



T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



***PALIURUS SPINA-CHRISTI* MILL. BİTKİSİNİN  
KALİTE KONTROL VE BİYOLOJİK AKTİVİTE  
AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Melis KASAP

Farmakognozi Anabilim Dalı

İzmir  
2024

T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

***PALIURUS SPINA-CHRISTI* MILL. BİTKİSİNİN  
KALİTE KONTROL VE BİYOLOJİK AKTİVİTE  
AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Melis KASAP

Danışman  
Prof. Dr. Nehir SOMER

Farmakognozi Anabilim Dalı  
Farmakognozi Tezli Yüksek Lisans Programı

İzmir  
2024

## Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

**Başkan** : Prof. Dr. Nehir SOMER

(Danışman)

**Üye** : Prof. Dr. Gülen İrem KAYA

**Üye** : Prof. Dr. Tuba Gönenc

Yüksek Lisans Tezinin Kabul Edildiği Tarih: 26.01.2024

## Önsöz

Marmara Üniversitesi Kimya Mühendisliği bölümünde öğrenciyken tıbbi ve aromatik bitkilere duyduğum ilgiyi fark ettim ve mezuniyetimin ardından bu ilginin peşinden gitmeye karar verdim. Bitkileri tanımayı ve onlardan nasıl faydalanabileceğimi bilimsel olarak öğrenmek istediğim için şehir değişikliği yaparak lisansüstü eğitim sürecime 2019 yılında, Ege Üniversitesi Farmakognozi Tezli Yüksek Lisans Programı'nda başladım. Pandemi sebebiyle kısa süreli ara vermek durumunda kalmış olsam da koşullar iyileşince çalışmalara kaldığım yerden devam ettim.

Tez danışman hocam sayın Prof. Dr. Nehir SOMER ile tez konusunu belirlerken az ele alınmış bitkilere yönelmeye özen gösterdik ve ön araştırmalarımız sonucunda *Paliurus spina-christi* Mill. bitkisi üzerinde çalışma yapmaya karar verdik. Eğitimimle birlikte aynı zamanda çalışma hayatımı da yürüttüğüm için bu süreç boyunca özellikle zaman yönetimini iyi yapmanın, planlı ilerlemenin ve olumsuzluklarla karşılaşıldığı durumlarda yılmadan devam edebilmenin önemini daha iyi kavradım. Deney çalışmalarının bitmesiyle birlikte “*Paliurus spina-christi* Mill. Bitkisinin Kalite Kontrol ve Biyolojik Aktivite Açısından Değerlendirilmesi” isimli çalışmamızla literatüre katkı sunmaktan mutluluk duyuyorum. Göz açıp kapayınca kadar geçen lisansüstü eğitiminin bana kattığı bilgi ve tecrübe ile öğrenme yolculuğuma devam edeceğim.

İzmir, 15.01.2024

Melis KASAP

## Özet

### *Paliurus spina-christi* Mill. Bitkisinin Kalite Kontrol ve Biyolojik Aktivite

#### Açısından Değerlendirilmesi

Rhamnaceae familyasına ait olan *Paliurus spina-christi* Mill. bitkisi ülkemizde “kara çalı, çalı diken, çaltı diken ve çeşmezen” gibi farklı isimlerle bilinmektedir. Halk tıbbında böbrek taşı, diyabet, romatizma gibi çeşitli rahatsızlıklarda kullanılmaktadır. Meyve ve çiçekli dönemlerde toplanan yaprak ve meyve drogları üzerinde “*Türk Farmakopesi*”ne uygun şekilde kalite kontrol çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar % değeriyle verilmiştir. Türk ve başka ülkelerin farmakopelerinde bitkiye ait monograf bulunmaması sebebiyle ileride hazırlanabilecek monograflara spesifikasyon sağlaması amaçlanmıştır.

Literatür araştırması sonucunda bitkiye ait kısımlarda flavonoidler, tanenler, fenolik asitler, flavonoid glikozitleri, yağ asitleri, alkaloidler, steroller, amino asitler, şeker bileşikleri ve mineraller içerdiği tespit edilmiştir. Flavonoidlerin de dahil olduğu fenolik bileşiklerden bazıları karaçalı bitkisinde majör olarak bulunmaktadır. Çalışma kapsamında metanol ile hazırlanan ekstraktlarda kantitatif yöntemler kullanılarak total fenol miktar tayini ve total flavonoid miktar tayini yapılmıştır. Ayrıca HPLC-DAD yöntemi kullanılarak rutin miktar tayini ve apigenin tespiti yapılmıştır.

Kolinesteraz enzimlerinin inhibisyonu Alzheimer hastalığında önemli bir tedavi yöntemi olduğu için tez çalışmamızda bitkinin metanol ekstraktlarının asetilkolinesteraz ve bütirikolinesteraz enzim inhibitör aktiviteleri incelenmiştir. Ayrıca ekstraktların antioksidan kapasitesi; hidrojen peroksitle indüklenmiş oksidatif stres modelinde hücre canlılığı ve antioksidan enzim aktivitesi açısından incelenmiştir.

**Anahtar Kelimeler;** *Paliurus spina-christi*; Kalite Kontrol; Biyolojik Aktivite; Kolinesteraz İnhibisyon

## Abstract

### **Evaluation of *Paliurus spina-christi* Mill. in terms of Quality Control and Biological Activity**

*Paliurus spina-christi* Mill., a member of the Rhamnaceae family, is known in Turkey by various names, such as "kara çalı, çalı diken, çaltı diken and çeşmezen." It is used in traditional medicine for various ailments, such as kidney stones, diabetes, and rheumatism. Quality control studies were carried out on the fruit and leaf drugs in accordance with the Turkish Pharmacopoeia. The results obtained are given as percentages. It is aimed to provide specifications for monographs that can be prepared in the future, as there is no monograph for the plant in the pharmacopoeias of Turkey and other countries.

As a result of the literature research, it was determined that the parts of the plant contain flavonoids, tannins, phenolic acids, flavonoid glycosides, fatty acids, alkaloids, sterols, amino acids, sugar compounds, and minerals. Some of the phenolic compounds, including flavonoids, are major in the karaçalı plant. Within the scope of the study, total phenol content determination and total flavonoid content determination were performed on the extracts prepared with methanol using quantitative methods. In addition, routine amount determination and apigenin diagnosis were performed using the HPLC-DAD method.

Inhibition of cholinesterase enzymes is an important treatment method in Alzheimer's disease, in our thesis study, the acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzyme inhibitory activity of the plant's methanol extracts was investigated. In addition, the antioxidant capacity of the extracts was investigated in terms of cell viability and antioxidant enzyme activity in a hydrogen peroxide-induced oxidative stress model.

**Keywords;** *Paliurus spina-christi*; Quality Control; Biological Activity; Cholinesterase Inhibition

## İçindekiler

Önsöz .....	II
Özet.....	III
Abstract.....	IV
İçindekiler .....	V
Tablolar Dizini.....	IX
Şekiller Dizini .....	XI
Grafikler Dizini .....	XII
Kısaltma Listesi .....	XIII
Giriş .....	1
Genel Bilgiler .....	3
2.1. <i>Paliurus spina-christi</i> Mill. Bitkisinin Genel Özellikleri .....	3
2.2. Kimyasal Bileşim .....	3
2.2.1. Fenolik Bileşikler .....	3
2.2.2. Diğer Bileşikler .....	6
2.3. Oksidatif Stres .....	8
2.4. Alzheimer Hastalığı.....	11
2.4.1. Asetilkolinesteraz ve Bütirikolinesteraz Enzim İnhibisyonu .....	12
2.5. Biyolojik Aktiviteler .....	13
2.5.1. Antioksidan Aktivite .....	13
2.5.2. Asetilkolinesteraz ve Bütirikolinesteraz Enzim İnhibisyonu .....	15
2.5.3. Diğer Aktiviteler .....	16
2.6. Miktar Tayini Çalışmaları .....	18
Gereç ve Yöntem .....	32
3.1. Kullanılan Kimyasalların Listesi .....	32
3.2. Kullanılan Gereçler.....	33
3.3. Bitkisel Materyalin Toplanması ve Hazırlanması.....	34
3.4. Kalite Kontrol Çalışmaları.....	37
3.4.1. Farmakope Analizleri .....	37
3.4.1.1. Kurutmada Kayıp Miktar Tayini.....	37
3.4.1.2. Bütün Kül Miktar Tayini .....	38
3.4.1.3. Sülfat Külü Miktar Tayini.....	38
3.4.1.4. Hidroklorik Asit (HCl)'de Çözünmeyen Kül Miktar Tayini .....	39

3.4.2. Ekstre Hazırlama .....	40
3.5. Total Fenol Miktar Tayini.....	41
3.5.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması .....	41
3.5.2. Gallik Asit Standart Eğri Grafiği Hazırlama.....	41
3.5.3. Bitki Ekstrelerinde Total Fenol Miktar Tayini .....	42
3.6. Total Flavonoit Miktar Tayini .....	42
3.6.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması .....	42
3.6.2. Kersetin Standart Eğri Grafiği Hazırlama.....	43
3.6.3. Bitki Ekstrelerinde Total Flavonoit Miktar Tayini .....	43
3.7. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC-DAD) ile Rutin ve Apigenin Bileşiklerinin Teşhis ve Miktar Tayini.....	44
3.7.1. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanışı.....	44
3.7.2. Örnek Çözeltilerinin Hazırlanışı .....	44
3.7.3. Standart Rutin ve Apigenin Çözeltilerinin Hazırlanışı .....	44
3.7.4. Standart Rutin ve Apigenine Ait Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması	44
3.7.5. Deneyin Yapılışı.....	45
3.8. Asetilkolinesteraz ve Bütirikolinesteraz İnhibitör Aktivite .....	46
3.8.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması .....	46
3.8.2. Enzim İnhibisyon Tayini .....	47
3.9. Hücre Kültürü Çalışmaları ve Antioksidan Enzim Aktivitesi.....	47
3.9.1. Bitki Ekstresi Hazırlanışı .....	48
3.9.2. Hücrelere Ekstre Uygulaması .....	48
3.9.3. Hücre Canlılığı Analizi .....	48
3.9.4. Hücrelerin Toplanması ve Protein Miktar Tayini .....	49
3.9.5. Total Antioksidan Durum Ölçümü.....	49
3.9.6. Total Oksidan Durum Ölçümü .....	50
3.9.7. İstatistiksel Değerlendirme.....	50
Bulgular.....	51
4.1. Kalite Kontrol Çalışmalarına Ait Bulgular .....	51
4.1.1. Kurutmada Kayıp Miktar Tayini Bulguları.....	51
4.1.2. Bütün Kül Miktar Tayini Bulguları .....	52
4.1.3. Sülfat Külü Miktar Tayini Bulguları .....	53
4.1.4. Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül Miktar Tayini Bulguları.....	54

4.2. Ekstre Verimi .....	55
4.3. Total Fenol Miktar Tayini Çalışmalarına Ait Bulgular .....	55
4.3.1. Gallik Asit Standart Eğri Grafiği Bulguları .....	55
4.3.2. Bitki Ekstrelerinde Total Fenol Miktar Tayini Bulguları.....	57
4.4. Total Flavonoit Miktar Tayini Çalışmalarına Ait Bulgular .....	58
4.4.1. Kersetin Standart Eğri Grafiği Bulguları.....	58
4.4.2. Bitki Ekstrelerinde Total Flavonoit Miktar Tayini Bulguları .....	59
4.5. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC-DAD) ile Rutin ve Apigenin Bileşiklerinin Teşhis ve Miktar Tayinine Ait Bulgular .....	61
4.5.1. Bitki Ekstre Verimi.....	61
4.5.2. Standart Rutin Kalibrasyon Eğrisi Hazırlanışı.....	62
4.5.3. Standart Apigenin Kalibrasyon Eğrisi Hazırlanışı.....	63
4.5.4. Bitki Ekstrelerine Ait HPLC-DAD Bulguları .....	65
4.5.5. Bitki Ekstrelerine Ait HPLC-DAD Kromatogramları.....	68
4.5.6. Rutin Miktar Tayini Validasyonu .....	69
4.5.6.1. Doğrusallık.....	70
4.5.6.2. Özgüllük (Seçicilik) .....	70
4.5.6.3. Tanımlama Limiti (LOD) ve Ölçüm (Rapor) Limiti (LOQ).....	70
4.5.6.4. Doğruluk (Gerçeklik).....	71
4.6. Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz İnhibitör Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular.....	72
4.7. Hücre Kültürü Çalışmaları ve Antioksidan Enzim Aktivitesi Ait Bulgular	73
4.7.1. Hücre Canlılığı Analizine Ait Bulgular .....	73
4.7.2. Total Oksidan ve Antioksidan Durumuna Ait Bulgular .....	74
Tartışma .....	75
5.1. Kalite Kontrol Çalışmaları.....	75
5.2. Total Fenolik ve Flavonoit Miktar Tayini .....	76
5.2.1. Total Fenolik Miktar Tayini .....	76
5.2.2. Total Flavonoit Miktar Tayini .....	78
5.3. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC-DAD) ile Rutin ve Apigenin Bileşiklerinin Teşhis ve Miktar Tayini.....	78
5.4. Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz İnhibitör Aktivite .....	79
5.5. Hücre Kültürü Çalışmaları ve Antioksidan Enzim Aktivitesi.....	80

<b>Sonuç ve Öneriler</b> .....	<b>81</b>
<b>Kaynaklar</b> .....	<b>83</b>
<b>Teşekkür</b> .....	<b>91</b>



## Tablolar Dizini

<b>Tablo 1.</b> <i>Paliurus spina-christi</i> Mill. bitkisinden elde edilen fenolik bileşikler .....	10
<b>Tablo 2.</b> Bitki üzerinde yapılmış kantitatif çalışmalar ve elde edilen sonuçlar .....	19
<b>Tablo 3.</b> Bitki üzerinde yapılmış total fenol ve total flavonoit kantitatif çalışmalar ve elde edilen sonuçlar.....	29
<b>Tablo 4.</b> Bitki örneklerine verilen kodlar ve toplanma tarihleri.....	35
<b>Tablo 5.</b> HPLC-DAD Gradient elüsyon oranları.....	45
<b>Tablo 6.</b> KÇY örneklerine ait kurutmada kayıp miktar tayini sonuçları.....	51
<b>Tablo 7.</b> KÇM örneklerine ait kurutmada kayıp miktar tayini sonuçları .....	51
<b>Tablo 8.</b> KÇY örneklerine ait bütün kül miktar tayini sonuçları.....	52
<b>Tablo 9.</b> KÇM örneklerine ait bütün kül miktar tayini sonuçları .....	52
<b>Tablo 10.</b> KÇY örneklerine ait sülfat külü miktar tayini sonuçları.....	53
<b>Tablo 11.</b> KÇM örneklerine ait sülfat külü miktar tayini sonuçları .....	53
<b>Tablo 12.</b> KÇY örneklerine ait HCl çözünmeyen kül miktar tayini sonuçları .....	54
<b>Tablo 13.</b> KÇM örneklerine ait HCl çözünmeyen kül miktar tayini sonuçları .....	54
<b>Tablo 14.</b> KÇM ve KÇY ekstrilerine ait verim sonuçları.....	55
<b>Tablo 15.</b> Farklı konsantrasyondaki gallik asit çözeltilerine ait absorbans değerleri	56
<b>Tablo 16.</b> KÇY metanol ekstrilerinin total fenol miktar tayini sonuçları.....	57
<b>Tablo 17.</b> KÇM metanol ekstrilerinin total fenol miktar tayini sonuçları .....	57
<b>Tablo 18.</b> Farklı konsantrasyondaki kersetin çözeltilerine ait absorbans değerleri...	58
<b>Tablo 19.</b> KÇY metanol ekstrilerinin total flavonoit miktar tayini sonuçları.....	60
<b>Tablo 20.</b> KÇM metanol ekstrilerinin total flavonoit miktar tayini sonuçları .....	60
<b>Tablo 21.</b> KÇY örneklerine ait % verim sonuçları.....	61
<b>Tablo 22.</b> KÇM örneklerine ait % verim sonuçları .....	61
<b>Tablo 23.</b> Rutin çözelti konsantrasyonuna karşılık gelen HPLC-DAD'da okunan ortalama alan değerleri.....	62
<b>Tablo 24.</b> Apigenin çözelti konsantrasyonuna karşılık gelen HPLC-DAD'da okunan ortalama alan değerleri.....	64
<b>Tablo 25.</b> KÇY ekstre örneklerine ait rutin konsantrasyon değerleri.....	66
<b>Tablo 26.</b> KÇM ekstre örneklerine ait rutin konsantrasyon değerleri.....	66
<b>Tablo 27.</b> KÇY ekstre örneklerine ait apigenin konsantrasyon değerleri .....	67
<b>Tablo 28.</b> KÇM ekstre örneklerine ait apigenin konsantrasyon değerleri.....	67
<b>Tablo 29.</b> Rutin için tanımlama ve ölçüm limit verileri ve sonuçları.....	71

<b>Tablo 30.</b> Rutin için geri kazanım yüzdeleri .....	71
<b>Tablo 31.</b> Yaprak ekstralarına ait asetilkolinesteraz inhibisyon sonuçları .....	72
<b>Tablo 32.</b> Yaprak ekstralarına ait bütirilkolinesteraz inhibisyon sonuçları.....	72
<b>Tablo 33.</b> Meyve ekstralarına ait asetilkolinesteraz inhibisyon sonuçları.....	72
<b>Tablo 34.</b> Meyve ekstralarına ait bütirilkolinesteraz inhibisyon sonuçları .....	73



## Şekiller Dizini

Şekil 1. <i>Paliurus spina-christi</i> Mill. bitkisinin çiçeklenme dönemindeki görünüşü .	35
Şekil 2. <i>Paliurus spina-christi</i> Mill. bitkisinin meyve dönemindeki görünüşü.....	36
Şekil 3. <i>Paliurus spina-christi</i> Mill. bitkisine ait herbaryum görselleri .....	36
Şekil 4. Standart rutine ait HPLC kromatogramı ( $R_T = 33.1$ dakika) .....	63
Şekil 5. Standart apigenine ait HPLC kromatogramı ( $R_T = 49.7$ dakika).....	65
Şekil 6. KÇY 1 örneği için HPLC kromatogramı.....	68
Şekil 7. KÇY 2 örneği için HPLC kromatogramı.....	68
Şekil 8. KÇY 3 örneği için HPLC kromatogramı.....	68
Şekil 9. KÇM 1 örneği için HPLC kromatogramı .....	69
Şekil 10. KÇM 2 örneği için HPLC kromatogramı .....	69
Şekil 11. KÇM 3 örneği için HPLC kromatogramı .....	69
Şekil 12. Rutin ve apigenin standartlarına ait HPLC kromatogramı .....	70

## Grafikler Dizini

<b>Grafik 1.</b> Gallik asit standart eğrisi .....	56
<b>Grafik 2.</b> Kerşetin standart eğrisi .....	59
<b>Grafik 3.</b> Rutin için kalibrasyon eğrisi.....	63
<b>Grafik 4.</b> Apigenin için kalibrasyon eğrisi.....	64
<b>Grafik 5.</b> KÇM ve KÇY ekstrelerin (1, 10, 100 µg/mL) SH-SY5Y hücrelerinde hücre canlılığına etkisi .....	73
<b>Grafik 6.</b> KÇM ve KÇY ekstrelerin (1µg/mL) SH-SY5Y hücrelerinde a) total antioksidan durum (TAS) ve b) total oksidan durum (TOS) üzerine etkisi.....	74



## Kısaltma Listesi

ABTS	: 2,2'-Azino-Bis(3-Etilbenzotiyazolin-6-Sülfonik Asit)
ACh	: Asetilkolin
AChE	: Asetilkolinesteraz Enzimi
BCA	: Bikinkoninik Asit
BChE	: Bütirikolinesteraz Enzimi
BHT	: Bütillenmiş Hidroksitoluen
CUPRAC	: Kuprik İyonu İndirgeme Kapasitesi
DMEM	: Dulbecco Modifiye Eagle Solüsyonu
DPPH	: 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil
DTNB	: 5,5'-Ditiyobis-(2-Nitrobenzoik Asit)
FRAP	: Demir İyonu İndirgeyici Antioksidan Güç Yöntemi
GC-MS	: Gaz Kromatografi - Kütle Spektrometresi
HPLC-DAD	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografisi - Kütle/Kütle Spektrometresi
LOD	: Tanımlama Limiti
LOQ	: Ölçüm (Rapor) Limiti
MCA	: Metal Şelatlama Aktivitesi
MTS	: 5-(3-Karboksimetoksifenil)-2-(4,5-Dimetil-Tiyazolil)-3(4-Sülfenil) Tetrazolyum

N	: Gürültü
PBD	: Fosfomolibden
S	: Sinyal
TAS	: Total Antioksidan Durum
TEAC	: Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite
TOS	: Total Oksidan Durum
UPLC	: Ultra Performans Sıvı Kromatografisi



## Giriş

Rhamnaceae familyasına ait olan *Paliurus spina-christi* Mill. bitkisine dikenli çalı veya nadir olarak küçük ağaç formunda rastlanabilmektedir (Davis, 1967; Güner, 2005; Yuca, Karakaya, & Güvenalp, 2023). Ülkemizde “kara çalı, çalı diken, çaltı diken ve çeşmezen” gibi çeşitli isimlerle bilinmektedir ve geniş bir alanda yayılış göstermektedir (Baytop, 1999). Türkiye dışında ise Kırım, Suriye, İran, Irak, Kafkaslar ve Avrupa'nın güneyinde bulunmaktadır (Davis, 1967).

Ülkemiz halk tıbbında çeşitli amaçlar için kullanıldığı bilinmektedir. Meyve kısmı göz hastalıklarında ve taze yaprakları çıban üzerine sarılarak kullanılmaktadır (Baytop, 1999). Edremit Körfezi'nde meyveleri mide ağrısı, akne, soğuk algınlığı, grip, astım rahatsızlıklarında; karminatif ve kan temizleyici etkileri için dekoksasyon olarak tüketilmektedir (Polat & Satıl, 2012). Meyve kısımları Elazığ, Sivrice'de kabızlık probleminde diüretik etki için (Cakilcioglu & Turkoglu, 2010); Kastamonu'da boğaz ağrılarında (Sezik, Zor, & Yeşilada, 1992); Edirne, Lalapaşa'da kalp hastalığı, diyabet, böbrek taşı ve karın ağrısı rahatsızlıklarında (Ertan Tuzlacı, Alparslan İşbilen, & Bulut, 2010); İstanbul, Şile'de tonik etkisi için (E. Tuzlacı & Tolon, 2000); Manisa, Turgutlu'da ise böbrek taşı ve idrar yolu rahatsızlıklarında dekoksasyon olarak tüketilmektedir (Bulut & Tuzlaci, 2013). Manisa, Alaşehir'de tohumları diyabet, böbrek ağrıları ve böbrek taşı rahatsızlıklarında; diüretik etki için dekoksasyon şeklinde kullanılmaktadır (Sargın, Akçicek, & Selvi, 2013). Hakkari, Geçitli'de antifungal özelliği için dalları ısıtılarak haricen yararlanılmaktadır (Kaval, Behçet, & Cakilcioglu, 2014). Balıkesir, Gönen'de kökleri sistit rahatsızlığı için dekoksasyon olarak tüketilmektedir (Ertan Tuzlacı & Aymaz, 2001).

Avrupa'da ise *P. spina-christi* bitkisinin meyve ve taze dalları halk tıbbında idrar söktürücü, ishal, romatizma ve doğum kontrolünde kullanılmaktadır (Brantner & Maleš, 1990, 1999; Maleš, Medić-Šarić, & Kuštrak, 1994).

*Paliurus spina-christi* bitkisine ait çeşitli kısımlar ile yapılan kimyasal içerik çalışmalarında, flavonoidler, tanenler, fenolik asitler, flavonoid glikozitleri, yağ asitleri, alkaloidler, steroller, amino asitler, şeker bileşikleri ve mineraller içerdiği bulunmuştur

(Ahmed et al., 2013, 2012; Brantner & Maleš, 1999; Dalakishvili et al., 1985; Kemertelidze et al., 1999; Maleš et al., 2001; Takım, 2021; Velcheva, 1993).

İçerdiği bileşikler sebebiyle yürütülen biyoaktivite çalışmaları incelendiğinde antioksidan, antimikrobiyal, antienflamatuvar, antidiyabetik, enzim inhibitör (kolinesteraz, tirozinaz,  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz), antifungal, antigenotoksik ve koleretik etkileri tespit edilmiştir (Ahmed et al., 2012; Ceylan et al., 2020; Kemertelidze et al., 1999; Şen, 2018; Takım & Işık, 2020; Zengin et al., 2023).

“Türk Farmakopesi” ve “Avrupa Farmakopesi” başta olmak üzere diğer ülke farmakopeleri, “Avrupa İlaç Ajansı (EMA), Fitoterapide Avrupa Bilimsel İşbirliği Grubu (ESCOP), Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Bitkisel İlaçlar için Doktor Referansı (PDR) ve Farmakognozi ve Fitoterapi Derneği (FFD) monografaları” incelenmiş bitkiye ait bir monograf bulunmadığı görülmüştür (European Pharmacopoeia 8.0, 2013; Türk Farmakopesi, 2017).

Bu çalışmada esas olarak, literatür araştırması sonucunda *Paliurus spina-christi* bitkisinin en çok kullanılan kısımlarının meyve ve yapraklar olduğu tespit edilmiş ve çalışma materyali olarak seçilerek kalite kontrol özelliklerinin ve biyolojik aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır. Kalite kontrol çalışmaları kapsamında, “Türk Farmakopesi”nde yer alan yöntemler esas alınarak kurutmada kayıp, toplam kül, sülfat külü ve hidroklorik asitte çözünmeyen kül testleri yapılarak drog spesifikasyonlarının belirlenmesi hedeflenmiştir. Bitkinin fenolik bileşikler içermesi ve bu bileşiklerin antioksidan aktiviteleri ile ön plana çıkmaları sebebiyle hazırlanacak ekstrelerde total fenol miktar tayini, total flavonoid miktar tayini ve majör fenolik bileşenlerinden biri olan rutin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC-DAD) yöntemi kullanılarak miktar tayini yapılması planlanmıştır. Biyolojik aktivite çalışmaları kapsamında, bitki ekstralarının *in vitro* koşullarda Ellman yöntemine dayalı antikolinesteraz (asetilkolinesteraz ve bütirikolinesteraz inhibitör) aktivitesi ve hücre kültürü çalışmaları ile oksidatif hasara karşı etkinliğinin araştırılması hedef olarak belirlenmiştir (Ellman, Courtney, Andres, & Featherstone, 1961).

## Genel Bilgiler

### 2.1. *Paliurus spina-christi* Mill. Bitkisinin Genel Özellikleri

Sinonimi *Rhamnus paliurus* Linnaeus olan *Paliurus spina-christi* Mill. bitkisi Rhamnaceae familyasında yer almaktadır. Ülkemizde “kara çalı, çalı diken, çalı diken, çeşmezen, isa diken, karadiken, kunar, Sincandiken” gibi çeşitli isimlerle bilinmektedir. Türkiye, Kırım, Suriye, İran, Irak, Kafkaslar ve Avrupa'nın güneyinde doğal olarak yetişmektedir. Türkiye coğrafyasında yaygın olarak bulunabilen bir türdür. Seyrek meşe ormanları, çalılıklar, fundalıklar, çalılık ormanlar, vadi yamaçları, geçitler, nehir vadileri, temizlenmiş ormanlık alanlar, bozulmuş ormanlık alanlar ve boş araziler dahil olmak üzere çeşitli habitatlarda bulunabilir (Baytop, 1999; Davis, 1967; Güner, 2005; “The World Flora Online,” 2023; Yuca et al., 2023).

2-4 m boyuna ulaşabilen, dikenli bir çalı veya nadir olarak boyu 5 m olabilen küçük ağaçlardır. Mayıs-Temmuz aylarında sarı küçük çiçekler açar, kışın ise yapraklarını döker. Genç dalları yoğun ve kahverengimsi tüylü, olgun dallar ise tüysüz ve kavislidir. Dalları ince ve zayıf yapılıdır. Yaprak kısmı oval ve eliptik arasında değişen şekilde, tüysüz ve saplıdır. Çiçek kısmı tüysüz, 3-6 mm çapında ve çiçek tablası disk şeklindedir. Meyve kısmı 2-2.5 cm çapında yuvarlak şekilde, ortası şişkin, üç tohumlu ve kenarları kanatlı samaradır (Baytop, 1999; Davis, 1967; Güner, 2005; “The World Flora Online,” 2023; Yuca et al., 2023).

### 2.2. Kimyasal Bileşim

#### 2.2.1. Fenolik Bileşikler

Dalakishvili ve arkadaşları tarafından meyve kısmı ile yapılan çalışmada, fotokolorometrik yöntem kullanılarak tespit edilen rutin, izokersitrin ve hiperozit bileşikleri poliamit sorbent kolonu ile izole edilmiştir (Dalakishvili, Zurabishvili, & Kemertelidze, 1987).

Kuştrak ve arkadaşları tarafından yaprak kısmı ile yapılan çalışmada, toz hale getirilmiş drogdaki yağda çözünen kısımları ve klorofili uzaklaştırmak için petrol eteri

kullanılmıştır. Sonrasında metanol ile ekstre hazırlanarak kolon kromatografisi kullanılarak rutin ve izokersitrin izole edilmiştir (Kuřtrak, Maleř, Brantner, & Pitarević, 1990).

Brantner ve Maleş tarafından yaprak kısmı ile yapılan çalışmada, toz hale getirilmiş droğ sırasıyla petrol eteri ve metanol ile ekstre edilmiştir. Ekstreye çeşitli kromatografik yöntemler uygulanarak kersetin-3-rutinozit-7-ramnozit, kemferol-*O*-triglikozit ve flavonoit *C/O*-triglikozitler izole edilmiştir (Brantner & Maleş, 1990).

Brantner ve Maleş tarafından yaprak, iek ve meyve kısımları ile yapılan çalışmada, toz hale getirilmiş her bir droğlar için ayrı metanol ekstre hazırlanmıştır. Yüksek başıncılı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak flavonoit glikozitlerinden olan rutin, izokersitrin, kersetin-3-*O*-ramnoglukozit-7-*O*-ramnozit, kersetin-3-*O*-ramnoglukozit-4'-*O*-ramnozit, kemferol-3-*O*-ramnoglukozit-7-*O*-ramnozit ve skoparin-7-*O*-ramnoglukozit izole edilmiştir. İncelenen tüm bitki kısımlarında kersetin-3-*O*-ramnoglukozit-7-*O*-ramnozit ve rutin ana flavonoit bileşenler olarak belirlenmiştir (Brantner & Maleş, 1999).

Ahmed ve arkadaşları tarafından gövde kısmı ile yapılan çalışmada, toz hale getirilmiş droğun metanol ekstresi hazırlanmıştır. HPLC kullanılarak gallik asit, kafeik asit ve şiringik asit gibi fenolik bileşiklerin varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca GC-MS kullanılarak fenolik bileşikler ve trimetil silan gibi fenol öncüsü bileşikler tespit edilmiştir (L. T. Ahmed, Al-Ani, & Smariee, 2012).

Ahmed ve arkadaşları tarafından gövde kısmı ile yapılan çalışmada, toz hale getirilmiş droğun metanol ekstresi hazırlanmıştır. HPLC kullanılarak gallik asit, şiringik asit, kafeik asit ve epikateşin bileşiklerinin varlığı tespit edilmiştir (L. T. Ahmed, Abood, Ghanim, Ibrahim, & Al-Naim, 2013).

Kayalar ve arkadaşları tarafından meyve kısmı ile yapılan çalışmada, toz hale getirilmiş droğ metanol ile 24 saat boyunca masere edilmiştir. Sıvı kromatografisi - ktle/ktle spektrometresi (LC-MS/MS) kullanılarak kateşin hidrat, proantosiyanidin B dimer, naringenin-*C*-diglikozit, 5-kafeoil kinik asit 5-*p*-kumaroilkinik asit, rutin,

kersetin heksozit ve kersetin ana bileşikler olarak bulunmuştur (Kayalar, Küçük, & Göger, 2016).

Yaşar ve arkadaşları tarafından dal ve gövde kısımları ile yapılan çalışmada, toz hale getirilmiş drog için metanol ekstresi hazırlanmıştır. HPLC kullanılarak protokateşik asit, kateşin, *p*-hidroksibenzoik asit, klorojenik asit, kafeik asit, epikateşin, şiringik asit, vanilin, *p*-kumarik asit ve ferulik asit varlığı tespit edilmiştir (Yaşar, Demir, & Karatepe, 2016).

Zor ve arkadaşları tarafından meyve kısmı ile yapılan çalışmada, toz hale getirilmiş droğun metanol ekstresi hazırlanmıştır. Metanol ekstresi sırasıyla n-hekzan, etil asetat ve n-butanol ile sıvı-sıvı ekstraksiyon yapılmıştır. Kromatografik yöntemler kullanılarak etil asetat ekstresinden (+/-) kateşin ve gallokateşin; n-butanol ekstresinden ise rutin izole edilmiştir (Zor, Aydın, Güner, Başaran, & Başaran, 2017).

Takım ve Işık tarafından meyve kısmı ile yapılan çalışmada, droğun su ekstresi hazırlanmıştır. LC-MS/MS kullanılarak ana bileşikler rutin ve malik asit olmak üzere toplamda 22 farklı fenolik bileşik tespit edilmiştir (Takım & Işık, 2020).

Takım tarafından meyve kısmı ile yapılan çalışmada, droğun su, metanol ve etanol ekstraheleri hazırlanmıştır. LC-MS/MS kullanılarak ana bileşikler rutin, kateşin, hesperidin, kinik asit ve malik asit olmak üzere toplamda 31 farklı fenolik bileşik tespit edilmiştir (Takım, 2021).

Zengin ve arkadaşları tarafından meyve, yaprak ve dal kısmı ile yapılan çalışmada, her bir drog için n-hekzan, etil asetat, diklorometan, metanol ve su ekstraheleri hazırlanmıştır. Ultra performans sıvı kromatografisi-uçuş zamanlı kütle spektrometresi (UPLC-QTOF-MS) kullanılarak analiz yapılmıştır. Dal kısmının metanol ve su ekstrahelerinde kersetin ve epigallokateşin türevleri; meyve kısmının metanol ve su ekstrahelerinde kersetin türevleri; yaprak kısmının metanol ve su ekstrahelerinde kemferol, kemferol türevleri ve kersetin türevleri bulunmuştur (Zengin et al., 2023).

### 2.2.2. Diğer Bileşikler

Dalakishvili ve arkadaşları tarafından tohum kısmı ile yapılan çalışmada, lipit profili incelenmiştir. Araştırma sonucunda doymamış yağ asidi olarak oleik asit (18:1) ve linoleik asit (18:2) baskın olmak üzere eikosenoik asit (20:1) de bulunmuştur. Oksitlenmiş asitler olarak 9,10-(12,13) epoksi 12(9)-18:1, 9,10-epoksi 18:0, okso-18:1, okso-18:2, 12-hidroksi-9-18:1 ve 9-hidroksi-10,11-18:2 yağ asitleri izole edilmiştir. Farklı yıllarda toplanan *P. spina-christi* tohumlarındaki lipidlerin açilgliserol kompozisyonunun değişken olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca ana sterol bileşenin % 66 oranıyla  $\beta$ -sitosterol olduğu, ardından % 13 oranında stigmasterol, % 11 kampesterol ve % 10 tanımlanamayan bileşiklerin geldiği tespit edilmiştir (Dalakishvili, Gusakova, Chachanidze, Kuparadze, & Kemertelidze, 1985).

Velcheva tarafından meyve kısmı ile yapılan çalışmada, frangufolin, frangulinin, amfibin C ve amfibin D alkaloidleri izole edilmiştir (Güner, 2005; Velcheva, 1993).

Kemertelidze ve arkadaşları tarafından meyve ve tohum kısımları ile yapılan çalışmada, kolon kromatografisi ve İTK kullanılarak hidrokarbonlar, yağ asidi esterleri, sterol esterleri, triaçilgliseritler, serbest yağ asitleri, diaçilgliseritler, serbest steroller, monoaçilgliseritler ve tanımlanamayan bileşikler tespit edilmiştir (Kemertelidze et al., 1999).

Maleš ve arkadaşları tarafından farklı bitki kısımları ile yapılan çalışmada, İTK kullanılarak lösin, fenilalanin, valin, tirozin, pirolin, alanin, treonin, serin, aspartik asit, glutamin, asparagin, lizin ve histidin amino asitleri olmak üzere 13 amino asit izole edilmiştir. Bunlardan serin, asparagin ve valin temel amino asitlerdir (Güner, 2005; Maleš, Plazibat, Hazler-Pilepic, & Cetina-Čizmek, 2001).

Ahmed ve arkadaşları tarafından kök kısmı ile yapılan çalışmada, uygun koşullarda kurutulmuş toz hale getirilmiş droğun metanol ekstresi hazırlanmıştır. GC-MS kullanılarak ise çok çeşitli şeker bileşikleri, amino asitler ve esterler tespit edilmiştir (L. T. Ahmed et al., 2012).

Golbkina ve arkadaşları tarafından yaprak kısmı ile yapılan çalışmada, uygun koşullarda kurutularak toz hale getirilmiş droğun içerdiği selenyum miktarı florometrik yöntem kullanılarak tespit edilmiştir (Golbkina et al., 2020).

Takım tarafından meyve kısmı ile yapılan çalışmada, droğun su, metanol ve etanol ekstreleri hazırlanmıştır. Endüktif olarak eşleştirilmiş plazma optik emisyon spektroskopisi (ICP-OES) kullanılarak mineral içeriği incelenmiştir ve analiz sonucunda sodyum, kalsiyum, magnezyum ve fosfor elementlerinin makro düzeyde, Zn ve Cr<sup>3+</sup> minerallerinin ise eser miktarda olduğu tespit edilmiştir (Takım, 2021).

Yuca ve arkadaşları tarafından meyve kısmı ile yapılan çalışmada, uygun koşullarda kurutularak toz hale getirilmiş droğun önce metanol ekstresi hazırlanmış sonrasında n-hekzan kullanılarak sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemiyle alt ekstre hazırlanmıştır. Araştırma sonucunda triterpen olan betulin, betulinik asit, lupeol ve sterol olan  $\beta$ -sitosterol bileşiği izole edilmiştir (Yuca, Özbek, Demirezer, & Güvenalp, 2022).

Oğuz ve arkadaşları tarafından yaprak ve çiçek kısımları ile yapılan çalışmada, uygun koşullarda kurutularak toz hale getirilmiş droğun etanol ekstresi hazırlanmıştır. Gaz kromatografisi kütle spektrometresi (GC-MS) kullanılarak yaprak ekstresinin pirolidin, 2-desenal, 2-undekanal, fitol, oleik asit, oleamit, skualen, E vitamini ve gamma-sitosterol; çiçek ekstraktının ise pirolidin, 2-desenal, 2-undesenal, oleik asit, lupeol ve gama-sitosterol içerdiği tespit edilmiştir (Oğuz, Çamlı Pulat, İlhan, & Atmaca, 2022).

Zengin ve arkadaşları tarafından meyve kısmı ile yapılan çalışmada, n-hekzan, etil asetat, diklorometan, metanol ve su ekstreleri hazırlanmıştır. Ultra performans sıvı kromatografisi-uçuş zamanlı kütle spektrometresi (UPLC-QTOF-MS) kullanılarak analiz yapılmıştır. Metanol ve su ekstrelerinde şeker yapısında bileşikler tespit edilmiştir (Zengin et al., 2023).

### 2.3. Oksidatif Stres

Serbest radikaller, normal hücrenel metabolizmanın ürünleridir. Son yörüngesinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren atom veya molekül olarak tanımlanmaktadır. Eşleşmemiş elektron içermesi sebebiyle serbest radikaller kararsız, kısa ömürlü ve son derece reaktif haldedir. Stabil hale gelmek için başka bileşiklerden elektron alarak o bileşiği de serbest radikal haline getirir. Bunun sonucunda canlı hücreye zarar verebilecek zincirleme reaksiyon başlamış olur (Dahan, Khalouf, Salcedo, Taieb, & Gassia, 2023; Mukherji & Singh, 1984; Phaniendra, Jestadi, & Periyasamy, 2015).

Bazı serbest radikaller metabolizma sırasında doğal olarak ortaya çıkar. Vücudun bağışıklık sistemi hücreleri, virüs ve bakterileri etkisiz hale getirmek için serbest radikalleri bilinçli olarak yaratır. Bu durumdan bağımsız kirlilik, radyasyon, sigara dumanı ve herbisit gibi çeşitli çevresel faktörler de serbest radikallerin oluşmasına neden olabilir. Dolayısıyla serbest radikaller bir yandan faydalı etkiler sağlayabilirken diğer yandan zararlı oksidasyona neden olabilir ve aşırı miktarda üretildiğinde ise ciddi hücrenel hasarlara neden olabilir (Kaur & Kapoor, 2008).

Serbest radikaller, vücudumuzda bulunan hücre membranına, hücre yapısında bulunan lipidlere, proteinlere, nükleik asitlere ve DNA'ya zarar vererek çeşitli hastalıklara yol açabilmektedir. Bu istenmeyen etkileri ortadan kaldırmak için antioksidan maddelerden faydalanılmaktadır. (Kasnak & Palamutoğlu, 2015; Velioglu, 2000). Vücudumuz serbest radikallerle baş etmek için çeşitli enzimler ve yüksek ve düşük molekül ağırlıklı antioksidanları içeren etkili bir savunma sistemine sahiptir. Antioksidanlar kendi elektronlarından birini vererek serbest radikalleri etkisiz hale getirir ve zincirleme elektron alma reaksiyonunu sonlandırır. Her durumda stabil kaldıkları için antioksidanlar elektron verdiklerinde serbest radikale dönüşmezler (Kaur & Kapoor, 2008).

Oksidatif stres, serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki dengenin antioksidanlar lehine bozularak organizmaya zarar verme potansiyeli taşıyan bir duruma dönüşmesi olarak tanımlanmaktadır (Sies, 2019). Artrit, diyabet, demans, kanser, ateroskleroz, damar hastalıkları, obezite, osteoporoz ve metabolik sendromlar gibi yaşa bağlı

hastalıkların gelişiminde önemli bir rol oynar. Antioksidan özelliklere sahip doğal bileşiklerin oksidatif stresi azaltabildiği, bağışıklık fonksiyonunu geliştirebildiği ve sağlıklı yaşlanma sürecine destek olduğu ortaya konulmuştur (Tan, Norhaizan, Liew, & Rahman, 2018).

Tüketiciler yaşadıkları sağlık endişeleri dolayısıyla sentetik antioksidanlar yerine doğal kaynaklı antioksidanları tercih etmektedirler (Pokorný, 2007). Bu endişeler sebebiyle antioksidan özelliklere sahip doğal olarak oluşan bileşiklerin etkinliğinin araştırılmasına olan ilgi artmıştır. Doğal kaynakların başında tıbbi ve aromatik bitkiler gelmektedir ve antioksidan kapasiteleri bakımından kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadırlar. Konu hakkında yayınlanan çalışma sayısı gün geçtikçe artmaktadır (Kırca & Arslan, 2008). Bitkiler, serbest radikallerle ilişkili hastalıklara karşı koruma sağlamaya yardımcı olan çok sayıda antioksidan bileşik içerirler. Bu bileşikler bitki yapılarında çoğunlukla sekonder metabolit olarak bulunurlar (Nwozo, Effiong, Aja, & Awuchi, 2023). Sekonder metabolitler grubunda yer alan fenoller antioksidan aktivite göstermektedir (Julsing, Koulman, Woerdenbag, Quax, & Kayser, 2006; Pietta, 2000). Bitkilerdeki başlıca fenolik bileşik grupları: basit fenoller, benzokinonlar, fenolik asitler, asetofenonlar, fenilasetik asitler, hidroksisinnamik asitler, fenilpropenler, kumarinler, izokumarinler, kromonlar, naftakinonlar, ksantonlar, stilbenler, antrakinonlar, flavonoidler, izoflavonoidler, lignanlar, neolignanlar, biflavonoidler, ligninler, kateşol türevleri ve kondanse tanen oluşmaktadır (Harbone, 1989).

*P. spina-christi* Mill. bitkisinde tespit edilmiş fenolik bileşiklere ait çalışmalar “Kimyasal Bileşimi” bölümünde “Fenolik Bileşikler” alt başlığı altında detaylı açıklanmıştır. Buna ilaveten, fenolik bileşikler buldukları bitki kısımlarına göre sınıflandırılarak Tablo 1.’de özet olarak sunulmuştur.

Bitki Kısımı	Fenolik İçerik	Referans
Yaprak	rutin, izokersitrin	(Kuştrak et al., 1990)
	kersetin-3-rutinozit-7-ramnozit, kemferol- <i>O</i> -triglikozit, flavonoit <i>C/O</i> -triglikozitler	(Brantner & Maleş, 1990)
	kersetin-3- <i>O</i> -ramnoglukozit-7- <i>O</i> -ramnozit, kersetin-3- <i>O</i> -ramnoglukozit-4'- <i>O</i> -ramnozit, kemferol-3- <i>O</i> -ramnoglukozit-7- <i>O</i> -ramnozit, skoparin-7- <i>O</i> -ramnoglukozit, izokersitrin, rutin	(Brantner & Maleş, 1999)
	kemferol, kemferol türevleri ve kersetin türevleri	(Zengin et al., 2023)
Meyve	rutin, izokersitrin, hiperozit bileşikleri	(Dalakishvili et al., 1987)
	kersetin-3- <i>O</i> -ramnoglukozit-7- <i>O</i> -ramnozit, kersetin-3- <i>O</i> -ramnoglukozit-4'- <i>O</i> -ramnozit, kemferol-3- <i>O</i> -ramnoglukozit-7- <i>O</i> -ramnozit, skoparin-7- <i>O</i> -ramnoglukozit, izokersitrin, rutin	(Brantner & Maleş, 1999)
	kateşin hidrat, proantosiyonidin B dimer, naringenin- <i>C</i> -diglikozit, 5-kafeoil kinik asit 5- <i>p</i> -kumaroilkinik asit, rutin, kersetin heksozit, kersetin	(Kayalar et al., 2016)
	(+/-) kateşin, gallokateşin, rutin	(Zor et al., 2017)
	rutin, malik asit	(Takım & Işık, 2020)
	rutin, kateşin, hesperidin, kinik asit, malik asit	(Takım, 2021)
	kersetin türevleri	(Zengin et al., 2023)
Çiçek	kersetin-3- <i>O</i> -ramnoglukozit-7- <i>O</i> -ramnozit, kersetin-3- <i>O</i> -ramnoglukozit-4'- <i>O</i> -ramnozit, kemferol-3- <i>O</i> -ramnoglukozit-7- <i>O</i> -ramnozit, skoparin-7- <i>O</i> -ramnoglukozit, rutin, izokersitrin	(Brantner & Maleş, 1999).
Gövde	gallik asit, kafeik asit ve şiringik asit fenolik bileşikler, fenol öncüsü (trimetil silan)	(L. T. Ahmed et al., 2012)
	gallik asit, şiringik asit, kafeik asit, epikateşin	(L. T. Ahmed et al., 2013)
Dal	kersetin, epigallokateşin türevleri	(Zengin et al., 2023)
Dal ve Gövde	protokateşik asit, kateşin, <i>p</i> -hidroksibenzoik asit, klorojenik asit, kafeik asit, epikateşin, şiringik asit, vanilin, <i>p</i> -kumarik asit, ferulik asit	(Yaşar et al., 2016)

**Tablo 1.** *Paliurus spina-christi* Mill. bitkisinden elde edilen fenolik bileşikler

## 2.4. Alzheimer Hastalığı

Demans, çeşitli beyin hastalıklarının neden olduğu hafıza, düşünme, davranış ve günlük aktiviteleri gerçekleştirme yeteneğini etkileyen, genellikle kronik veya ilerleyici nitelikte bir sendromdur. Dünya çapında demansla yaşayan insan sayısının şu anda 50 milyonun üzerinde olduğu tahmin edilmekte ve 2050 yılına kadar sayının neredeyse üç katına çıkacağı öngörülmektedir (“Dementia,” n.d.). Tüm demans vakalarının % 50-70’ini oluşturan Alzheimer hastalığı, beyin hücrelerinin yok olmasına neden olarak ilerleyen nörolojik bir hastalıktır. Yaşın ilerlemesiyle birlikte belirtilerin ortaya çıkmaya başlaması sebebiyle yaşlı nüfusun arttığı toplumlarda önemli bir sağlık sorunudur. Prevelans, 60 yaşından sonra her beş senede bir 1-2 katına çıkmaktadır. 65 yaş üzerinde prevelans % 6-10 iken, 85 yaş üzerinde ise % 30-47’dir. Her ne kadar Alzheimer hastalığı için yaş faktörü önemli olsa da tek risk faktörü değildir (Selekler, 2010; Tari & Yağmurtaşan, 2023). Alzheimer's Disease International kuruluşunun 2023 yılında yayınladığı rapora göre değiştirilebilir ve değiştirilemez risk faktörleri bulunmaktadır. Değiştirilebilir risk faktörleri; düşük eğitim düzeyi, hipertansiyon, işitme kaybı, sigara kullanımı, obezite, depresyon, fiziksel hareketsizlik, diyabet, sosyal izolasyon, aşırı alkol tüketimi, kafa travmaları ve hava kirliliği olmak üzere 12 madde altında toplanmıştır. Değiştirilemeyen risk faktörleri arasında yaş, cinsiyet, aile öyküsü ve genetik risk faktörleri olarak belirtilmiştir. Özellikle down sendromu ve apolipoprotein E4 alelleri varlığı Alzheimer hastalığı riskini arttırmaktadır (Long, Benoist, & Weidner, 2023).

Alzheimer hastalığının semptomatik tedavisinde kullanılan en başarılı yaklaşım kolinerjik hipotezidir. Bu hipotez, hastalarının yaşadığı bilişsel gerilemenin en azından bir kısmının merkezi sinir sisteminde bulunan nörotransmitter asetilkolin (ACh) eksikliğinden kaynaklandığını öne sürmektedir (Barril, Kalko, Orozco, & Luque, 2005).

#### 2.4.1. Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz Enzim İnhibisyonu

Kolinesteraz, asetilkolini, kolin ve asetik aside hidrolizini katalize eden bir enzim ailesidir. Asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirilkolinesteraz (BuChE) olmak üzere iki çeşidi bulunmaktadır. Asetilkolinesteraz birçok iletim dokusunda yer alırken bütirilkolinesteraz ise karaciğerde bulunur. Antikolinesterazlar, kolinesteraz enziminin ACh'yi parçalamasını engelleyerek nörotransmitter etkisinin hem seviyesini hem de süresini artırır (Colović, Krstić, Lazarević-Pašti, Bondžić, & Vasić, 2013).

Sağlıklı beyinde ve Alzheimer'lı beyinde BuChE özelliklerinin ve davranışlarının aydınlatılmasıyla birlikte BuChE'nin hastalığın ilerlemesindeki rolüne dair kanıt sağlanmaktadır. Normal beyinde AChE, kolinesteraz aktivitesinin yaklaşık % 80'ini temsil eder ve geri kalanını BuChE oluşturur. Ancak ilerlemiş Alzheimer hastalığında AChE aktivitesi belirli beyin bölgelerinde normal seviyenin % 55-67'sine düşebilirken BuChE aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir. BuChE için arttırılmış seçiciliğe sahip ajanların kullanımı ve rivastigmin gibi hem AChE hem de BuChE'ni inhibe edebilen kolinesteraz inhibitörlerinin kullanımı Alzheimer hastalığında potansiyel terapötik faydalar göstermektedir (Bergmann, Tomlinson, Blessed, Gibson, & Perry, 1978; Greig et al., 2001). Alzheimer hastalığı tedavi stratejisinde ana hedef kolinesteraz inhibitörleri kullanılarak ACh seviyesinin arttırılmasıdır (Aynacı, Arslan, Sarı, & Yaşar, 2014; Colović et al., 2013; Yıldırım & Ulusoy Güzeldemirci, 2023).

Alzheimer tedavisinde kolinesteraz inhibitörü için kullanılan galantamin ve rivastigmin doğal kaynaklı ilaçlardır. Bu sebeple doğal kaynakların araştırılarak yeni kolinesteraz inhibitörleri elde edilmesi önemlidir ve konuyla ilgili son yıllarda yoğun araştırmalar yürütülmektedir (S. Ahmed et al., 2021; Bortolami et al., 2021).

## 2.5. Biyolojik Aktiviteler

### 2.5.1. Antioksidan Aktivite

*P. spina-christi* Mill. bitkisinin çeşitli kısımlarında fenolik bileşiklerin tespit edilmesiyle birlikte çeşitli metotlar kullanılarak antioksidan aktivitesi incelenmiştir. Yapılan çalışmalar aşağıda özet halinde verilmiştir.

Kırca ve arkadaşları tarafından çiçek kısmıyla hazırlanan metanol ekstresi “*troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC)*” ve DPPH yöntemleri kullanılarak incelendiğinde sonuçlar sırasıyla  $1281.52 \pm 11.77$   $\mu\text{mol}$  troloks eşdeğeri/g ve  $\text{EC}_{50}$ :  $0.211 \pm 0.001$  (mg kuru drog) olarak bulunmuştur. İki yöntemde de karşılaştırıldığı diğer bitkilere göre yüksek inhibisyon aktivitesi gösterdiği görülmüştür (Kırca & Arslan, 2008).

Jukic ve arkadaşları tarafından çiçek kısmından metanol, kloroform ve etil asetat ile hazırlanan ekstreler DPPH ve FRAP yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. DPPH deneyi sonucunda en yüksek inhibisyon aktiviteyi  $\text{IC}_{50}$ : 1.75 mg/mL değeriyle metanol ekstresi göstermiştir. FRAP deneyi sonunda ise kloroform ekstresi (448  $\mu\text{mol}$   $\text{Fe}^{2+}$  eşdeğeri/L) en yüksek aktiviteyi göstermiştir (Jukic, Burcul, Carev, Politeo, & Milos, 2012).

Ahmed ve arkadaşları tarafından gövde kısmı DPPH yöntemi kullanılarak incelenmiştir. 100  $\mu\text{L}$  konsantrasyondaki metanol ekstresinin % 80.8 ile en yüksek anti-radikal aktivite gösterdiği bulunmuştur. Çalışma sonucunda ekstrenin konsantrasyonu arttıkça pro-oksidan aktivitenin de arttığı saptanmıştır. Biyolojik aktivite için düşük konsantrasyonun iyi bir seçim olabileceği belirtilmiştir (L. T. Ahmed et al., 2013).

Kayalar ve arkadaşları tarafından meyve kısmıyla hazırlanan metanol ekstresi DPPH yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Standart antioksidan BHT ( $\text{IC}_{50}$ : 0.054 mg/mL) ile

karşılaştırıldığında meyve ekstresinin ( $IC_{50}$ : 0.062 mg/mL) daha yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Kayalar et al., 2016).

Şen tarafından meyve, yaprak ve dal kısımları DPPH ve “2,2'-Azino-bis(3-*etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit*) (ABTS)” yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. DPPH deneyi sonucunda en yüksek antioksidan aktiviteyi  $IC_{50}$ :  $15.54 \pm 0.02$  µg/mL değeriyle dalın sulu etanol ekstresi, en düşük antioksidan aktiviteyi ise  $IC_{50}$ :  $2174 \pm 27.58$  µg/mL değeriyle meyvenin n-hekzan ekstresi göstermiştir. ABTS deneyi sonucunda en yüksek antioksidan aktiviteyi  $IC_{50}$ :  $22.06 \pm 0.17$  µg/mL değeriyle dalın etanol ekstresi, en düşük antioksidan aktiviteyi ise  $IC_{50}$ :  $851.0 \pm 1.27$  µg/mL değeriyle meyvenin n-hekzan ekstresi göstermiştir (Şen, 2018).

Ceylan ve arkadaşları tarafından Artvin ve Giresun'dan toplanan çiçekli kısımlar ve yaprakları “2,2'-*difenil-1-pikrilhidrazil* (DPPH)” yöntemi, “*demir iyonu indirgeyici antioksidan güç* (FRAP)” yöntemi ve “*kuprik iyonu indirgeme kapasitesi* (CUPRAC)” yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. DPPH deneyinde en yüksek antioksidan aktiviteyi  $IC_{50}$ : 0.29 mg/mL değeri ile Giresun'dan toplanan yaprağın metanol ekstresi, FRAP ve CUPRAC deneyinde en yüksek aktiviteyi Artvin'den toplanan yaprağın metanol ekstresi göstermiştir. Deney sonuçları sırasıyla  $103.90 \pm 1.99$  µmol  $FeSO_4 \cdot 7H_2O/g$  ve  $1.07 \pm 0.14$  mmol TEAC/g bulunmuştur (Ceylan, Harşit, Saral, Özcan, & Demir, 2020).

Takım ve Işık tarafından meyve kısmı DPPH, ABTS, FRAP ve CUPRAC yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. DPPH ve ABTS deneyleri sonucunda radikal süpürme aktiviteleri sırasıyla  $\% 63.69 \pm 3.21$  ve  $\% 77.41 \pm 4.62$  olarak bulunmuştur. CUPRAC ve FRAP deneyleri sonucunda metal indirgeme aktiviteleri sırasıyla  $\% 56.31 \pm 2.08$  ve  $\% 92.01 \pm 3.18$  olarak bulunmuştur (Takım & Işık, 2020).

Arslan ve Kaya tarafından meyve ve yaprak kısımları DPPH, ABTS ve CUPRAC yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. CUPRAC deneyi sonucunda en yüksek indirgeme gücü meyvenin su ekstresinde (ABS: 0.824; 450 nm) görülmüştür ancak

standart antioksidan olarak seçilmiş Troloks (ABS: 1.746; 450 nm) ve BHT (ABS: 1.74; 450 nm) ile karşılaştırıldığında tüm ekstrelerin düşük aktivite gösterdiği görülmüştür. Hem meyve hem de yaprağın etanol ve su ekstralarının  $\text{Cu}^{+2}$  indirgeme gücünün konsantrasyonun artmasıyla doğru orantılı olarak arttığı bildirilmiştir. DPPH deneyi sonucunda yaprağın etanol ekstresinin % 80.2 değeriyle en yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmüştür ve antioksidanlarla karşılaştırıldığında BHT'den (% 87.4) düşük ancak Troloks'tan (% 65.8) yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. ABTS deneyi sonucunda en yüksek aktiviteyi meyvenin su (% 96.2) ve etanol (% 96.2) ekstraları göstermiştir ve antioksidanlarla karşılaştırıldığında ise tüm ekstraların BHT (% 97.2) ve Troloks'tan (% 97.8) düşük aktivite gösterdiği görülmüştür (Arslan & Kaya, 2021).

Zengin ve arkadaşları tarafından meyve, yaprak ve dal kısımları DPPH, ABTS, FRAP, CUPRAC, “*metal şelatlama aktivitesi (MCA)*” ve “*fosfomolibden (PBD)*” yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP ve PBD deneylerinde en yüksek aktivite sonuçlarını yaprağın metanol ekstresi vermiştir. Deney sonuçları sırasıyla  $909.88 \pm 4.25$  mg TE/g ekstre,  $3358.33 \pm 51.14$  mg TE/g ekstre,  $781.88 \pm 16.37$  mg TE/g ekstre,  $996.70 \pm 47.28$  mg TE/g ekstre ve  $4.96 \pm 0.26$  mmol TE/g ekstre çıkmıştır. MCA deneyi için en yüksek aktivite sonucu  $28.80 \pm 0.32$  mg EDTAE/g ekstre ile gövdenin diklorometan ekstresidir (Zengin et al., 2023).

### **2.5.2. Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz Enzim İnhibisyonu**

Jukic ve arkadaşları tarafından çiçek kısmından metanol, kloroform ve etil asetat ile hazırlanan ekstraların AChE inhibisyonu incelenmiştir. Sadece metanol ekstresinin inhibisyon aktivitesi (% 11.60) görülmüştür (Jukic et al., 2012).

Zengin ve arkadaşları tarafından meyve, yaprak ve dal kısımları ile hazırlanan n-hekzan, etil asetat, diklorometan, metanol ve su ekstralarının asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirilkolinesteraz (BChE) inhibisyonu incelenmiştir. AChE inhibisyonu bakımından en yüksek dalın n-hekzan ekstresi ( $8.89 \pm 0.08$  mg GALAE/g), BChE

inhibisyonu bakımından en yüksek etkiyi dalın metanol ekstresi ( $2.50 \pm 0.05$  mg GALAE/g) göstermiştir (Zengin et al., 2023).

### 2.5.3. Diğer Aktiviteler

Arslan ve Kaya tarafından meyve ve yaprak kısımları ile hazırlanan etanol ve su ekstralarının antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. En yüksek antimikrobiyal aktiviteyi etanol ekstraları göstermiştir (Arslan & Kaya, 2021).

Ceylan ve arkadaşları tarafından çiçekli kısımlar ve yaprakları ile hazırlanan metanol ekstralarının 12 mikroorganizma üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* ve *Candida albicans* mikroorganizmalarına karşı minimum inhibitör konsantrasyon değerleri rapor edilmiştir (Ceylan et al., 2020).

Brantner ve arkadaşları tarafından yaprak, çiçek, meyve, kabuk ve kök kısımları ile hazırlanan etanol ekstralarının antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Çalışma sonucunda ekstraların hepsi tüm Gram-pozitif bakterilere (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* ve *Micrococcus luteus*) karşı aktivite gösterirken, Gram-negatif bakterilerine karşı etki görülmemiştir (Brantner, Maleš, Pepeljnjak, & Antolić, 1996).

Şen tarafından meyve, yaprak ve dal kısımları ile hazırlanan etil asetat ve etanol ekstralarının antiinflamatuvar aktivitesi incelendiğinde yaprakların etil asetat ve etanol ekstralarının, lipoksijenaz inhibisyon deneyinde en yüksek anti-inflamatuvar aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Şen, 2018).

Takım tarafından meyve kısmı ile hazırlanan dekoksasyonun antidiyabetik aktivitesi incelenmiştir. Streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçanlardaki kan şekeri, insülin ve glikozillenmiş hemoglobin düzeyleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda insülin ve meyve dekoksasyonu uygulanan gruplar ile diyabetik kontrol

grubu karşılaştırıldığında kan şekeri ve glikolize hemoglobin düzeylerinin istatistiksel olarak düştüğü ortaya konulmuştur (Takım, 2021).

Takım ve Işık tarafından meyve kısmı ile hazırlanan infüzyonun aktivitesi incelenmiştir. Streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçan dokularında katalaz ve süperoksit dismutaz enzimleri ve lipid peroksidasyonu üzerindeki etkisi *in vivo* olarak araştırılmıştır. Çalışma sonucunda infüzyon kullanılan grupta, streptozotosin sebebiyle azalan katalaz ve süperoksit dismutaz enzim düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği belirlenmiştir. Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit miktarı, hasta grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermektedir. İnfüzyon kullanılan grupta ise hasta grubuna göre anlamlı bir azalış görülmektedir (Takım & Işık, 2020).

Zengin ve arkadaşları tarafından meyve, yaprak ve dal kısmı ile yapılan bir çalışmada, her bir drog için hazırlanan n-hekzan, etil asetat, diklorometan, metanol ve su ekstralarının tirozinaz,  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz enzimleri üzerine inhibisyon aktiviteleri incelenmiştir. Çalışma sonucunda tirozinaz enzimini gövdenin metanol ekstresinin;  $\alpha$ -amilaz enzimini meyvenin etil asetat ekstresinin;  $\alpha$ -glukozidaz enzimini ise gövdenin diklorometan ekstresinin en çok inhibe ettiği görülmüştür (Zengin et al., 2023).

Zor ve arkadaşları tarafından meyve kısmı ile hazırlanan ekstraların antijenotoksik aktivitesi incelenmiştir. Çalışma sonucunda DNA hasarına bağlı bozukluklardan korunmada kullanılabileceği belirtilmiştir (Zor et al., 2017).

Esfahani ve arkadaşları tarafından meyve kısmı ile hazırlanan ekstraların glikoz tüketimi üzerindeki etkileri, yüksek glikoz ve insülin tarafından indüklenmiş insüline dirençli HepG2 hücrelerinde sinyal yolları araştırılmıştır. Çalışma sonucunda meyvenin metanol ve toprak üstü ekstralarında bulunan aktif bileşenlerin antidiyabetik etkisi olduğu tespit edilmiştir (Esfahani et al., 2023).

Yuca ve arkadaşları tarafından meyve kısmı ile hazırlanan ekstrelerin  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz enzim inhibisyon aktiviteleri incelenmiştir (Yuca et al., 2022).

Ahmed ve arkadaşları tarafından gövde kısmı ile hazırlanan metanol ekstresinin antifungal aktivitesi incelenmiş ve *Trichophyton mentagrophytes* mantarı üzerinde etkisi olduğu görülmüştür (L. T. Ahmed et al., 2012).

Kemertelidze ve arkadaşları tarafından meyve kısmı kullanılarak "Tsarubol" adı verilen bir preparat hazırlanmıştır. Preparatın toksik hepatitli melez sıçan modeli kullanıldığında safra salgısı ve safra üretimini normalleştirdiği görülmüştür. Ayrıca karaciğer hücrelerinde lipit peroksidasyonunu inhibe ettiği ve kan transaminaz seviyesini düşürerek karaciğer üzerinde koruyucu bir etki oluşturduğu belirtilmiştir (Kemertelidze et al., 1999).

Oğuz ve arkadaşları tarafından çiçek ve yaprak kısımları ile hazırlanan etanol ekstrelerinin antikanser aktivitesi insan MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde incelenmiştir. Çalışma sonucunda yaprak ve çiçek ekstrelerinin MCF-7 meme kanseri hücrelerinde sitotoksik ve apoptotik etkilere sahip oldukları bildirmektedir (Oğuz et al., 2022).

## **2.6. Miktar Tayini Çalışmaları**

Literatür taranarak kalitatif sonuç elde edilen çalışmalar bulunmuş ve Tablo 2 ve 3'te özet olarak sunulmuştur.

Bitki Kısımı	Ekstre	Tayin Yöntemi	Bileşik	Miktar	Literatür
Meyve	Dekoksasyon	LC-MS/ MS	Kinik Asit	1163.0 ± 0.433 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	(Takım, 2021)
			Malik Asit	7580.5 ± 0.985 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Gallik Asit	245.0 ± 0.027 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Protokatekuik Asit	18781.2 ± 6.57 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Kateşin	4321.4 ± 1.087 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Gentisik asit	282.0 ± 0.047 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Tannik Asit	20.2 ± 0.004 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			4-OH Benzoik Asit	399.6 ± 0.095 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Epikateşin	11483.3 ± 2.535 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Kafeik Asit	12.5 ± 0.005 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Salisilik Asit	763.0 ± 0.125 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Rutin	3642.4 ± 0.895 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			İzokersitrin	154 ± 0.035 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Hesperidin	2752.3 ± 0.925 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Nikotiflorin	24 ± 0.002 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Kersetin	1793.0 ± 0.315 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
Naringenin	23 ± 0.009 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)				

**Tablo 2.** Bitki üzerinde yapılmış kantitatif çalışmalar ve elde edilen sonuçlar

Bitki Kısımı	Ekstre	Tayin Yöntemi	Bileşik	Miktar	Literatür
Meyve	Dekoksasyon	LC-MS/ MS	Hesperetin	162.8 ± 0.055 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	(Takım, 2021)
			Luteolin	4.2 ± 0.001 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Kemferol	43.6 ± 0.009 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
Meyve	Su İnfüzyonu	LC-MS/ MS	Kinik Asit	766 ± 0.284 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Malik Asit	15682.2 ± 2.038 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Gallik Asit	131.7 ± 0.015 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Protokatekuik Asit	15379.5 ± 5.38 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Kateşin	3265.2 ± 0.721 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Gentisik asit	233.0 ± 0.039 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			4-OH Benzoik Asit	415.0 ± 0.098 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Epikateşin	2582 ± 0.570 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Kafeik Asit	9.7 ± 0.001 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Vanillin	31.6 ± 0.003 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Salisilik Asit	1130.0 ± 0.178 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Rutin	2789.3 ± 0.688 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Hesperidin	2341.6 ± 0.784 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
Nikotiflorin	111.5 ± 0.011 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)				

**Tablo 2'nin devamı.** Bitki üzerinde yapılmış kantitatif çalışmalar ve elde edilen sonuçlar

Bitki Kısımı	Ekstre	Tayin Yöntemi	Bileşik	Miktar	Literatür
Meyve	Su İnfüzyonu	LC-MS/ MS	Kersetin	365.0 ± 0.063 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	(Takım, 2021)
			Naringenin	4.0 ± 0.001 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Hesperetin	38.4 ± 0.012 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Luteolin	9.4 ± 0.002 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
Meyve	Metanol	LC-MS/ MS	Kinik Asit	28388.3 ± 10.561 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Fumarik Asit	1035.5 ± 0.094 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Malik Asit	17536.8 ± 2.279 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Gallik Asit	211.0 ± 0.024 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Epigallokateşin	5749.6 ± 1.057 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Protokatekuik Asit	1111.0 ± 0.388 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Kateşin	43696.5 ± 9.656 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Gentisik asit	694.1 ± 0.115 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Klorojenik Asit	834.0 ± 0.177 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Protokatekuik Aldehit	636.5 ± 0.025 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Tannik Asit	103.6 ± 0.019 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			4-OH Benzoik Asit	840.0 ± 0.199 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Epikateşin	8024.3 ± 1.773 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	

**Tablo 2'nin devamı.** Bitki üzerinde yapılmış kantitatif çalışmalar ve elde edilen sonuçlar

Bitki Kısım	Ekstre	Tayin Yöntemi	Bileşik	Miktar	Literatür
Meyve	Metanol	LC-MS/ MS	Vanillik Asit	9046 ± 1.311 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	(Takım, 2021)
			Kafeik Asit	135.0 ± 0.02 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Vanillin	573.6 ± 0.069 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Şiringik Aldehit	130.4 ± 0.028 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			<i>p</i> -Kumarik Asit	213.5 ± 0.041 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Salisilik Asit	1594.5 ± 0.251 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Rutin	66778.5 ± 16.49 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			İzokersitrin	8079.0 ± 1.777 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Hesperidin	36698.4 ± 12.29 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Kozmosin	91.2 ± 0.007 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Astragalin	479.2 ± 0.054 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Nikotiflorin	2081.0 ± 0.224 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Kersetin	423.5 ± 0.074 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Naringenin	16.0 ± 0.006 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Hesperetin	35.2 ± 0.011 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Luteolin	11.3 ± 0.003 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
Kemferol	11.0 ± 0.002 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)				

**Tablo 2'nin devamı.** Bitki üzerinde yapılmış kantitatif çalışmalar ve elde edilen sonuçlar

Bitki Kısım	Ekstre	Tayin Yöntemi	Bileşik	Miktar	Literatür
Meyve	Etanol	LC-MS/ MS	Kinik Asit	38279.5 ± 14.239 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	(Takım, 2021)
			Malik Asit	1242.53 ± 0.161 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Gallik Asit	59.5 ± 0.006 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Epigallokateşin	11359.3 ± 2.090 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Protokatekuik Asit	455.0 ± 0.159 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Kateşin	58695.3 ± 12.971 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Gentisik asit	89.2 ± 0.014 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Klorojenik Asit	255.3 ± 0.054 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Protokatekuik Aldehit	104.3 ± 0.041 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Tannik Asit	11.0 ± 0.002 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			4-OH Benzoik Asit	677.5 ± 0.160 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Epikateşin	4882.6 ± 1.078 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Vanillik Asit	1833 ± 0.265 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Kafeik Asit	151.0 ± 0.022 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Vanillin	744.9 ± 0.09 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
Şiringik Aldehit	31.8 ± 0.006 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)				

**Tablo 2'nin devamı.** Bitki üzerinde yapılmış kantitatif çalışmalar ve elde edilen sonuçlar

Bitki Kısımı	Ekstre	Tayin Yöntemi	Bileşik	Miktar	Literatür
Meyve	Etanol	LC-MS/ MS	<i>p</i> -Kumarik Asit	232.8 ± 0.045 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	(Takım, 2021)
			Salisilik Asit	456.1 ± 0.072 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Sinarozit	13.0 ± 0.005 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Rutin	98753.4 ± 24.39 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			İzokersitrin	15088.5 ± 3.319 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Hesperidin	47445.2 ± 15.894 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Kersitrin	37.7 ± 0.009 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Astragalin	532.2 ± 0.060 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Nikotiflorin	1659.1 ± 0.179 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Kersetin	364.3 ± 0.063 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Naringenin	28.0 ± 0.010 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Hesperetin	43.0 ± 0.013 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
Meyve	Hidroliz	LC-MS/ MS	Kinik Asit	25113.2 ± 9.342 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Fumarik Asit	976.0 ± 0.088 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Malik Asit	8286.2 ± 1.077 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Gallik Asit	284.0 ± 0.031 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	

**Tablo 2'nin devamı.** Bitki üzerinde yapılmış kantitatif çalışmalar ve elde edilen sonuçlar

Bitki Kısım	Ekstre	Tayin Yöntemi	Bileşik	Miktar	Literatür
Meyve	Hidroliz	LC-MS/ MS	Epigallokateşin	1520.0 ± 0.279 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	(Takım, 2021)
			Protokatekuik Asit	993.5 ± 0.347 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Kateşin	3866.0 ± 0.854 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Gentisik asit	1293.0 ± 0.215 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Klorojenik Asit	59.0 ± 0.012 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Protokatekuik Aldehit	1828.0 ± 0.723µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Tannik Asit	1505.0 ± 0.285 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			4-OH Benzoik Asit	284.6 ± 0.067 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Epikateşin	2139.0 ± 0.472 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Vanillik Asit	7258.3 ± 1.052 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Kafeik Asit	87.4 ± 0.013 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Vanillin	1050.0 ± 0.128 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Şiringik Aldehit	142.7 ± 0.030 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Epikateşin Gallat	170.3 ± 0.038 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			<i>p</i> -Kumarik Asit	105.2 ± 0.020 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
Salisilik Asit	1051.0 ± 0.166 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)				

**Tablo 2'nin devamı.** Bitki üzerinde yapılmış kantitatif çalışmalar ve elde edilen sonuçlar

Bitki Kısımı	Ekstre	Tayin Yöntemi	Bileşik	Miktar	Literatür
Meyve	Hidroliz	LC-MS/ MS	Rutin	24141.5 ± 5.962 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	(Takım, 2021)
			İzokersitrin	2360.0 ± 0.519 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Hesperidin	11958.4 ± 4.005 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Kozmosin	49.6 ± 0.004 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Astragalin	118.8 ± 0.013 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Nikotiflorin	1019.0 ± 0.110 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Kersetin	2133.0 ± 0.373 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Naringenin	10.2 ± 0.003 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Hesperetin	182.5 ± 0.058 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Luteolin	11.3 ± 0.003 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Kemferol	152.1 ± 0.032 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
Meyve	—	ICP-OES	Kalsiyum	790.8 ± 38.14 mg/kg (ppm)	
			Bakır	1.46 ± 0.106 mg/kg (ppm)	
			Demir	43.71 ± 8.31 mg/kg (ppm)	
			Potasyum	2017 ± 206.46 mg/kg (ppm)	
			Magnezyum	275.03 ± 10.25 mg/kg (ppm)	
			Mangan	18.03 ± 0.18 mg/kg (ppm)	

**Tablo 2'nin devamı.** Bitki üzerinde yapılmış kantitatif çalışmalar ve elde edilen sonuçlar

Bitki K kısmı	Ekstre	Tayin Yöntemi	Bileşik	Miktar	Literatür
Meyve	—	ICP-OES	Sodyum	193.96 ± 5.66 mg/kg (ppm)	(Takım, 2021)
			Nikel	< LOQ	
			Alüminyum	45.20 ± 5.62 mg/kg (ppm)	
			Çinko	3.1 ± 0.04 mg/kg (ppm)	
			Kadmiyum	< LOQ	
			Kobalt	< LOQ	
			Krom	1.36 ± 0.16 mg/kg (ppm)	
			Kurşun	< LOQ	
			Fosfor	254.13 ± 22.46 mg/kg (ppm)	
Meyve	İnfüzyon	LC-MS/MS	Kumarin	6.54 ± 0.005 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	(Takım & Işık, 2020)
			Hesperidin	1.85 ± 0.0005 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			<i>p</i> -Kumarik Asit	166.4 ± 0.085 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Gallik Asit	205.78 ± 0.058 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Kafeik Asit	24.98 ± 0.0088 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Vanilik Asit	1106.2 ± 0.56 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Kinik Asit	3331.72 ± 0.27 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			4-OH-Benzoik Asit	105.79 ± 0.03 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	

**Tablo 2'nin devamı.** Bitki üzerinde yapılmış kantitatif çalışmalar ve elde edilen sonuçlar

Bitki Kısım	Ekstre	Tayin Yöntemi	Bileşik	Miktar	Literatür
Meyve	İnfüzyon	LC-MS/MS	Ferulik Asit	156.27 ± 0.077 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	(Takım & Işık, 2020)
			Klorojenik Asit	397.01 ± 0.027 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Protokatekuik Asit	14.66 ± 0.006 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Sinamik Asit	96.1 ± 0.013 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Fumarik Asit	3.21 ± 0.0004 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Vanillin	1.1 ± 0.0003 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Malik Asit	28424.18 ± 3.21 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Şiringik Asit	12.76 ± 0.0005 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Rutin	23459.68 ± 3.73 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Kersetin	1.53 ± 0.0008 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Kersitrin	23.02 ± 0.46 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			İzokersitrin	1312.25 ± 0.17 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Rhoifolin	2.07 ± 0.0019 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
			Nikotiflorin	234.44 ± 0.064 µg analit/g meyve ekstresi (a/a)	
Yaprak	Metanol	Mikro Florometri	Selenyum	1800 ± 200 µg/kg kuru ağırlık	(Golbkina et al., 2020)

**Tablo 2'nin devamı.** Bitki üzerinde yapılmış kantitatif çalışmalar ve elde edilen sonuçlar

Bitki Kısmı	Ekstre	TPC Miktarı	TFC Miktarı	Literatür
Dal	n-Hekzan	22.36 ± 0.26 mg GAE/g ekstre <sup>(a)</sup>	0.83 ± 0.07 mg RE/g ekstre <sup>(b)</sup>	(Zengin et al., 2023)
	Etil Asetat	55.19 ± 1.29 mg GAE/g ekstre	7.84 ± 0.26 mg RE/g ekstre	
	Diklorometan	30.50 ± 0.82 mg GAE/g ekstre	8.56 ± 0.15 mg RE/g ekstre	
	Metanol	121.78 ± 1.41 mg GAE/g ekstre	11.25 ± 0.26 mg RE/g ekstre	
	Su	105.14 ± 0.99 mg GAE/g ekstre	5.32 ± 0.08 mg RE/g ekstre	
Meyve	n-Hekzan	16.86 ± 0.25 mg GAE/g ekstre	0.14 ± 0.03 mg RE/g ekstre	
	Etil Asetat	17.36 ± 0.32 mg GAE/g ekstre	0.51 ± 0.03 mg RE/g ekstre	
	Diklorometan	16.58 ± 0.75 mg GAE/g ekstre	0.34 ± 0.02 mg RE/g ekstre	
	Metanol	75.91 ± 0.58 mg GAE/g ekstre	17.55 ± 0.09 mg RE/g ekstre	
	Su	68.97 ± 0.36 mg GAE/g ekstre	8.84 ± 0.39 mg RE/g ekstre	
Yaprak	n-Hekzan	23.21 ± 0.28 mg GAE/g ekstre	8.43 ± 0.03 mg RE/g ekstre	
	Etil Asetat	25.72 ± 0.10 mg GAE/g ekstre	11.68 ± 0.47 mg RE/g ekstre	
	Diklorometan	21.77 ± 0.04 mg GAE/g ekstre	21.56 ± 0.14 mg RE/g ekstre	
	Metanol	94.64 ± 2.12 mg GAE/g ekstre	75.36 ± 0.92 mg RE/g ekstre	
	Su	62.55 ± 0.28 mg GAE/g ekstre	42.18 ± 0.26 mg RE/g ekstre	
Meyve	Su (İnfüzyon)	272.94 ± 1.74 mg TE /g kuru drog <sup>(c)</sup>	—	(Takım, 2021)
Yaprak	Metanol	56 ± 3 mg GAE/g kuru ağırlık	—	(Golbkina et al., 2020)

**Tablo 3.** Bitki üzerinde yapılmış total fenol ve total flavonoit kantitatif çalışmaları ve elde edilen sonuçlar

Bitki Kısım	Ekstre	TPC Miktarı	TFC Miktarı	Literatür
Meyve	Su	22.10 ± 0.09 mg GAE/g kuru drog	8.29 ± 0.07 mg QE/g kuru drog <sup>(d)</sup>	(Takım & Işık, 2020)
Yaprak	Etanol	106.9 ± 0.65 mg GAE/g ekstre	—	(Şen, 2018)
	n-Hekzan	3.83 ± 0.42 mg GAE/g ekstre	—	
	Kloroform	76.38 ± 0.68 mg GAE/g ekstre	—	
	Etil Asetat	210.0 ± 3.98 mg GAE/g ekstre	—	
	Sulu Etanol	149.1 ± 3.66 mg GAE/g ekstre	—	
Dal	Etanol	216.2 ± 2.92 mg GAE/g ekstre	—	
	n-Hekzan	6.26 ± 0.16 mg GAE/g ekstre	—	
	Kloroform	147.8 ± 0.80 mg GAE/g ekstre	—	
	Etil Asetat	286.6 ± 0.90 mg GAE/g ekstre	—	
	Sulu Etanol	194.4 ± 2.28 mg GAE/g ekstre	—	
Meyve	Etanol	61.24 ± 2.28 mg GAE/g ekstre	—	
	n-Hekzan	2.44 ± 0.27 mg GAE/g ekstre	—	
	Kloroform	85.13 ± 1.27 mg GAE/g ekstre	—	
	Etil Asetat	17.81 ± 0.27 mg GAE/g ekstre	—	
	Sulu Etanol	36.49 ± 0.90 mg GAE/g ekstre	—	

**Tablo 3'ün devamı.** Bitki üzerinde yapılmış total fenol ve total flavonoit kantitatif çalışmalar ve elde edilen sonuçlar

Bitki Kısımı	Ekstre	TPC Miktarı	TFC Miktarı	Literatür
Yaprak	Metanol	10.14 ± 0.94 mg GAE/g ekstre	67.72 ± 1.88 QE/g ekstre	(Ceylan et al., 2020)
		14.63 ± 0.42 mg GAE/g ekstre	97.45 ± 2.20 QE/g ekstre	
Çiçek Tohumu		4.35 ± 0.25 mg GAE/g ekstre	9.73 ± 0.97 QE/g ekstre	
		8.24 ± 5.99 mg GAE/g ekstre	11.74 ± 2.61 QE/g ekstre	
Meyve	Metanol	109.54 mg GAE/g ekstre	—	(Kayalar et al., 2016)
Çiçek	Metanol	64.85 mg GAE/mg kuru ekstre	—	(Jukic et al., 2012)
	Kloroform	10.27 mg GAE/mg kuru ekstre	—	
	Etil Asetat	5.99 mg GAE/mg kuru ekstre	—	
Meyve	Metanol	91.20 ± 3.89 mg GAE/g	—	(Kırca & Arslan, 2008)
Yaprak/Gövde		75.50 ± 0.35 mg GAE/g	—	

**Tablo 3'ün devamı.** Bitki üzerinde yapılmış total fenol ve total flavonoit kantitatif çalışmalar ve elde edilen sonuçlar

- (a) GAE = Gallik asit eşdeğer
- (b) RE = Rutin eşdeğer
- (c) TE = Tanen eşdeğer
- (d) QE = Kersetin eşdeğer

## Gereç ve Yöntem

### 3.1. Kullanılan Kimyasalların Listesi

- 2,2'-Azino-Bis(3-Etilbenztiyazolin-6-Sülfonik Asit) (ABTS) ( $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$ )
- 5-(3-Karboksimetoksifenil)-2-(4,5-Dimetil-Tiyazolil)-3(4-Sülfofenil) Tetrazolyum (MTS) ( $C_{20}H_{20}N_5O_6S_2$ )
- 5,5'-Ditiyobis-(2-Nitrobenzoik Asit) (DTNB) (Sigma) ( $C_{14}H_8N_2O_8S_2$ )
- Alüminyum Klorür (Merck) ( $AlCl_3$ )
- Amonyum Karbonat (Merck) ( $(NH_4)_2CO_3$ )
- Apigenin (TCI) ( $C_{15}H_{10}O_5$ )
- Asetilkolinesteraz Enzimi (Sigma)
- Asetiltiyokolin İyodür (Sigma) ( $C_7H_{16}INO_2$ )
- Asetonitril (Merck) ( $C_2H_3N$ )
- Bikinkoninik Asit (BCA) Kiti
- Bütirilkolinesteraz Enzimi (Sigma)
- Disodyum Hidrojen Fosfat (Merck) ( $Na_2HPO_4$ )
- Dipotasyum Fosfat (Sigma) ( $KH_2PO_4$ )
- Dulbecco Modifiye Eagle Solüsyonu (DMEM) (Lonza)
- Fetal Sığır Serum (FBS) (Hyclone)
- Folin-Ciocalteu Reaktifi (Sigma)
- Fosforik Asit (Merck) ( $H_3PO_4$ )
- Galantamin (Sigma)
- Gallik Asit (Sigma) ( $C_7H_6O_5$ )
- Hidrojen Peroksit (Sigma) ( $H_2O_2$ )
- Hidroklorik Asit (Sigma) (HCl)
- Kersetin (Sigma) ( $C_{15}H_{10}O_7$ )
- L-Glutamin (Gibco) ( $C_5H_{10}N_2O_3$ )

Metanol (Sigma) (CH<sub>3</sub>OH)  
Penisilin (Invitrogen) (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S)  
Potasyum Asetat (Sigma) (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K)  
Rutin (Sigma) (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>)  
S-Bütiriltiyokolin İyodür (Sigma) (C<sub>9</sub>H<sub>20</sub>INO<sub>2</sub>)  
SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™)  
Sığır Serum Albümini (Sigma)  
Sodyum Dihidrojen Fosfat (Riedel) (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)  
Sodyum Hidroksit (Merck) (NaOH)  
Sodyum Karbonat (AFG Bioscience) (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)  
Sodyum Klorür (Merck) (NaCl)  
Streptomisin (Invitrogen) (C<sub>21</sub>H<sub>39</sub>N<sub>7</sub>O<sub>12</sub>)  
Sülfürik Asit (Merck) (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)  
Tripan Mavisi Solüsyon (Biowest)  
Tripsin (Sigma) (C<sub>35</sub>H<sub>47</sub>N<sub>7</sub>O<sub>10</sub>)  
Troloks (Sigma) (C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>)  
Tween 20 (Sigma) (C<sub>58</sub>H<sub>114</sub>O<sub>26</sub>)

### **3.2. Kullanılan Gereçler**

12 Kuyucuklu Kültür Kapları  
96 Kuyucuklu Mikroplaka (Greiner)  
Analitik Terazî (Denver)  
Değirmen (Retsch GmbH SK 1)  
Etüv (Heraus)  
Isıtıcı Plaka (Sinbo)

İnvert Mikroskop  
Laminar Hava Kabini (Termofisher Scientific)  
Manyetik Karıştırıcı (Yellowline)  
Mikropipet (Brand)  
Mikroplaka okuyucu (Multiskan Go, Thermo Scientific)  
Mikroplaka Okuyucu (Versamax™ Tunable Microplate Reader)  
pH Kağıdı (Isolab)  
pH Metre (WTW Inolab)  
Rotary Evaporatör (Buchi)  
Santrifüj (Hettich EBA 20)  
Spektrofotometre (SP3000 Nano Optima)  
Süzgeç Kağıdı (Sartorius)  
Total Antioxidant Status ((TAS) Rel Assay Diyagnostik Gaziantep, Türkiye)  
Total Oxidant Status ((TOS) Rel Assay Diyagnostik Gaziantep, Türkiye)  
Ultrasonik Banyo (Bandelin Sonorex)  
Vorteks (IKA)  
Yakma Fırını (Elektromag)

### **3.3. Bitkisel Materyalin Toplanması ve Hazırlanması**

Çalışmada *Paliurus spina-christi* Mill. bitkisine ait yaprak ve meyve kısımları kullanılmıştır. Bitki örnekleri İzmir, Bornova, Ege Üniversitesi Kampüsü'nden toplanmıştır. Toplanan örnekler Prof. Dr. Nehir SOMER (Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı) tarafından teşhis edilmiştir. Uygun şartlarda kurutulmuş bitki örneklerinden herbaryum hazırlanmış ve herbaryum örnekleri Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı Herbaryumu'nda 1657 ve 1658 numaralarıyla kayıt altına alınmıştır. Bitki kısmına göre toplanma tarihi ve çalışmalar sırasında kullanılan örnek kodları Tablo 4'te belirtilmiştir.

Bitki Kısımı	Örnek Kodu	Toplanma Tarihi
Kara Çalı Yaprak	KÇY	23.05.2022
Kara Çalı Meyve	KÇM	05.07.2022

**Tablo 4.** Bitki örneklerine verilen kodlar ve toplanma tarihleri

Toplanan bitki kısımları gölgede ve oda sıcaklığında kurutulmuştur ve kurutma işleminin ardından elek çapı 1 mm olan Retsch GmbH SK 1 marka elektrikli değirmen kullanılarak toz haline getirilmiştir.



**Şekil 1.** *Paliurus spina-christi* Mill. bitkisinin çiçeklenme dönemindeki görünüşü



Şekil 2. *Paliurus spina-christi* Mill. bitkisinin meyve dönemindeki görünüşü



Şekil 3. *Paliurus spina-christi* Mill. bitkisine ait herbarium görselleri

### 3.4. Kalite Kontrol Çalışmaları

#### 3.4.1. Farmakope Analizleri

*Paliurus spina-christi* Mill. bitkisi için “*Türk Farmakopesi*” ve “*Avrupa Farmakopesi*” başta olmak üzere diğer ülkelerin farmakopeleri, “*EMA, ESCOP, WHO, PDR ve FFD monografaları*” gibi çeşitli kaynaklar araştırılmıştır ancak bitkiye ait monografa rastlanamamıştır. Bu sebeple kalite kontrol çalışmaları “*Avrupa Farmakopesi 8.0*” ve “*Türk Farmakopesi*” esas alınarak yürütülmüştür (*European Pharmacopoeia 8.0, 2013; Türk Farmakopesi, 2017*).

##### 3.4.1.1. Kurutmada Kayıp Miktar Tayini

Örnekler üzerinde yapılan çalışmalar 3 paralel şeklinde yürütüldü. Daraları bilinen kurutma kapları 105 °C’ye getirilmiş etüvde 1 saat bekletildi, ardından desikatöre alınarak 30 dakika soğumaya bırakıldı. Sürenin sonunda ilk tartım alındı. Aynı işlem adımları tüm kurutma kapları sabit vezne gelinceye kadar devam edildi. İki tartım arasındaki farkın 0.5 mg’ı geçmediği durumda kurutma kaplarının sabit vezne geldiği kabul edildi. Sabit vezne getirilen kurutma kaplarına 1 g toz drog tartıldı. 105 °C’deki etüvde 1 saat bekletildi, ardından desikatöre alınarak 30 dakika soğumaya bırakıldı. Sürenin sonunda tartım alındı. Aynı işlem adımları tüm örnekler sabit vezne gelinceye kadar devam edildi. Örneklerin hepsi sabit vezneye geldikten sonra çalışma sonlandırıldı. Kurutmada kayıp miktarını hesaplanırken aşağıda belirtilen formül kullanıldı ve her drog için 3 paralelin ortalaması alındı.

A: Kurutma Kabının Darası

B: Kurutma Kabının Darası + Drog Miktarı

C: Kurutma Kabının Darası + Son Drog Miktarı

% Kurutmada Kayıp Miktarı =  $(B-C) \times 100 / (B-A)$

#### 3.4.1.2. Bütün Kül Miktar Tayini

Örnekler üzerinde yapılan çalışmalar 3 paralel şeklinde yürütüldü. Daraları bilinen porselen krezeler, 600 °C'ye getirilmiş yakma fırınında 1 saat bekletildi, ardından desikatöre alınarak 30 dakika soğumaya bırakıldı. Sürenin sonunda ilk tartım alındı. Aynı işlem adımları tüm krezeler sabit vezne gelinceye kadar devam edildi. İki tartım arasındaki farkın 0.5 mg'ı geçmediği durumda krezelerin sabit vezne geldiği kabul edildi. Sabit vezne getirilen porselen krezelere 1 g toz drog tartıldı ve nemi uzaklaştırmak amacıyla 105 °C'ye getirilmiş etüvde 1 saat bekletildi. Porselen krezelere soğutma işlemi uygulamadan hemen 600 °C'de bulunan yakma fırınına alınarak 1 saat bekletildi, ardından desikatöre alınarak 30 dakika soğumaya bırakıldı. Sürenin sonunda tartım alındı. Aynı işlem adımları tüm örnekler sabit vezne gelinceye kadar devam edildi. Örneklerin hepsi sabit vezneye geldikten sonra çalışma sonlandırıldı. Bütün kül miktarı hesaplanırken aşağıda belirtilen formül kullanıldı ve her drog için 3 paralelin ortalaması alındı.

A: Kroze Darası

B: Kroze Darası + Drog Miktarı

C: Kroze Darası + Kül Miktarı

$$\% \text{ Bütün Kül Miktarı} = (C-A) \times 100 / (B-A)$$

#### 3.4.1.3. Sülfat Külü Miktar Tayini

Örnekler üzerinde yapılan çalışmalar 3 paralel şeklinde yürütüldü. Daraları bilinen porselen krezeler, 600 °C'ye getirilmiş yakma fırınında 1 saat bekletildi, ardından desikatöre alınarak 30 dakika soğumaya bırakıldı. Sürenin sonunda ilk tartım alındı. Aynı işlem adımları tüm krezeler sabit vezne gelinceye kadar devam edildi. İki tartım arasındaki farkın 0.5 mg'ı geçmediği durumda krezelerin sabit vezne geldiği kabul edildi. Sabit vezne getirilen porselen krezelere 1 g toz drog tartıldı. Droğun üzerine 2 mL %10'luk sülfürik asit çözeltisi yavaş yavaş ilave edildi. Kroze ısıtıcı plakaya yerleştirildi ve duman çıkışı bitene kadar ısıtıldı. Krezeler, 600 °C'de bulunan yakma fırınında 1 saat bekletildi, ardından desikatöre alınarak 30 dakika soğumaya bırakıldı. Krozeye 1-2 damla %10'luk sülfürik asit çözeltisinden damlatıldı. Benzer şekilde

duman çıkışının bittiği gözlemlenene kadar ısıtıcı plakaya yerleştirildi ve ardından 1 saat yakma fırınında yakıldı. Desikatöre alınarak 30 dakika soğumaya bırakıldıktan sonra krozeye % 15.8'lik amonyum karbonat çözeltisinden 1-2 damla ilave edildi. Krozeler yine 600 °C'de bulunan yakma fırınında 1 saat bekletildi, ardından desikatöre alınarak 30 dakika soğumaya bırakıldı. Sürenin sonunda tartım alındı. Tüm krozeler sabit vezne gelinceye kadar işlem adımlarına yakma fırını-soğutma-tartım şeklinde devam edildi. Örneklerin hepsi sabit vezne geldikten sonra çalışma sonlandırıldı. Bütün kül miktarı hesaplanırken aşağıda belirtilen formül kullanıldı ve her drog için 3 paralelin ortalaması alındı.

A: Kroze Darası

B: Kroze Darası + Drog Miktarı

C: Kroze Darası + Kül Miktarı

% Sülfat Külü Miktarı =  $(C-A) \times 100 / (B-A)$

#### **3.4.1.4. Hidroklorik Asit (HCl)'de Çözünmeyen Kül Miktar Tayini**

Deneyin ilk kısmında bütün kül miktar tayininde yapılan işlemlerin aynısı uygulandı. Sonrasında sabit vezne gelmiş krozenin içine 15 mL distile su ve 10 mL HCl konuldu. Krozenin ağzı saat camı ile kapatılarak 10 dakika ısıtıcı plakada ısıtıldı. Biraz soğumaya bırakıldıktan sonra krozenin içindkiler kül bırakmayan süzgeç kağıdına aktarılarak süzldü. Bakiye, distile su ile yıkanmaya başlandı ve pH kağıdı ile belirli aralıklarla pH'ı kontrol edildi. Distile su ile bakiyeyi yıkama işlemi pH nötr çıkıncaya kadar sürdürldü. Süzgeç kağıdı ve üzerinde kalan bakiyesi krozenin içine yerleştirildi. 600 °C'de bulunan yakma fırınına alınarak 1 saat bekletildi, ardından desikatöre alınarak 30 dakika soğumaya bırakıldı. Sürenin sonunda tartım alındı. Aynı işlem adımları tüm örnekler sabit vezne gelinceye kadar devam edildi. Örneklerin hepsi sabit vezne geldikten sonra çalışma sonlandırıldı. Hidroklorik asitte çözünmeyen kül miktarı hesaplanırken aşağıda belirtilen formül kullanıldı ve her drog için 3 paralelin ortalaması alındı.

A: Kroze Darası

B: Kroze Darası + Drog Miktarı

C: Kroze Darası + HCl'de Çözünmeyen Kül Miktarı

% HCl'de Çözünmeyen Kül Miktarı =  $(C-A) \times 100 / (B-A)$

### 3.4.2. Ekstre Hazırlama

Meyve ve yaprak kısmı için iki ayrı ekstre anlatılan adımlara göre hazırlandı. Darası bilinen 500 mL'lik balona (E1) 15 g toz edilmiş drog tartıldı. 150 mL metanol mezürle ölçülerek balona ilave edildi. Ağızı pamuk ile kapatılarak 30°C'deki ultrasonik banyoya konuldu ve yarım saat bekletildi. Süre sonunda biraz soğumaya bırakıldı. Elde edilen çözelti, darası bilinen 250 mL'lik başka bir balona (E2) filtre kağıdı yardımıyla süzüldü. Çözücü alçak basınç altında distillendi. Tam katılığa ulaşmadan içerisinde biraz çözücü bırakılan ekstre darası bilinen 50 mL'lik balona (E3) cam pastör pipeti yardımıyla aktarıldı. E1 balonuna tekrardan 150 mL metanol ilave edildi. Ağızı pamuk ile kapatılarak 30°C'deki ultrasonik banyoya konuldu ve yarım saat bekletildi. Süre sonunda biraz soğumaya bırakıldı. Ekstre filtre kağıdı kullanılarak E2 balonuna süzüldü ve rotary evaporatörde çözücüsü uzaklaştırıldı. Kalan bakiye E3 balonuna aktarıldı. Aynı işlem adımları bir kere daha tekrarlandı. Son basamakta E3 balonunda kalan çözücünün tamamı alçak basınç altında kuruluğa kadar distillendi. Verim hesaplanırken aşağıda belirtilen formül kullanıldı.

A: Kullanılan Drog Miktarı

B: Balon Darası (E3)

C: Balon Darası + Ekstre Miktarı

% Verim =  $(C-B) \times 100 / A$

### 3.5. Total Fenol Miktar Tayini

#### 3.5.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

**Folin-Ciocalteu Çözeltisi (%10):** 100 mL'lik balon jøjeye 10 mL Folin çözeltisi konulduktan sonra üzerine 90 mL distile su ilave edilerek tamamlandı.

**Sodyum Karbonat Çözeltisi (1 M):** 100 mL'lik balon jøjeye 10.59 g sodyum karbonat tartılarak konuldu. Bir miktar distile su ile çözüldükten sonra 100 mL'ye tamamlandı.

**Standart Gallik Asit Çözeltisi:** Cam flakona tartılan 5 mg gallik asit, 5 mL metanol:su (1:1) karışımı içinde çözümlenerek stok gallik asit çözeltisi hazırlandı. Ardından stok gallik asit çözeltisi seyreltilerek 12.5, 25, 50, 75, 100, 150, 200 ve 300 µg/mL'lik standart gallik asit içeren çözeltiler hazırlandı. Seyreltmeler metanol:su (1:1) karışımı ile yapıldı.

**Kör Çözeltisi:** 500 µL metanol:su (1:1) üzerine 5 mL Folin-Ciocalteu çözeltisi ilave edildi. Vorteks ile homojenizasyon işlemi yapıldıktan sonra karanlık ortamda yarım saat inkübe edildi. 4 mL 1 M sodyum karbonat çözeltisi eklendikten sonra 45 °C'ye ısıtılmış su banyosunda yarım saat bekletildi. 765 nm dalga boyunda absorbanans değerleri ölçüldü.

#### 3.5.2. Gallik Asit Standart Eğri Grafiği Hazırlama

Santrifüj tüplerine 500 µL gallik asit çözeltisi konulduktan sonra 5 mL %10'luk hazırlanan Folin-Ciocalteu çözeltisi ilave edildi. Vorteks karıştırıcı kullanılarak karışımlar homojen hale getirildikten sonra yarım saat karanlık ortamda inkübe edildi. Sürenin sonunda 4 mL 1 M sodyum karbonat çözeltisi eklendi. Tüpler, 45 °C'ye ısıtılmış su banyosunda yarım saat bekletildi. Soğuduktan sonra spektrofotometrede 765 nm dalga boyunda kör çözeltilisine karşı absorbanans değerleri ölçüldü. Her konsantrasyon için 3 paralel çalışmanın ortalaması alındı. Her konsantrasyona karşılık

gelen absorbans değeri kullanılarak standart gallik asit eğrisi grafiği oluşturuldu ve oluşan eğrinin denklemi bulundu.

### **3.5.3. Bitki Ekstrelerinde Total Fenol Miktar Tayini**

Darası bilinen cam flakonlara 5 mg ekstre tartıldıktan sonra üzerine 5 mL metanol ilave edilerek stok çözeltisi hazırlandı. Santrifüj tüplerine 500 µL stok çözelti konulduktan sonra 5 mL %10'luk hazırlanan Folin-Ciocalteu çözeltisi ilave edildi. Vorteks karıştırıcı kullanılarak karışım homojen hale getirildikten sonra yarım saat oda sıcaklığında ve karanlık ortamda inkübe edildi. Sürenin sonunda 4 mL 1 M sodyum karbonat çözeltisi eklendi. Tüpler, 45 °C'ye ısıtılmış su banyosunda yarım saat bekletildi. Soğuduktan sonra spektrofotometrede 765 nm dalga boyunda kör çözeltiye karşı absorbans değerleri ölçüldü. 3 paralel çalışmanın ortalaması alındı. Bir önceki çalışmada bulunan standart gallik asit eğri denkleminde absorbans değeri yerine konularak fenolik miktar "mg Gallik Asit Eşdeğeri / g Ekstre ± Standart Sapma (GAE ± SS)" cinsinden hesaplandı.

## **3.6. Total Flavonoit Miktar Tayini**

### **3.6.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması**

**Alüminyum Klorür Çözeltisi (%10):** 50 mL'lik balon jøjeye 5 g alüminyum klorür tartılarak konuldu. Bir miktar distile su ile çözüldükten sonra 50 mL'ye tamamlandı.

**Potasyum Asetat Çözeltisi (1 M):** 10 mL'lik balon jøjeye 0.982 g potasyum asetat tartılarak konuldu. Bir miktar distile su ile çözüldükten sonra 10 mL'ye tamamlandı.

**Standart Kersetin Çözeltisi:** Cam flakona tartılan 5 mg kersetin, 5 mL metanol içinde çözümlenerek stok kersetin çözeltisi hazırlandı. Ardından stok kersetin çözeltisi seyreltilerek 12.5, 25, 50, 75, 100, 150 ve 200 µg/mL'lik standart kersetin içeren çözeltiler hazırlandı. Seyreltmeler metanol ile yapıldı.

**Kör Çözeltisi:** 500 µL metanol üzerine sırasıyla 1.5 mL metanol, 0.1 mL %10'luk alüminyum klorür, 0.1 mL 1 M potasyon asetat ve 2.8 mL distile su ilave edildi. Vorteks ile homojenizasyon işlemi yapıldıktan sonra karanlık ortamda oda sıcaklığında yarım saat inkübe edildi. 415 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü.

### **3.6.2. Kersetin Standart Eğri Grafiği Hazırlama**

Santrifüj tüplerine 500 µL kersetin çözeltisi konulduktan sonra sırasıyla 1.5 mL metanol, 0.1 mL %10'luk alüminyum klorür, 0.1 mL 1 M potasyon asetat ve 2.8 mL distile su ilave edildi. Vorteks karıştırıcı kullanılarak karışım homojen hale getirildikten sonra yarım saat oda sıcaklığında ve karanlık ortamda inkübe edildi. Spektrofotometrede 415 nm dalga boyunda köre karşı absorbans değerleri ölçüldü. Her konsantrasyon için 3 paralel çalışmanın ortalaması alındı. Konsantrasyona karşılık gelen absorbans değeri kullanılarak standart kersetin eğrisi grafiği oluşturuldu ve oluşan eğrinin denklemi bulundu.

### **3.6.3. Bitki Ekstrelerinde Total Flavonoit Miktar Tayini**

Darası bilinen cam flakonlara 5 mg ekstre tartıldıktan sonra üzerine 5 mL metanol ilave edilerek stok çözeltisi hazırlandı. Her drog için 3 paralel çalışıldı. Santrifüj tüplerine 500 µL stok çözelti konulduktan sonra sırasıyla 1.5 mL metanol, 0.1 mL %10'luk alüminyum klorür, 0.1 mL 1 M potasyon asetat ve 2.8 mL distile su ilave edildi. Vorteks karıştırıcı kullanılarak karışım homojen hale getirildikten sonra yarım saat oda sıcaklığında ve karanlık ortamda inkübe edildi. Spektrofotometrede 415 nm dalga boyunda köre karşı absorbans değerleri ölçüldü. 3 paralel çalışmanın ortalaması alındı. Bir önceki çalışmada bulunan standart kersetin eğri denkleminde absorbans değeri yerine konularak flavonoit miktar “mg Kersetin / g Ekstre ± Standart Sapma (KE ± SS)” cinsinden hesaplandı.

### **3.7. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC-DAD) ile Rutin ve Apigenin Bileşiklerinin Teşhis ve Miktar Tayini**

#### **3.7.1. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanışı**

Santrifüj tüplerine 500 mg drog tartıldıktan sonra üzerine 5 mL metanol ilave edildi. Her drog için 3 paralel deneme yapıldı. Yarım saat 30 °C'de ultrasonik su banyosunda bekletildi. Sürenin sonunda tüpler santrifüj aletine yerleştirilerek 5000 rpm hızda 10 dakika santrifüj edildi. Toz droğa ait partiküller çöktükten sonra üstte toplanan sıvı faz balona aktarıldı. Adımlar toplamda 3 kez tekrar edildikten sonra işlem sonlandırıldı. Çözeltiler birleştirilerek çözücü alçak basınç altında distillendi.

#### **3.7.2. Örnek Çözeltilerinin Hazırlanışı**

Hazırlanan ekstrelerden 20 mg tartılarak Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne (MATAL) analiz yaptırıldı. KÇY-1, KÇY-2, KÇY-3, KÇM-1, KÇM-2 ve KÇM-3 kodları verilen ekstrele tartım miktarlarına göre uygun oranda metanol:su (80:20, v:v) karışımı ilave edildi. Karışım vortekslendikten sonra filtreden süzülerek cihaza enjekte edildi.

#### **3.7.3. Standart Rutin ve Apigenin Çözeltilerinin Hazırlanışı**

Rutin ve apigenin standartlarının ana stok çözeltileri 1000 µg/mL derişimde metanol:su (80:20, v:v) karışımı kullanılarak hazırlandı.

#### **3.7.4. Standart Rutin ve Apigenine Ait Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması**

Kalibrasyon eğrileri için farklı çalışma derişimleri ana stoktan uygun oranda seyreltilerek hazırlandı. 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0 ve 100.0 µg/mL derişimlerinde çalışıldı. 20 µl enjeksiyon yapılarak alan değerleri ölçüldü. Uygulanan miktara karşı okunan alan değerleriyle rutin ve apigenine ait ölçü eğrisi ve denklem oluşturuldu.

### 3.7.5. Deneyin Yapılışı

Analizler Agilent 1260 Infinity II HPLC-DAD sisteminde gerçekleştirildi. Kolon olarak C18 reverse-phase column (4.6 mm x 25 cm), type Spherisorb ODS-2 5 $\mu$ m, 100 A $^{\circ}$  kullanıldı. Dedektör dalga boyunun 330 nm olduğu yöntemde enjeksiyon hacmi 20  $\mu$ L'dir. Gradient elüsyon ile gerçekleştirilen analizde mobile fazlar su 0.2% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (V/V) (A), metanol (B), asetonyitril (C)'den oluşmaktadır. Gradient elüsyon oranları Tablo 5'te verildi.

Zaman (dakika)	Akış Hızı (mL/dak)	A (%)	B (%)	C (%)
0	1.0	96	2	2
40	1.0	50	25	25
45	1.0	40	30	30
50	1.0	0	50	50
52	1.0	0	50	50
56	1.0	96	2	2

**Tablo 5.** HPLC-DAD Gradient elüsyon oranları

Hazırlanan örnek çözeltiler cihaza enjekte edildi. Okunan alan değerlerine karşılık gelen miktarlar, kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem kullanılarak hesaplandı.

### 3.8. Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz İnhibitör Aktivite

#### 3.8.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

**Fosfat Tampon Çözeltisinin Hazırlanması (PBS):** Bir cam şişeye 0.695 g dipotasyum fosfat ( $K_2HPO_4$ ), 0.136 g sodyum dihidrojen fosfat ( $NaH_2PO_4$ ), 4.385 g sodyum klorür ( $NaCl$ ) ve 0.25 mL tween 20 konuldu. Maddeler distile su içinde çözündürüldü. Manyetik karıştırıcıda homojen hale getirildikten sonra pH 7.5'a ayarlandı. Karışım çözelti distile su ilave edilerek 500 mL'ye tamamlandı.

**Asetilkolinesteraz İnhibitör Aktivite İçin Substrat Çözeltisi Hazırlama:** Bir cam şişeye 0.284 g disodyum hidrojen fosfat ( $Na_2HPO_4$ ), 0.004 g 5,5'-Ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ve 0.0034 g asetiltiyokolin iyodür konuldu. Maddeler distile su içinde çözündürüldü. Manyetik karıştırıcıda homojen hale getirildikten sonra pH 7.5'a ayarlandı. Karışım çözelti distile su ilave edilerek 50 mL'ye tamamlandı.

**Bütirilkolinesteraz İnhibitör Aktivite İçin Substrat Çözeltisi Hazırlama:** Bir cam şişeye 0.284 g disodyum hidrojen fosfat ( $Na_2HPO_4$ ), 0.004 g 5,5'-Ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ve 0.0038 g S-bütiriltiyokolin iyodür konuldu. Maddeler distile su içinde çözündürüldü. Manyetik karıştırıcıda homojen hale getirildikten sonra pH 7.5'a ayarlandı. Karışım çözelti distile su ilave edilerek 50 mL'ye tamamlandı.

**Asetilkolinesteraz Enzim Çözeltisi Hazırlama:** 0.25 U/mL konsantrasyonu içerecek şekilde hazırlandı.

**Bütirilkolinesteraz Enzim Çözeltisi Hazırlama:** 0.25 U/mL konsantrasyonu içerecek şekilde hazırlandı.

**Örnek Çözeltileri Hazırlama:** Darası bilinen cam flakonlara 5 mg ekstre tartıldıktan sonra üzerine 5 mL metanol ilave edilerek stok çözeltisi hazırlandı. Ardından stok çözelti seyreltilerek 20, 200 ve 1000  $\mu g/mL$ 'lik örnek çözeltiler hazırlandı. Seyreltmeler PBS ile yapıldı.

### 3.8.2. Enzim İnhibisyon Tayini

Asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzim inhibitör aktiviteleri ölçmek için Ellman metodu kullanılarak mikropilaya deneyinden yararlanıldı. Deneyin esası, asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzimlerinin sırasıyla asetiltiyokolin ve bütiriltiyokolin substratlarını kataliz etmesi neticesinde meydana gelen tiyokolin-5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile tepkimeye girerek 2-nitrobenzoat-5-merkaptotiyokolin ve sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoat meydana getirmesidir. Bu kapsamda farklı konsantrasyonlarda hazırlanan örnek çözeltilerinden 50 µL alınarak üzerine 50 µL enzim çözeltisi kuyucuklara konulduktan sonra 30 dk inkübe edildi. Sürenin sonunda 100 µL substrat çözeltisi kuyucuklara ilave edildi. Pozitif kontrol olarak galantaminden (IC<sub>50</sub> AChE: 0.043 µg/ml IC<sub>50</sub> BuChE:0.711 µg/ml) yararlanıldı. Reaksiyon sonucunda oluşan sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoat bileşiğine ait absorbans 405 nm dalga boyunda mikropilaya okuyucu kullanılarak ölçüldü. Her bir örnek çözeltisi için 3 paralel deneme yapıldı. Enzimin % inhibisyonu hesaplanırken aşağıda belirtilen formül kullanıldı.

E: Örnek Çözeltisinin Absorbans Değeri

B: Kör Çözeltisinin Absorbans Değeri

C: Kontrol Çözeltisinin Absorbans Değeri

BC: Kontrol Çözeltisinin Körünün Absorbans Değeri

$$\% I = 100 - ((E-B)/(C-BC)) \times 100$$

### 3.9. Hücre Kültürü Çalışmaları ve Antioksidan Enzim Aktivitesi

Çalışmamızda insan nöroblastoma hücre serileri (SH-SY5Y, ATCC CRL-2266) kullanıldı. Hücreler %10 fetal sığır serumu (FBS), 2 mM L-glutamin, 100 U/mL penisilin ve streptomisin içeren besi yeri (DMEM) kullanılarak poli-L-lizin kaplı polistiren hücre kültür kaplarına ekilip, %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C'de inkübe edilerek çoğaltıldı ve 1:4 oranında pasajlandı. Açılan her hücre serisinin kullanım süresi 20 pasajlama sayısı ile sınırlandırıldı. Hücreler istenen oranda çoğaldıktan sonra tripsin (%0.25) yardımı ile flasklardan kaldırılarak santrifüj edildi ve 1:1 oranında hücre süspansiyonu

ve % 0.4 tripan mavisi solüsyonu ile karıştırıldı. Hemositometre lamına yerleştirilerek 1-2 dakika oda sıcaklığında bekletilerek invert mikroskopta sayıldı.

### **3.9.1. Bitki Ekstresi Hazırlanışı**

Sayfa 28’de yer alan Bölüm “3.4.2. Ekstre Hazırlama” kısmında anlatılmış olan bitkisel ekstreler kullanıldı. Hücre kültürü çalışmaları için 10 mg ekstre tartıldı.

### **3.9.2. Hücelere Ekstre Uygulaması**

Hücreler 12 kuyucuklu kültür kaplarında  $0.25 \times 10^6$  hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi ve %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C’ye ayarlanmış inkübatörde 24 saat boyunca inkübe edildi. Hücrelerin adhere olmasını takiben kültür ortamı içinde hazırlanmış ekstreler (1, 10, 100 µg/mL) 2 saat boyunca uygulandı. Ardından hücreler besiyerinde hazırlanmış H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 µM) çözeltisi ile 2 saat muamele edildi. Süre sonunda besiyeri uzaklaştırılıp yenilendi. Taze besiyeri ile hücreler 18 saat inkübe edildi.

### **3.9.3. Hücre Canlılığı Analizi**

Uygulamaların sonunda her bir kuyucuğa 40 µL 5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4,5-dimetil-tiyazolil)-3(4-sülfofenil) tetrazolyum (MTS) çalışma çözeltisi eklendi ve 2 saat süre ile %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C’ye ayarlanmış inkübatörde inkübe edildi. Mikroplaka okuyucu (Multiskan Go, Thermo Scientific) ile her bir kuyucuk 440 nm dalga boyunda okutuldu. Okunan absorbans değerine göre hücre canlılığı belirlendi. Hücre canlılığındaki değişim:  $1 - (\text{test kuyucugunun absorbansı} / \text{kontrol kuyucugunun absorbansı}) \times 100$  denklemi kullanılarak tayin edildi.

### 3.9.4. Hücrelerin Toplanması ve Protein Miktar Tayini

Uygulamaları takiben hücreler soğuk 1x PBS ile süspande edilerek pellet halinde toplandı. Toplanan pellet, proteaz inhibitör kokteyli içeren homojenizasyon tamponu ile soğukta homojenize edildi. 15000xg'de +4°C'da 15 dakika santrifüj edildi. Ayrılan supernatanlar protein miktar tayini için kullanıldı. Toplam protein miktarı bikinkoninik asit (BCA) kiti kullanılarak ölçüldü (Erdogan, Ashour, Yuca, Gorgulu, & Ozpolat, 2021). Ölçüm 562 nm dalga boyunda mikropilaya okuyucuda yapıldı. Sığır serum albümini konsantrasyonlarına karşı okunan absorbans değerleri kullanılarak standart eğri grafiği oluşturuldu ve denklem ile örneklerdeki protein miktarı tayin edildi.

### 3.9.5. Total Antioksidan Durum Ölçümü

Total Antioksidan Durum ölçümü, test edilecek örnekteki antioksidan durumu koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikalinin renksiz olan redüklenmiş ABTS formuna indirgenmesi esasına dayanarak tespit etmeyi sağlamaktadır. 660 nm'de ölçülen absorbans değeri numunenin toplam antioksidan seviyesi ile ilişkilidir. Standart çözelti için yaygın olarak bilinen bir E vitamini analogu olan Troloks çözeltisi kullanıldı. Ekstrelerin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında ve yokluğunda hücrelerdeki total antioksidan durumuna olan etkisi “*Total Antioxidant Status ((TAS) Rel Assay Diyagnostik Gaziantep, Türkiye)*” kiti ile değerlendirildi. Uygulamaları takiben toplanan hücre homojenatları ve standart Troloks çözeltisi (1mM) 18'er µL olacak şekilde 96 kuyucuklu kaplara eklendi. Bunu takiben üzerine 1. çalışma çözeltisi eklendi (*Reagent 1*) ve 30 saniye sonunda 660 nm'de 1. ölçüm alındı (A1). Ardından 2. çalışma çözeltisi eklenerek (*Reagent 2*) 5 dakika 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 660 nm'de 2. ölçüm alındı (A2). Sonuçlar aşağıda belirtilen formül üzerinden hesaplandı ve uygulama yapılmamış hücrelere göre % değişim olarak verildi.

$$A2-A1 = \Delta Abs \text{ (Standart veya örnek)}$$

$$\text{Sonuç (mmol Troloks eşdeğeri/L cinsinden)} = \frac{\Delta Abs_{H_2O} - \Delta Abs_{\text{Örnek}}}{\Delta Abs_{H_2O} - \Delta Abs_{\text{Standart}}}$$

### 3.9.6. Total Oksidan Durum Ölçümü

Total Oksidan Durum ölçümü, test edilecek örnekteki oksidanların ferröz demir şelatör kompleksini ferrik iyonla oksitleyerek renk reaksiyonu oluşturması esasına dayanır. Ferrik iyon, asidik bir ortamda kromojen ile renkli bir kompleks oluşturur. Renk yoğunluğu, örnekte bulunan oksidan moleküllerin toplam miktarı ile ilişkilidir. Standart çözeltisi olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10µM) kullanıldı. Renk değişimi 530 nm'de ölçüldü.

Ekstrelerin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında ve yokluğunda hücrelerdeki total antioksidan durumuna etkisi “*Total Oxidant Status ((TOS) Rel Assay Diyagnostik Gaziantep, Türkiye)*” kiti ile değerlendirildi. Uygulamaları takiben toplanan hücre homojenatları ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> standart çözeltisi (10µM) 45'er µL olarak 96 kuyucuklu kaplara eklendi. Bunu takiben üzerine 1. çalışma çözeltisi eklendi (*Reagent 1*) ve 30 saniye sonunda 530 nm'de 1. ölçüm alındı (A1). Ardından 2. çalışma çözeltisi eklenerek (*Reagent 2*) 5 dakika 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 530 nm'de 2. ölçüm alındı (A2). Sonuçlar aşağıda belirtilen formül üzerinden hesaplanmış ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasına göre % değişim olarak verildi.

$$A2-A1 = \Delta Abs \text{ (Standart veya örnek)}$$

$$\text{Sonuç (}\mu\text{M H}_2\text{O}_2 \text{ eşdeğeri/L cinsinden)} = [\Delta Abs \text{Örnek} / \Delta Abs \text{Standart}] \times 10$$

### 3.9.7. İstatistiksel Değerlendirme

Deney gruplarında tüm örnekler en az üç kez çalışıldı. Elde edilen değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak sunuldu. Değerlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilks ile test edildi, çoklu grup karşılaştırmasında ise tek yönlü varyans analizi post hoc Bonferroni testi kullanıldı.  $p < 0.05$  ise ortalamalar arası fark anlamlı kabul edilmiştir.

## Bulgular

### 4.1. Kalite Kontrol Çalışmalarına Ait Bulgular

#### 4.1.1. Kurutmada Kayıp Miktar Tayini Bulguları

*Paliurus spina-christi* Mill. bitkisine ait KÇM ve KÇY kodlu örnekler üzerinde 3 paralel olarak, “Avrupa Farmakopesi” ve “Türk Farmakopesi”’nde yer alan yöntem kullanılarak kurutmada kayıp miktar tayini yapılmıştır (*European Pharmacopoeia 8.0*, 2013; *Türk Farmakopesi*, 2017). Deney sonucunda elde edilen veriler Tablo 6 ve 7’de gösterilmiştir.

Örnek Kodu	Drog Miktarı (g)	% Kurutmada Kayıp Miktarı
KÇY-1	1.0056	8.7709
KÇY-2	1.0047	7.9228
KÇY-3	1.0108	7.7958
<b>Ortalama ± Standart Sapma: % 8.1632 ± 0.5301</b>		

**Tablo 6.** KÇY örneklerine ait kurutmada kayıp miktar tayini sonuçları

Örnek Kodu	Drog Miktarı (g)	% Kurutmada Kayıp Miktarı
KÇM-1	1.0013	5.6027
KÇM-2	1.0008	5.4057
KÇM-3	1.0010	5.3946
<b>Ortalama ± Standart Sapma: % 5.4677 ± 0.1171</b>		

**Tablo 7.** KÇM örneklerine ait kurutmada kayıp miktar tayini sonuçları

#### 4.1.2. Bütün Kül Miktar Tayini Bulguları

*Paliurus spina-christi* bitkisine ait KÇM ve KÇY kodlu örnekler üzerinde 3 paralel olarak, “Avrupa Farmakopesi” ve “Türk Farmakopesi”nde yer alan yöntem kullanılarak bütün kül miktar tayini yapılmıştır (*European Pharmacopoeia 8.0*, 2013; *Türk Farmakopesi*, 2017). Deney sonucunda elde edilen veriler Tablo 8 ve 9’da gösterilmiştir.

Örnek Kodu	Drog Miktarı (g)	% Bütün Kül Miktarı
KÇY-1	1.0007	8.0444
KÇY-2	1.0004	7.9868
KÇY-3	1.0006	7.9752
<b>Ortalama ± Standart Sapma: % 8.0021 ± 0.0370</b>		

**Tablo 8.** KÇY örneklerine ait bütün kül miktar tayini sonuçları

Örnek Kodu	Drog Miktarı (g)	% Bütün Kül Miktarı
KÇM-1	1.0005	5.2174
KÇM-2	1.0006	4.9970
KÇM-3	1.0007	5.1664
<b>Ortalama ± Standart Sapma: % 5.1269 ± 0.1154</b>		

**Tablo 9.** KÇM örneklerine ait bütün kül miktar tayini sonuçları

#### 4.1.3. Sülfat Külü Miktar Tayini Bulguları

*Paliurus spina-christi* bitkisine ait KÇM ve KÇY kodlu örnekler üzerinde 3 paralel olarak, “Avrupa Farmakopesi” ve “Türk Farmakopesi”nde yer alan yöntem kullanılarak sülfat külü miktar tayini yapılmıştır (*European Pharmacopoeia 8.0*, 2013; *Türk Farmakopesi*, 2017). Deney sonucunda elde edilen veriler Tablo 10 ve 11’de gösterilmiştir.

Örnek Kodu	Drog Miktarı (g)	% Sülfat Külü Miktarı
KÇY-1	1.0013	10.7660
KÇY-2	1.0016	11.0623
KÇY-3	1.0016	11.1322
<b>Ortalama ± Standart Sapma: % 10.9868 ± 0.1944</b>		

**Tablo 10.** KÇY örneklerine ait sülfat külü miktar tayini sonuçları

Örnek Kodu	Drog Miktarı (g)	% Sülfat Külü Miktarı
KÇM-1	1.0007	6.7952
KÇM-2	1.0006	7.1357
KÇM-3	1.0006	6.5761
<b>Ortalama ± Standart Sapma: % 6.8357 ± 0.2820</b>		

**Tablo 11.** KÇM örneklerine ait sülfat külü miktar tayini sonuçları

#### 4.1.4. Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül Miktar Tayini Bulguları

*Paliurus spina-christi* bitkisine ait KÇM ve KÇY kodlu örnekler üzerinde 3 paralel olarak, “Avrupa Farmakopesi” ve “Türk Farmakopesi”nde yer alan yöntem kullanılarak hidroklorik asitte çözünmeyen kül miktar tayini yapılmıştır (*European Pharmacopoeia 8.0*, 2013; *Türk Farmakopesi*, 2017). Deney sonucunda elde edilen veriler Tablo 12 ve 13’te gösterilmiştir.

Örnek Kodu	Drog Miktarı (g)	% HCl Çözünmeyen Kül Miktarı
KÇY-1	1.0007	0.1899
KÇY-2	1.0004	0.0700
KÇY-3	1.0006	0.0800
<b>Ortalama ± Standart Sapma: % 0.1133 ± 0.0665</b>		

**Tablo 12.** KÇY örneklerine ait HCl çözünmeyen kül miktar tayini sonuçları

Örnek Kodu	Drog Miktarı (g)	% HCl Çözünmeyen Kül Miktarı
KÇM-1	1.0005	0.1099
KÇM-2	1.0007	0.0500
KÇM-3	1.0006	0.0700
<b>Ortalama ± Standart Sapma: % 0.0766 ± 0.0305</b>		

**Tablo 13.** KÇM örneklerine ait HCl çözünmeyen kül miktar tayini sonuçları

## 4.2. Ekstre Verimi

KÇM ve KÇY kodlu metanol ekstrelerinin tartımı alınarak verim hesabı yapılmıştır. Elde edilen veriler Tablo 14’te gösterilmiştir.

Örnek Kodu	Drog Miktarı (g)	Ekstre Miktarı (g)	% Verim
KÇY	15.0025	3.8332	25.5504
KÇM	15.0004	1.5848	10.5651

**Tablo 14.** KÇM ve KÇY ekstrelerine ait verim sonuçları

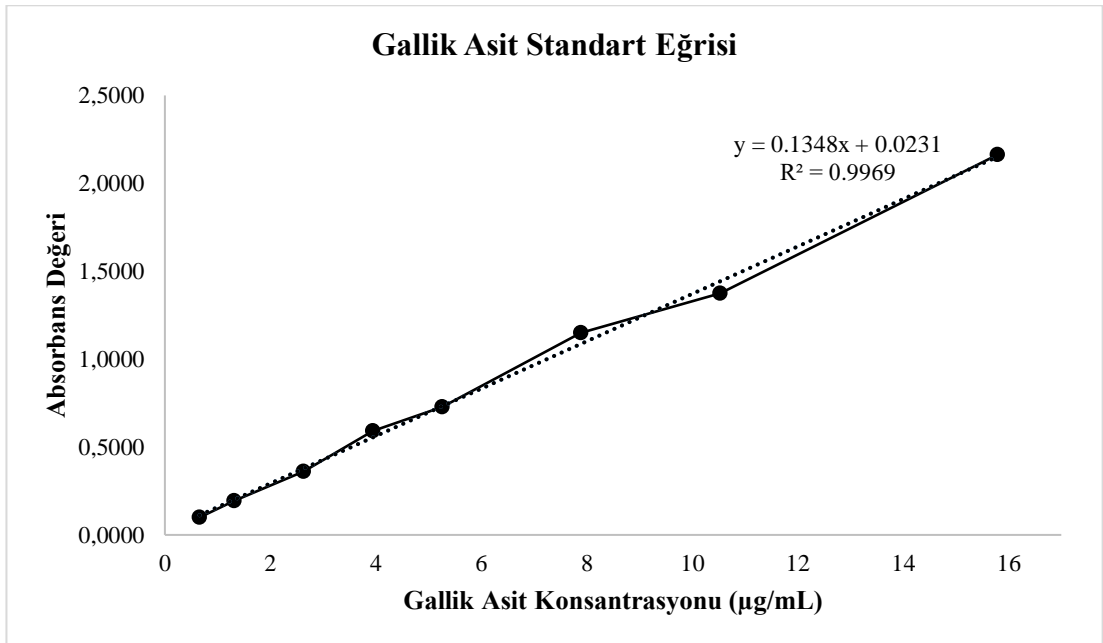
## 4.3. Total Fenol Miktar Tayini Çalışmalarına Ait Bulgular

### 4.3.1. Gallik Asit Standart Eğri Grafiği Bulguları

Total fenol madde miktarı analizi için çeşitli konsantrasyonlardaki gallik asit çözeltilerinin 765 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçülerek gallik asit standart eğrisi oluşturulmuştur. Deney sonucunda elde edilen ortalama absorbans değerleri “Ortalama  $\pm$  Standart Sapma” şeklinde Tablo 15’te gösterilmiştir. Bu değerlerle oluşturulan gallik asit standart eğrisine ise Grafik 1’de yer verilmiştir.

Gallik Asit Çalışma Çözültisi Konsantrasyonu (µg/mL)	Gallik Asit Çalışma Çözültisi Son Konsantrasyonu (µg/mL)	Ortalama Absorbans Değeri ± SS
12.5	0.6579	0.0993 ± 0.0067
25	1.3158	0.1947 ± 0.0035
50	2.6316	0.3597 ± 0.0032
75	3.9474	0.5920 ± 0.0080
100	5.2632	0.7267 ± 0.0208
150	7.8947	1.1490 ± 0.0040
200	10.5263	1.3740 ± 0.0259
300	15.7895	2.1623 ± 0.0265

**Tablo 15.** Farklı konsantrasyondaki gallik asit çözültilerine ait absorbans değerleri



**Grafik 1.** Gallik asit standart eğrisi

#### 4.3.2. Bitki Ekstrelerinde Total Fenol Miktar Tayini Bulguları

KÇY ve KÇM kodlu örneklerin metanol ekstreleri 765 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçülmüş ve ortalaması alınmıştır. Gallik asit standart eğrisinde çıkan denklem ile total fenol miktar hesaplanmıştır. Deneyden elde edilen sonuçlar “mg GAE / g Ekstre ± Standart Sapma” şeklinde Tablo 16 ve 17’de gösterilmiştir.

Örnek Kodu	Absorbans Değeri	Total Fenol Madde Miktarı (mg GAE/g ekstre) ± SS
KÇY	0.7170	97.8056
	0.7760	106.1217
	0.7680	104.9941
<b>Ortalama Total Fenol Madde Miktarı ± SS: 102.9738 ± 4.5112</b>		
<b>Ortalama Absorbans Değeri ± SS: 0.7537 ± 0.02374</b>		

**Tablo 16.** KÇY metanol ekstrelerinin total fenol miktar tayini sonuçları

Örnek Kodu	Absorbans Değeri	Total Fenol Madde Miktarı (mg GAE/g ekstre) ± SS
KÇM	0.4370	58.3394
	0.4710	63.1318
	0.4820	64.6822
<b>Ortalama Total Fenol Madde Miktarı ± SS: 62.0511 ± 3.3066</b>		
<b>Ortalama Absorbans Değeri ± SS: 0.4633 ± 0.0235</b>		

**Tablo 17.** KÇM metanol ekstrelerinin total fenol miktar tayini sonuçları

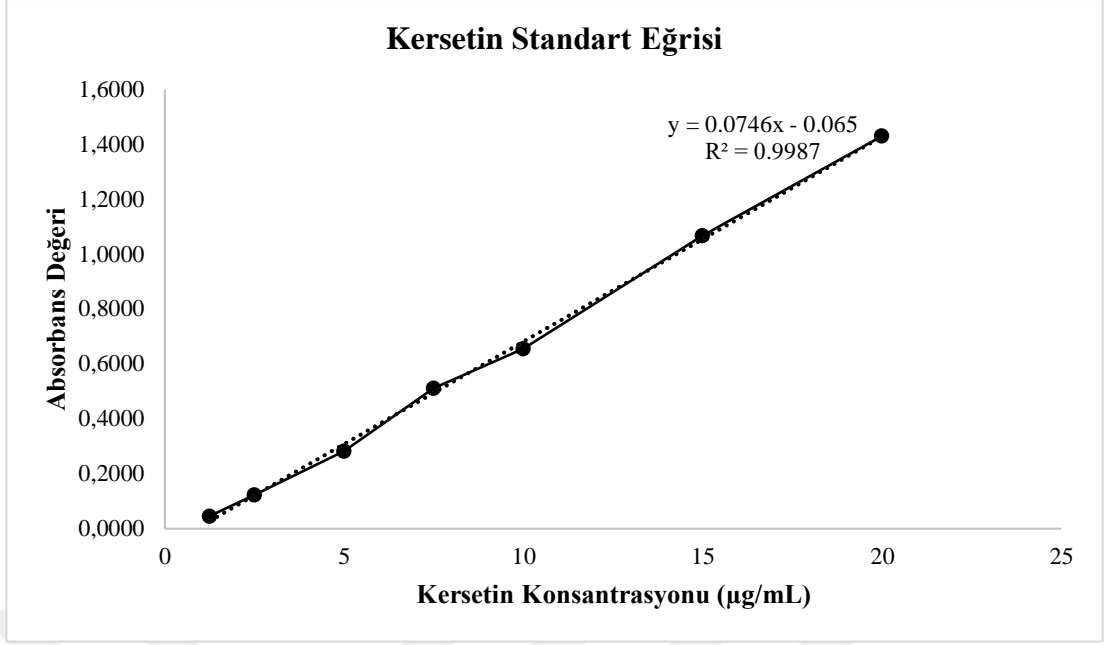
#### 4.4. Total Flavonoit Miktar Tayini Çalışmalarına Ait Bulgular

##### 4.4.1. Kersetin Standart Eğri Grafiği Bulguları

Total flavonoit madde miktarı analizi için çeşitli konsantrasyonlardaki kersetin çözeltilerinin 415 nm dalga boyundaki absorbands değerleri ölçülerek kersetin standart eğrisi oluşturulmuştur. Deney sonucunda elde edilen ortalama absorbands değerleri “Ortalama  $\pm$  Standart Sapma” şeklinde Tablo 18’de gösterilmiştir. Bu değerlerle oluşturulan kersetin standart eğrisine ise Grafik 2’de yer verilmiştir.

Kersetin Çalışma Çözeltisi Konsantrasyonu ( $\mu\text{g/mL}$ )	Kersetin Çalışma Çözeltisi Son Konsantrasyonu ( $\mu\text{g/mL}$ )	Ortalama Absorbans Değeri $\pm$ SS
12.5	1.25	0.0460 $\pm$ 0
25	2.5	0.1230 $\pm$ 0.001
50	5	0.2833 $\pm$ 0.0112
75	7.5	0.5113 $\pm$ 0.0067
100	10	0.6550 $\pm$ 0
150	15	1.0673 $\pm$ 0.0419
200	20	1.4293 $\pm$ 0.0220

**Tablo 18.** Farklı konsantrasyondaki kersetin çözeltilerine ait absorbands değerleri



**Grafik 2.** Kersetin standart eğrisi

#### 4.4.2. Bitki Ekstrelerinde Total Flavonoit Miktar Tayini Bulguları

KÇY ve KÇM kodlu örneklerin metanol ekstreleri 415 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçülmüş ve ortalaması alınmıştır. Kersetin standart eğrisinde çıkan denklem ile total flavonoit miktarı hesaplanmıştır. Deneyden elde edilen sonuçlar “mg KE / g Ekstre ± Standart Sapma” şeklinde Tablo 19 ve 20’de gösterilmiştir.

Örnek Kodu	Absorbans Değeri ± SS	Total Flavonoit Madde Miktarı (mg KE/g ekstre) ± SS
KÇY	0.4220	65.2815
	0.4650	71.0456
	0.4550	69.7051
<b>Ortalama Total Fenol Madde Miktarı ± SS: 68.6751 ± 3.0163</b>		
<b>Ortalama Absorbans Değeri ± SS: 0.4473 ± 0.0225</b>		

**Tablo 19.** KÇY metanol ekstrelerinin total flavonoit miktar tayini sonuçları

Örnek Kodu	Absorbans Değeri ± SS	Total Flavonoit Madde Miktarı (mg KE/g ekstre) ± SS
KÇM	0.2890	47.4531
	0.2750	45.5764
	0.2900	47.5871
<b>Ortalama Total Fenol Madde Miktarı ± SS: 46.8722 ± 1.1242</b>		
<b>Ortalama Absorbans Değeri ± SS: 0.2847 ± 0.0084</b>		

**Tablo 20.** KÇM metanol ekstrelerinin total flavonoit miktar tayini sonuçları

#### 4.5. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC-DAD) ile Rutin ve Apigenin Bileşiklerinin Teşhis ve Miktar Tayinine Ait Bulgular

##### 4.5.1. Bitki Ekstre Verimi

Analiz için hazırlanan KÇY ve KÇM kodlu ekstrelerin % verim değerleri Tablo 21 ve 22’de verilmiştir.

Örnek Kodu	Drog Miktarı (g)	Ekstre Miktarı (g)	% Verim
KÇY-1	0.5000	0.1003	20.0600
KÇY-2	0.5000	0.1185	23.7000
KÇY-3	0.5003	0.1104	22.0668
<b>Ortalama ± Standart Sapma: % 21.9423 ± 1.8232</b>			

**Tablo 21.** KÇY örneklerine ait % verim sonuçları

Örnek Kodu	Drog Miktarı (g)	Ekstre Miktarı (g)	% Verim
KÇM-1	0.5000	0.0531	10.6200
KÇM-2	0.5005	0.0482	9.6304
KÇM-3	0.5001	0.0376	7.5185
<b>Ortalama ± Standart Sapma: % 9.2563 ± 1.5842</b>			

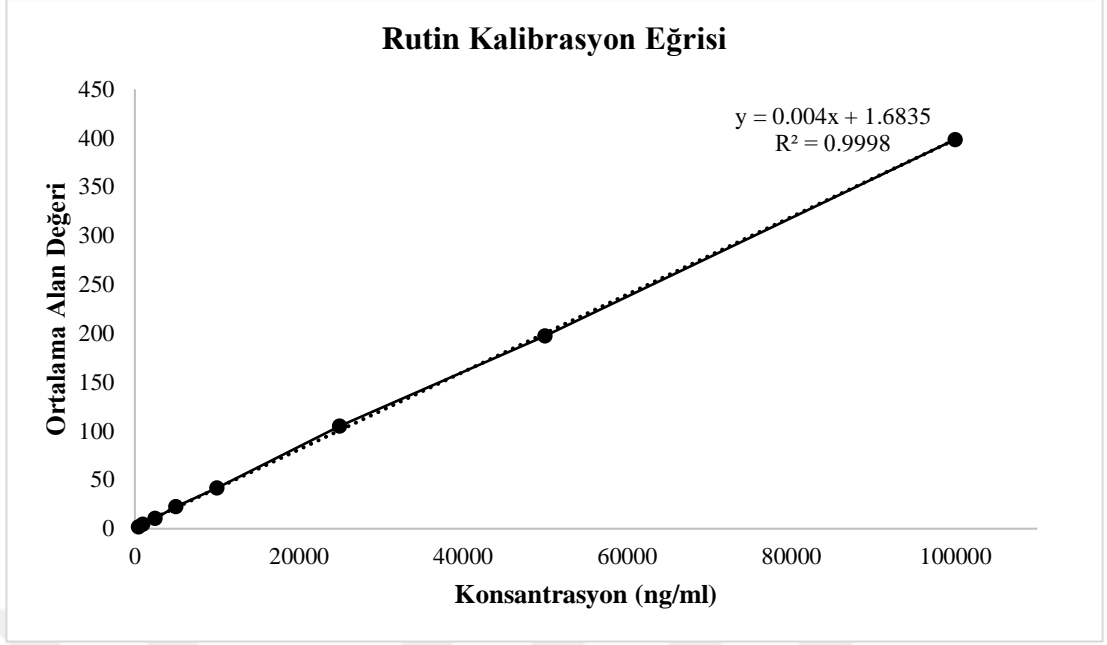
**Tablo 22.** KÇM örneklerine ait % verim sonuçları

#### 4.5.2. Standart Rutin Kalibrasyon Eğrisi Hazırlanışı

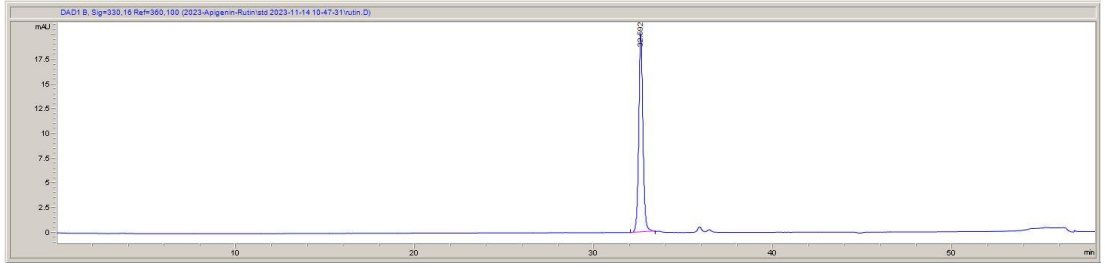
Ana stoktan seyreltilerek farklı çalışma derişimlerinde hazırlanan rutin çözeltilerinin ölçüm sonuçları Tablo 23'te verilmiştir. Konsantrasyona karşılık gelen ortalama alan değerleri ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi Grafik 3'te gösterilmiştir. Standart olarak kullanılan rutin kromatogramı ise Şekil 4'te gösterilmiştir.

Konsantrasyon ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rutin İçin Ort. Alan Değerleri
0.5	2
1.0	4.5
2.5	10.7
5.0	22.9
10.0	41.9
25.0	105.1
50.0	197.5
100.0	398.6

**Tablo 23.** Rutin çözeltileri konsantrasyonuna karşılık gelen HPLC-DAD'da okunan ortalama alan değerleri



**Grafik 3.** Rutin için kalibrasyon eğrisi



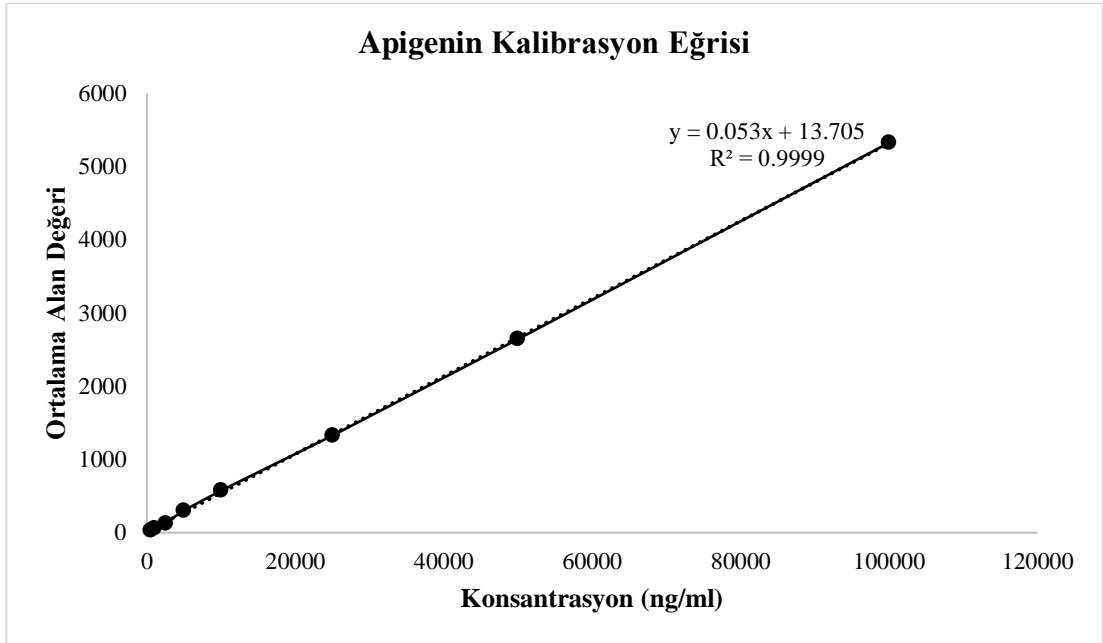
**Şekil 4.** Standart rutine ait HPLC kromatogramı ( $R_T = 33.1$  dakika)

#### 4.5.3. Standart Apigenin Kalibrasyon Eğrisi Hazırlanışı

Ana stoktan seyreltilerek farklı çalışma derişimlerinde hazırlanan apigenin çözeltilerinin ölçüm sonuçları Tablo 24'te verilmiştir. Konsantrasyona karşılık gelen ortalama alan değeri ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi Grafik 4'te gösterilmiştir. Standart olarak kullanılan apigeninin kromatogramı Şekil 5'te gösterilmiştir.

Konsantrasyon ( $\mu\text{g/mL}$ )	Apigenin İçin Ort Alan Değerleri
0.5	29.1
1.0	60.1
2.5	130
5.0	301.9
10.0	577.6
25.0	1326.2
50.0	2644.7
100.0	5322.9

**Tablo 24.** Apigenin özelti konsantrasyonuna karşılık gelen HPLC-DAD’da okunan ortalama alan değerleri



**Grafik 4.** Apigenin için kalibrasyon eğrisi



**Şekil 5.** Standart apigenine ait HPLC kromatogramı ( $R_T = 49.7$  dakika)

#### **4.5.4. Bitki Ekstrelerine Ait HPLC-DAD Bulguları**

KÇY-1, KÇY-2, KÇY-3, KÇM-1, KÇM-2 ve KÇM-3 kodları verilen ekstreler HPLC-DAD cihazına enjekte edildikten sonra alan değerleri okunmuştur. Çalışmada her örnek iki kez tekrarlanmıştır. Alan değerleri, kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklemde yerine yerleştirilerek konsantrasyon hesaplanmıştır. Çalışılan örneklerde apigenin varlığı kantitatif düzeyde saptanamamış olup her iki örnekte de rutin teşhis edilmiş ve miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Ekstrelelere ait rutin ve apigenin konsantrasyon bulguları sırasıyla Tablo 25, 26, 27 ve 28’de gösterilmiştir.

<b>Örnek Kodu</b>	<b>Rutin Konsantrasyonu (µg/mL)</b>	<b>Rutin Miktarı (µg/g)</b>
KÇY 1-1	31.1800	3118.0
KÇY 1-2	29.5800	2958.0
KÇY 2-1	29.3800	2938.0
KÇY 2-2	29.9000	2990.0
KÇY 3-1	28.9500	2895.0
KÇY 3-2	28.6800	2868.0
<b>Ortalama ± Standart Sapma: 2961.1667 ± 88.3548 µg/g</b>		

**Tablo 25.** KÇY ekstre örneklerine ait rutin konsantrasyon değerleri

<b>Örnek Kodu</b>	<b>Rutin Konsantrasyonu (µg/mL)</b>	<b>Rutin Miktarı (µg/g)</b>
KÇM 1-1	36.1300	3613.0
KÇM 1-2	36.3800	3638.0
KÇM 2-1	38.7300	3873.0
KÇM 2-2	38.3300	3833.0
KÇM 3-1	32.9300	3293.0
KÇM 3-2	33.1300	3313.0
<b>Ortalama ± Standart Sapma: 3593.8333 ± 247.7179 µg/g</b>		

**Tablo 26.** KÇM ekstre örneklerine ait rutin konsantrasyon değerleri

Örnek Kodu	Apigenin Konsantrasyonu (µg/mL)
KÇY 1-1	<LOQ
KÇY 1-2	<LOQ
KÇY 2-1	<LOQ
KÇY 2-2	<LOQ
KÇY 3-1	<LOQ
KÇY 3-2	<LOQ
<b>Ortalama ± Standart Sapma: 0.0000 ± 0.0000</b>	

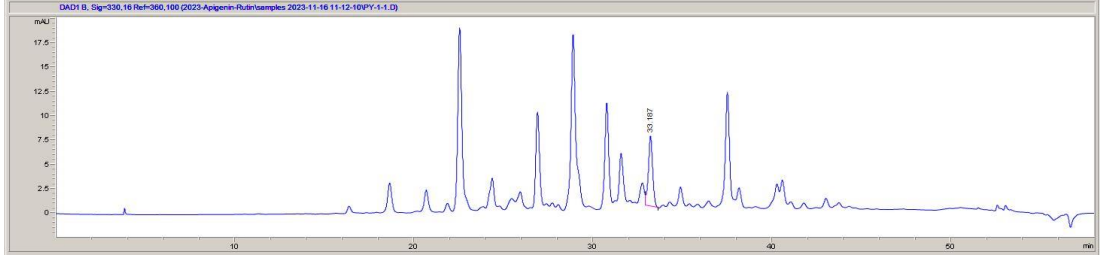
**Tablo 27.** KÇY ekstre örneklerine ait apigenin konsantrasyon değerleri

Örnek Kodu	Apigenin Konsantrasyonu (µg/mL)
KÇM 1-1	<LOQ
KÇM 1-2	<LOQ
KÇM 2-1	<LOQ
KÇM 2-2	<LOQ
KÇM 3-1	<LOQ
KÇM 3-2	<LOQ
<b>Ortalama ± Standart Sapma: 0.0000 ± 0.0000</b>	

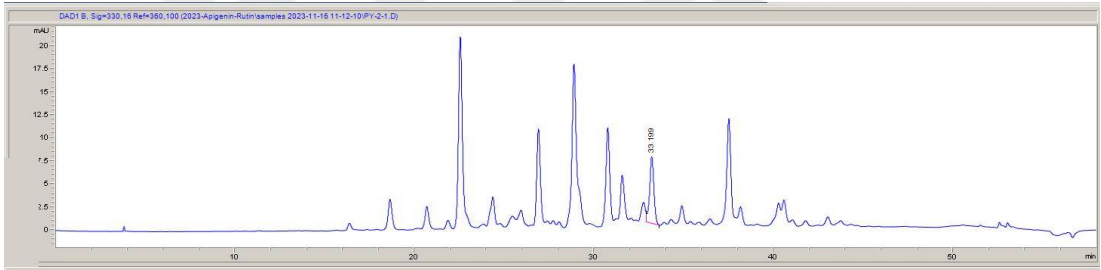
**Tablo 28.** KÇM ekstre örneklerine ait apigenin konsantrasyon değerleri

#### 4.5.5. Bitki Ekstrelerine Ait HPLC-DAD Kromatogramları

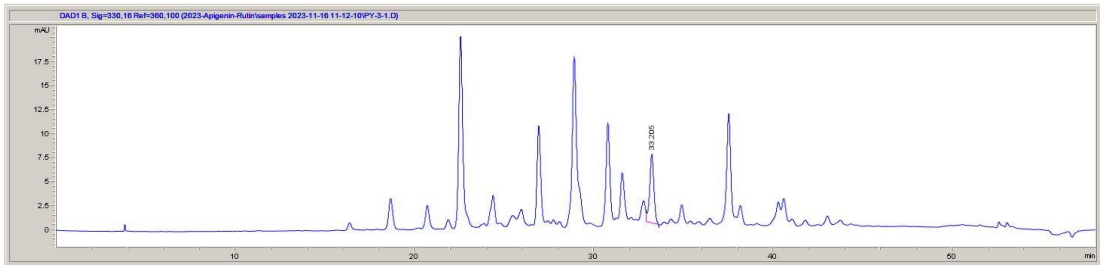
Bitki ekstrelerine ait HPLC-DAD kromatogramları Şekil 6, 7, 8, 9, 10 ve 11’de gösterilmiştir.



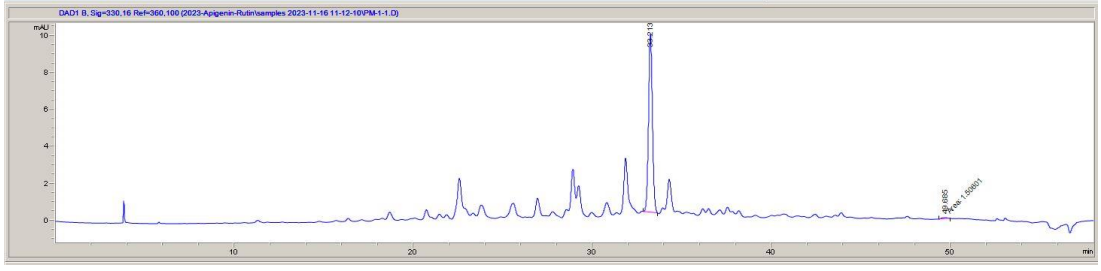
Şekil 6. KÇY 1 örneği için HPLC kromatogramı



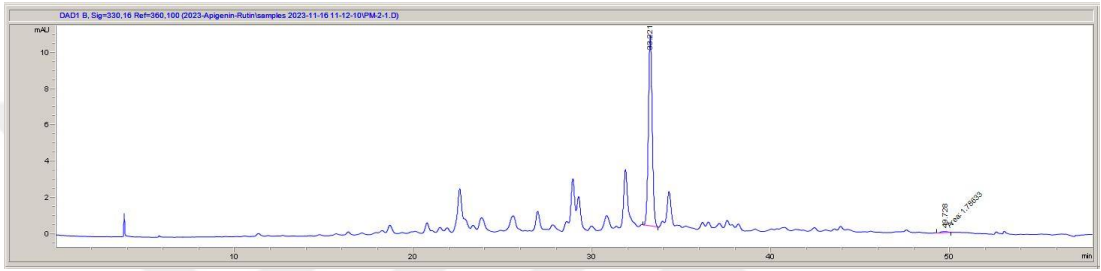
Şekil 7. KÇY 2 örneği için HPLC kromatogramı



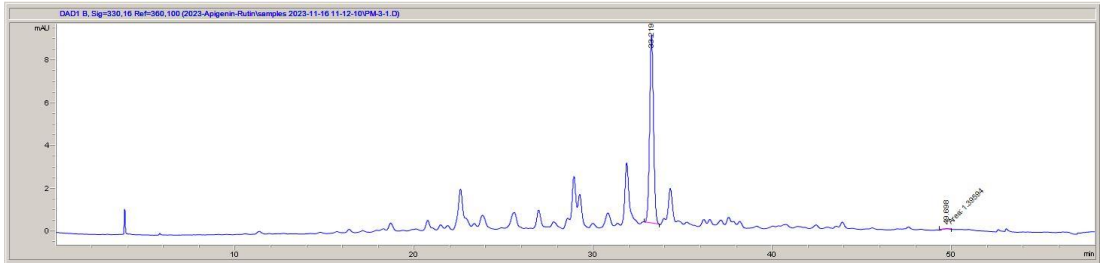
Şekil 8. KÇY 3 örneği için HPLC kromatogramı



Şekil 9. KÇM 1 örneği için HPLC kromatogramı



Şekil 10. KÇM 2 örneği için HPLC kromatogramı



Şekil 11. KÇM 3 örneği için HPLC kromatogramı

#### 4.5.6. Rutin Miktar Tayini Validasyonu

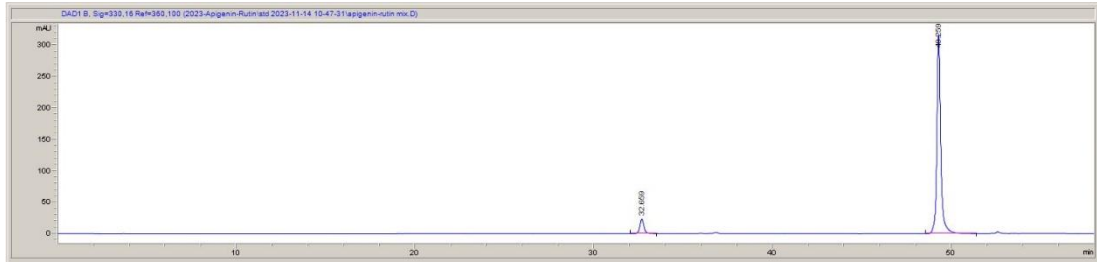
Kullanılacak yöntemin geçerliliğini ispat edecek doğrusallık, seçicilik, tanımlama ve ölçüm limiti ve doğruluk parametrelerini içeren yöntem validasyon çalışmasına ait sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

#### 4.5.6.1. Doğrusallık

8 ayrı konsantrasyonda hazırlanan standart çözeltiler HPLC-DAD cihazına enjeksiyon edildi ve bu konsantrasyonlardaki rutin miktarı cihaz tarafından ölçülerek alanına karşılık gelen konsantrasyon grafiği oluşturuldu. Rutine ait standart grafik Grafik 3'te belirtilmiştir ve değerler Tablo 23'te gösterilmiştir.

#### 4.5.6.2. Özgülük (Seçicilik)

Özgülük, bir analitin tanımlanmasında ve/veya miktarının belirlenmesinde diğer maddelerin (örneğin safsızlıklar, bozunma ürünleri, ilgili maddeler, matrisler veya mevcut olması muhtemel diğer bileşenler) varlığından etkilenmediğini ifade etmektedir (ICH Steering Committee, 2023). Standart rutin pikine ait retansiyon zamanı ve kromatogramı karşılaştırılarak ekstredeki rutin varlığı saptanmıştır. Yöntemin, standart rutin ( $R_T$ : 33.1 dk) ve apigeninin ( $R_T$ : 49.7 dk) alıkonma zamanları karşılaştırıldığında aynı anda tayin edilebilmesi için uygun olduğu gösterilmiştir.



Şekil 12. Rutin ve apigenin standartlarına ait HPLC kromatogramı

#### 4.5.6.3. Tanımlama Limiti (LOD) ve Ölçüm (Rapor) Limiti (LOQ)

Tanımlama limiti (LOD), analitin güvenli şekilde tespit edilebildiği en düşük konsantrasyonu; ölçüm (rapor) limiti (LOQ), ise analitin güvenli şekilde tespit edilebildiği en düşük miktarı ifade etmektedir. Sinyal (S) ve gürültü (N) yüksekliğine dayanarak hesaplama yapılmaktadır. LOD değeri  $(S/N)*3$ ; LOQ değeri  $(S/N)*10$  formülleri kullanılarak hesaplanabilir (ICH Steering Committee, 2023). Rutin için

LOD ((S/N)\*3) ve LOQ ((S/N)\*10) değerleri S/N üzerinden hesaplandı. Hesaplamaya ait veriler ve sonuçlar Tablo 29'da gösterildi.

Kör Sinyal Yüksekliği	0.028
En Düşük Derişim Sinyal Yüksekliği	0.13
Rutin Standardın Derişimi	0.1
LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.065
LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.005

**Tablo 29.** Rutin için tanımlama ve ölçüm limit verileri ve sonuçları

#### 4.5.6.4. Doğruluk (Gerçeklik)

Doğruluk parametresi için konsantrasyonu bilinen rutin ekstrelelere eklenerek geri kazanım işlemi 3 farklı derişimde gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 30'da verildi.

Rutin Eklenen Derişim ( $\mu\text{g/mL}$ )	Geri Kazanım (%)
10	101.1 $\pm$ 1.6
25	100.9 $\pm$ 3.3
50	100.7 $\pm$ 1.9

**Tablo 30.** Rutin için geri kazanım yüzdeleri

#### 4.6. Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz İnhibitör Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular

Mikroplakalar 405 nm dalga boyunda 3'er kez ölçülmüştür. Deney sonucunda elde edilen % inhibisyon değerleri (I) Tablo 31, 32, 33 ve 34'te gösterilmiştir.

Konsantrasyon ( $\mu\text{g/mL}$ )	Son Konsantrasyon ( $\mu\text{g/mL}$ )	% I
1000	250	% 18.2149
200	50	% 3.8251
20	5	% 0.1821

**Tablo 31.** Yaprak ekstralarına ait asetilkolinesteraz inhibisyon sonuçları

Konsantrasyon ( $\mu\text{g/mL}$ )	Son Konsantrasyon ( $\mu\text{g/mL}$ )	% I
1000	250	% 24.2833
200	50	% 7.3356
20	5	% 3.7943

**Tablo 32.** Yaprak ekstralarına ait bütirilkolinesteraz inhibisyon sonuçları

Konsantrasyon ( $\mu\text{g/mL}$ )	Son Konsantrasyon ( $\mu\text{g/mL}$ )	% I
1000	250	% 40.9091
200	50	% 6.7273
20	5	% 0.3636

**Tablo 33.** Meyve ekstralarına ait asetilkolinesteraz inhibisyon sonuçları

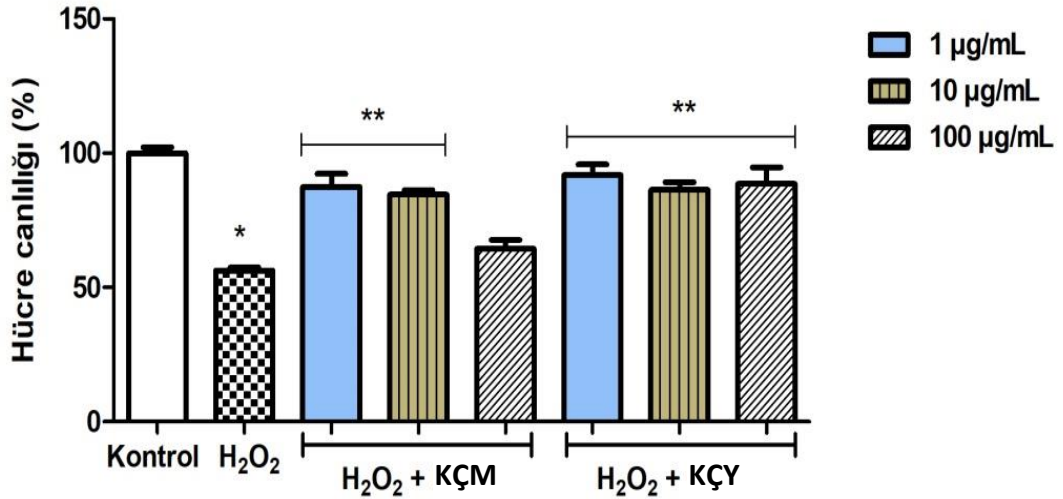
Konsantrasyon ( $\mu\text{g/mL}$ )	Son Konsantrasyon ( $\mu\text{g/mL}$ )	% I
1000	250	% 44.9050
200	50	% 6.2176
20	5	% 1.8998

**Tablo 34.** Meyve ekstrilerine ait bütirilkolinesteraz inhibisyon sonuçları

#### 4.7. Hücre Kültürü Çalışmaları ve Antioksidan Enzim Aktivitesi Ait Bulgular

##### 4.7.1. Hücre Canlılığı Analizine Ait Bulgular

Hidrojen peroksitle indüklenmiş oksidatif stres koşullarında 1, 10, 100  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonlarında hazırlanan ekstrilerin SH-SY5Y hücrelerinde hücre canlılığına etkisi incelenmiştir. Deney sonucunda elde edilen değerler Grafik 5'te gösterilmiştir.



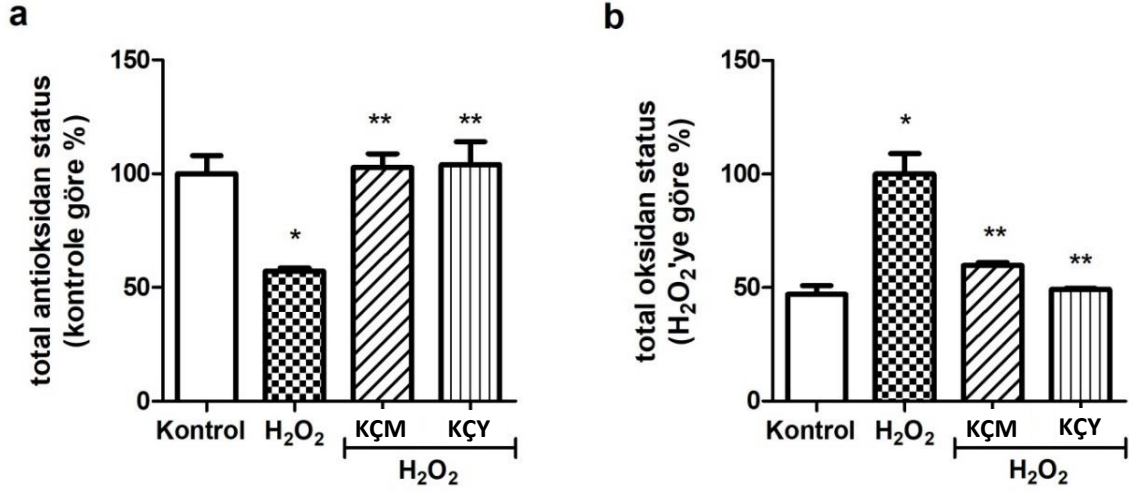
**Grafik 5.** KÇM ve KÇY ekstrilerin (1, 10, 100  $\mu\text{g/mL}$ ) SH-SY5Y hücrelerinde hücre canlılığına etkisi

\* $p < 0.05$ ; uygulama yapılmamış hücrelerle karşılaştırıldığında hücre canlılığında anlamlı azalma

\*\* $p < 0.05$ ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanan hücrelerle karşılaştırıldığında hücre canlılığında anlamlı artış

#### 4.7.2. Total Oksidan ve Antioksidan Durumuna Ait Bulgular

Ekstrelerin (1 µg/mL) hidrojen peroksitle (200 µM) indüklenmiş SH-SY5Y hücrelerinde total antioksidan durum (TAS) ve total oksidan durum (TOS) üzerine etkisi incelenmiştir. Deney sonucunda elde edilen değerler Grafik 6'da gösterilmiştir.



**Grafik 6.** KÇM ve KÇY ekstrelerinin (1µg/mL) SH-SY5Y hücrelerinde a) total antioksidan durum (TAS) ve b) total oksidan durum (TOS) üzerine etkisi

\*p<0.05; uygulama yapılmamış hücrelerle karşılaştırıldığında anlamlı değişim

\*\*p<0.05; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanan hücrelerle karşılaştırıldığında anlamlı değişim

## Tartışma

Çalışmamızda, *Paliurus spina-christi* Mill. bitkisinin en çok kullanılan kısımları olduğu tespit edilen yaprak ve meyve kısmı için botanik bilgiler, kimyasal içeriği, gösterdiği biyolojik aktiviteler ve halk tıbbında kullanımı konu başlıklarından yola çıkılarak daha önce yapılan çalışmalar incelenmiş ve detaylı bir derleme hazırlanmıştır.

### 5.1. Kalite Kontrol Çalışmaları

Bitki materyalimiz, Ege Üniversitesi Kampüsü'nden Mayıs ayında çiçeklenme döneminde ve Temmuz ayında meyveli dönemde olmak üzere iki farklı zamanda toplanmıştır. Uygun şartlarda kurutulmuş toz hale getirilen örnekler çalışmalarda kullanılmaya hazır hale getirilmiştir. “Türk Farmakopesi” ve çeşitli monograflarda bitkiye ait bir monograf bulunmaması sebebiyle örnekler için ileride hazırlanabilecek monograflara yardımcı olabilecek kalite kontrol çalışmaları yapılmıştır. Gravimetrik yöntemlere dayalı kurutmada kayıp, bütün kül miktar tayini, sülfat külü miktar tayini ve hidroklorik asitte çözünmeyen kül miktarı tayini çalışmaları “Avrupa Farmakopesi 8.0” ve “Türk Farmakopesi”nde yer alan yöntemler esas alınarak yapılmıştır (European Pharmacopoeia 8.0, 2013; Türk Farmakopesi, 2017).

Kurutmada kayıp miktar tayini deneyinde, KÇY kodlu örnekler için ortalama % 8.1632, KÇM kodlu örnekler için ortalama % 5.4677 oranında nem tespit edilmiştir. Yaprak ve meyve örnekleri arasında karşılaştırma yapıldığında yaprak örneklerinin daha yüksek oranda nem içerdiği bulunmuştur.

Bütün kül miktar tayini deneyinde, KÇY kodlu örnekler için ortalama % 8.0021, KÇM kodlu örnekler için ortalama % 5.1269 oranında kül tespit edilmiştir. Yaprak ve meyve örnekleri arasında karşılaştırma yapıldığında yaprak örneklerinin daha yüksek oranda kül içerdiği bulunmuştur.

Sülfat külü miktar tayini deneyinde, KÇY kodlu örnekler için ortalama % 10.9868, KÇM kodlu örnekler için ortalama % 6.8357 oranında sülfat külü tespit edilmiştir. Yaprak ve meyve drog örnekleri arasında karşılaştırma yapıldığında yaprak droglarının daha yüksek oranda sülfat külü içerdiği bulunmuştur.

HCl'de çözünmeyen kül miktar tayini deneyinde, KÇY kodlu örnekler için ortalama % 0.1133, KÇM kodlu örnekler için ortalama % 0.0766 oranında HCl'de çözünmeyen kül tespit edilmiştir. Yaprak ve meyve drog örnekleri arasında karşılaştırma yapıldığında yaprak droglarının daha yüksek oranda HCl'de çözünmeyen kül içerdiği bulunmuştur.

Ekstre verimi bakımından değerlendirildiğinde yaprak droğunda verimin % 25.5504, meyve droğunda ise % 10.5651 olduğu saptanmıştır. İki drog karşılaştırıldığında yaprak droğundan daha yüksek verimde ekstre elde edilmiştir.

## **5.2. Total Fenolik ve Flavonoit Miktar Tayini**

Literatür araştırmasında, bitkinin yaprak ve meyve droğunun flavonoitlerin de dahil olduğu fenolik bileşiklerce zengin olduğu tespit edilmiştir. Bu grup bileşiklerin antioksidan aktivitede önemli rol oynayan bitki sekonder metabolitleri arasında yer alması sebebiyle çalışmamızda bitkiden hazırlanan ekstrelerde kantitatif yöntemler kullanılarak söz konusu metabolit gruplarının toplam miktarı tespit edilmiştir. Çalışma kapsamında, spektrofotometrik esasa dayalı total fenol miktar tayini, total flavonoit miktar tayini yapılmıştır.

### **5.2.1. Total Fenolik Miktar Tayini**

Gallik asit üzerinden yapılan total fenol miktar tayini deneyinde, gallik asit standart eğrisinden bulunan denklem kullanılarak ekstrelerin içerdikleri gallik asit miktarı hesaplanmıştır. KÇY kodlu örnekler için ortalama 102.9738 mg GAE/g ekstre, KÇM

kodlu örnekler için ortalama 62.0551 mg GAE/g ekstre değerleri bulunmuştur. Yaprak ve meyve drog sonuçları karşılaştırıldığı zaman yaprak droğunda daha fazla fenolik madde bulunduğu tespit edilmiştir.

Kırca ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, meyve ve yapraklı dallarından hazırlanan metanol ekstralarının gallik asit üzerinden hesaplanan total fenol bileşen miktarı sırasıyla  $91.20 \pm 3.89$  mg GAE/g ve  $75.50 \pm 0.35$  mg GAE/g olarak bulunmuştur (Kırca & Arslan, 2008). Şen tarafından yapılan çalışmada, yaprak, dal ve meyve kısımlarından hazırlanan etanol, n-hekzan, kloroform, etil asetat ve sulu etanol ekstralarının gallik asit üzerinden total fenol bileşen miktarı hesaplanmıştır. Deney sonucunda en yüksek sonucu  $216.2 \pm 2.92$  mg GAE/g ekstre değeri ile dalın etanol ekstresi almıştır. Yaprak ekstraları arasında en yüksek miktar  $210.0 \pm 3.98$  mg GAE/g ekstre değeri ile etil asetat ekstresinde bulunmuştur. Meyve ekstraları arasında en yüksek miktara  $85.13 \pm 1.27$  mg GAE/g ekstre ile kloroform ekstresinde rastlanmıştır (Şen, 2018). Ceylan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, iki farklı lokasyondan toplanan yaprak kısmından hazırlanan metanol ekstralarının gallik asit üzerinden hesaplanan total fenol bileşen miktarı sırasıyla  $14.63 \pm 0.42$  mg GAE/g ve  $10.14 \pm 0.94$  mg GAE/g olarak bulunmuştur (Ceylan et al., 2020). Takım ve Işık tarafından yapılan çalışmada, meyve kısmından hazırlanan su ekstresinin gallik asit üzerinden hesaplanan total fenol bileşen miktarı  $22.10 \pm 0.09$  mg GAE/g kuru drog olarak bulunmuştur (Takım & Işık, 2020). Zengin ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise meyve, yaprak ve dal kısımlarından hazırlanan n-hekzan, etil asetat, diklorometan, metanol ve su ekstralarının gallik asit üzerinden total fenol bileşen miktarı hesaplanmıştır. En yüksek fenolik bileşik içeriği  $121.78 \pm 1.41$  mg GAE/g ekstre değeri ile dalın metanol ekstresinde bulunmuştur. Yaprak kısmı için en yüksek fenolik bileşen miktarı  $94.64 \pm 2.12$  mg GAE/g ekstre ile metanol ekstresinde saptanmıştır. Meyvedeki en yüksek fenolik bileşen miktarı  $75.91 \pm 0.58$  mg GAE/g ekstre ile metanol ekstresinde tespit edilmiştir (Zengin et al., 2023). Çalışmalarda elde ettiğimiz sonuçlar literatür ile karşılaştırıldığında genel olarak uyumlu görünmektedir.

### 5.2.2. Total Flavonoit Miktar Tayini

Kersetin üzerinden yapılan total flavonoit miktar tayini deneyinde, kersetin standart eğrisinden bulunan denklem kullanılarak ekstrelerin içerdikleri kersetin miktarı hesaplanmıştır. KÇY kodlu örnekler için ortalama 68.6774 mg KE/g ekstre, KÇM kodlu örnek için ortalama 46.8722 mg KE/g ekstre değerleri bulunmuştur. Yaprak ve meyve drog sonuçları karşılaştırıldığı zaman yaprak drogunda total flavonoit miktarının daha yüksek bulunduğu tespit edilmiştir.

Ceylan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, iki farklı lokasyondan toplanan yaprak kısmından hazırlanan metanol ekstralarının kersetin üzerinden hesaplanan total flavonoit miktarı sırasıyla  $67.72 \pm 1.88$  mg kersetin eşdeğeri/g ve  $97.45 \pm 2.20$  mg kersetin eşdeğeri/g olarak bulunmuştur (Ceylan et al., 2020). Takım ve Işık tarafından yapılan çalışmada, meyve kısmından hazırlanan su ekstrelerinin kersetin üzerinden hesaplanan total flavonoit miktarı  $8.29 \pm 0.07$  mg kersetin eşdeğeri/g kuru drog olarak bulunmuştur (Takım & Işık, 2020). Zengin ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, meyve, yaprak ve dal kısımlarından hazırlanan n-hekzan, etil asetat, diklorometan, metanol ve su ekstralarının rutin üzerinden total flavonoit miktarı hesaplanmıştır. En yüksek flavonoit içeriği  $75.36 \pm 0.92$  mg rutin eşdeğeri/g ekstre değeri ile yaprağın metanol ekstresinde bulunmuştur. Meyve kısmı için en yüksek miktar  $17.55 \pm 0.09$  mg rutin eşdeğeri/g ekstre değeri ile metanol ekstresinde saptanmıştır (Zengin et al., 2023). Çalışmalarda elde ettiğimiz sonuçlar literatür ile karşılaştırıldığında genel olarak uyumlu görünmektedir.

### 5.3. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC-DAD) ile Rutin ve Apigenin Bileşiklerinin Teşhis ve Miktar Tayini

Bitki üzerinde daha önce yapılan çalışmalarda majör bileşenler arasında saptanan (Takım, 2021; Takım & Işık, 2020) ve bitkilerde yaygın olarak bulunan bir flavonol glikozidi olan rutin (Baliga et al., 2014; Patel & Patel, 2019). HPLC-DAD yöntemi kullanılarak miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Ayrıca elimizde standardı bulunması ve seçtiğimiz HPLC yönteminin uygunluğu nedeniyle flavon yapısına sahip apigenin adlı

bileşiminin de ekstredeki varlığı araştırılmıştır. Analiz sonucunda meyve ekstresindeki ortalama rutin miktarı (3593.8 (µg/g)), yaprak ekstresindeki miktara (2961.2 (µg/g)) göre yüksek bulunmuştur. Apigeninin ise literatürle uyumlu olarak kantitatif olarak tayin edilebilecek düzeyde bulunmadığı (<LOQ) doğrulanmıştır.

Doğrusallık, seçicilik, tanımlama ve ölçüm limiti ve doğruluk parametrelerini içeren yöntem validasyon çalışmaları yapılarak kullanılacak yöntemin geçerliliğini ispat edilmiştir.

Takım'ın yaptığı çalışmada, LC-MS/MS analizi sonucunda rutin meyvenin metanollü ekstresinde  $66778.5 \pm 16.49$  µg rutin/g miktarında bulunmuştur. Bizim çalışmamızla benzer şekilde apigenin varlığı tespit edilememiştir (Takım, 2021).

#### **5.4. Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz İnhibitör Aktivite**

Asetilkolinesteraz inhibitör aktivite deneyinde 1000, 200 ve 20 µg/mL (son konsantrasyon 250, 50, 5 µg/g) konsantrasyonlarında hazırlanan metanol meyve ekstraları sırasıyla % 40.9091, % 6.7273 ve % 0.3636 oranında AChE enzimini inhibe ettiği saptanmıştır. Bütirilkolinesteraz inhibitör aktivite deneyinde ise 1000, 200 ve 20 µg/mL (250, 50, 5 µg/g) konsantrasyonlarındaki metanol ekstralarının sırasıyla % 44.9050, % 6.2176, % 1.8998 oranında BuChE enzimini inhibe ettiği tespit edilmiştir.

Zengin ve arkadaşları tarafından meyve, yaprak ve dal kısımları ile çeşitli çözücüler kullanılarak hazırlanan ekstralarda AChE inhibisyonu bakımından en yüksek dalın n-hekzan ekstresi ( $8.89 \pm 0.08$  mg GALAE/g), BChE inhibisyonu bakımından en yüksek etkiyi dalın metanol ekstresinin ( $2.50 \pm 0.05$  mg GALAE/g) gösterdiği bulunmuştur (Zengin et al., 2023).

### 5.5. Hücre Kültürü Çalışmaları ve Antioksidan Enzim Aktivitesi

Ekstrelerin antioksidan kapasitesi; hidrojen peroksitle indüklenmiş oksidatif stres modelinde hücre canlılığı ve antioksidan enzim aktivitesi açısından değerlendirilmiştir (Loubidi et al., 2018). Hidrojen peroksitle ( $H_2O_2$ ) indüklenmiş oksidatif stres koşullarında 1, 10, 100  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonundaki ekstrelerin insan nöroblastoma hücre serileri (SH-SY5Y, ATCC® CRL-2266™) üzerindeki hücre canlılığı etkisi gözlemlenmiştir. Grafik 5'te (sayfa 71) yer alan verilere göre kontrol grubu ile oksidatif stres yaratılmış grup karşılaştırıldığında hücre canlılığında anlamlı azalma olduğu bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Bu durum oksidatif stres koşullarının yaratıldığını göstermektedir.  $H_2O_2$  uygulanan hücreler ile yaprak ve meyve ekstrelerinin uygulandığı hücreler karşılaştırıldığında hücre canlılığında anlamlı artış olduğu gözlemlenmiştir. Meyve ekstresinin uygulandığı hücreler içerisinde en yüksek % canlılık oranı 1  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonunda görülmüştür. 1  $\mu\text{g/mL}$  ve 10  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonlarında % canlılık oranında anlamlı farklılık olmasa da konsantrasyon arttıkça oranın düştüğü gözlemlenmiştir. Yaprak ekstresinin uygulandığı hücreler içerisinde ise en yüksek % canlılık oranı 1  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonunda görülmüştür.

Hücre kültür deneyinin ikinci aşamasında ise 1  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonundaki yaprak ve meyve ekstrelerinin hidrojen peroksitle indüklenmiş SH-SY5Y hücrelerinde total antioksidan durum (TAS) ve total oksidan durum (TOS) üzerine etkisi incelenmiştir. Grafik 6'da (sayfa 72) yer alan verilere göre meyve ekstresiyle aralarında anlamlı fark bulunmasa da yaprak ekstresinin daha yüksek % TAS oranına sahip olduğu görülmüştür. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ekstrelerin  $H_2O_2$  ile indüklenmiş oksidatif stresi ortadan kaldırdığı bulunmuştur. Ekstreler % TOS oranına göre karşılaştırıldıklarında meyve ekstresinin daha yüksek olduğu görülmektedir. İki çalışmanın sonuçlarının birbiriyle uyumlu olduğu belirtilebilir.

## Sonuç ve Öneriler

Tez çalışmamızda, Türkiye’de yaygın olarak yetişen ve halk arasında kullanımı bulunan *Paliurus spina-christi* Mill. bitkisinin “*Türk Farmakopesi*”ne uygun şekilde kalite kontrol çalışmaları (kurutmada kayıp, bütün kül miktar tayini, sülfat külü miktar tayini ve hidroklorik asitte çözünmeyen kül miktar tayini) yürütülmüştür. Kurutmada kayıp yaprakta ortalama % 8.1632, meyvede ortalama % 5.4677; bütün kül yaprakta ortalama % 8.0021, meyvede ortalama % 5.1269; sülfat külü yaprakta ortalama % 10.9868, meyvede ortalama % 6.8357; HCl’de çözünmeyen kül yaprakta ortalama % 0.1133, meyvede ortalama % 0.0766 oranlarında bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar, sınır değerlerin belirlenmesi amacıyla ileride hazırlanabilecek monograflarda kullanılabilir.

Ekstre veriminin yaprak droğunda % 25.5504, meyve droğunda ise % 10.5651 olduğu saptanmıştır.

Total fenol miktar tayini çalışmaları sonucunda yaprak ekstresinde ortalama 102.9738 mg GAE/g, meyve ekstresinde ise ortalama 62.0511 mg GAE/g değerleri bulunmuştur.

Total flavonoit miktar tayini çalışmaları sonucunda yaprak ekstresinde ortalama 68.6774 mg KE/g, meyve ekstresinde ise ortalama 46.8722 mg KE/g değerleri bulunmuştur.

Rutin miktar tayini HPLC-DAD yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Yaprak droğunda rutin ortalama 2961.1667 µg/g, meyve droğunda ise ortalama 3593.8333 µg/g olarak bulunmuştur. İki ekstrede de apigenin saptanamamıştır.

Antikolinesteraz ve antibütirikolinesteraz aktivite çalışmaları *in vitro* koşullarda yapılmıştır. En yüksek inhibisyonu gösteren meyve ekstresinin AChE ve BChE inhibisyon yüzdesi değerleri sırasıyla % 40.9091 ve % 44.9050 olarak bulunmuştur.

Hücre canlılığı çalışmaları sonucunda hidrojen peroksitle indüklenmiş oksidatif stres modelinde 1 ve 10 µg/mL meyve ve yaprak ekstraları uygulanmış hücreler H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanan hücrelerle karşılaştırıldığında hücre canlılığında anlamlı artış görülmüştür (p<0.05). Antioksidan enzim aktivitesi çalışmaları sonucunda hidrojen peroksitle (200 µM) indüklenmiş SH-SY5Y hücreleri ile 1 µg/mL meyve ve yaprak ekstraları uygulanmış hücreler karşılaştırıldığında total antioksidan durum (TAS) ve total oksidan durum (TOS) üzerine anlamlı değişim (p<0.05) görülmüştür.

Literatür taraması sonucunda bitki üzerinde gerek kimyasal içerik gerekse biyolojik aktivite açısından yapılan bazı çalışmaların olduğu görülmüştür. Biyolojik aktivite olarak antioksidan, antimikrobiyal, antienflamatuvar, antidiyabetik, enzim inhibitör (kolinesteraz, tirozinaz, α-amilaz ve α-glukozidaz), antifungal, antigenotoksik ve koleretik etkilerini inceleyen çalışmalar mevcuttur. Bununla birlikte, SH-SY5Y hücreleri üzerinde kültür çalışmaları ve antioksidan enzim aktivitesi ile ilgili bilginiz dahilinde bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Sonuç olarak, mevcut literatür bilgileri ışığında, bitkinin hem kimyasal içerik hem de biyolojik aktivite açısından araştırmacıların ilgisini çektiğini belirtmek mümkündür. Son yıllarda, Alzheimer ve diyabet üzerine çalışmalar yürütüldüğü görülmekle birlikte bu alanda daha ileri çalışmalar yapılması, bitkinin biyoaktivite açısından potansiyelinin ortaya konulması için uygun olabilir. Bitkilerin yetiştiği çevre koşulları ve genetik çeşitliliğe bağlı olarak içerdiği bileşikler farklılık gösterebilir. Teze konu olan bitkinin farklı lokasyonlarda, farklı zaman aralıklarında veya farklı bitki kısımları toplanarak fitokimyasal içeriği kalitatif ve kantitatif yöntemlerle araştırılabilir.

## Kaynaklar

- Ahmed, L. T., Abood, K. W., Ghanim, Q., Ibrahim, N. K., & Al-Naim, A. S. (2013). Anti Oxidant Activity of Paliurus Spina-Christi Methanolic Extract. *International Journal of Bio-Technology and Research*, 3(3), (s. 1–4).
- Ahmed, L. T., Al-Ani, N. K., & Smariee, K. W. (2012). Chemical Analysis and Antifungal Activity of Paliurus spina-christii. *J. Exp. Biol. (Bot.)*, 8(1), (s. 99–102). Retrieved from <http://www.egyseb.org>
- Ahmed, S., Khan, S. T., Zargaham, M. K., Khan, A. U., Khan, S., Hussain, A., ... Al-Harrasi, A. (2021). Potential Therapeutic Natural Products Against Alzheimer's Disease with Reference of Acetylcholinesterase. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 139, (s. 111609). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111609>
- Arslan, L., & Kaya, E. (2021). Investigation of Antimicrobial and Antioxidant Activities of Paliurus spina-christi Mill. in Kahramanmaraş, Turkey. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 24(6), (s. 1161–1169). <https://doi.org/10.18016/ksutarimdogavi>.
- Aynacı, E., Arslan, F., Sarı, N., & Yaşar, A. (2014). Yeni Asetilkolinesteraz İnhibitörlerinin Sentezi, Karakterizasyonu ve İnhibisyon Özelliklerinin İncelenmesi. In *2. İlaç Kimyası, Üretimi, Teknolojisi ve Standardizasyonu Kongresi*.
- Baliga, M. S., Saxena, A., Kaur, K., Kalekhan, F., Chacko, A., Venkatesh, P., & Fayad, R. (2014). Polyphenols in the Prevention of Ulcerative Colitis. In *Polyphenols in Human Health and Disease* (p. 655–663). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398456-2.00050-5>
- Barril, X., Kalko, S., Orozco, M., & Luque, F. (2005). Rational Design of Reversible Acetylcholinesterase Inhibitors. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2(1), (s. 27–36). <https://doi.org/10.2174/1389557023406494>
- Baytop, T. (1999). *Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi Geçmişte ve Bugün. İstanbul Üniversitesi Yayınları* (2. Baskı).
- Bergmann, K., Tomlinson, B. E., Blessed, G., Gibson, P. H., & Perry, R. H. (1978). Correlation of Cholinergic Abnormalities with Senile Plaques and Mental Test Scores in Senile Dementia. *British Medical Journal*, 2(6150), (s. 1457–1459). <https://doi.org/10.1136/bmj.2.6150.1457>

- Bortolami, M., Rocco, D., Messori, A., Di Santo, R., Costi, R., Madia, V. N., ... Pandolfi, F. (2021). Acetylcholinesterase Inhibitors for The Treatment of Alzheimer's Disease – A Patent Review (2016–Present). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 31(5), (s. 399–420). <https://doi.org/10.1080/13543776.2021.1874344>
- Brantner, A., & Maleš, Ž. (1990). Investigations on the Flavonoid Glycosides of *Paliurus spina-christi*. *Planta Medica*, 56(6), (s. 582–583). <https://doi.org/10.1055/s-2006-961187>
- Brantner, A., & Maleš, Ž. (1999). Quality Assessment of *Paliurus spina-christi* Extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 66, (s. 175–179). [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00180-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00180-9)
- Brantner, A., Maleš, Ž., Pepeljnjak, S., & Antolić, A. (1996). Antimicrobial activity of *Paliurus spina-christi* Mill. (Christ's thorn). *Journal of Ethnopharmacology*, 52(2), (s. 119–122). [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(96\)01408-0](https://doi.org/10.1016/0378-8741(96)01408-0)
- Bulut, G., & Tuzlaci, E. (2013). An Ethnobotanical Study of Medicinal Plants in Turgutlu (Manisa - Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 149(3), (s. 633–647). <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.07.016>
- Cakilcioglu, U., & Turkoglu, I. (2010). An Ethnobotanical Survey of Medicinal Plants in Sivrice (Elazığ-Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 132(1), (s. 165–175). <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.08.017>
- Ceylan, Ş., Harşit, B., Saral, O., Özcan, M., & Demir, I. (2020). Comparison of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Plant Extracts Centaury (*Hypericum montbretii* and *Hypericum bupleuroides*) and Blackthorn (*Paliurus spina-christi* Mill) in Artvin, Giresun Region of Turkey. *Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 21(1), (s. 13–20). <https://doi.org/10.17474/artvinofd.579494>
- Colović, M. B., Krstić, D. Z., Lazarević-Pašti, T. D., Bondžić, A. M., & Vasić, V. M. (2013). Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*, 11(3), (s. 315–335). <https://doi.org/10.2174/1570159X11311030006>
- Dahan, S., Khalouf, R., Salcedo, N., Taieb, C., & Gassia, V. (2023). Knowledge of Free Radicals and Antioxidants in Dermatology in The General Population. *JEADV Clinical Practice*, (August), (s. 1–8). <https://doi.org/10.1002/jvc2.274>
- Dalakishvili, T. M., Guskova, S. D., Chachanidze, N. I., Kuparadze, K. G., &

- Kemertelidze, E. P. (1985). Lipids of The Seeds of *Paliurus spina-christi*. *Chemistry of Natural Compounds*, 21, (s. 300–303). <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF00574198>
- Dalakishvili, T. M., Zurabishvili, T. S., & Kemertelidze, E. P. (1987). Phytochemical Investigation of *Paliurus spina-christi*. *Journal of Tropical Ecology*, (s. 602–603).
- Davis, P. M. (Ed.). (1967). *Flora of Turkey and the East Aegean Island* (Vol. 2). UK: Edinburg University Press. <https://doi.org/10.2307/1219306>
- Dementia. (n.d.). Retrieved December 9, 2023, from <https://www.who.int/news-room/facts-in-pictures/detail/dementia>
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), (s. 88–95). [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Erdogan, M. A., Ashour, A., Yuca, E., Gorgulu, K., & Ozpolat, B. (2021). Targeting Eukaryotic Elongation Factor-2 Kinase Suppresses the Growth and Peritoneal Metastasis of Ovarian Cancer. *Cellular Signalling*, 81, (s. 109938). <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.109938>
- Esfahani, S. M. M., Tarighi, P., Dianat, K., Ashour, T. M., Mottaghi-Dastjerdi, N., Aghsami, M., ... Montazeri, H. (2023). *Paliurus spina-christi* Mill Fruit Extracts Improve Glucose Uptake and Activate The Insulin Signaling Pathways in HepG2 Insulin-Resistant Cells. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 23(1), (s. 1–9). <https://doi.org/10.1186/s12906-023-03977-y>
- European Pharmacopoeia 8.0*. (2013).
- Golbkina, N., Lapchenko, V., Ryff, L., Lapchenko, H., Naumenko, T., Bagrikova, N., ... Caruso, G. (2020). Medicinal Plants as Sources of Selenium and Natural Antioxidants. *Banat's Journal of Biotechnology*, (December), (s. 4738–12). <https://doi.org/10.7904/2068>
- Greig, N. H., Utsuki, T., Yu, Q., Zhu, X., Holloway, H. W., Perry, T., ... Lahiri, D. K. (2001). A New Therapeutic Target in Alzheimer's Disease Treatment: Attention to Butyrylcholinesterase. *Current Medical Research and Opinion*, 17(3), (s. 159–165). <https://doi.org/10.1185/0300799039117057>
- Güner, N. D. (2005). *Paliurus Spina-Christi* Mill. *Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar*. Hacettepe Üniversitesi.
- Harbone, J. B. (1989). *General Procedures and Measurement of Total Phenolics*.

- Methods In Plant Biochemistry: Volume 1: Plant Phenolics* (Vol. 1). Academic Press Limited. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-461011-8.50007-x>
- ICH Steering Committee. (2023). *ICH Q2(R2) Guideline on Validation of Analytical Procedures. European Agency for The Evaluation of Medicinal Products, International Commission on Harmonisation, (CPMP/ICH/281/95)* (Vol. 2).
- Jukic, M., Burcul, F., Carev, I., Politeo, O., & Milos, M. (2012). Screening for Acetylcholinesterase Inhibition and Antioxidant Activity of Selected Plants from Croatia. *Natural Product Research*, 26(18), (s. 1703–1707). <https://doi.org/10.1080/14786419.2011.602639>
- Julsing, M. K., Koulman, A., Woerdenbag, H. J., Quax, W. J., & Kayser, O. (2006). Combinatorial Biosynthesis of Medicinal Plant Secondary Metabolites. *Biomolecular Engineering*, 23(6), (s. 265–279). <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2006.08.001>
- Kasnak, C., & Palamutoğlu, R. (2015). Doğal Antioksidanların Sınıflandırılması ve İnsan Sağlığına Etkileri. *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 3(5), (s. 226–234). Retrieved from [www.agrifoodscience.com](http://www.agrifoodscience.com)
- Kaur, C., & Kapoor, H. C. (2008). Antioxidants in Fruits and Vegetables - The Millennium's Health. *International Journal of Food Science & Technology*, 36(7), (s. 703–725). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.00513.x>
- Kaval, I., Behçet, L., & Cakilcioglu, U. (2014). Ethnobotanical Study on Medicinal Plants in Geçitli and its Surrounding (Hakkari-Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 155(1), (s. 171–184). <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.05.014>
- Kayalar, E., Küçük, S., & Göger, F. (2016). Determination of Antioxidant Activity and Phenolic Profile of *Paliurus spina-christi* P. Mill. In *Pharmacology and Ethnopharmacology* (Vol. 6, p. 2161).
- Kemertelidze, E. P., Dalakishvili, T. M., Gusakova, S. D., Shalashvili, K. G., Khatiashvili, N. S., Bitadze, M. A., ... Bereznyakova, A. I. (1999). Chemical Composition and Pharmacological Activity of the Fruits of *Paliurus spina-christi* Mill. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 33(11), (s. 591–594).
- Kırca, A., & Arslan, E. (2008). Antioxidant Capacity and Total Phenolic Content of Selected Plants from Turkey. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(11), (s. 2038–2046). <https://doi.org/10.1111/j.1365->

2621.2008.01818.x

- Kuštrak, D., Maleš, Ž., Brantner, A., & Pitarević, I. (1990). Flavonoids of the Leaves of Christ's Thorn (*Paliurus spina-christi* Mill.). *Acta Pharmaceutica Jugosl.*, 40(4), (s. 551–554).
- Long, S., Benoist, C., & Weidner, W. (2023). *World Alzheimer Report 2023: Reducing Dementia Risk: Never Too Early, Never Too Late*. London.
- Loubidi, M., Jouha, J., Tber, Z., Khouili, M., Suzenet, F., Akssira, M., ... Guillaumet, G. (2018). Efficient Synthesis and First Regioselective C-6 Direct Arylation of Imidazo[2,1- c ][1,2,4]triazine Scaffold and Their Evaluation in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -Induced Oxidative Stress. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 145, (s. 113–123). <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.081>
- Maleš, Ž., Medić-Šarić, M., & Kuštrak, D. (1994). Application of Numerical Methods in the Investigation of The Flavonoids of Christ's Thorn (*Paliurus spina-christi* Mill.). *Acta Pharmaceutica*, 44(2), (s. 183–191).
- Maleš, Ž., Plazibat, M., Hazler-Pilepic, K., & Cetina-Čižmek, B. (2001). Investigation of The Composition of Amino Acids in Christ's Thorn (*Paliurus spina christi* Mill.). *Farmaceutski Glasnik*, 57(7–8), (s. 257–265).
- Mukherji, S. M., & Singh, S. P. (1984). *Reaction Mechanism in Organic Chemistry*. Macmillan Publishers India Limited.
- Nwozo, O. S., Effiong, E. M., Aja, P. M., & Awuchi, C. G. (2023). Antioxidant, Phytochemical and Therapeutic Properties of Medicinal Plants: A Review. *International Journal of Food Properties*, 26(1), (s. 359–388). <https://doi.org/10.1080/10942912.2022.2157425>
- Oğuz, F., Çamlı Pulat, Ç., İlhan, S., & Atmaca, H. (2022). GC-MS Analysis and Potential Apoptotic Effect of *Paliurus spina-christi* Mill. Leaf and Flower Extracts Against Breast Cancer Cells. *Sakarya University Journal of Science*, 26(2), (s. 357–364). <https://doi.org/10.16984/saufenbilder.1029351>
- Patel, K., & Patel, D. K. (2019). The Beneficial Role of Rutin, A Naturally Occurring Flavonoid in Health Promotion and Disease Prevention: A Systematic Review and Update. In *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases* (p. 457–479). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813820-5.00026-X>
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties,

- Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), (s. 11–26). <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), (s. 1035–1042). <https://doi.org/10.1021/np9904509>
- Pokorný, J. (2007). Are Natural Antioxidants Better - and Safer - Than Synthetic Antioxidants? *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(6), (s. 629–642). <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700064>
- Polat, R., & Satıl, F. (2012). An Ethnobotanical Survey of Medicinal Plants in Edremit Gulf (Balıkesir - Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 139(2), (s. 626–641). <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.12.004>
- Sargin, S. A., Akçicek, E., & Selvi, S. (2013). An Ethnobotanical Study of Medicinal Plants Used by the Local People of Alaşehir (Manisa) in Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(3), (s. 860–874). <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.09.040>
- Selekler, K. (2010). Alois Alzheimer ve Alzheimer Hastalığı. *Türk Geriatri Dergisi*, 13(3), (s. 9–14).
- Şen, A. (2018). Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of Fruit, Leaf and Branch Extracts of *Paliurus spina-christi* P. Mill. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 22(2), (s. 328–333). <https://doi.org/10.12991/mpj.2018.71>
- Sezik, E., Zor, M., & Yeşilada, E. (1992). Traditional Medicine in Turkey II. Folk Medicine in Kastamonu. *Int. J. Pharmacognosy*, 30(3), (s. 233–239). <https://doi.org/10.3109/13880209209054005>
- Sies, H. (2019). Oxidative Stress: Eustress and Distress. In H. Sies (Ed.), *Oxidative Stress: Eustress and Distress* (p. 3–12). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2018-0-04253-X>
- Takım, K. (2021). Bioactive Component Analysis and Investigation of Antidiabetic Effect of Jerusalem Thorn (*Paliurus spina-christi*) Fruits in Diabetic Rats Induced by Streptozotocin. *Journal of Ethnopharmacology*, 264(August 2020), (s. 113263). <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113263>
- Takım, K., & Işık, M. (2020). Phytochemical Analysis of *Paliurus spina-christi* Fruit and Its Effects on Oxidative Stress and Antioxidant Enzymes in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 191(4), (s.

- 1353–1368). <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03287-w>
- Tan, B. L., Norhaizan, M. E., Liew, W.-P.-P., & Rahman, H. S. (2018). Antioxidant and Oxidative Stress: A Mutual Interplay in Age-Related Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 9(OCT), (s. 1–28). <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01162>
- Tari, Ö., & Yağmurtaşan, R. (2023). Alzheimer Hastalığı ve Anti-Alzheimer Etkili Bileşiklerin Yapılarının Araştırılması. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 43(2), (s. 150–173). <https://doi.org/10.52794/hujpharm.1175099>
- The World Flora Online. (2023). Retrieved from <https://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000471780>
- Türk Farmakopesi*. (2017).
- Tuzlacı, E., & Tolon, E. (2000). Turkish Folk Medicinal Plants, Part III: Şile (Istanbul). *Fitoterapi*, 71, (s. 673–685).
- Tuzlacı, Ertan, Alparslan İşbilen, D. F., & Bulut, G. (2010). Turkish Folk Medicinal Plants, VIII: Lalapaşa (Edirne). *Marmara Pharmaceutical Journal*, 14(1), (s. 47–52). <https://doi.org/10.12991/201014463>
- Tuzlacı, Ertan, & Aymaz, P. E. (2001). Turkish Folk Medicinal Plants, Part IV: Gönen (Balıkesir). *Fitoterapia*, 72(4), (s. 323–343). [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(00\)00277-X](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00277-X)
- Velcheva, M. P. (1993). Constituents of Paliurus spina christi. *Fitoterapia*, 64(3), (s. 284–285).
- Velioglu, S. (2000). Doğal Antioksidanların İnsan Sağlığına Etkileri. *Gıda*, 25(3), (s. 167–176).
- Yaşar, S., Demir, F., & Karatepe, Y. (2016). Bazı Maki Türlerinin Kimyasal İçeriği ve Fenolik Ekstraktifleri Üzerine Araştırmalar. *Turkish Journal of Forestry*, 17(2), (s. 187). <https://doi.org/10.18182/tjf.22143>
- Yıldırım, E., & Ulusoy Güzeldemirci, N. (2023). Recent Advances of Cholinesterase Inhibitors Playing A Critical Role in The Treatment of Alzheimer's Disease (2020-2022). *Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi / Journal of Advanced Research in Health Sciences*, 6(2), (s. 197–209). <https://doi.org/10.26650/jarhs2023-1197992>
- Yuca, H., Karakaya, S., & Güvenalp, Z. (2023). Anatomy of Paliurus spina-christi Mill. (Blackthorn) (Rhamnaceae). *Pharmata*, 3(4), (s. 78–83).

<https://doi.org/10.5152/pharmata.2023.23020>

- Yuca, H., Özbek, H., Demirezer, L. Ö., & Güvenalp, Z. (2022). Assessment of the  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -Amylase Inhibitory Potential of *Paliurus spina-christi* Mill. and Its Terpenic Compounds. *Medicinal Chemistry Research*, *31*(8), (s. 1393–1399). <https://doi.org/10.1007/s00044-022-02921-y>
- Zengin, G., Fernández-Ochoa, Á., Cádiz-Gurrea, M. de la L., Leyva-Jiménez, F. J., Segura-Carretero, A., Elbasan, F., ... Fawzi Mahomoodally, M. (2023). Phytochemical Profile and Biological Activities of Different Extracts of Three Parts of *Paliurus spina-christi*: A Linkage Between Structure and Ability. *Antioxidants*, *12*(2), (s. 1–15). <https://doi.org/10.3390/antiox12020255>
- Zor, M., Aydın, S., Güner, N. D., Başaran, N., & Başaran, A. A. (2017). Antigenotoxic Properties of *Paliurus spina-christi* Mill Fruits and Their Active Compounds. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *17*(229), (s. 1–10). <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1732-1>

## Teşekkür

Yüksek lisans eğitimi süresince bana yol gösteren, bilgilerini aktaran ve desteğini daima hissettiğim danışman hocam Prof. Dr. Nehir SOMER'e,

Bilimsel hazırlıktan itibaren eğitim serüvenimde yer alan Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı'nda görevli tüm öğretim üyelerine,

Hücre kültürü çalışmalarında desteğini rica ettiğimiz Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda görevli Prof. Dr. Güliz ARMAĞAN'a,

Tez çalışmamıza mali destek sağlayarak gerçekleşmesini sağlayan T.C. Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinatörlüğü'ne (BAP Proje No: 24122),

HPLC-DAD analizi için destek veren Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (MATAL)'da görevli Kimyager Zinar Pınar GÜMÜŞ'e,

Maddi ve manevi desteği sayesinde beni bugünlere getiren anneme,

Beni her zaman destekleyen ve motivasyonumu her daim yüksek tutan nişanlım Emre ANAÇ'a,

Yoğun deney ve tez yazım sürecimde bana anlayış gösteren Ecomercek'te birlikte yol aldığımız iş arkadaşlarıma,

Ve son olarak sevgili arkadaşlarıma,

en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

İzmir, 15.01.2024

Melis KASAP