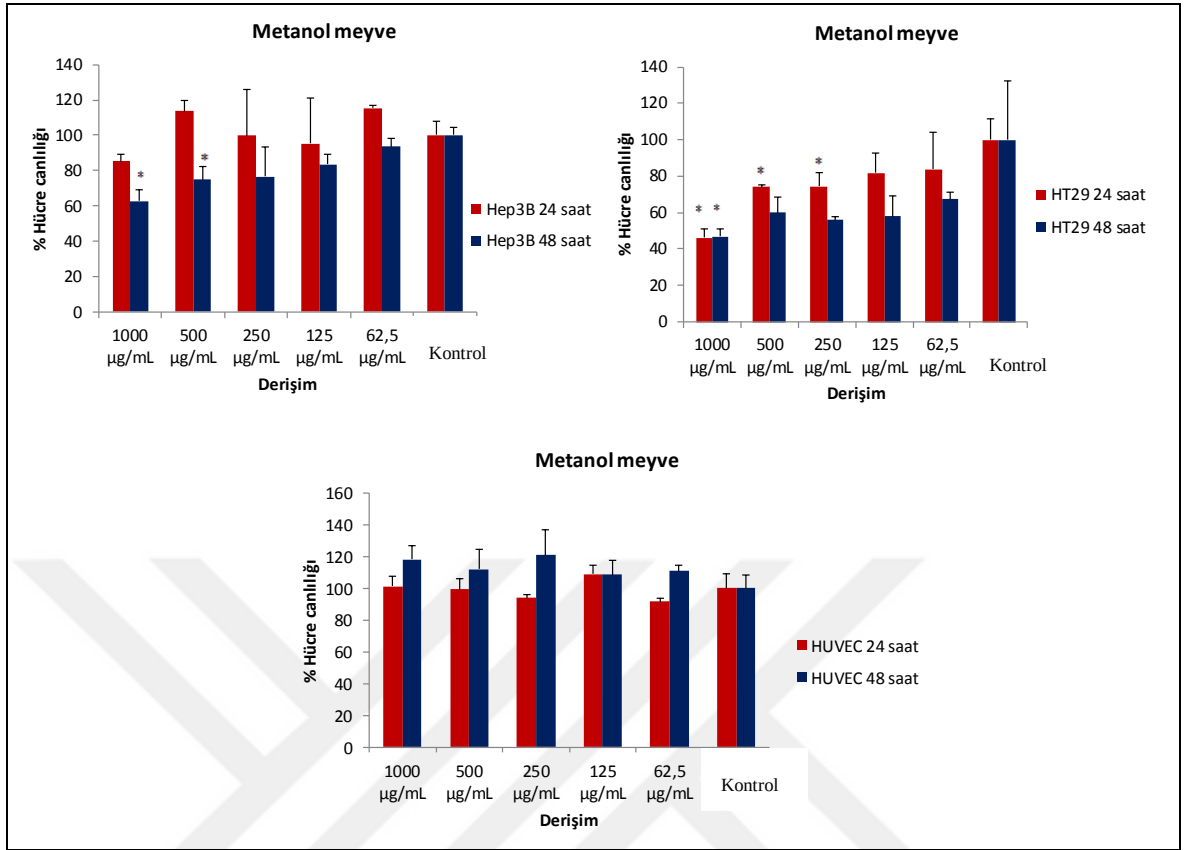
Şekil 4.197. Metanol çiçek özütünün Hep3B, HT-29 ve HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin grafik üzerinde gösterilmesi

Şekil 4.197’de verilmiş olan sitotoksik sonuçlar incelendiğinde, metanol çiçek özütü Hep3B hücrelerinin büyümelerine karşı 24 saatte herhangi bir etki göstermezken, 48 saat zaman diliminde hücre büyümelerini bütün dozlarda anlamlı olarak inhibe etmiştir. 250 µg/mL derişimde hücre büyümesini yaklaşık olarak %50 inhibe ettiği bulunmuştur. HT-29 hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak hücrelerin büyümesini azaltmış, özellikle 24 saat zaman diliminde 250, 500 ve 1000 µg/mL derişimlerde anlamlı olarak azaltmıştır. 1000 µg/mL derişimde hücre büyümesini yaklaşık olarak %60 inhibe ettiği bulunmuştur. Sağlıklı model olan HUVEC hücrelerine karşı ise hiçbir etki göstermemiştir.



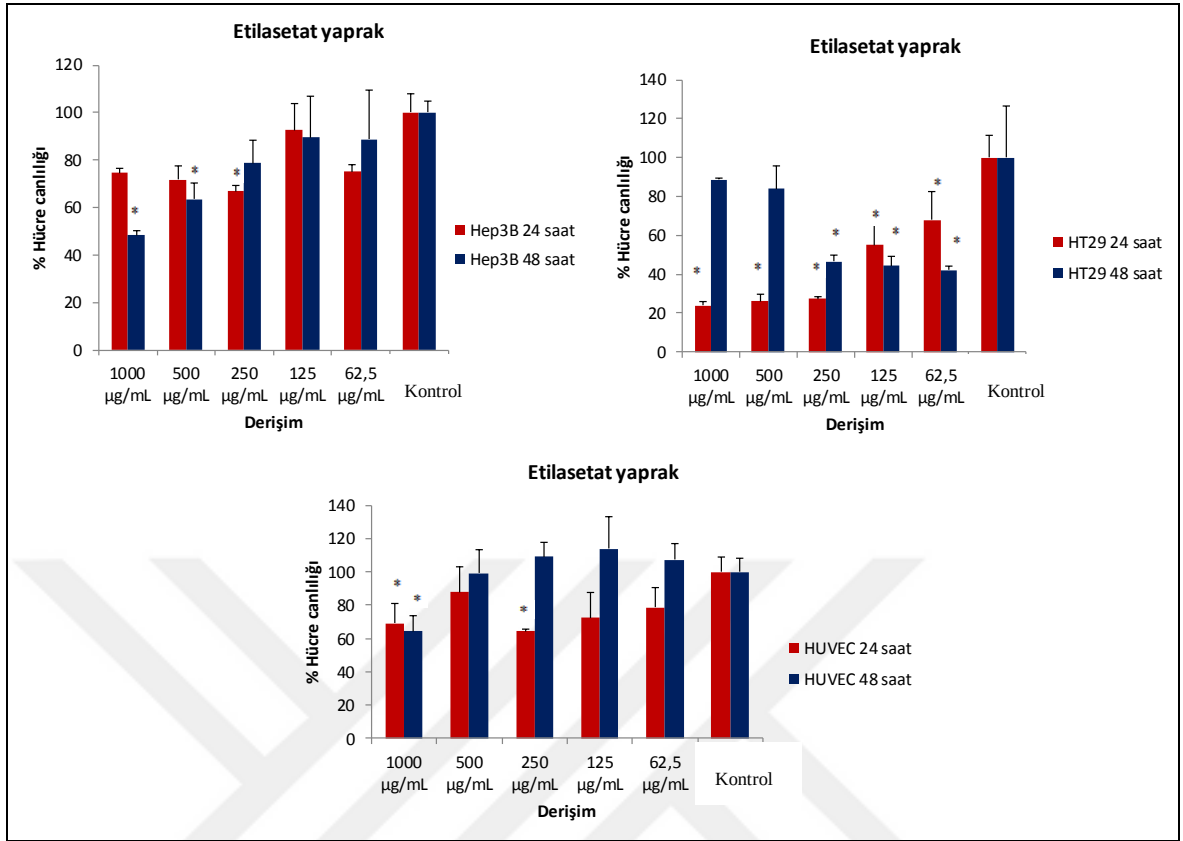
Şekil 4.198. Metanol yaprak özütünün Hep3B, HT-29 ve HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin grafik üzerinde gösterilmesi

Şekil 4.198’te verilmiş sitotoksik sonuçlar incelendiğinde, metanol yaprak özütü Hep3B hücrelerinin büyümelerine karşı 24 saatte herhangi bir etki göstermezken, 48 saat zaman diliminde bütün dozlarda anlamlı olarak inhibe etmiştir. 1000 ve 500 µg/mL derişimlerde hücre büyümesini yaklaşık olarak %50 inhibe ettiği bulunmuştur. HT-29 hücreleri üzerinde ise konsantrasyona bağlı olarak hücrelerin büyümesini 24 saat zaman diliminde 250, 500 ve 1000 µg/mL derişimlerde anlamlı olarak azaltmış, 500 µg/mL derişimde hücre büyümesini yaklaşık olarak %50 inhibe ettiği bulunmuştur. 48 saat diliminde ise 1000 ve 500 µg/mL derişimlerde hücreleri inhibe etmiştir. Sağlıklı model olan HUVEC hücrelerine karşı proliferatif bir etki göstermiştir. Özellikle 48 saat zaman diliminde 250 µg/mL derişimde hücrelerin büyümesini anlamlı olarak arttırmıştır.



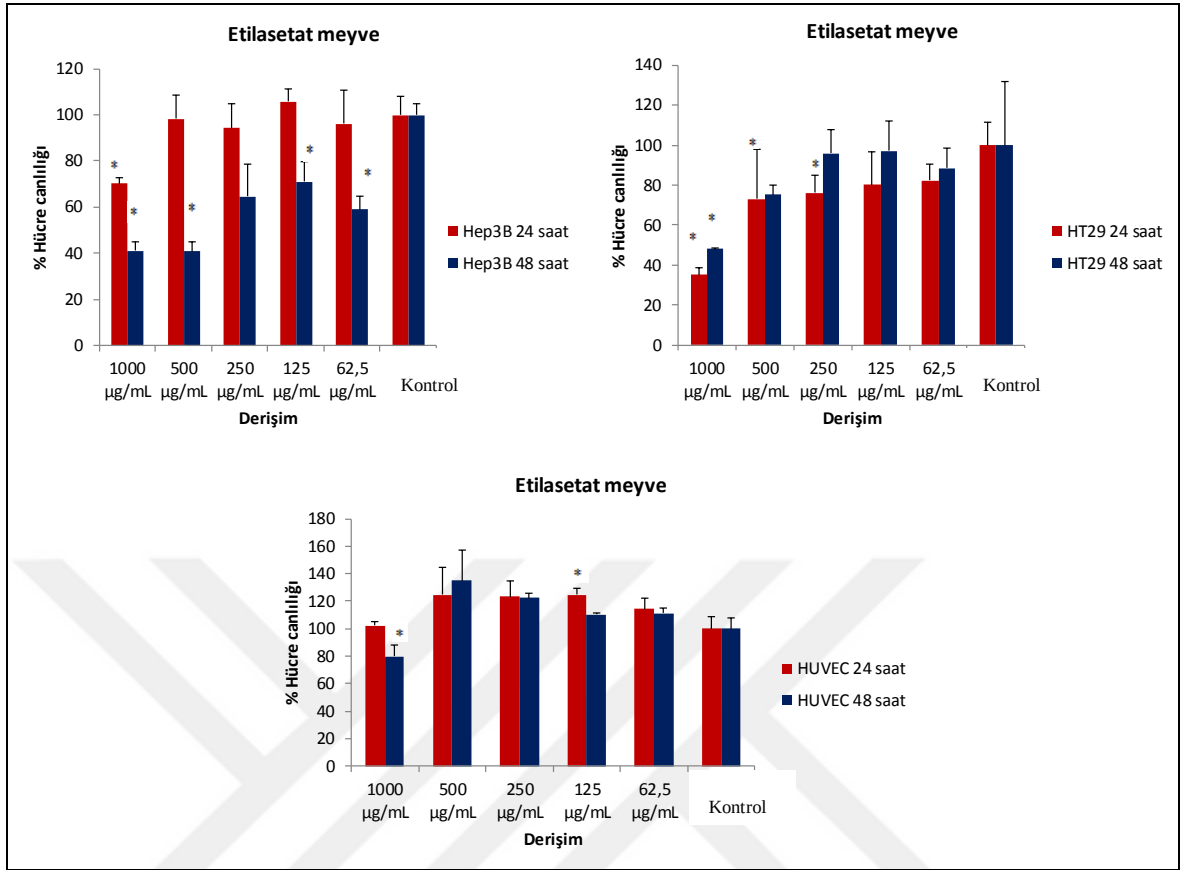
Şekil 4.199. Metanol meyve özütünün Hep3B, HT-29 ve HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin grafik üzerinde gösterilmesi

Şekil 4.199’da verilmiş sitotoksik sonuçlar incelendiğinde, metanol meyve özütü Hep3B hücrelerinin büyümelerine karşı 24 saatte herhangi bir etki göstermezken, 48 saat zaman diliminde özellikle 500 ve 1000 µg/mL derişimlerde anlamlı olarak inhibe etmiştir. 1000 µg/mL derişimde hücre canlılığı % 60 olarak bulunmuştur. HT-29 hücreleri üzerinde ise 24 saat dilimlerinde konsantrasyona bağlı olarak 1000, 500 ve 250 µg/mL derişimlerde hücrelerin büyümesini anlamlı olarak azaltmış, 1000 µg/mL derişimde hücre büyümesini yaklaşık olarak %50 inhibe ettiği bulunmuştur. 48 saat zaman diliminde ise bütün dozlarda hücrelerin büyümesini azaltmış, 1000 µg/mL derişimde hücre büyümesini anlamlı olarak yaklaşık olarak %50 inhibe ettiği bulunmuştur. Sağlıklı model olan HUVEC hücrelerine karşı ise herhangi bir etki göstermemiştir.



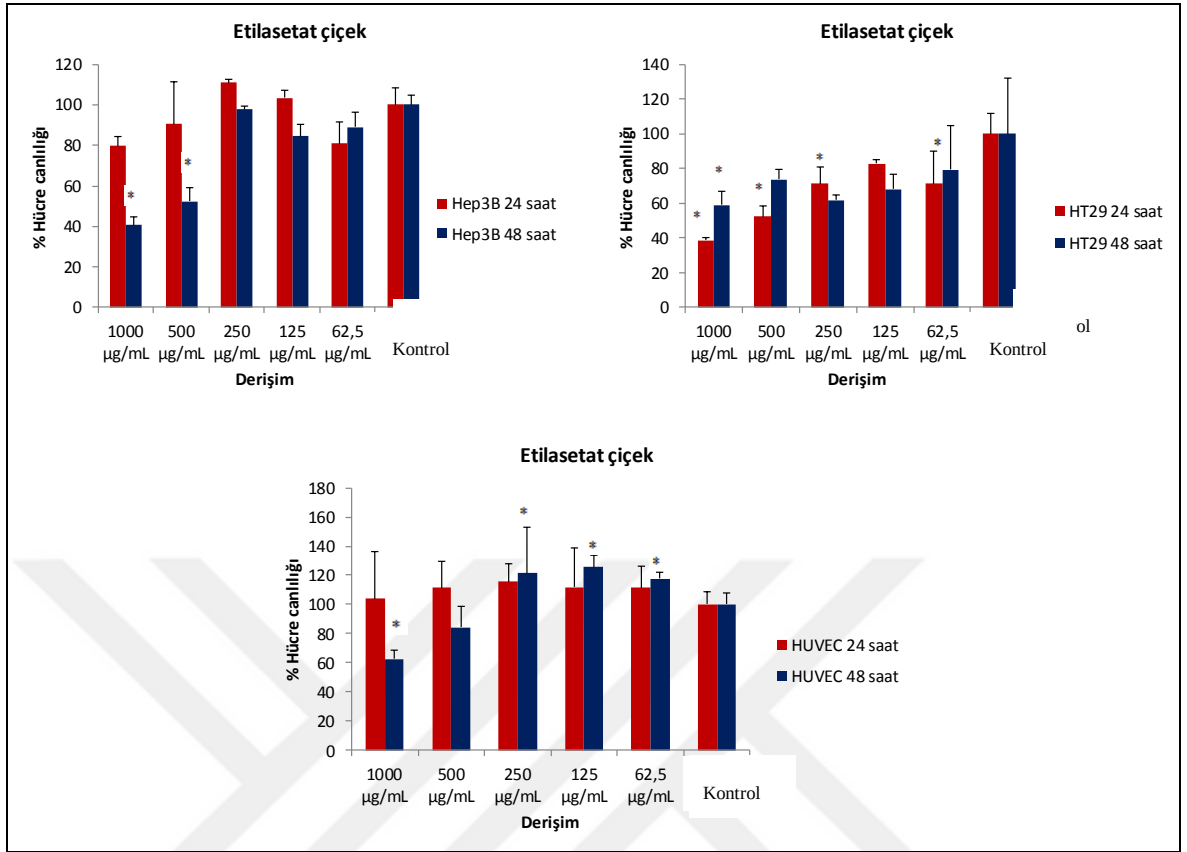
Şekil 4.200. Etilasetat yaprak özütünün Hep3B, HT-29 ve HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin grafik üzerinde gösterilmesi

Şekil 4.200’de verilmiş sitotoksik sonuçlar incelendiğinde, etilasetat yaprak özütü Hep3B hücrelerinin büyümelerini 24 saatte konsantrasyona bağlı olarak özellikle 250 µg/mL derişimde anlamlı olmak üzere azaltmış, 48 saat zaman diliminde konsantrasyona bağlı olarak özellikle 500 ve 1000 µg/mL derişimlerde anlamlı olarak inhibe etmiştir. 1000 µg/mL derişimde hücre canlılığı yaklaşık % 50 olarak bulunmuştur. HT-29 hücreleri üzerine ise konsantrasyona bağlı olarak hücrelerin büyümesini 24 saat diliminde bütün dozlarda, 48 saat diliminde ise 62,5 125, 250 µg/mL derişimlerde inhibe etmiştir. 24 saat sonuçları incelendiğinde HT-29 hücrelerinde % 50 inhibisyon değeri 125 µg/mL olarak belirlenmiştir. Sağlıklı model olan HUVEC hücrelerine karşı ise 24 ve 48 saat dilimlerinde 1000 µg/mL derişimde anlamlı olarak inhibe etmiştir.



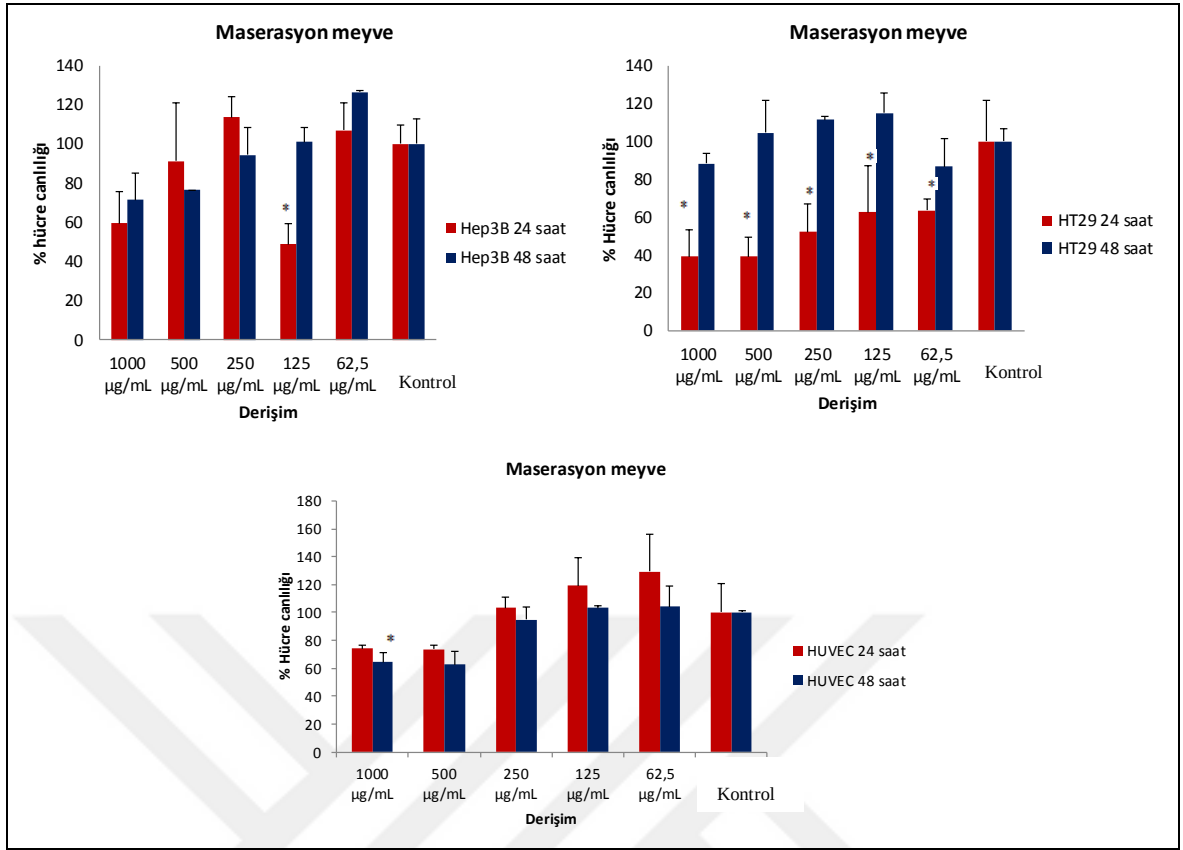
Şekil 4.201. Etilasetat meyve özütünün Hep3B, HT-29 ve HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin grafik üzerinde gösterilmesi

Şekil 4.201’de verilmiş sitotoksik sonuçlar incelendiğinde, etilasetat meyve özütü Hep3B hücrelerinin büyümelerini 24 saatte 1000 µg/mL derişimde anlamlı olarak azaltmış, 48 saat zaman diliminde konsantrasyona bağlı olarak özellikle 500 ve 62,5 µg/mL derişimlerde anlamlı olarak inhibe etmiştir. 62,5 µg/mL derişimde hücre canlılığı yaklaşık % 60 olarak bulunmuştur. HT-29 hücreleri üzerinde ise konsantrasyona bağlı olarak hücrelerin büyümesini 24 ve 48 saat diliminde özellikle 1000 µg/mL derişimde anlamlı olarak azaltmıştır. Sağlıklı model olan HUVEC hücrelerine karşı 48 saat dilimlerinde 1000 µg/mL derişimde anlamlı olarak inhibe etmiştir. Fakat HUVEC hücrelerine karşı proliferatif bir etki de göstermiştir. Özellikle 24 saatte 125 µg/mL derişimde hücrelerin büyümesini anlamlı olarak arttırmıştır.



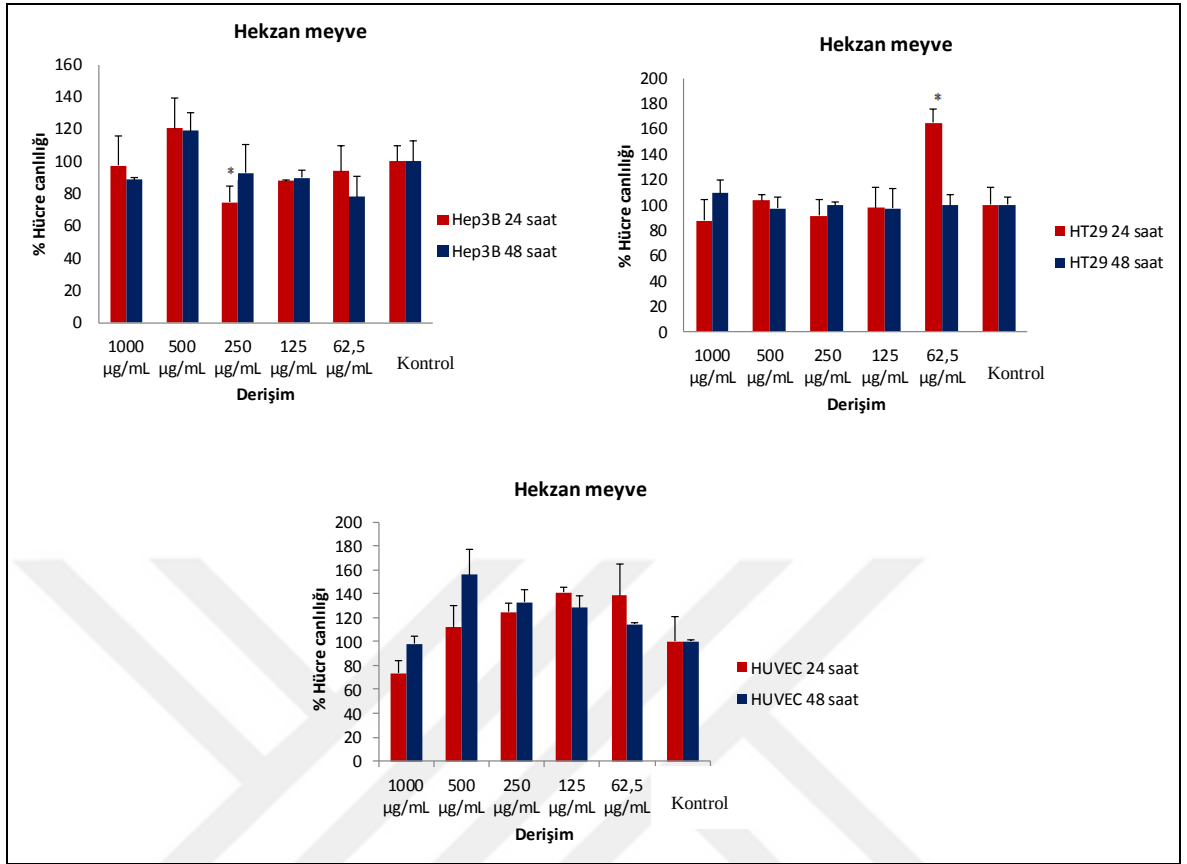
Şekil 4.202. Etilasetat çiçek özütünün Hep3B, HT-29 ve HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin grafik üzerinde gösterilmesi

Şekil 4.202’de verilmiş sitotoksik sonuçlar incelendiğinde, etilasetat çiçek özütü Hep3B hücrelerinin büyümelerini 24 saatte 1000 ve 62,5 µg/mL derişimlerde azaltmış, 48 saat zaman diliminde konsantrasyona bağlı olarak özellikle 1000 ve 500 µg/mL derişimlerde anlamlı olarak inhibe etmiştir. 500 µg/mL derişimde hücre canlılığı yaklaşık % 50 olarak bulunmuştur. HT-29 hücreleri üzerinde ise konsantrasyona bağlı olarak hücrelerin büyümesini 24 ve 48 saat dilimlerinde azaltmış, özellikle 24 saatte 1000 ve 500 µg/mL derişimlerde anlamlı olarak inhibe etmiş ve 500 µg/mL derişimde hücre canlılığı yaklaşık % 50 olarak bulunmuştur. Sağlıklı model olan HUVEC hücrelerine karşı ise 24 saatte hiçbir etki göstermemiş, 48 saat diliminde 1000 µg/mL derişimde anlamlı olarak inhibe etmiştir. Fakat HUVEC hücrelerine karşı proliferatif bir etki de göstermiştir. Özellikle 48 saatte 250, 125 ve 62,5 µg/mL derişimlerde hücrelerin büyümesini anlamlı olarak arttırmıştır.



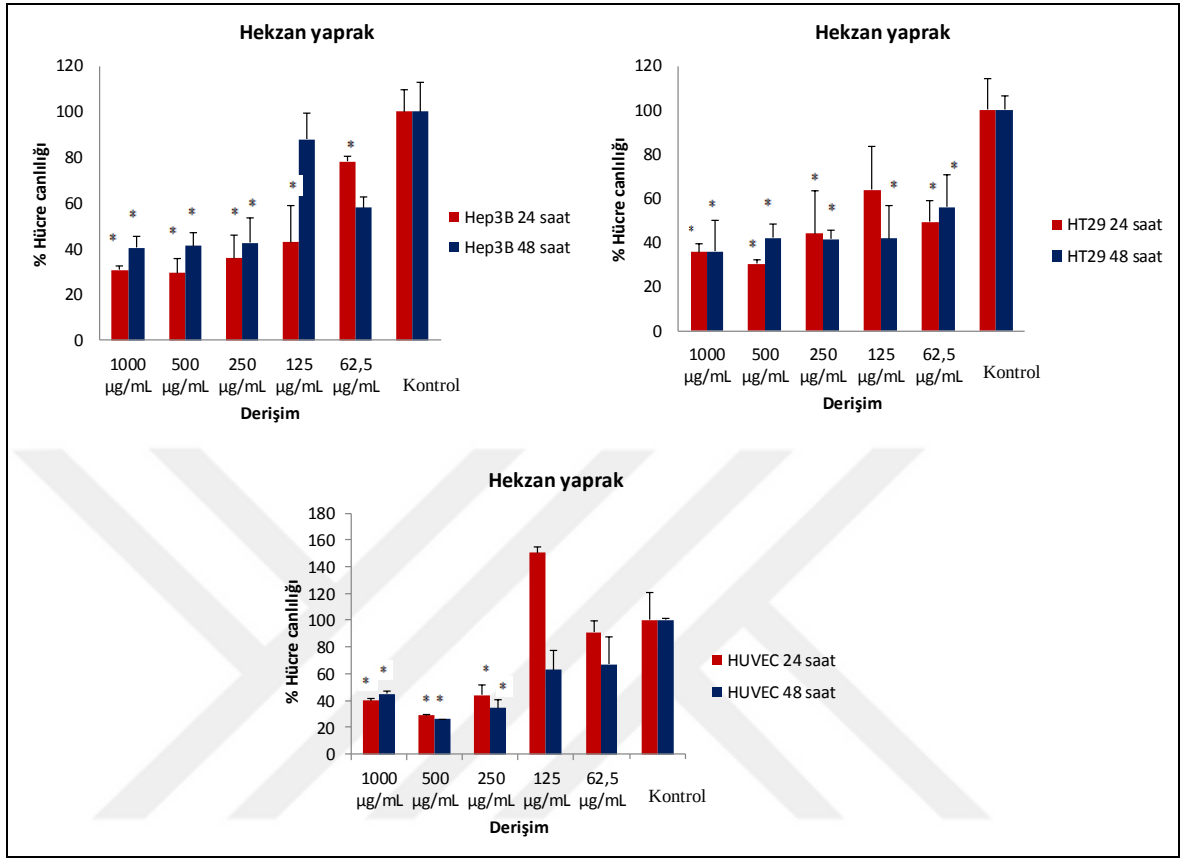
Şekil 4.203. Maserasyon meyve özütünün Hep3B, HT-29 ve HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin grafik üzerinde gösterilmesi

Şekil 4.203'te verilmiş sitotoksik sonuçlar incelendiğinde, maserasyon meyve özütü Hep3B hücrelerinin büyümelerini 24 saatte 125 µg/mL derişimde anlamlı olarak azaltmış, 48 saat zaman diliminde konsantrasyona bağlı olarak özellikle 1000 ve 500 µg/mL derişimlerde inhibe etmiştir. 24 saat diliminde 125 µg/mL derişimde hücre canlılığı yaklaşık % 50 olarak bulunmuştur. HT-29 hücreleri üzerinde ise 48 saatte herhangi bir etki göstermezken, özellikle 24 saat zaman diliminde bütün dozlarda anlamlı olarak inhibe etmiştir. Sağlıklı model olan HUVEC hücrelerine karşı ise 24 ve 48 saat diliminde 1000 ve 500 µg/mL derişimlerde inhibe etmiştir.



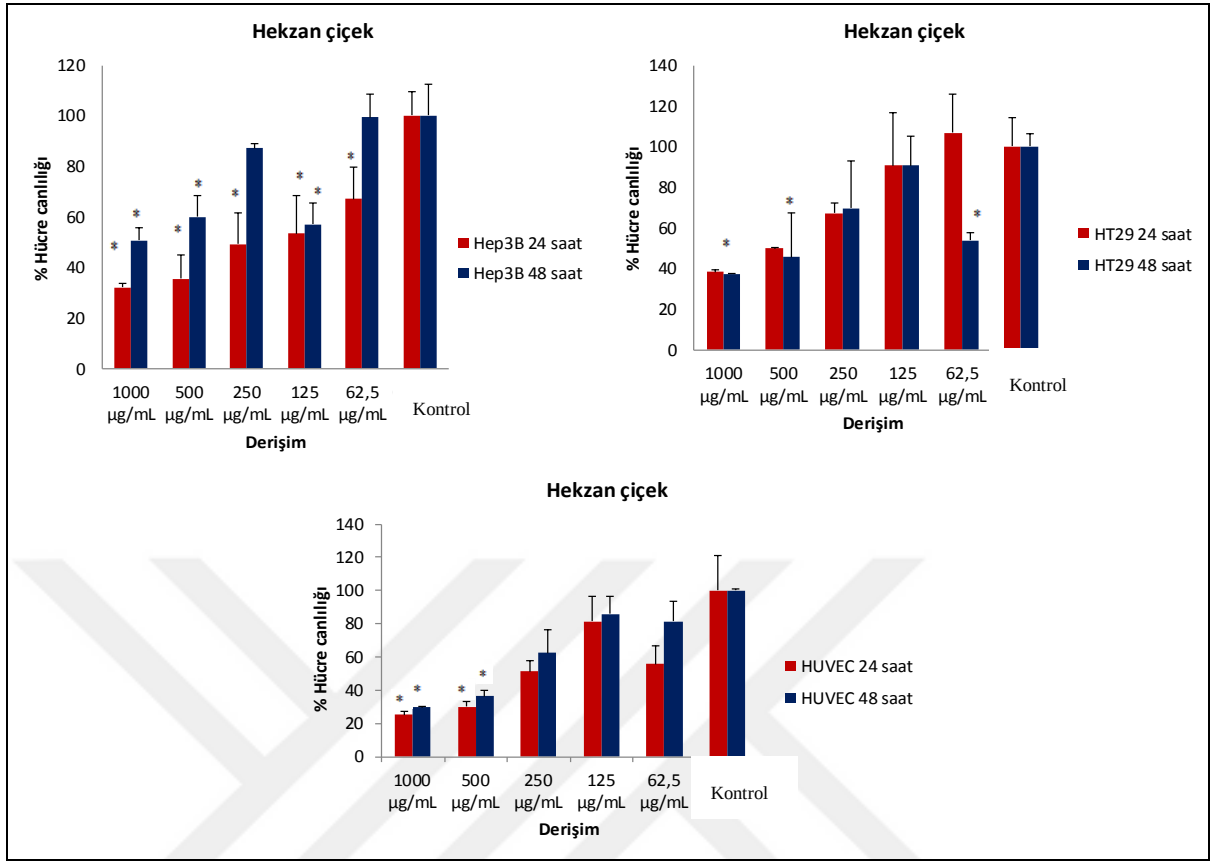
Şekil 4.204. Hekzan meyve özütünün Hep3B, HT-29 ve HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin grafik üzerinde gösterilmesi

Şekil 4.204'te verilmiş sitotoksik sonuçlar incelendiğinde, hekzan meyve özütü Hep3B hücrelerinin büyümesini 24 saatte 250 µg/mL derişimde anlamlı olarak azaltmış, 48 saat zaman diliminde ise 62,5 µg/mL derişimde inhibe etmiştir. HT-29 hücreleri üzerine ise herhangi bir etki gözlenmemiştir. Sağlıklı model olan HUVEC hücrelerine karşı ise 48 saatte ise hiçbir etki gözlenmezken, 24 saatte 1000 µg/mL derişimde inhibe etmiştir.



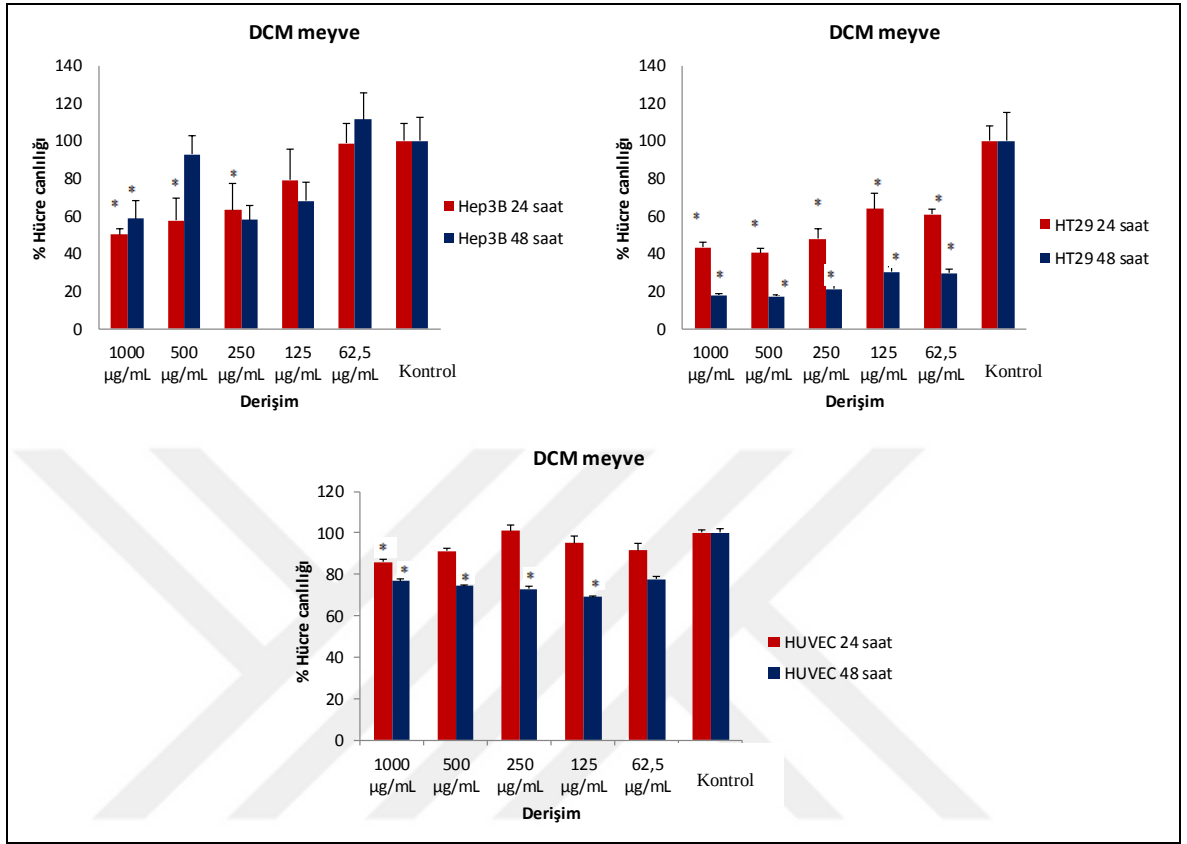
Şekil 4.205. Hekzan yaprak özütünün Hep3B, HT-29 ve HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin grafik üzerinde gösterilmesi

Şekil 4.205'te verilmiş sitotoksik sonuçlar incelendiğinde, hekzan yaprak özütü Hep3B hücrelerinin büyümesini 24 saatte bütün dozlarda anlamlı olarak azaltmış, 48 saat zaman diliminde ise 1000, 500 ve 250 µg/mL derişimlerde anlamlı olarak inhibe etmiştir. HT-29 hücreleri üzerinde ise konsantrasyona bağlı olarak hücrelerin büyümesini 24 ve 48 saatte bütün dozlarda anlamlı olarak azaltmıştır. Sağlıklı model olan HUVEC hücrelerinin büyümesini 24 ve 48 saatte 1000, 500 ve 250 µg/mL derişimlerde anlamlı olarak azaltmıştır.



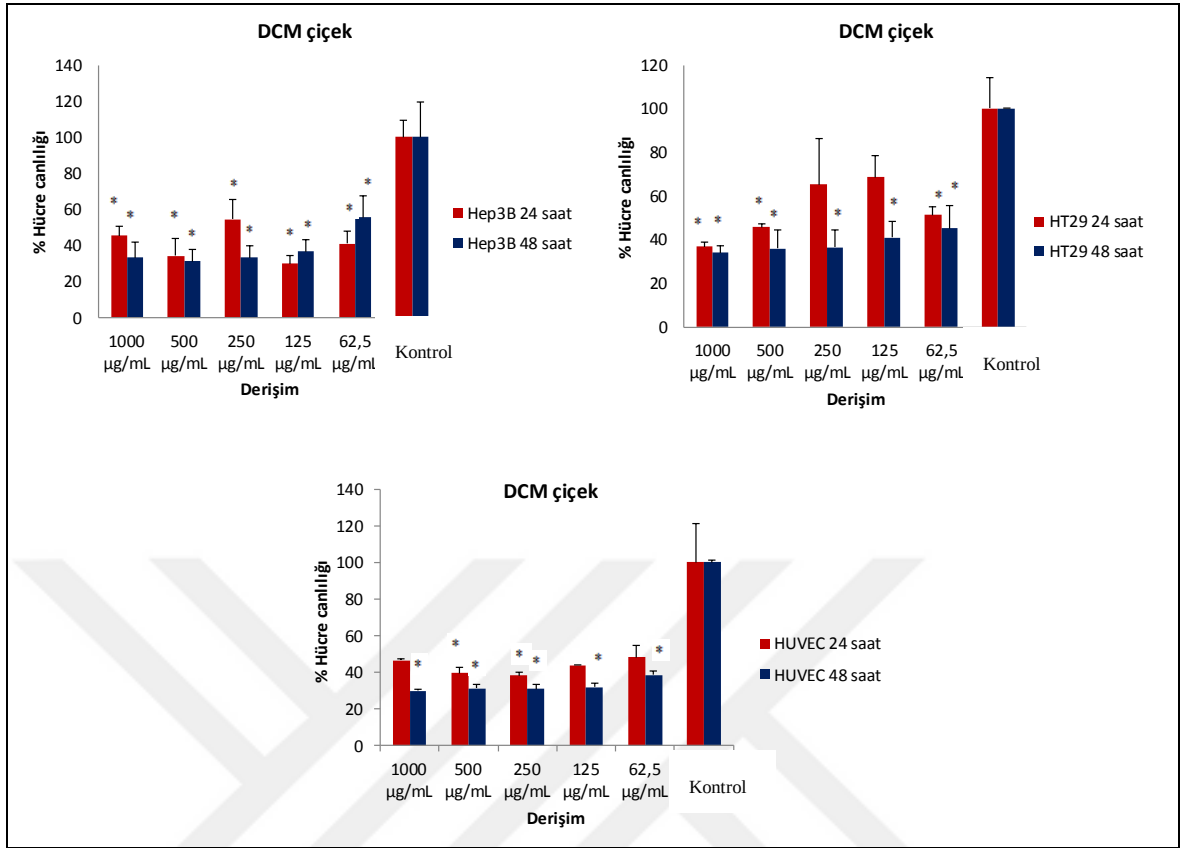
Şekil 4.206. Hekzan çiçek özütünün Hep3B, HT-29 ve HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin grafik üzerinde gösterilmesi

Şekil 4.206’da verilmiş sitotoksik sonuçlar incelendiğinde, hekzan çiçek özütü Hep3B hücrelerinin büyümesini 24 saatte bütün dozlarda, 48 saat zaman diliminde ise 1000, 500 ve 125 µg/mL derişimlerde anlamlı olarak inhibe etmiştir. 24 saat diliminde 250 µg/mL derişimde, 48 saatte ise 1000 µg/mL derişimde hücre canlılığı yaklaşık % 50 olarak bulunmuştur. HT-29 hücreleri üzerine ise konsantrasyona bağlı olarak hücrelerin büyümesini 24 saatte 250, 500 ve 1000 µg/mL, 48 saatte 1000, 500 ve 62,5 µg/mL derişimlerde anlamlı olarak azaltmıştır. 62,5 µg/mL derişimde hücre canlılığı yaklaşık % 50 olarak bulunmuştur. Sağlıklı model olan HUVEC hücrelerine karşı ise 24 ve 48 saatte özellikle 1000 ve 500 µg/mL derişimde anlamlı olmak üzere bütün dozlarda inhibe etmiştir.



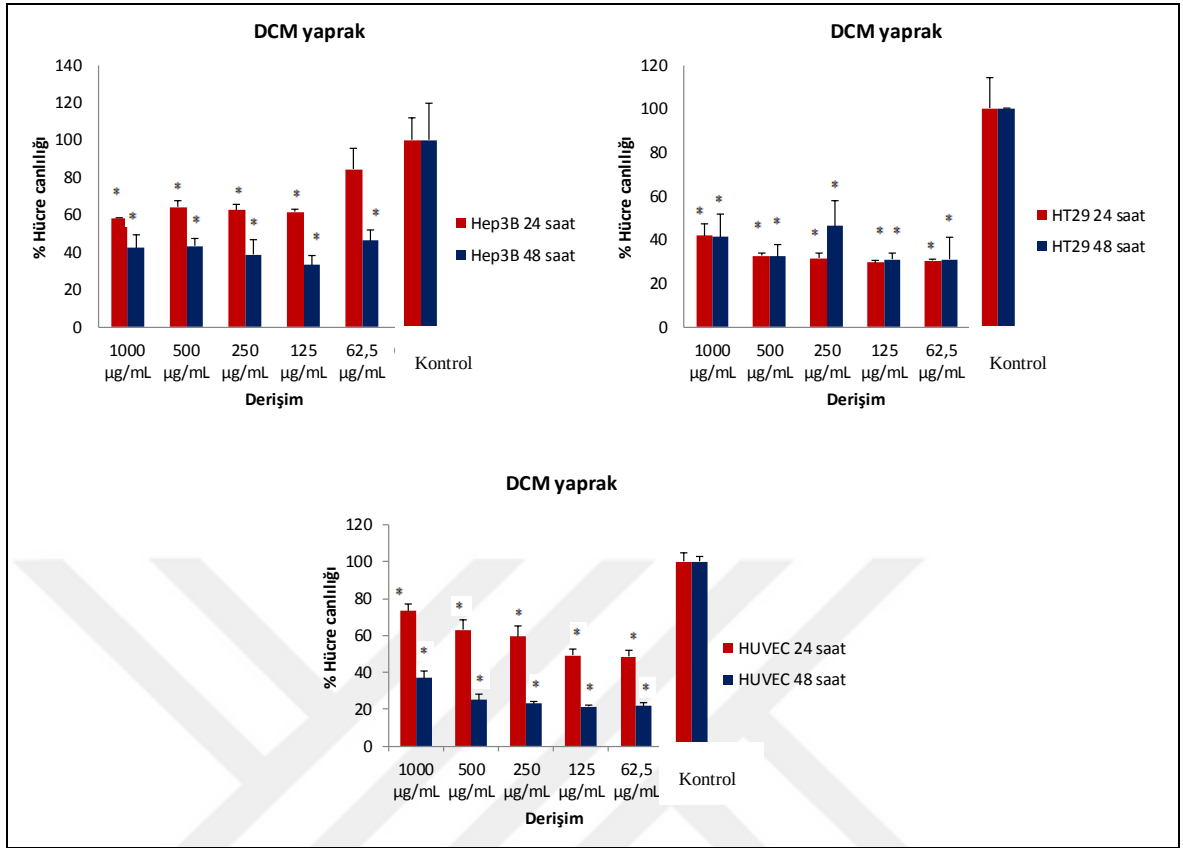
Şekil 4.207. DCM meyve özütünün Hep3B, HT-29 ve HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin grafik üzerinde gösterilmesi

Şekil 4.207’de verilmiş sitotoksik sonuçlar incelendiğinde, DCM meyve özütü Hep3B hücrelerinin büyümelerini 24 saatte 1000, 500 ve 250 µg/mL derişimlerde, 48 saatte 1000 µg/mL derişimde anlamlı olarak inhibe etmiştir. 24 saatte 1000 µg/mL derişimde hücre canlılığı yaklaşık % 50 olarak bulunmuştur. HT-29 hücreleri üzerine ise konsantrasyona bağlı olarak 24 ve 48 saatte bütün dozlarda anlamlı olarak inhibe etmiştir. 24 saatte 250 µg/mL derişimde hücre canlılığı % 50 inhibisyon değerine yakın olarak bulunmuştur. Sağlıklı model olan HUVEC hücrelerine karşı 24 saatte 1000 µg/mL derişimde, 48 saatte ise farklı dozlarda anlamlı olarak inhibe etmiştir.



Şekil 4.208. DCM çiçek özütünün Hep3B, HT-29 ve HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin grafik üzerinde gösterilmesi

Şekil 4.208’de verilmiş sitotoksik sonuçlar incelendiğinde, DCM çiçek özütü Hep3B hücre büyümelerini 24 ve 48 saatte bütün dozlarda anlamlı olarak azaltmıştır. 24 saatte 250 µg/mL derişimde hücre canlılığı % 50 inhibisyon değerine yakın olarak bulunmuştur. HT-29 hücreleri üzerine konsantrasyona bağlı olarak hücre büyümelerini 24 saatte 1000, 500 ve 62,5 µg/mL derişimlerde, 48 saatte bütün dozlarda anlamlı olarak inhibe etmiştir. 24 saatte 62,5 µg/mL derişimde hücre canlılığı % 50 inhibisyon değerine yakın olarak bulunmuştur. Sağlıklı model olan HUVEC hücrelerine karşı ise özellikle 24 saatte 500 ve 250 µg/mL derişimlerde anlamlı olmak üzere diğer derişimlerde de inhibe etmiştir.



Şekil 4.209. DCM yaprak özütünün Hep3B, HT-29 ve HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin grafik üzerinde gösterilmesi

Şekil 4.209’da verilmiş sitotoksik sonuçlar incelendiğinde, DCM yaprak özütü Hep3B hücre büyüme oranlarını 48 saatte bütün dozlarda anlamlı olarak azaltmış, 24 saatte 1000, 500, 250 ve 125 µg/mL derişimlerde anlamlı olarak inhibe etmiştir. HT-29 hücreleri üzerine konsantrasyona bağlı olarak 24 ve 48 saatte bütün dozlarda anlamlı olarak inhibe etmiştir. Sağlıklı model olan HUVEC hücrelerinin büyüme oranlarını 24 ve 48 saatte bütün dozlarda anlamlı olarak azaltmıştır.

4.8. GC/MS Ham Özütleri Bileşen Analizi Sonuçları

Hekzan ham özütlerinin bileşen analizi için yapılan uygulamada GC/MS cihazının kütüphane taramasından aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 4.28. Hekzan ham özütleri için uygulanan GC-MS analizi ile tanımlanan bileşikler

	<i>Hekzan çiçek özütünde tanımlanan bileşikler</i>	
<i>Alıkonma zamanı</i>	<i>BİLEŞİKLER</i>	<i>Alan %</i>
8,74	Heptanal	0,104
9,32	Hekzanoik asit, metil ester	0,263
9,63	Metoksi fenil oksim	0,078
10,46	Benzaldehit	59,43
10,71	6-Metil-5-hepten-2-one	0,763
10,74	2-N-pentilfuran	1,673
10,88	Oktametilsiklotetrasiloksan	1,487
10,97	Oktanal	0,806
11,15	E,E-2,4-Heptadienal	1,692
11,43	D-Limonen	0,524
11,61	Benzil alkol	1,669
11,74	2- Hidroksi benzaldehit	1,947
11,92	(2R-cis)-1-(5-Etenil-tetrahydro-5-methyl-2-Furanil)-Ethanon	0,415
12,05	3,5,5-Trimetil-2-siklohekzenon (isoforon)	0,282
12,19	2-Asetilpirol	0,252
12,25	(z,e),(e,e)-3,5-oktadien-2-on	0,866
12,42	Heptanoik asit	0,134
12,57	2-Metoksi-fenol (guaiacol, guajol, guasol, anastil, guaiastil)	0,198
12,68	Metil benzoat	3,959
12,80	Nonanal	2,364
12,92	3-Asetil-2,6-heptandion,	0,796
13,01	2-Fenil-ethanol	1,252
13,12	Oktanoik asit metil ester (metil oktanoat)	1,066
13,35	Pentandioik asit dimetil ester (dimetil glutarat)	0,057
13,46	Lilac aldehit B	1,657
13,61	Lilac aldehit A, lilac aldehit B, lilac aldehit C	1,998
13,84	Lilac aldehit D	1,725
14,01	Metil-fenil asetat (fenil asetik asit metil ester)	0,666
14,15	Azulen	0,557

‘Çizelge 4.28’nin devamı’

14,30	Metil salisilat (betula, exagien, analgit, flucarmit, gaultheriaol)	0,788
14,40	Safranal	0,334
14,57	Lilac alkol D,C	0,368
14,67	Nonanoik asit metil ester (metil pelargonat)	0,712
14,72	2,6,6-Trimetil-1-siklohekzen-1-karboksaldehit	0,507
14,84	Metil-etil-maleimid	0,071
15,05	1-Fenoksi-2-propanol	0,156
15,14	Sikloheksiliden aseton	0,065
15,34	Nonanoik asit	0,154
15,46	Sinnameal (fenil akrolein)	0,068
15,53	3,3-Dimetil-2,7-oktandion	0,151
15,70	Metil(s)-(+)-mandelat	0,279
15,82	Karvakrol (antioxine, isotimol, 2-metil-5-isopropil fenol	0,085
15,88	Undecanal	0,063
16,03	2-Metoksi-4-vinil fenol	0,423
16,10	Metil kaprat	0,339
16,25	2,3-Dihidro-3-metil-furan	0,042
16,31	Metoksi-siklooktan	0,139
16,42	İsofitol	0,423
16,67	8-Hidroksi-linalol	0,212
16,93	Ilagen (ylangene)	0,027
16,99	Metil (z)-sinnameat	0,053
17,08	Tetradekan	0,051
17,15	2-Benzoil-6,7-dimetoksi-4-metiliden-2h-1,3-benzotiyazin	0,043
17,22	Vanilin	0,091
17,30	Eugenol	0,019
17,43	Undekanoik asit metil ester	0,017
17,47	4-Florokumen + 3,4,5,5-tetra metil -2-siklopenten-1-on,	0,028
17,59	Alfa- ionon	0,146
17,79	Kumarin	0,043
17,84	2-Metoksi-4-(1-profenil)-fenol	0,121

‘Çizelge 4.28’nin devamı’

17,99	4-Asetil-1-amidin-5-metilpirazol	0,033
18,26	Curcumene	0,045
18,34	(e)-.Beta.-ionone	0,588
18,47	Valencene	0,076
18,68	Metil laurat	0,080
18,81	Calamenene	0,080
19,00	Dihidroaktinidiolid	0,327
19,32	1-(2-Vinilfenil)propan-1-on	0,062
19,56	Hekzadekan	0,012
19,62	Dietil fitalat	0,023
20,34	Silikon polimer	0,058
20,62	Cadalın	0,008
20,71	Patchouli alkol	0,027
22,81	Nonadekan	0,006

	Hekzan meyve özütünde tanımlanan bileşikler	
<i>Alıkonma zamanı</i>	<i>BİLEŞİKLER</i>	<i>Alan %</i>
5,76	N,n-dimetilformamid	70,19
9,08	2-Amino-oksazol	0,755
9,75	5-Metil-4-hepten-3-on	0,412
10,06	Benzaldehit	3,884
10,59	Hekzanoik asit	0,456
10,87	Oktametilsiklotetrasiloksan	1,893
11,08	1,4-Dikloro-Benzen	2,443
11,42	Limonen	1,638
11,57	Benzil alkol	1,019
11,71	Salisilik aldehit	1,534
12,12	1,4-Dioksaspiro[4.5]dekan	0,263
12,77	N-nonanal	0,503
12,99	2-Fenil ethanol	0,843
13,57	Pristane	1,024

‘Çizelge 4.28’nin devamı’

13,85	Benzoik asit	0,863
14,13	Naftalin	1,272
14,62	4-(1-Hidroksi-etil)-butanolakton	0,662
14,79	Benzotiyazol	0,873
16,10	16-Oksosalutaridin	0,803
16,63	Eugenol	0,413
16,85	N-butil butirat	0,038
17,09	Tetradekan	0,063
17,24	Vanilin	0,371
17,39	Isolongifolene	0,088
18,09	2,6-Di(t-butil)-4-hidroksi-4-metil-2,5-sikloheksadien-1-on	0,086
18,34	5,10-Dihidro-5-[3-metilamino) propil]-11H-dibenzo [B,E][1,4] diazepin-11-on	0,530
18,63	4-Metil-2,6-di-ter-butilfenol (BHT, deenax, dalpac, stavox , vianol)	0,059
18,69	Dodekanoik asit metil ester	0,045
19,00	4,5,7,7A-Tetrahidro-4,4,7A-trimetil-2(6H)benzofuranon	0,198
20,18	5-Etil-1,3-dihidro-1,3-diiminoisoindol	0,557
20,34	Silikon polimer	0,165

	Hekzan yaprak özütünde tanımlanan bileşikler	
<i>Alıkonma zamanı</i>	<i>BİLEŞİKLER</i>	<i>Alan %</i>
7,51	E-2-Hekzanal	2,098
7,99	1-Hepten	0,882
9,05	Dihidro-2(3H)-furanon	0,285
9,31	Metil ester hekzanoik asit	0,145
9,49	3-Hekzenoik asit metil ester	0,490
10,69	2-Pentil-furan	0,760
10,18	Benzaldehit	10,292
10,89	Cis-2-(2-pentenil) furan	0,994
11,03	3,4-Dihidropirol[1,2-a]pirazin-1(2H)-on	0,292

‘Çizelge 4.28’nin devamı’

11,11	1,4-Diklorobenzen	0,890
11,45	3-Hekzenoik asit	0,562
11,63	Benzilalkol	2,654
11,97	5-Etil-dihidro -2(3H)-furanon	0,533
12,06	2-Hekzenoik asit	0,233
12,23	Trans-2-hekzenoik asit	0,661
12,35	2-Metilfenol	0,122
12,48	4-Oksohekzenoik asit metil ester	0,052
12,57	2-Metoksifenol	0,109
12,67	Metil benzoat	1,170
12,78	Nonanal	0,353
12,86	Butanedioik asit etil metil ester	0,129
12,92	2,6-Dimetilsikloheksanol	0,172
13,01	Benzenethanol	0,869
13,12	3-Hidroksi-2-metil-4-piron	0,363
13,28	2-Propil-tiyofen	0,096
13,40	Benzil siyanid(benzenasetonitril)	0,150
13,49	2,6,6-Trimetil-2-sikloheksen-1,4-dion	0,064
13,61	2,6-Nonadienal	0,377
13,71	2-Nonenal	0,183
13,80	Benzil asetat	0,281
13,91	Etil benzoat	0,497
14,02	Metil fenil asetat	0,630
14,14	Siklopentasiklohepten	0,413
14,21	Benzoik asit	0,193
14,30	Metil salisilat	0,337
14,40	Safranal	0,169
14,58	2-Hidroksi-3-propil-2-siklopenten-1-on	0,069
14,65	Etil 3,3-dimetil butirat	0,041
14,71	2,6,6-Trimetil-1-sikloheksen-1-karboksaldehit	0,127
14,88	3-Etil-4-metil-1H-pirol-2,5-dion	0,112
15,02	Etil fenil asetat	0,178

‘Çizelge 4.28’nin devamı’

15,15	4-Asetil-1-metilsiklohekzen	0,041
15,20	2-Fenil etil asetat	0,092
15,33	5-Formil-4-nonen	0,038
15,39	4,5-Dihidro-1(3H)-isobenzofuranon	0,044
15,45	3-Fenilpropenal	0,035
15,54	4-Etil-benzenemetanol	0,060
15,62	Orto-hidroksi-propiyofenon	0,024
15,70	2-Etil-1-okten-3-in	0,026
15,76	2-(1,1-Dimetil etil)-sikloheksanol	0,042
15,82	5-Metil-2-isopropilfenol	0,030
15,88	Dekahidronaftalin	0,041
15,94	Sikloheptanon	0,018
16,03	2-Metoksi-4-vinil fenol	0,060
16,10	(z)-3-Hekzenil pentenoat	0,068
16,11	(e)-2-[(n-Hidroksi-n-fenil)-amino]-3-[n-(fenilimino)]-indol	0,018
16,20	Hekzil tiglat	0,020
16,25	1-Siklopropil etanon	0,066
16,30	2,4-Dimetil-4-pentenoik asit metil ester	0,036
16,44	5-Pentil-2(5H)-furanon	0,036
16,50	5,6-Dietil-siklohekza-1,3-dien	0,066
16,63	2-Metoksi-4-(2-propenil)-fenol	0,257
16,93	Copaene	0,046
17,07	Beta-Bourbonene	0,035
17,22	3-Metil-2-(cis-2-penten-1-il)-2-siklopenten-1-on	0,120
17,55	t--Caryophyllene	0,104
17,79	Kumarin	0,033
17,84	2-Metoksi-4-propenil fenol	0,073
17,99	1,1,4,8-Tetra metil-cis, cis, cis,-4,7,10-sikloundekatrien	0,027
18,09	Nealloocimene (Alloaromadendrene)	0,048
18,34	Beta-Ionone	0,140

‘Çizelge 4.28’nin devamı’

18,51	E,E-.alfa.-Farnesene	0,070
18,81	1-cis-Calamenene	0,065
19,00	Dihidro aktinidiolid	0,092
20,18	6-Metoksi-3-metil-1,2,3,4-tetrahidro-gama-karbolin	0,016
20,34	Silikon polimer	0,011



BÖLÜM 5

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında yaban eriği bitkisinin antioksidan, sitotoksik, enzim-aktif özüt ve bileşenlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla bitkiye farklı çözücü sistemleri ile özütleme işlemi uygulanmış ve daha sonra hangi özütün daha antioksidatif olduğu ve bu özütlerin içerdiği etken bileşenlerin ne derece etkili olduğu DPPH, CUPRAC, TEAC, FRAP ve Folin-Ciocalteu reaktifi ve toplam fenolik madde analizi ile belirlenmiştir. Antioksidan özelliği belirlenen ham özütler sitotoksisite ve enzim-aktivite/inhibisyon çalışmalarında kullanılmıştır. Sitotoksisite çalışmaları için Hep3B, HUVEC ve HT-29 hücre hatları seçilmiştir. Etken özütler için enzim-aktivite/inhibisyon çalışmalarında proteaz, tirozinaz ve β -laktamaz enzimleri ve bunların substratları seçilmiştir. Etken özütler için kromatografik analiz, hekzan özütleri için ise GC/MS analizi yapılmıştır (Cömert, 2012).

Literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında yaban eriği meyvesinin antioksidan aktivitesine DPPH, FRAP, ABTS, TEAC, ORAC yöntemleri ile fenolik bileşik içeriğine ise Folin-Ciocalteu ve Tilmans' yöntemleri ile bakılmıştır (Jablonska-Rys ve ark., 2009; Egea ve ark., 2010; Fraternale ve ark., 2009; Turker ve ark., 2012). Çalışılan tez kapsamında farklı çözücü sistemleri ile meyve, çiçek, yaprak özütlerine ilişkin antioksidan aktivitelerini karşılaştırmak ve literatürdeki çalışmalar ile kıyaslamak amacıyla DPPH, CUPRAC, TEAC, FRAP yöntemleri ile toplam fenolik madde analizi ise Folin-Ciocalteu reaktifi ile belirlenmiştir. Yaban eriği meyvesine ait yapılan literatür çalışmasında FRAP değeri= $14,17 \pm 3,06$ mM Fe.100g⁻¹, ABTS değeri= $5,33 \pm 0,22$ μ gM TE g⁻¹, toplam fenolik bileşen miktarı ise $402,67 \pm 12,44$ mg gallik asit.100 g⁻¹ olarak belirlenmiştir. (Jablonska-Rys ve ark., 2009). Ayrıca yapılan diğer antioksidan yöntemine ait literatür çalışmasına bakıldığında yaban eriği meyvesinin aseton ve etanol özütleri için DPPH analizi yapılmıştır. DPPH analizi sonucunda aseton özütünün IC₅₀ değeri= $2,13 \pm 0,01$ μ g/mL, % inhibisyon değeri= $97,8 \pm 0,1$; etanol özütünün ise IC₅₀ değeri = $2,26 \pm 0,04$ μ g/ mL, % inhibisyon değeri= $97,2 \pm 0,1$ olarak belirlenmiştir (Turker ve ark., 2012).

DPPH analizi sonucunda inhibisyonu % 50 veya % 50'den büyük özütlerin 1 mg/mL'lik örnekleri için seri seyreltmeler yapılarak IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca inhibisyonu % 50 den düşük fakat % 50 ye yakın olan 1 mg/mL'lik örneklerin stok

çözeltileri (10 mg/mL) için DPPH analizi yapılmıştır. Bunun sonucunda hekzan çiçek (% 68,70) ve metanol meyvenin (% 74,42) inhibisyonları % 50 den fazla bulunmuştur.

DPPH analizi ile sonucunda diklorometan çiçek ve meyve özütü, hekzan çiçek özütü, etilasetat meyve, çiçek ve yaprak özütleri, metanol yaprak, çiçek ve meyve özütlerinde antioksidan aktivite bulunmuştur. Bu yöntemde bir antioksidan için ölçülen IC_{50} değeri arttıkça antioksidan etkisi azalacağından; etilasetat meyve özütünün 1 mg/mL çözeltisinde antioksidan etkisi metanol meyve ve diklorometan meyve özütlerine göre daha yüksek bulunmuştur. DPPH analizinde en etkin meyve özütü olarak; etil asetat meyve özütü (1 mg/mL) (DPPH- IC_{50} = 0,327 mg/mL), en etkin çiçek özütü olarak; etil asetat çiçek özütü (1 mg/mL) (DPPH- IC_{50} = 0,387 mg/mL), en etkin yaprak özütü olarak ise; etilasetat (1 mg/mL) (DPPH- IC_{50} = 0,463 mg/mL) ve metanol yaprak (DPPH- IC_{50} = 0.48 mg/mL) özütleri belirlenmiştir.

TEAC yöntemi analizi sonucunda ise; meyve, çiçek ve yaprak için TEAC değerleri karşılaştırıldığında etilasetat meyve, DCM çiçek ve etilasetat yaprak özütleri etkilidir.

TEAC değerlerinin karşılaştırılması;

Etil asetat meyve > DCM çiçek > DCM meyve > Hekzan çiçek > Etil asetat yaprak > DCM yaprak > Metanol meyve > Etil asetat çiçek > Metanol çiçek > Metanol yaprak > Maserasyon meyve > Hekzan yaprak > Hekzan meyve

Yapılan analiz sonucunda toplam fenolik bileşen içeriği en yüksek meyve özütü olarak; metanol meyve = 19 mg, çiçek özütü olarak; etil asetat çiçek = 15 mg, yaprak özütü olarak ise; etil asetat yaprak = 12,5 mg belirlenmiştir.

CUPRAC analizinde (0,1 mg/mL) QREFC (Kersetin eşdeğeri flavonoid derişimi) değeri en yüksek özütler; etil asetat meyve = 0,363, metanol yaprak = 0,300 ve hekzan çiçek = 0,342 özütleri bulunmuştur.

FRAP analizi sonucunda FRAP değerlerinin karşılaştırılması;

Metanol yaprak > DCM meyve > Etil asetat meyve > Metanol çiçek > Etil asetat çiçek > Etil asetat yaprak > DCM yaprak > Metanol meyve > Hekzan çiçek

Literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında yaban eriğine rengini veren antosiyaninlerin enzim-inhibisyonu ve antibakteriyel özelliği ile meyve özütlerinin hekzan, diklorometan ve metanolde antibakteriyel özelliği, biyolojik aktiviteleri incelenmiştir. (Kumarasamy ve ark., 2004). Yapılan tez çalışmasında farklı çözücülere ilişkin etken yaban eriği meyve, çiçek, yaprak özütlerinin enzim inhibisyon değerleri belirlenmiştir. Enzim-aktivite/inhibisyon çalışmalarında proteaz, tirozinaz ve β -laktamaz enzimleri ve

bunların substratları seçilerek çalışılmıştır ve elde edilen inhibisyon değerleri yorumlanmıştır. Enzim-aktivite/inhibisyon çalışmalarında proteaz, tirozinaz ve β -laktamaz enzimlerinin seçilmesinin nedeni; bu enzimlerin aşırılığının kanser, alzheimer, bağışıklık vs. bir çok hastalığa sebep olması ve bunların aktif özüt veya saf bileşenler yardımıyla inhibe edilerek aşırılığında ortaya çıkan zararın giderilmeye çalışılmasıdır.

Eğer özütler enzimleri büyük oranda inhibe etmiş olsalardı elde edilen spektrumlar kullanılan inhibitörün spektrumu ile aynı olması gerekirdi. Kontrol ve aktif özütlerin enzim, substrat ve tampon çözelti ile verdiği reaksiyon grafiğinden V_{maks} değerleri elde edilmiştir. Enzim inhibisyon çalışmaları 2 tekrarlı çalışıldığından elde edilen iki V_{maks} değerinin ortalaması alınmış, kontrol ve özütlerin V_{maks} 'ları arasındaki fark belirlenip özütleri kıyaslamak amacıyla en yüksek % inhibisyon değeri 100 olarak kabul edilerek bunun üzerinden % inhibisyon değerleri belirlenmiştir.

α -Kimotripsin enziminin inhibisyon sonuçlarına bakıldığında; metanol yaprak özütü dışındaki diğer meyve, yaprak ve çiçek özütlerinde özüt derişimi artırıldığında % inhibisyon değerlerinin de arttığı görülmektedir. Özütlerin % inhibisyon değerleri karşılaştırıldığında; 10 mg/ mL' lik derişimlerde yaban eriğı meyvesinde etil asetat meyve, çiçeğinde metanol çiçek, yaprağında ise diklorometan yaprak özütünün daha yüksek inhibisyona sahip olduğu belirlenmiştir.

Tripsin enziminin inhibisyon sonuçlarına bakıldığında; meyve, yaprak ve çiçek özütlerinde özüt derişimi artırıldığında maserasyon meyve özütü (MeOH) ile metanol yaprak, meyve ve çiçek özütlerinin inhibisyon değerlerinde azalma, hekzan çiçek, diklorometan yaprak ve meyve özütü ile etil asetat yaprak, meyve ve çiçek özütlerinde inhibisyon değerlerinde artma olduğu görülmektedir. Özütlerin % inhibisyon değerleri karşılaştırıldığında; 10 mg /mL lik derişimlerde yaban eriğı meyvesinde etil asetat meyve, çiçeğinde etil asetat çiçek, yaprağında ise diklorometan yaprak özütünün daha yüksek inhibisyona sahip olduğu belirlenmiştir.

Papain enziminin inhibisyon sonuçlarına bakıldığında; meyve, yaprak ve çiçek özütlerinde özüt derişimi artırıldığında özütlerin genel olarak inhibisyon değerlerinde artma olduğu görülmektedir. 10 mg/mL' lik özütlerde derişim artırıldığında; yaban eriğı meyvesinde etil asetat meyve, çiçeğinde etil asetat çiçek, yaprağında ise etil asetat yaprak özütünün daha yüksek inhibisyona sahip olduğu belirlenmiştir.

Tirozinaz enziminin inhibisyon sonuçlarına bakıldığında; meyve, yaprak ve çiçek özütlerinde özüt derişimi artırıldığında özütlerin genel olarak inhibisyon değerlerinde

artma olduğu gör÷lmektedir. 10 mg/mL’lik örneklerde derişim artırıldığında inhibisyon değerlerine bakılırsa yaban eriğı meyvesinde etil asetat meyve ve maserasyon meyve (MeOH), çiçeğinde etil asetat çiçek, yaprağında ise metanol yaprak özütünün daha yüksek inhibisyona sahip olduğu gör÷lmektedir.

Penisilinaz enziminin inhibisyon sonuçlarına bakıldığında; meyve, yaprak ve çiçek özütlerinde özüt derişimi artırıldığında 10 µL için yaprak, meyve ve çiçek özütlerinin inhibisyon değerlerinde artma, 50 µL için ise özütlerin inhibisyon değerlerinde azalma olduğu gör÷lmektedir. Özütlerin 10 mg/mL ‘lik örnekleri için % inhibisyon değerleri karşılaştırıldığında; yaban eriğı meyvesinde etil asetat meyve, çiçeğinde etil asetat çiçek, yaprağında ise diklorometan yaprak özütünün daha yüksek inhibisyona sahip olduğu belirlenmiştir.

Ham özütlere ait enzim denemeleri göz önüne alındığında etilasetat meyve, çiçek ve yaprak özütü potansiyel papain enzim inhibitörü olarak kullanılabilir.

Sitotoksite çalışması; bitki örneklerinin doku kültüründe farklı kanserli hücre hatlarında sitotoksik etkilerinin araştırılması, bitki örneklerinin uygulanması ve antikanser aktivitelerinin belirlenmesi, hücresel hasarın çeşitli ölçüm yöntemleri ile belirlenmesi, hücresel büyümenin belirlenmesi, morfolojik olarak hücresel hasarın gözlenmesi, hücresel metabolizmadaki herhangi bir değışikliğin belirlenmesi amacıyla yapılmaktadır.

Farklı çözücülere ilişkin meyve, çiçek ve yaprak özütlerinin HUVEC, Hep3B ve HT-29 hücre hatlarına uygulanan örneklerin farklı derişimlerinin sonuçları, grafikleri açıklayabilmek amacıyla birbirleri ile ve kontrole göre kıyaslanmıştır. (Bölüm 4.7.)

Sitotoksite çalışmalarının sonuçları incelendiğinde; metanol meyve, çiçek ve yaprak özütleri Hep3B hücrelerinin büyümelerine karşı 24 saatte herhangi bir etki göstermezken, 48 saatte farklı derişimlerde anlamlı olarak inhibe ettiğı gör÷lmektedir. HT-29 hücrelerinin büyümelerinde ise 24 ve 48 saatte farklı derişimlerde anlamlı olarak inhibe ettiğı gör÷lmektedir. Metanol çiçek özütünün Hep3B hücrelerinin büyümesini 250 µg/mL derişimde yaklaşık olarak %50, HT-29 hücrelerinde ise 1000 µg/mL derişimde hücre büyümesini yaklaşık olarak %60 inhibe ettiğı bulunmuştur. Metanol yaprak özütünün Hep3B hücrelerinin büyümesini 1000 ve 500 µg/mL derişimlerde, HT-29 hücrelerinin büyümesini ise 500 µg/mL derişimde yaklaşık olarak %50 inhibe ettiğı bulunmuştur. Metanol meyve özütü için Hep3B hücrelerinde 1000 µg/mL derişimde hücre canlılığı % 60, HT-29 hücreleri üzerinde ise 24 ve 48 saatte 1000 µg/mL derişimde hücre canlılığı yaklaşık olarak %50 olarak belirlenmiştir. Metanol meyve ve çiçek özütleri sağlıklı model

olan HUVEC hücrelerine karşı herhangi bir etki göstermezken, metanol yaprak özütü proliferatif bir etki göstermiştir. Özellikle 48 saat zaman diliminde 250 µg/mL derişimde hücrelerin büyümesini anlamlı olarak arttırmıştır.

Etilasetat meyve, çiçek ve yaprak özütleri Hep3B ve HT-29 hücrelerinin büyümesine karşı 24 ve 48 saatte farklı derişimlerde anlamlı olarak inhibe ettiği görülmektedir. Etilasetat yaprak özütünün Hep3B hücrelerinin büyümesini 1000 µg/mL derişimde yaklaşık olarak %50, HT-29 hücrelerinde ise 125 µg/mL derişimde hücre büyümesini yaklaşık olarak %50 inhibe ettiği bulunmuştur. Etilasetat meyve özütünün Hep3B hücrelerinin büyümesini 62,5 µg/mL derişimde yaklaşık olarak %60 inhibe ettiği bulunmuştur. Etilasetat çiçek özütü için Hep3B ve HT-29 hücrelerinde 500 µg/mL derişimde hücre canlılığı % 50 olarak belirlenmiştir. Etilasetat meyve, çiçek ve yaprak özütlerinin sağlıklı model olan HUVEC hücrelerinin büyümesini farklı derişimlerde anlamlı olarak inhibe ettiği bulunmuştur. Ayrıca etilasetat meyve ve çiçek özütleri proliferatif bir etki de göstermiştir.

Maserasyon meyve özütü Hep3B hücrelerinin büyümelerini 24 ve 48 saatte farklı derişimlerde anlamlı olarak inhibe etmiştir ve 125 µg/mL derişimde hücre canlılığı yaklaşık % 50 olarak bulunmuştur. HT-29 hücreleri üzerinde ise 48 saatte herhangi bir etki göstermezken, özellikle 24 saat zaman diliminde bütün dozlarda anlamlı olarak inhibe etmiştir. Sağlıklı model olan HUVEC hücrelerine karşı ise 24 ve 48 saat diliminde 1000 ve 500 µg/mL derişimlerde inhibe etmiştir.

Hekzan çiçek ve yaprak özütleri Hep3B ve HT-29 hücrelerinin büyümesine karşı 24 ve 48 saatte farklı derişimlerde anlamlı olarak inhibe ettiği görülmektedir. Hekzan meyve özütü ise Hep3B hücrelerinin büyümesine karşı 24 saatte ve 48 saatte farklı derişimlerde anlamlı olarak inhibe ettiği fakat HT-29 hücrelerinin büyümesine karşı 24 ve 48 saatte herhangi bir etki göstermediği belirlenmiştir. Hekzan çiçek özütünün Hep3B hücrelerinin büyümesini 24 saatte 250 µg/mL derişimde, 48 saatte 1000 µg/mL derişimde yaklaşık olarak %50 inhibe ettiği bulunmuştur. HT-29 hücrelerinde ise 62,5 µg/mL derişimde hücre büyümesini yaklaşık olarak %50 inhibe ettiği bulunmuştur. Hekzan çiçek ve yaprak özütlerinin sağlıklı model olan HUVEC hücrelerinin büyümesini farklı derişimlerde anlamlı olarak inhibe ettiği bulunmuştur. Hekzan meyve özütlerinin ise sağlıklı model olan HUVEC hücrelerinin büyümesini 24 saatte 1000 µg/mL derişimde anlamlı olarak inhibe ettiği fakat 48 saatte herhangi bir etki göstermediği bulunmuştur.

DCM meyve, çiçek ve yaprak özütleri Hep3B ve HT-29 hücrelerinin büyümelerine karşı 24 ve 48 saatte farklı derişimlerde anlamlı olarak inhibe ettiği görölmektedir. DCM meyve özütünün Hep3B hücrelerinin büyümesini 1000 µg/mL derişimde, HT-29 hücrelerinin büyümesini ise 250 µg/mL derişimde yaklaşık olarak %50 inhibe ettiği bulunmuştur. DCM çiçek özütünün Hep3B hücrelerinin büyümesini 250 µg/mL derişimde, HT-29 hücrelerinin büyümesini ise 62,5 µg/mL derişimde yaklaşık olarak %50 inhibe ettiği bulunmuştur. DCM meyve, çiçek ve yaprak özütlerinin sağlıklı model olan HUVEC hücrelerinin büyümesini farklı derişimlerde anlamlı olarak inhibe ettiği bulunmuştur.

Sitotoksisite çalışmalarının sonuçlarına bakıldığında; metanol, etilasetat, DCM, hekzan çözücülerine ait meyve, çiçek, yaprak özütlerine ilişkin apolar çözücülere ait meyve, çiçek ve yaprak özütlerinin polar çözücülerdeki özütlere göre Hep3B ve HT-29 hücrelerinin büyümelerini daha fazla inhibe ettiği fakat sağlıklı model olan HUVEC hücrelerini de inhibe ettiği görölmektedir. Metanol meyve, çiçek ve yaprak özütlerinin Hep3B hücrelerinin büyümelerine karşı 48 saatte, HT-29 hücrelerinin büyümelerinde ise 24 ve 48 saatte farklı derişimlerde anlamlı olarak inhibe ettiği görölmektedir. Yapılan diğer antioksidan ve enzim çalışmaları da göz önünde bulundurularak sitotoksik etkiyi gösteren yaban eriği meyve, çiçek ve yapraklarında bulunan aktif bileşen grupları olan flavonoid, antosiyanin, fenolik bileşen, kumarin, karotenoid veya kumarin grubu bileşikler olduğu düşünölebilir.

Kolon kromatografisi yardımıyla bileşen analizi için antioksidan, enzim ve sitotoksisite denemelerinde aktif olan etilasetat meyve, çiçek ve yaprak özütleri ile metanol meyve, çiçek ve yaprak özütleri kullanılmıştır. DPPH ile aktifliği belirlenen ham özütlerden saf bileşene gitmek için kolon kromatografisi yardımıyla içerisindeki bileşen sayısı azaltılarak aktif özütler elde edilmiştir. Elde edilen aktif özütlerin DPPH ile İTK incelemesi sonucunda bileşen aktifliği nitel olarak belirlenmiştir.

Etilasetat meyve, çiçek özütleri ile MeOH meyve ve çiçek özütleri içerisindeki bileşen sayısı 2 yada 3 olarak azaltılarak aktif özütlerdeki bileşenler karışım halinde elde edilmiştir. Nitel olarak belirlenen aktiflik denemesinde MeOH çiçek, etilasetat çiçek ve yaprak özütlerinde sarı renkte, MeOH ve etilasetat meyve özütlerinde ise kırmızı ve beyaz renkte aktif bileşen olduğu görölmüştür. Yapılan çalışmalar göz önünde bulundurularak MeOH çiçek, etilasetat çiçek ve yaprak özütlerinde sarı renkte olan bileşenlerin flavonoid grubu bileşik, MeOH ve etilasetat meyve özütlerinde kırmızı renkte olan bileşenin

antosiyenin grubu bileşik, beyaz renkte olan bileşenin ise kumarin grubu bileşik olduğu düşünülmektedir (Harborne, 1998).

Ham özütlerden saf bileşene gitmek için kolon kromatografisi yardımıyla içerisindeki bileşen sayısı azaltılarak aktif özütler elde edilmiştir fakat her bir bileşeni ayırma-saflaştırma işlemi uzun kolonlar yardımıyla çok fazla miktarlarda çözücü harcanacağından yapılmadığından etken bileşenler için tam ayırım sağlanamamıştır. En etken bileşeni ayırmak ve çalışmalara onun üzerinden devam etmek amacıyla özütü, ham halinden kurtararak klasik kolonda yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Literatüre ilişkin meyve özütlerinde antosiyenin, flavonoid, fenolik bileşen, kumarin, karotenoid; çiçekte ve yaprakta flavonoidler bulunduğu belirtildiğinden bu aktif bileşen gruplarına yönelik etken bileşikler elde etmek amacıyla CombiFlash, HPLC vb.ile saflaştırma çalışmalarına devam edilmesi düşünülmektedir. Ayrıca saf bileşen elde edildiğinde yayına yönelik antioksidan etkinlik, enzim inhibisyon ve sitotoksikite çalışmalarının, bileşen(ler) üzerinde de denenmesi düşünülmektedir (Stefova ve ark.,2001).

Yabancı ülkelerde *Prunus spinosa* L. ile ilgili yapılan çalışmalarda; yaban eriği içerisindeki kimyasal bileşen analizleri yapılarak antosiyeninler, flavanoidler, steroller, terpenler, glikozitler, nitrojen içeriği, uçucu bileşenler, şeker vb., kimyasal bileşenler analiz edilmiştir. Ayrıca yaban eriği meyvelerinin fizikokimyasal özellikleri, bitkinin farmakolojik aktivitesi, biyoaktif bileşenleri, izolasyon ve tanımlamaları, antioksidan aktivitesi, toplam fenolik bileşen içeriği, biyolojik aktivitesi, kozmetik etkinliği incelendiği görülmektedir.

Türkiye’de yaban eriği ile ilgili yapılan çalışmalarda literatüre bakıldığında taze meyvenin yağ içeriği, serbest radikal temizleyici aktivitesi, toplam fenolik bileşen içeriği ve antioksidan özelliği, yaban eriği meyvelerinin kimyasal ve fiziksel özellikleri, vitamin ve organik asit içeriği, yağ asidi ve amino asit bileşenleri, işleme tabi tutulan ve taze formda yaban eriği meyve pürelerinin *Salmonella* spp üzerinde 25°C ve 4°C de farklı zaman aralıklarında antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir.

Yapılan tez çalışması; bilinen enzim aktivite yöntemleri daha önce ülkemizde *Prunus spinosa* L. bitkisine uygulanmadığından ilk kez enzim-aktivite çalışması olması, bitki özütünün ve ayrılacak biyoaktif bileşenlerin sitotoksik etkilerinin insan hepatoma ve kolon kanseri hücreleri ve sağlıklı hücreler üzerinde denenmesi, ve daha sonra yapılacak olan antioksidan, enzim-aktivitesi ve sitotoksik aktivite çalışmalarına da kaynak oluşturacak

olması bakımından önem taşımaktadır. Ayrıca yüksek aktivite gözlenen bileşenlere ulaşıldığı takdirde, sentezlerine yönelik yeni projelerin planlanması açısından da önemlidir.

Günümüzde sentetik ilaçların yan etkilerine bakılarak tıbbi bitkilerinin biyoaktif bileşenlerinin elde edilerek bitkisel ilaca yönelik yapılan çalışmaların çok fazla önemli arzettiği göz önünde bulundurulmalı ve antioksidan denemeleri, enzim-aktivite/inhibisyon ve sitotoksikite denemeleri desteklenmelidir.



KAYNAKLAR

- Albayrak S., Sağdıç O., Aksoy A., 2010. Bitkisel Ürünlerin ve Gıdaların Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 26 (4): 401-409.
- Ames B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M., 1993. Oxidants, Antioxidants, and The Degenerative Diseases of Aging. Proc. Natl. Acad. Sci., 90: 7915-7922.
- Apak R., Güçlü K., Özyürek M., Karademir S. E., 2004. A Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols, Vitamin C and E Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 7970-7981.
- Apak R., Güçlü K., Özyürek M., Karademir S. E., Altun M., 2005. Total Antioxidant Capacity Assay of Human Serum Using Copper (II)-Neocuproine as Chromogenic Oxidant: The CUPRAC method. Free Radical Research, 39: 949-961.
- Apak R., Güçlü K., Demirata B., Özyürek M., Çelik S. E., Bektaşoğlu B., Berker Işıl K., Özyurt D., 2007. Comparative Evaluation Of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied To Phenolic Compounds With The Cuprac Assay (Review) Molecules, 12: 1496-1547.
- Atta-ur-Rahman M., Choudhary I., Thomsen W. J., 2005. Bioassay Techniques for Drug Development. 103, 104, 106-114, 125-133, 136-138 p.
- Balsano C., Alisi A., 2009. Antioxidant Effects of Natural Bioactive Compounds. Current Pharmaceutical Design, 15: 3063-3073.
- Barros, L., Carvalho, A. M., Morais, J. S., Ferreira, I. C. F. R, 2010. Strawberry-tree, Blackthorn and Rose Fruits: Detailed Characterisation In Nutrients and Phytochemicals With Antioxidant Properties. Food Chemistry, 120 (1): 247–254.
- Baytop T., 1999. Türkiye’de Bitkiler İle Tedavi. Nobel Tıp Kitabevleri, 204.
- Benzie I.F.F., Strain J.J., 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power” The FRAP Assay. Anal. Biochem., 239 (1): 70–76.

- Benzie I.F.F., Strain J.J., 1999. Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay: Direct Measure of Total Antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic Acid Concentration. *Methods Enzymol.*, 299: 15– 27.
- Brand-Williams W., Cavalier M. E., Berset C., 1995. Use of Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Food Science and Technology*, 28(1): 25-30.
- Crespo Irizar, A., Fernandez Fernandez, M., Gonzalez, Antonio G., Gutierrez Ravelo, A., 1992. Constituents Of *Prunus spinosa* L. *Journal of Natural Products*, 55: 4450-4.
- Cömert F., 2012. Bazı Şifalı Bitkilerin Ekonomiye Kazandırılması: Şerbetçi otu (*humulus lupulus* L.) Bitkisinin Antioksidan, Sitotoksik, Enzim Aktif Özüt ve Bileşenlerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale, Türkiye.
- Davis PH, 1972. *Flora of Turkey and The East Aegean Islands*. Edinburgh Press University, Edinburgh, UK, 11:31-446.
- Dundar Y, *Fitokimyasallar ve Sağlıklı Yaşam*, 2001. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 2:131-138
- Egea I., Sánchez-Bel P., Romojaro F., Pretel Maria T., 2010. Six Edible Wild Fruits As Potential Antioxidant Additives or Nutritional Supplements. *Plant Foods Hum Nutr*, 65: 121–129.
- Fraternale D., Giamperi L., Bucchini A., Ricci D. , 2009a. Antioxidant Activity Of *Prunus spinosa* L.. Fruit Juice. *Ital. J. Food Sci.*, 21: 337-346.
- Fraternale D., Giamperi L., Bucchini A., Sestili P., Paolillo M., Ricci D., 2009b. *Prunus spinosa* L. Fresh Fruit Juice: Antioxidant Activity In Cell Free and Cellular Systems. *Natural product communications*, 4 (12): 1665-70.
- Gonzalez Gonzalez, A., Gutierrez Ravelo, A., Crespo Irizar, A., Fernandez Fernandez, M., 1991. New Type A Dimeric Proanthocyanidia Obtained From *Prunus spinosa* L. (Rosaceae). *Revista Latinoamericana de Quimica*, 22 (3): 91-3.
- Gonzalez Gonzalez, A., Gutierrez Ravelo, A., Crespo Irizar, A., Fernandez Fernandez, M., 1992. Type A Proanthocyanidins From *Prunus spinosa* L. *Phytochemistry*, 31(4): 1432-4.

- Gonzalez Gonzalez, A., Gutierrez Ravelo, A., Crespo Irizar, A., Palenzuela, J. A., 1994. A-Type Proanthocyanidins From *Prunus spinosa* L, Configurational Studies From CD and NMR Data. Natural Product Letters, 5 (1): 25-31.
- Gökpınar Ş., Koray T., Akçiçek E., Göksan T., Durmaz Y., 2006. Algal Antioksidanlar. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi* 23 - Ek (1/1): 85-89.
- Güçlü K., Altun M., Özyürek M., Karademir S. E., Apak R., 2006. Antioxidant Capacity of Fresh, Sun-and Sulphited-Dried Malatya Apricot (*Prunus armeniaca*) Assayed by CUPRAC, ABTS/ TEAC and Folin Methods. International Journal of Food Science and Technology, 41: 76-85.
- GyanK. Y., Woodell S. R. J., 1987. Nectar Production, Sugar Content, Amino Acids and Potassium in *Prunus spinosa* L. *Crataegus monogyna* Jacq. and *Rubus fruticosus* L. at Wytham, Oxfordshir, Functional Ecology, 1: 251-259.
- Harborne J.B, 1998. Phytochemical Methods, A Guide To Modern Techniques Of Plant Analysis. Third Edition.
- Horhammer L, Endres L, Wagner H, Richthammer F., 2010. Isolation and Identification Of A Flavone dipentoside From The Leaves Of *Prunus spinosa* L. Food Chemistry, 120 (1): 247–254.
- Huang D., Ou B., Prior R.L., 2005. The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays. J. Agric. Food Chem., 53: 1841-1856.
- Humpf H. U.and Schreier P., 1992. 3-Hydroxy-5,6-epoxy- β -ionol β -D-Glucopyranoside and 3-Hydroxy-7,8-dihydro- β -ionol β -D-Glucopyranoside: New C13 Norisoprenoid Glucoconjugates from Sloe Tree (*Prunus spinosa* L.) Leaves. J. Agrlc. Food Chem., 40: 1898-1901.
- Ikawa M., Schaper T. D., Dollord C. A., Sosner J. J., 2003. Utilization of Folin- Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51 (7): 1811-1815.
- Jablonska-Rys, E., Zalewska-Korona, M., Kalbarczyk, J., 2009. Antioxidant Capacity, Ascorbic acid and Phenolics Content In Wild Edible Fruits. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 17 (2): 115-120.

- Kahkönen M. P., Hopia A. I., Vuorela H. J., Rauha J. P., Pihlaja K., Kujala T.S., Heinonen M., 1999. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 3954-3962.
- Kaur C., Kapoor H. C., 2001. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of some Asian Vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, 37 (2): 153-161.
- Kumarasamy Y., Cox P.J., Jaspars M., Nahar L., Sarker, S.D., 2004. Comparative Studies On Biological Activities Of *Prunus padus* and *P. Spinosa L.* *Fitoterapia*, 75: 77–80.
- Lopez-Alarcon C. ve Lissi E., 2005. Interaction of Pyrogallol Red with Peroxyl Radicals. A Basis for a Simple Methodology for The Evaluation of Antioxidant Capabilities. *Free Radical Research*, 39 (7): 729-736.
- MacDonald-Wicks L.K., Wood L.G., Garg M.L., 2006. Methodology for the Determination of Biological Antioxidant Capacity in vitro: a review, *J. Sci. Food Agric.*, 86: 2046–2056.
- Makarov V. A., Shinkarenko A. L., 1968. Flavonols of *Prunus spinosa*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 4 (6): 380.
- Makarov V. A., 1968. Flavonoids of *Prunus spinosa*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 4 (4): 248.
- Makarov V. A., Shinkarenko A. L., Litvinenko V. I., Kovalev I. P., 1969. Flavonoid Diglycosides of *Prunus spinosa*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 5 (5): 345-348.
- Makarov V. A., Litvinenko V. I., 1970. *Prunus spinosa* Flavonoids. *Aktual'nye Voprosy Farmatsii*, 200-201.
- Makarov V. A., 1970. Spasmolytic and Antitonic Action of *Prunus spinosa* Flavonoids. *Aktual'nye Voprosy Farmatsii*, 188-190.
- Makarov, V. A., 1972. Chemical and Pharmacological Study Of *Prunus spinosa L.* Flavonoids. *Rastitel'nye Resursy*, 8 (1): 42-9.
- Mariana N. Ștefanut, Adina Cata, Raluca Pop, Cristina Moșoarca, Alina D. Zamfir, 2011. Anthocyanins HPLC-DAD and MS Characterization, Total Phenolics, and Antioxidant Activity Of Some Berries Extracts, *Analytical Letters*, 44, 2843–2855.

- McGahon A. J., Martin S. J., Bissonnette R. P., Mahbaubi A., Shi Y., Mogil R. J., Nishioka W. K., Green D.R., 1995. The End of the (cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis in vitro. In *Methods in Cell Biology, Cell Death*, Schwartz LM, Osborne BA (eds.), Academic Press, San Diego. 46: 150-181.
- Miller N.J., Rice-Evans C.A., Davies M.J., Gopinathan V., Milner A., 1993. A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and Its Application to Monitoring The Antioxidant Status in Premature Neonates. *Clin. Sci.*, 84: 407-412.
- Molyneux P., 2004. The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Journal of Science and Technology*, 26 (2): 211-219.
- Nagai T., Myoda T., Nagashima T., 2005. Antioxidative Activities of Water Extract and Ethanol Extract from Field Horsetail (tsukushi) *Equisetum Arvense*. *Food Chemistry*, 91: 389-394.
- Olszewska, M., Wolbis, M., 2000. Phenolic acids In Flowers and Leaves Of *Prunus spinosa* L. *Herba Polonica*, 46 (4): 249-254.
- Olszewska M., Glowacki R., Wolbis M., Bald E., 2001. Quantitative Determination Of Flavonoids In The Flowers and Leaves Of *Prunus spinosa* L. *Acta Poloniase Pharmaceutica-Drug Research*, 58 (3): 199-203.
- Olszewska, M., Wolbis, M., 2002a. Flavonoids From The Flowers Of *Prunus spinosa* L.. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 58 (5): 367-372.
- Olszewska M., Wolbis M., 2002b. Further Flavonoids from the Flowers of *Prunus spinosa* L. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 59 (2), 133-137.
- Olszewska M., Wolbis M., 2002c. Flavonoids from the Leaves of *Prunus spinosa* L. *Polish Journal of Chemistry*, 76 (7), 967-974.
- Önder F.C., Ay M., Sarker S.D., 2013. *J. Agric. Food Chem.* 61: 10498–10506.
- Özcan T., Bayçu G., 2008. Fatty acid and amino acid profiles in the fruits of *Prunus spinosa* L. subsp. *dasyphylla* (Schur) Domin from Europe-in Turkey. *Advances in Molecular Biology* (1): 39-46.

- Pellegrini N., Re R., Yang M., Rice-evans C., 1999. Screening of Dietary Carotenoids and Carotenoid-Rich Fruit Extracts for Antioxidant Activities Applying 2,2' azinobis(3-ethylene benzothiazoline-6-sulfonic Acid Radical Cation Decolorization Assay. *Methods Enzymol.*, 299: 379-389.
- Price J.A., Sanny C.G., Shevlin D., 2006. Application of Manual Assessment of Oxygen Radical Absorbent Capacity (ORAC) for Use in High Throughput Assay of “Total” Antioxidant, Activity of Drugs and Natural Products, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 54: 56 – 61.
- Prior R. L., Cao G., 1999. In vivo Total Antioxidant Capacity: Comparison of Different Analytical Methods, *Free Radical Bio. Med.*, 27: 1173–1181.
- Re R., Pellegrini N., Protrggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C., 1999. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology and Madicine*, 26: 1231-1237.
- Rice-Evans C. A., Miller N. J., 1984. Total Antioxidant Status in Plasma and Body Fluids. *Methods in Enzymology*, 234: 279-293.
- Sakar, M. K., Engelshowe, R., Tamer, A. U., 1992. Isolation and Antimicrobial Activity Of Flavonoids From *Prunus spinosa* L. Flowers. *Hacettepe Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi*, 12 (2): 59-63
- Sakar, M. K., Kolodziej, H., 1993. Flavonoid Glycosides From The Flowers Of *Prunus spinosa* L. *Fitoterapia*, 64 (2): 180-1.
- Satooka H., Kubo I., 2011. Effects of Thymol on Mushroom Tyrosinase-Catalyzed Melanin Formation. *J. Agric. Food Chem.*, 59: 8913.
- Scinto L. F., Daffner K. R., 2000. Early Diagnosis of Alzheimer’s Disease. *Humana pres.* 1-31 p.
- Shoeb M., Macmanus S.M., Kong-Thoo-Lin P., Celik S., Jaspars M., Nahar L., Sarker S.D., 2007. Bioactivity of The Extracts and Isolation of Lignans and a Sesquiterpene from The Aerial Parts of *Centaurea pamphylica* (Asteraceae). *Daru* 15 (3): 119.
- Singleton V. L., Rossi J.L., 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 16: 144-158.

- Somogyi A., Rosta K., Pusztai P., Tulassay Z., Nagy G., 2007. Antioxidant Measurements. *Physiol. Meas.*, 28: 41–55.
- Stefova M., Kulevanova S. & Stafilov T., 2001. Assay of Flavonols and Quantification of Quercetin in Medicinal Plants by HPLC with UV-DIODE Array Detection. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 24 (15): 2283–2292.
- Tamas, M., 1985. Study Of Flavones In *Prunus spinosa* L. Flowers. *Farmacia* (Bucharest, Romania), 33 (3):181-6.
- Tamburic, S. 2006. Effects Of Polymer Entrapment Of *Prunus spinosa* Fruit Extract On Its Cosmetic Efficacy. *Journal of Applied Cosmetology*, 24 (2). pp. 63-76.
- Turker, G., Kızılkaya, B., Çevik, N., Gönüz A., 2012. Free Radical Scavenging Activity and Phenolic Content Of Edible Wild Fruits From Kazdagi (Ida Mountains). Turkey, *Journal of Medicinal Plants Research*, 6 (36): 4989-4994.
- Velioğlu Y. S., Mazza G., Gao L., Oomah B. D., 1998. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *J. of Agr. Food Chem.*, 46: 4113–4117.
- Vinson J., Zubik L., Bose P., Sammon N., Proch J. 2005. Dried fruits: Excellent in vitro and in vivo Antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*, 24 (1): 44-50.
- Yamada Y., Azuma K., 1977. Evaluation of the in vitro Antifungal Activity of Allicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, April, 743-749.
- Wolbis, M., Olszewska, M., Wesolowski, W. J., 2001. Triterpenes And Sterols In The Flowers and Leaves Of *Prunus spinosa* L. (Rosaceae). *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 58 (6): 459-462.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : MERVE KURT

Doğum Yeri : Edremit

Doğum Tarihi : 05/03/1989



EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Marmara Üniversitesi, Atatürk Eğitim Fakültesi, Kimya Öğretmenliği (2007-2012).

Yüksek Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya A.B.D. Organik Kimya B. D. (2012- DEVAM EDİYOR).

Yüksek Lisans Tez Konusu: Yaban Eriği (*Prunus spinosa* L.) Bitkisinin Antioksidan, Sitotoksik, Enzim Aktif Özüt ve Bileşenlerinin Belirlenmesi

Yüksek lisans tez çalışması ÇOMÜ BAP FYL 2014-212 numaralı proje ile desteklenmektedir.

Yabancı Dil: İngilizce

Alınan Sertifikalar

- 1. Ulusal Kromatografi Uygulamalı Yaz Okulu Eğitim Sertifikası, 24-27 Eylül 2013, Çanakkale.
- Certificate of Attendance, English C1, Amerikan Kültür Derneği Dil Okulları, 29 Haziran 2013

Alınan ödüller

- Marmara Üniversitesi, 2012, Kimya Öğretmenliği A.B.D. 1. si

Staj Deneyimi

- İstanbul Atatürk Fen Lisesi, 2012.
- Mustafa Saffet Anadolu Lisesi, İstanbul, 2012.

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

Uluslararası kongre, sempozyum, panel gibi bilimsel toplantılarda sunularak, programda yer alan özet metin olarak yayınlanan bildiri ya da poster veya gösteri

- Gülден Yetiş, Ayhan Çelik, Mehmet Ay, Tuğba Güngör, Ferah Cömert Önder, Melek Tercan

Yavaşoğlu, **Merve Kurt**, NITROREDUCTASE BASED PRO-DRUG

ACTIVATION, 44th IUPAC World Chemistry Congress, P1280, 11-16 August 2013, ISTANBUL-TURKIYE

- Gülden Yetiş, Ayhan elik, Mehmet Ay, Tuğba Güngör, Ferah Cömert nder, Melek Tercan Yavaşoğlu, **Merve Kurt**, A NOVEL Ssap-NtrB/PRO-DRUG COMBINATION FOR CANCER THERAPY, 44th IUPAC World Chemistry Congress, P1281, 11-16 August 2013, ISTANBUL-TURKIYE
- Mehmet Ay, **Merve Kurt**, INVESTIGATION OF ENZYME ACTIVITY/INHIBITION OF *PRUNUS SPINOSA L.* EXTRACTS, ISOPS -11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, P104, 9-12 June 2015, ANKARA- TURKEY.

Ulusal kongre, sempozyum, panel gibi bilimsel toplantılarda sunularak, programda yer alan zet metin olarak yayınlanan bildiri ya da poster veya gösteri

- Mehmet Ay, **Merve Kurt**, Türkiye İlaç Piyasa Araştırması, 1. İlaç Kimyası retimi, Teknolojisi, Standardizasyonu Kongresi, 29-31 Mart, 2013, Antalya, P128.
- Mehmet Ay, **Merve Kurt**, Yaban Eriği (*Prunus spinosa L.*) Meyvesi ztlerinin Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi, 2. İlaç Kimyası retimi, Teknolojisi, Standardizasyonu Kongresi, 21-23 Mart, 2014, Antalya, P501.
- **Merve Kurt**, Mehmet Ay, Esra Tokay, Feray Tura Kkar, *Prunus spinosa l.* Bitkisi (meyve, iek, yaprak) ztlerinin Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi, Gıda ve Doğal rnler - 4. Oturum (28 Ağustos 2015), 27. Ulusal Kimya Kongresi, 23-28 Ağustos,2015, Çanakkale.

Katıldığı alıştaylar

- Kimya Lisans (Kimyagerlik, Kimya ğretmenliği ve Kimya Mühendisliği) Araştırma Projesi Eğitimi alıştayı, KİMYA-2 (alıştay 2011) 20.07 -28.07.2011 (Çanakkale) TÜBİTAK-BİDEB.

İLETİşİM

Tel: 0543 420 01 42

e-posta adresi: merveonmez_20@hotmail.com





Investigation of Enzyme Activity/Inhibition of *Prunus spinosa* L. Extracts



Mehmet Ay^a, Merve Kurt^a

mehmetay06@comu.edu.tr



^a Çanakkale Onsekiz Mart University, Faculty of Sciences and Arts, Department of Chemistry, Natural Products and Drug Research Laboratory, Çanakkale, Turkey

INTRODUCTION

Nowadays, many medicinal raw materials are obtained from plants which have biological activities such as antimicrobial, antiviral, antioxidant, anti-tumor. Plant extracts are a useful resource for many important therapeutic drugs derived from natural products. *Prunus spinosa* L. comprises important components that are major in terms of human health and having anticancer, antioxidants, antimicrobial properties of phytochemicals such as anthocyanins, glycosides, flavonoids, coumarins and phenolic compounds [1,2].

MATERIALS AND METHODS

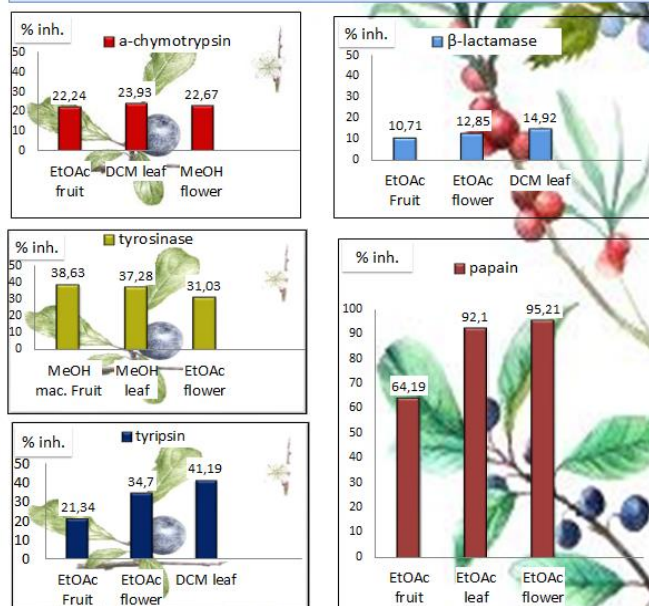
For this purpose, hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol extracts of the fruit, leaves and flower parts of *Prunus spinosa* L. were checked for enzyme-activity/inhibition studies with proteases (α -Chymotrypsin, trypsin, papain and carboxypeptidase A), tyrosinase, β -lactamase enzymes have been carried out successfully. 10 mg/mL and 1 mg/mL solutions of fruit, leaf and flower extracts of plant of have been used for performing enzyme inhibition assays [3]. The inhibition studies of the extracts have been carried out at 25 °C with tyrosinase and β -lactamase, at 37 °C with α -chymotrypsin, trypsin and papain enzymes for 10 minutes, respectively. The absorbances were measured at 410 nm for each one and at 254 nm for carboxypeptidase A. The absorbances of tyrosinase and β -lactamase studies were measured at 475 and 495 nm with a microplate reader, respectively. The graphs have been obtained against the PMSF (Phenyl methane sulphonyl fluor) inhibitor.

RESULTS AND DISCUSSION

When examined the result of inhibition of tyrosinase enzyme and proteases enzyme (including papain, α -chymotrypsin and trypsin); while the concentration of extracts were increasing, inhibition values in general seemed to be increasing in extracts of fruit, leaf and flower. Although, while the concentration of extracts were increasing for β -lactamase enzyme; the inhibition values in general seemed to be increasing for concentration of 10 μ L/10 mg/mL but inhibition values in general seemed to be decreasing for concentration of 50 μ L/10 mg/mL in extracts of fruit, leaf and flower.

EtOAc fruit, DCM leaf and MeOH flower of extracts have the high values of % inhibition than the other extracts for α -Chymotrypsin enzyme, fruit, leaf, flower of EtOAc extracts have the high values of % inhibition than the other extracts for papain enzyme, MeOH maceration fruit, MeOH leaf, EtOAc flower extracts have the high values of % inhibition than the other extracts for tyrosinase enzyme, EtOAc fruit, EtOAc flower and DCM leaf of extracts have the high values of % inhibition than the other extracts for trypsin and β -lactamase enzymes, respectively.

Table 1. The % inhibition values of extracts for different enzymes



CONCLUSIONS

The ethyl acetate extracts may be used potential papain enzyme inhibitors.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank ÇOMÜ BAP (FYL 2014/212) for financial support and GTE (Ayhan Çelik) for contributions during enzyme studies.

REFERENCES

1. Onder F.C., Ay M., Sarker S.D., J. Agric. Food Chem. 2013, 61, 10498–10506.
2. Olszewska M., Wolbis M., 2002, Polish Journal of Chemistry, 76(7), 967-974.
3. Atta-ur-Rahman M., Choudhary I., Thomsen W. J., 2005. Bioassay Techniques for Drug Development, 103, 104, 106-114, 125-133, 136-138 p.

Yaban Eriği (*Prunus spinosa* L.) Meyvesi Özütlerinin Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi



Mehmet Ay^a, Merve Kurt^a

mehmetay06@comu.edu.tr



^aÇanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Doğal Ürünler ve İlaç Araştırma Laboratuvarı, 17020, Çanakkale

Giriş

Prunus spinosa L. bitkisi insan sağlığı açısından önemli antioksidan, antikanser ve antimikrobiyal özellikler taşıyan bileşenleri (antosiyaniinler, glikozitler, flavanoidler, fenolik bileşikler vb.) içermektedir^[1]. *Prunus spinosa* L. meyvesinde antosiyaniin, tannin, fenolik bileşen, organik asit, karotenoid, flavanoid, vitamin, yağ asitleri, aminoasit, uçucu bileşen, doğal boyar madde, pektin ve şeker gibi kimyasal bileşenler bulunmaktadır^[2,3,4,5,6,7,8]. Bu çalışmada *Prunus spinosa* L. meyvesinin hekzan, diklorometan, etil asetat ve metanol özütlerinin DPPH ve CUPRAC yöntemleri ile antioksidan aktiviteleri, F-C reaktifi ile toplam fenolik bileşen içeriği belirlenmiştir^[9-11].

Materyal ve yöntem

Çanakkale/Ayvacak ilçesinden toplanan bitki tanımlanmış, meyvesi kurutulup öğütüldükten sonra Soxhlet düzeneğinde sırasıyla hekzan, diklorometan, etilasetat ve metanol ile özütlenmiştir. Deriştilen özütlerden hazırlanan depo çözeltilerden (10 mg/mL) yapılan seri seyreltmeler (1 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,01 mg/mL, 0,001 mg/mL, 0,0001 mg/mL) için DPPH ve CUPRAC yöntemleri ile antioksidan aktivitesi incelenmiş ve F-C reaktifi ile de toplam fenolik bileşen içerikleri bulunmuştur.

Toplam Fenolik Bileşen Miktar Tayini

Toplam fenolik bileşen miktarı tayininde seri seyreltme ile elde edilen 1 mg/mL derişimdeki çözeltilerden deneme tüplerine 100 µL örnek ve 10 kat saf su ile seyreltilmiş 0,75 mL F-C reaktifinden eklenerek karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığında 5 dakika bekletilerek 0,75 mL Na₂CO₃ (a/h)'ın % 6'lık çözeltisi eklenip karıştırıldı. Oda sıcaklığında 90 dakika bekledikten sonra soğurmalar UV'de 725 nm'de okundu. Standart olarak ferulik asit çözeltisi (0,001–0,005 mg/mL) kullanıldı.

DPPH Üzerinden Serbest Radikal Süpürücü Etkinlik Tayini

DPPH ile radikal süpürücü etkinlik tayini; seri seyreltme ile elde edilen (1 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,01 mg/mL, 0,001 mg/mL, 0,0001 mg/mL) derişimdeki çözeltilerden 1'er mL tüplere alınarak üzerine DPPH (8 mg/100 mL)'ın metanoldeki çözeltisinden 1'er mL ilave edildi. Örnekler 30 dakika bekletilip 517 nm'de soğurmaları okundu. Soğurmaların % inhibisyonları hesaplanıp derişime karşı grafiğe geçirildi. % 50 Inhibisyona yakın olan aktif derişimden (1mg/mL) 100-900 µL arasındaki tüm hacimler alınarak metanol ile 1 mL'ye tamamlandı. Her bir çözeltilen 500 µL alınarak, 500 µL DPPH (8 mg/100 mL)'ın metanoldeki çözeltisinden eklendi. 30 dakika sonra 517 nm'de okunan soğurmaların % inhibisyonları hesaplanıp derişime karşı grafiğe geçirildi. Standart olarak kersetin kullanıldı.

CUPRAC (Bakır İndirgeme Yöntemi)

Bakır(II) indirgeyici antioksidan kapasite tayininde 10⁻² M CuCl₂, 7,5x10⁻³ M neokuproin çözeltileri ve amonyum asetat tamponundan (pH=7) 1'er mL alındı. Belirlenen etkin derişimden (0,1 mg/mL) 100-900 µL arasındaki tüm hacimler alınarak üzerine son hacim 4,1 mL olacak şekilde, x mL özüt çözeltisi ve (1-x) mL su ilave edilip iyice karıştırıldı. Tüpler oda sıcaklığında ağzı kapalı olarak 30 dakika bekletilip 450 nm'de soğurmalar okundu. Standart olarak kersetin kullanıldı.

Bulgular

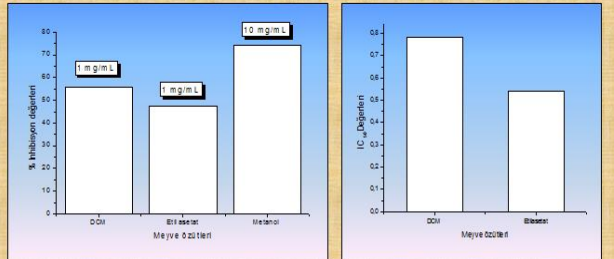
DPPH analizi sonucunda diklorometan, etilasetat ve metanol meyve özütlerinde antioksidan aktivite bulunmuştur. DPPH analizi ile % 50 inhibisyona yakın olan etkin derişimler; 1 mg/mL çözeltide DCM meyve (% 55,63) ve etilasetat meyve (% 47,34) özütleri, 10 mg/mL'de metanol meyve özütü (% 74,42) dir. IC₅₀ değeri artıkaça antioksidan etkisi azalacağından etil asetat meyve özütünün 1 mg/ mL çözeltisinde antioksidan etkisi metanol ve DCM meyve özütlerine göre daha yüksek bulunmuştur. En etkin özüt olarak, DPPH analizinde etil asetat (1mg/mL) (DPPH-IC₅₀= 0,54 ± 0,188 mg /mL), CUPRAC analizinde etil asetat (0,1 mg/mL) (QREFC(Kersetin eşdeğeri flavonoid derişimi) = 0,3629) özütü bulunmuştur. Ayrıca toplam fenolik bileşen miktarı en yüksek metanol (1mg/mL) (19 mg ferulik asit/100 g özüt) özütünde belirlenmiştir.

Çizelge 1. Farklı çözücülerdeki meyve özütlerinin antioksidan etkinliğe ait DPPH ve CUPRAC sonuçları

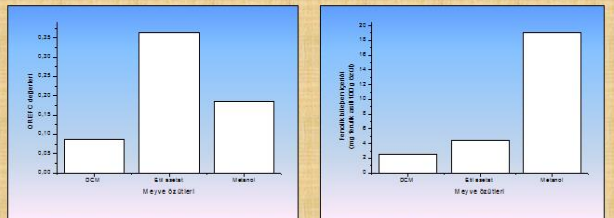
Meyve özütleri	Derişim (mg/mL)	DPPH			CUPRAC	
		Absorbans değerleri	% inhibisyon değerleri	IC ₅₀ değerleri (mg/mL)	Derişim (mg/mL)	QREFC değerleri
DCM	1	0,4486	55,63	0,784±0,088	0,1	0,086
Etil asetat	1	0,4940	47,34	0,54±0,1882	0,1	0,3629
Metanol	10	0,2452	74,42	-	0,1	0,1845

Çizelge 2. Farklı çözücülerdeki meyve özütlerinin fenolik bileşen miktarı tayini sonuçları

Meyve özütleri	Derişim (mg/ mL)	Absorbans	Fenolik bileşen içeriği (mg ferulik asit/100 g özüt)
DCM	1	1,180	2,5
Etil asetat	1	1,082	4,5
Metanol	1	0,5718	19



Şekil 1. Farklı çözücülerdeki meyve özütlerinin DPPH ile % inhibisyon değerleri ve IC₅₀ değerleri



Şekil 2. Farklı çözücülere ait meyve özütlerinin CUPRAC ile QREFC değerleri ve fenolik bileşen miktarları

Desteklerinden dolayı (ÇOMÜ BAP 2013/212) ÇOMÜ'ne teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Emale D. F., Giampieri L., Bucchini A., Ricci D., 2009, *Ital. J. Food Sci.*, 21, 337-346.
- Casado-Redin I., Fernandez M., Vega F. A., 1992, 16(PT 2), 108-111.
- Egea I., Sánchez-Bel P., Romojaro F., Pretel M. T., 2010, *Plant Foods Hum Nutr.*, 65, 121-129.
- Özcan T., 2008, *IUFS J Biol, Istanbul University*, 67(2): 105-114.
- Özcan T., Baycu G., 2008, *Advances in Molecular Biology, Istanbul University*, (1): 39-45.
- Chai Q., Wu B., Liu W., Wang L., Yang C., Wang Y., Fang J., Liu Y., Li S., 2012, *Food Chemistry*, 130, 432-440.
- Ferency S., Kerenyi Z., Donko E., Ery G., 1978, *Hung. Teljes, HU 14695 A2 19780328*,
- Rosa J., Wojcik B., 1961, *Przemysl Spozyczny*, 15, 48-9.
- Önder F. C., Ay M., Sarker S. D., *J. Agric. Food Chem* 2013, 61, 10498-10506.
- Velloğlu Y. S., Mazza G., Gao L., Oomah B. D., 1998, *J. Agric. Food Chem.* 46: 4113-4117.
- Apak R., Güçlü K., Demirtaş B., Özyürek M., Çelik S. E., Bektaşoğlu B., K. Berker I., Özyurt D., 2007, *Molecules*, 12, 1496-1547.

(S-GI013)**PRUNUS SPINOSA L. BİTKİSİ (MEYVE, ÇİÇEK, YAPRAK) ÖZÜTLERİNİN
SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ****MERVE KURT¹, MEHMET AY¹, ESRA TOKAY², FERAY KÖÇKAR²**¹ ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ² BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ

mervesonmez_20@hotmail.com

Prunus spinosa L. bitkisi antosiyaninler, glikozitler, flavanoidler, fenolik bileşikler ve antioksidanlar gibi birçok fitokimyasallar bakımından zengin olmasıyla insan sağlığı açısından önemli antioksidan, antikanser, antimikrobiyal özellikler taşıyan bileşenleri içermektedir. *Prunus spinosa* L. bitkisi (meyve, çiçek, yaprak) özütlerinin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi kapsamında; bitki örneklerinin doku kültüründe kanserli ve sağlıklı hücre hatlarında sitotoksik etkilerinin araştırılması ve antikanser aktivitelerinin belirlenmesi hedeflenmiştir[1,2].

Hekzan, diklorometan, etilasetat ve metanol çözücülerine ait meyve çiçek ve yaprak özütleri ile maserasyon meyve özütü olmak üzere 13 farklı özüt HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell line) ve Hep3B hücre hatlarına uygulanarak sitotoksik etkileri incelenmiştir. Bunun için her bir özüt için 0,1 g tartılarak 2 mL DMSO ilave edilmiştir. Her bir özüt için sırasıyla; 50 mg/mL 25 mg/mL 12,5 mg/mL 6,25 mg/mL, 125 mg/ mL olmak üzere beş farklı derişimde çözeltiler elde edilmiştir. 200 µL lik kuyucuklardaki derişimin sırasıyla; 1 mg/ mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/ mL, 0,0625 mg/ mL olacak şekilde uygulamalar yapılmıştır. Kontrol grubu olarak %2 DMSO kuyucuklara uygulanmıştır. MTT çözeltisi uygulanarak hücrelerin 550 nm dalga boyunda soğurma değerleri ölçülmüş, verilerin grafiksel ve minitab programı ile istatistiksel analizi yapılmıştır [3].

Sonuç olarak, meyve çiçek ve yaprak hekzan, diklorometan, etilasetat ve metanol özütleri ile maserasyon meyve özütünün HUVEC hücre hattı için sağlıklı hücrelerde toksik özellik göstermediği, Hep3B hücre hattı için, kanserli hücrelerde 24 ve 48 saat inkübasyon sürelerinden sonra MeOH çiçek özütünün 0.25 mg/ mL derişimde; MeOH meyve ve yaprak ile etilasetat çiçek, meyve, yaprak özütlerinde ise 1 mg/mL derişimde inhibitör etkileri olduğu ve antiproliferasyon etki gösterdikleri belirlenmiştir.

Bu çalışma ÇOMÜ BAP FYL 2014-212 numaralı proje ile desteklenmektedir.

Anahtar Kelimeler : *Prunus Spinosa* L., Özüt, Sitotoksik Etki**Kaynakça**

- [1] M. K. Sakar; R. Engelshowe and A. U. Tamer, *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, **12(2)**, , (1992), 59-63.
- [2] Y. Kumarasamy , P.J. Cox , M. Jaspars , L. Nahar and S.D. Sarker, *Fitoterapia* ,**75**, (2004), 77–80.
- [3] Y. Yamada and K. Azuma, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (1977), 743-749.