

**T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ORGANİK KİMYA BİLİM DALI**

ONOSMA DEMIRIZII ÜZERİNE FİTOKİMYASAL BİR ARAŞTIRMA

Remzi Can KARAN

**Danışman
Prof. Dr. Mehmet Sabih ÖZER**



Manisa, 2023

Remzi Can
KARAN

ONOSMA DEMIRIZII ÜZERİNE FITOKİMYASAL BİR ARAŞTIRMA

2023

TAAHHÜTNAME

Bu tezin Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Remzi Can KARAN



İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇİNDEKİLER.....	I
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	III
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IV
TABLO DİZİNİ	V
TEŞEKKÜR.....	VI
ÖZET.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Boraginaceae Familyası.....	2
2.2. <i>Onosma</i> Cinsi	2
2.2.1. <i>Onosma demirizii</i> Türü.....	3
2.3. <i>Onosma</i> Türlerinin Literatürdeki Yeri.....	3
2.3.1. Fitokimyasal Çalışmalar.....	3
2.3.2. Etnofarmakolojik Çalışmalar	5
2.3.3. Geleneksel Kullanım	7
2.3.4. Endüstriyel Kullanım	8
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	10
3.1. Çözücüler ve Kimyasallar	10
3.2. Bitkinin Toplanması ve Teşhis Edilmesi.....	10
3.3. Özütlerin Hazırlanması.....	10
3.4. Antioksidan Aktivite Analizleri	11
3.4.1. Toplam Antioksidan Aktivite Testi.....	11
3.4.2. DPPH Radikal Süpürüm Testi.....	11
3.4.3. Demir (II) İyonları Şelatlama Testi	12
3.4.4. ABTS Katyon Radikal Süpürüm Testi.....	12
3.4.5. CUPRAC İndirgeme Gücü Testi	12
3.4.6. FRAP İndirgeme Gücü Testi.....	12
3.5. Enzim İnhibisyon Aktivite Analizleri	13
3.5.1. Kolinesteraz İnhibisyon Aktivite Testi.....	13
3.5.2. Tirozinaz İnhibisyon Aktivite Testi	13

3.5.3. α -Glukosidaz İnhibisyon Aktivite Testi	14
3.5.4. α -Amilaz İnhibisyon Aktivite Testi.....	14
3.6. Özütlerin Fenolik Bileşik İçeriklerinin Tespit Edilmesi	15
3.6.1. LC-ESI–MS/MS Analizi	15
3.6.2. Toplam Fenolik Bileşik Analizi	15
3.6.3. Toplam Flavonoit Bileşik Analizi	16
3.7. İstatistiksel Analizler	16
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	17
4.1. Özütleme Verimleri	17
4.2. Özütlerin Toplam Fenolik ve Flavonoit İçerik Analizleri.....	17
4.3. Özütlerin LC-MS Analizleri.....	18
4.4. ÖzütlerinAntioksidan Aktivite Analizleri	21
4.5. Özütlerin Enzim İnhibisyon Aktivite Analizleri	27
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	32
KAYNAKLAR.....	33
ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AChE	Asetilkolinesteraz
ACEs	Akarboz eşdeğer
BHA	Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş hidroksitoluen
CUPPRAC	Bakır indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
EC₅₀	Etkili konsantrasyon
IC₅₀	İnhibisyon konsantrasyonu
QEs	Kuersetin eşdeğer
EDTAEs	Etilendiamin tetraasetik asit disodyum tuzu eşdeğer
FCR	Folin-Ciocalteu Reaktifi
GAEs	Gallik asit eşdeğer
GALAEs	Galantamin eşdeğer
KAEs	Kojik asit eşdeğer
LC	Sıvı kromatografisi
REs	Rutin eşdeğer
MeOH	Metanol
TEs	Troloks eşdeğer
m	Metre
ml	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
dk	Dakika

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. <i>Onosma demirizii</i> bitkisi genel görünümü	3
Şekil 4.1. Özütleme verimleri	17
Şekil 4.2. Özütleme toplam fenolik içerikleri.....	18
Şekil 4.3. Özütleme toplam flavonoid içerikleri	18
Şekil 4.4. Özütleme bulunan ana fitokimyasalların açık yapıları	20
Şekil 4.5. Özütleme DPPH radikal süpürüm aktiviteleri.....	22
Şekil 4.6. Özütleme ABTS katyon radikal süpürüm aktiviteleri.....	22
Şekil 4.7. Özütleme CUPRAC indirgeme gücü kapasiteleri	23
Şekil 4.8. Özütleme FRAP indirgeme gücü kapasiteleri	23
Şekil 4.9. Özütleme toplam antioksidan aktiviteleri.....	24
Şekil 4.10. Özütleme demir (II) iyonları şelatlama kapasiteleri	24
Şekil 4.11. Özütleme bağıl antioksidan kapasite indeksleri	25
Şekil 4.12. Özütleme asetilkolin esterase inhibisyon aktiviteleri	27
Şekil 4.13. Özütleme bütirilkolin esterase inhibisyon aktiviteleri	28
Şekil 4.14. Özütleme α -amilaz inhibisyon aktiviteleri	28
Şekil 4.15. Özütleme α -glukosidaz inhibisyon aktiviteleri	29
Şekil 4.16. Özütleme trozinaz inhibisyon aktiviteleri	29

TABLO DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 4.1. Özütlerdeki seçilen fitokimyasalların derişimleri.....	19
Tablo 4.2. Özütlerin ve standartların antioksidan kapasiteleri.....	21
Tablo 4.3. Fitokimyasallarla biyolojik aktivite testleri arasındaki Pearson korelasyonu.....	26
Tablo 4.4. Standartların ve özütlerin enzim inhibisyon aktiviteleri.....	27



TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımda bana yol gösteren, bilgi birikimi ile çalışmalara farklı açılardan bakmamı sağlayan, hoşgörü ve anlayışı ile beraber çalışmaktan ve öğrencisi olmaktan gurur duyduğum değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Mehmet Sabih ÖZER'e, her türlü imkan, destek ve emeklerini esirgemeyen, beni yönlendiren Prof. Dr. Cengiz SARIKÜRKÜ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, organik kimyada bana destek veren Sayın Prof. Dr. İnci DURUCASU ve Sayın Prof. Dr. Mustafa Eskici'ye teşekkür ediyorum.

Bu tez çalışması esnasında her türlü desteklerini benden esirgemeyen sevgili aileme de ayrıca teşekkür ederim.

Remzi Can KARAN

Manisa, 2023

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Onosma demirizii Üzerine Fitokimyasal Bir Araştırma

Remzi Can KARAN

Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Sabih ÖZER

Onosma türleri geleneksel olarak müshil ve antelmintik ajanlar olarak kullanıldığı gibi göz, kan hastalıkları, bronşit, karın ağrısı, boğulma, susuzluk, kaşıntı, lökoderma, ateş, yaralar, yanıklar, basurlar ve idrar taşlarında da kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, *Onosma demirizii*'den elde edilen etil asetat, metanol ve su özütlerinin antioksidan ve enzim inhibisyon aktivitelerini ve kimyasal bileşimlerini sıvı kromatografi-elektrosprey tandem kütle spektrometresi (LC-ESI-MS/MS) kullanarak belirlemektir. Antioksidan kapasite, radikal süpürme, indirgeyici etki, fosfomolibdenyum ve metal şelatlama testleri dahil olmak üzere farklı kimyasal yöntemler kullanılarak analiz edildi. Kolinesteraz, α -amilaz, α -glukosidaz ve tirozinaza karşı enzim inhibisyon etkisi araştırıldı.

LC-ESI-MS/MS analizleri sonucunda özütlerin, özellikle metanol özütünün ana bileşenlerinin hesperidin, hiperosit, klorojenik asit, rosmarinik asit ve pinoresinol olduğu bulunmuştur.

Demir (II) iyon şelatlama kapasite testi dışında, metanol özütü fosfomolibdenyum, DPPH ve ABTS üzerine radikal süpürüm ve indirgeme gücü (CUPRAC ve FRAP) testlerinde dikkate değer antioksidan aktivite gösterdi.

Tirosinaz enzimi hariç etil asetat ekstraktı, asetilkolinesteraz (AChE), butirilkolinesteraz (BChE), α -glukosidaz ve α -amilaz üzerinde en yüksek inhibisyon aktiviteyi sergiledi.

Ek olarak, tüm deneysel parametre çiftleri için ayrı ayrı hesaplanan korelasyon katsayılarına dayanarak, özütlerdeki ana fitokimyasallar ile özütlerin antioksidan ve enzim inhibisyon aktiviteleri arasında yüksek korelasyon olduğu bulunmuştur.

Sonuçlar, *O. demirizii* özütlerinin yeni ve alternatif antioksidan ve enzim inhibitör ajanların kaynağı olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Onosma demirizii*, Kimyasal Kompozisyon, Antioksidan aktivite, Enzim inhibisyon aktivite

2023, 44 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

A Phytochemical Study on *Onosma demirizii*

Remzi Can KARAN

Manisa Celal Bayar University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet Sabih ÖZER

Onosma species have traditionally been used as laxative and anthelmintic agents as well as their uses in eye, blood diseases, bronchitis, abdominal pain, strangury, thirst, itch, leucoderma, fever, wounds, burns, piles, and urinary calculi. The aim of this study is to determine the antioxidant and enzyme inhibitory activities of ethyl acetate, methanol, and water extracts obtained from *Onosma demirizii*, as well as their chemical composition by using liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry (LC–ESI–MS/MS). Antioxidant capacity was tested by using different chemical methods including radical scavenging, reductive effect, phosphomolybdenum and metal chelating assays. Enzyme inhibitory effect was investigated against cholinesterase, tyrosinase, α -amylase and α -glucosidase.

As a result of the LC–ESI–MS/MS analyses, hesperidin, hyperoside, chlorogenic acid, rosmarinic acid, and pinoresinol were found to be the major compounds of the extracts, especially the MeOH extract.

Except for the ferrous ion chelating effect, the methanol extract showed remarkable antioxidant activity in phosphomolybdenum, radical scavenging on DPPH and ABTS, and reducing power (CUPRAC and FRAP) assays.

Ethyl acetate extract, excluding tyrosinase enzyme, exhibited the highest inhibitory activity on acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BChE), α -glucosidase and α -amylase. In addition, Based on the correlation coefficients calculated separately for all experimental parameter pairs, major phytochemicals were found to be highly in correlation with the antioxidant and enzyme inhibitory activities of the extracts.

The results indicate that *O. demirizii* extracts could be used as a source of new and alternative antioxidant and enzyme inhibitory agents.

Keywords: *Onosma demirizii*, Chemical composition, Antioxidant activity, Enzyme inhibitory activity.

2023, 44 pages

1. GİRİŞ

Bitkiler, farmasötik bileşiklerin üretiminde önemli doğal kaynaklar olarak kabul edilmektedir. Günümüzde kimyasal bileşiklerin üretiminden çok, bu bileşikler bakımından zengin bitkilerin üretimine yönelmeye başlamıştır [1]. Bitkilerin biyolojik aktiviteleri üzerine yapılan yoğun çalışmalar sonucunda birçok ilginç aktivite ortaya çıkarılmıştır. Bu faaliyetler arasında, belki de en bilinen ve en sık çalışılan antioksidan aktivitedir [2-4]. Bu alanda çalışan birçok araştırmacı, uçucu yağ bileşenleri, flavonoidler ve fenolik asitler olan terpenoidlerin antioksidan aktiviteden sorumlu bileşikler olduğu konusunda hemfikirdir [2].

Binyıldan beri tüketiciler, gıdaların raf ömrünü uzatmak için kullanılan butillenmiş hidroksi anizol (BHA) ve butillenmiş hidroksi tolueen (BHT) insan sağlığı üzerindeki zararlı etkilerinden şüphe etmeye başladılar. Bazı yetkililer, bu sentetik antioksidan maddelerin DNA molekülüne zarar verdiğini düşünmektedir [5]. Bu nedenle antioksidan fitokimyasallar açısından zengin bitki türlerinin veya baharatların gıdalarda katkı maddesi olarak kullanımına olan ilgi artmıştır. Bitkisel materyale göre değişmekle birlikte uygun ekstraksiyon yönteminin uygulanması, elde edilen ekstraktta antioksidan madde derişimini artırabilir. Ortam polaritesi veya polar bileşikler, polar olmayanlardan daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiğinden, aynı bitki türlerinden elde edilen farklı ekstraktların antioksidan aktivite potansiyelleri arasındaki farklar, aktiviteyi sergileyen bileşenlerin polaritesi hakkında fikir verebilir [6].

Bu çalışmada, Türkiye’de doğal olarak yetişen ve literatürde üzerinde sadece yeni bir tür olarak kayıt edildiğini gösteren tek çalışma [7] bulunan *Onosma demirizii* (Boraginaceae) bitkisinin farklı polariteye sahip çözücüler (etil asetat, metanol ve su) kullanılarak elde edilen özütlerinin antioksidan ve enzim inhibisyon aktiviteleri araştırıldı. Buna ilaveten özütlerin biyolojik aktiviteleri ile fitokimyasal bileşimleri arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak için toplam fenolik/flavonoid içerikleri ile bazı standart fitokimyasalların (polifenolik bileşikler) miktarları LC-ESI-MS/MS sistemi kullanılarak analiz edildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Boraginaceae Familyası

Boraginaceae familyası üyeleri genellikle mavi, beyaz, pembe ya da sarı renk çiçeklere sahiptir ve genellikle arı ve böceklerle tozlaşmaktadır. Boraginaceae familyasına ait bitkiler genellikle amfistomatiktir. Bitkinin bütün yüzeyi genellikle tüylerle örtülüdür. Tüyler örtü ve salgı olmak üzere iki çeşittir. Tüyler genellikle tek hücreli, fakat nadiren de olsa iki veya daha fazla hücrelidir. Familya içinde görülen konik, kalkerli veya silisli ve dikenimsi tüylere “boraginaceous tüyleri” denmektedir. Bu familyanın örneklerinde tüylerin bazal kısımlarında sistolit benzeri yapılar bulunmaktadır. Genellikle anizositik ve anomositik tip stomalar bulunmaktadır [8].

Sert ve büyük tüylerle kaplı, tek yıllık, iki yıllık veya çok yıllık otsu bitkilerden, ender olarak çalı veya ağaçlardan oluşan Boraginaceae familyası, dünya genelinde 150 cins ve yaklaşık 2500 civarında tür içermektedir. Bu familya yaklaşık %35 gibi oldukça yüksek endemik türleri içermekte ve çoğunlukla Akdeniz bölgesinde yayılış göstermektedir [9].

2.2. *Onosma* Cinsi

Onosma, Boraginaceae familyasındaki çiçekli bitkilerin bir cinsidir [10]. Ülkemizde en yaygın ve en çok tür içeren cinslerinden biri olup Boraginaceae familyasının Boraginoideae subfamilyasına dahildir. Boraginaceae familyasının En büyük cinsi *Onosma* L. olup 99 tür, 4 varyete ve bir melez tür ile temsil edilmekte ve bunlardan 51 tür ve bir varyete endemiktir. Cinsin toplamda endemizm oranı %50'dir [11].

Onosma üyelerinin köklerinin, ilginç farmakolojik aktivitelerinin yanı sıra, shikonin türevi kimyasalların zengin bir kaynağı olduğu bilinmektedir. Bu kırmızı renkli boya, eski zamanlardan beri çeşitli alanlarda (örneğin ipek ve gıda endüstrileri) sıkça kullanılmıştır (Pal ve Chaudhury, 2010). Bu pigment aynı zamanda bazı farmakolojik özellikler (örn. Antiinflamatuvar, antimikrobiyal vb.) nedeniyle kozmetik ve tıbbi uygulamalarda popüler fitokimyasallar arasındadır (He, 2009; Noula ve ark., 2010). Bu nedenle bu türlerin hem tarlada hem de doku kültürü teknikleri ile üretilmesi büyük önem taşımaktadır [1]

2.2.1. *Onosma demirizii* Türü

Onosma demirizii, *O. subulifolium* ile yakından ilişkilidir; ancak, bu yeni tür oldukça farklıdır. *O. demirizii*'nin sarımsı yeşil patent kıllı indumentumu, lineer ila dar oblanceolate gövde yaprakları ve daha kısa kaliks ve korollaya sahiptir. Ayrıca liflerden daha uzun olan anterleri de bulunmaktadır (Şekil 2.1). Ek olarak, bu yeni türün *O. thracicum* Velen. ile benzerlikleri vardır, ancak daha kısa gövdesi, kıvrık yaprakları, tüysüz ve krem tacı ve subkapitat çiçek salkımına göre farklılık göstermektedir [7].



Şekil 2.1. *Onosma demirizii* bitkisi genel görünümü [7]

2.3. *Onosma* Türlerinin Literatürdeki Yeri

2.3.1. Fitokimyasal Çalışmalar

Literatür araştırması, *Onosma* L. cinsi üzerinde çok az fitokimyasal çalışmanın yapıldığını ve şimdiye kadar sadece bazı naftakinonlar, alkaloidler ve fenolik bileşiklerin rapor edildiğini ortaya koymaktadır [12]. Alkanninler ve shikoninler, Boraginaceae familyasının esas olarak *Alkanna*, *Lithospermum*, *Echium*, *Onosma* ve *Arnebia* cinslerine ait birçok türün köklerinin dış tabakasında bulunan, doğal olarak oluşan izoheksenilnaftazarinlerin kiral çiftleridir [13, 14]. Yapılan bir çalışmada, *Onosma bracteosum*'da daha yüksek seviyelerde oleik ve α -linolenik asitler tespit edilmişken, diğer yağ asitleri ve α -tokoferol, *O. thracicum*'da daha yüksek derişimlerde saptanmıştır [15].

Onosma arenaria türünün alkaloid özütünden asetil ve ekimidinil kısımları ile esterleştirilmiş 1,2 doymamış pirolizidin alkaloidi olan uplandicine elde edilmiş ve yapısı kütle spektroskopisi, ¹H- ve ¹³C-nükleer manyetik rezonans (NMR) analizi ile doğrulanmıştır. Ayrıca, kütle spektral verileri ve/veya Kovats indeksleri temelinde dokuz minör alkaloid tanımlanmıştır [14, 16].

Onosma argentatum kökleri n-heksan-diklorometan karışımı (1:1) ile özütlenmiş; silika jel kolon kromatografisine tabi tutulmuş ve elüsyon, gradyan elüsyonlu bir n-heksan-etil asetat karışımı ile yapılarak deoksishikonin, asetil shikonin, 3-hidroksi-izovaleril shikonin ve 5,8-O-dimetil asetil shikonin elde edilmiştir [17, 18].

Onosma echioides ile ilgili yapılan çalışmada, deoksialkannin veya deoksishikonin ve 5,8-dihidroksi-2-(4-metil-6-okso-5,6-dihidro-2H-piran-2-il)-[1,4] naftokinon'un varlığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte aynı çalışmada, özüt içerisinde arnebin VI bulunmuş ve HPLC-MS ile karakterize edilmiştir [19].

Onosma echioides var. *columnae* türü uçucu yağı, gaz kromatografisi ve gaz kromatografisi-MS ile araştırılmıştır. 64 uçucu bileşen tanımlanmış, çiçek yağlarında heksadekanoik asit ve fitol baskın iken, fitol ve heksahidrofarnesil aseton yaprak uçucu yağlarında ana bileşen olarak tespit edilmiştir. Alkanlar, yağ asitleri ve aldehytlerin çiçek uçucu yağında ana fraksiyonu oluştururken, yaprak uçucu yağının oksijenli diterpenler ve ketonların baskın olduğu belirlenmiştir [14, 20].

Onosma paniculata bitkisinin petrol eteri özütünden perperatif HPLC ile β-hidroksiizovalerilshikonin, asetilshikonin, dimetilacrylshikonin ve bir a-metilbutirilshikonin ve izovalerilshikonin karışımının izole edildiği yedi fraksiyon yedi fraksiyon toplanmıştır ve çeşitli shikonin türevleri saptanmıştır [21].

Onosma exsertum, *O. confertum*, *O. hookerii* var. *longiflorum*, *O. hookerii* ve *O. waltonii* türlerinden izole edilen sekiz naftokinon bir HPLC yöntemi ile belirlenmiştir. Önemli miktarlarda naftakinon türevleri içeren bu *Onosma* türleri aynı zamanda Çin'deki Tibet ve Yunnan halkları tarafından da kullanılmaktadır [22].

Onosmin A ve B, *Onosma hispidum* bitkisinden izole edilmiş ve yapıları, 2D-NMR içeren spektroskopik çalışmalarla 2-[(4-metilbenzil)amino]benzoik asit ve metil 2-[(4-metilbenzil)amino]benzoat olarak belirlenmiştir. Bu türden aynı zamanda apigenin, 6, 4' dimetoksi 3, 5, 7 trihidroksi flavon, 6, 7-dimetoksi-3, 5,4' trihidroksi-flavon ve apigenin 7-O- β -D-glukozit bilinen bileşikleri de rapor edilmiştir [23]. 2006 yılında, yine aynı bitkinin kök kabuğunun etanolik özütünden 4-hidroksi-3-metoksi sinamik asit (ferulik asit) ve 4-hidroksi-3-metoksi benzoik asit (vanilik asit) izolasyonu yapılmıştır [24]. Yeni bir flavanon olan hispidon, spektroskopik yöntemlerle izole edilmiş ve (2S)-5, 2'-dihidroksi-7, 4', 5' trimetoksi flavanon yapısı tanımlanmış ve bu türe ek olarak benzoik asit ve 4-hidroksi benzoik asit de rapor edilmiştir [13].

2.3.2. Etnofarmakolojik Çalışmalar

Onosma cinsinin bitkileri, anti-inflamatuar, yara iyileşmesi, analjezik ve antibakteriyel etkilerinden sorumlu olabilen alkannin ve shikonin, flavonoidler, ferulik ve vanilik asitler içerir. Bir literatür çalışmasına göre bu fitokimyasalların, indometasinin neden olduğu gastrik hasar olmaksızın önemli anti-inflamatuar ve anti-ağrı etkisine sahip olduğu görülmüştür [25]. *Onosma limitaneum*'un antikanser aktiviteye [23] ve *O. argentatum*'un antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelere sahip olduğu rapor edilmiştir [14, 26].

Onosma argentatum kökü özütünün insan amniyon fibroblastlarının büyümesini uyarma davranışları araştırılmış, yara iyileştirme aktivitesinin kısmen shikonin türevlerinin aditif etkisine bağlı olabileceği belirtilmiştir [18]. Kök özütünün ayrıca spazmolitik ve antipiretik aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir [27].

O. arenaria'nın kök özütünün naftazarin türevlerine sahipti olduğu ve insan serviks adenokarsinom hücreleri ve lösemi K562 hücreleri üzerinde sitotoksikite gösterdiği bildirilmiştir [14]. Aynı bitki üzerine yapılan başka bir çalışmaya göre β -hidroksiizovalerilalkannin, asetilalkannin ve pigment fraksiyonunun malign olmayan periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) ve aynı zamanda fitohemagglutinin tarafından aktive edilen sağlıklı PBMC üzerinde yüksek sitotoksikite sergilediği belirtilmiştir [28]. Deneysel bir çalışmada, *Onosma armeniacum*'un antiülser ve antioksidatif özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir [29].

Onosma aucheriana'nın sulu, metanolik ve diklorometan özütleri, insan makrofajları tarafından nitroz oksit üretimini indüklediği de gösterilen parazitin hücre içi amastigot formu üzerinde ilginç antileishmanial aktiviteler sergiledi belirtilmiştir [30].

Onosma bracteatum özütünün sıçan peritoneal mast hücrelerinin degranülasyonu üzerindeki etkisi ve mast hücrelerinin immünolojik olarak indüklenen degranülasyonunda hücre inhibitör etkisi önemli bulunmuştur [31]. Bu bitkinin hidro-alkolik özütü, mast hücre aktivitesini, romatoid artriti stabilize ettiği için astımda kullanılmış ve kemirgenlerde eozinofillerin ve nötrofillerin infiltrasyonunu azaltmada bronşiyal aşırı duyarlılığın belirgin azalmasında önemli bir rol gösterdiği belirtilmiştir [32, 33]. Bu bitki aynı zamanda Unani tıp sisteminde stres, vücut homeostazının bozuklukları veya psikolojik (davranışsal değişiklikler), immünolojik ve hormonal dengesizlikler gibi normal vücut fizyolojisinin bozuklukları ile Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, hipertansiyon, insan vücudunun bağışıklık sisteminin zayıflığı, astım, diyabet, kalp rahatsızlıkları ve kanser [34] gibi bazı kronik hastalıkların oluşumuna neden olan rahatsızlıklar için tedavi edici antioksidan [35] olarak kullanılmaktadır [36, 37].

Onosma chlorotricum türünün antioksidan kapasitesi [14] ve *O. griffithii* bitkisinin ise spazmojenik aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir [38]. Bununla birlikte, *O. chlorotricum* [39] ve *O. dichroanthum* [40] türlerinin ise spazmolitik aktivite sergiledikleri bildirilmiştir. Ayrıca *O. dichroanthum* bitki kökleri aseton özütünün güçlü serbest radikal süpürücü etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir [41].

İsviçre farelerinde, markırlar ve oksidatif stres ile indüklenen iki aşamalı cilt kanseri ve tümör promotör üzerine *O. echiodides* özütünün etkisi araştırılmıştır. Yapılan her iki çalışmada da *O. echiodides* özütünün hem ultraviyole B radyasyonuna maruziyetin takip ettiği benzoil peroksitin tekli topikal uygulaması üzerine oksidatif stressi indüklediği tümör gelişiminin markır parametrelerini yükselttiği bildirilmiştir [42]. *Onosma griffithii* bitkisinin IC₅₀ değerlerine bağlı olarak *Leishmania major*'a karşı parazit öldürücü olarak etkili bir aktiviteye sahip olduğu; benzer şekilde metanolik özütün *Aspergillus flavus* ve *Fusarium solani*'ye karşı orta derecede antifungal aktivite, su özütünün ise *Staphylococcus aureus*'a karşı orta derecede antibakteriyel aktivite sergilediği gösterilmiştir [14, 43].

Onosma stellulata türünün toprak üstü ve toprak altı kısımlarının genotoksik etkilerinin *in vitro* koşullarda, soğanın meristematik hücrelerinde mitozda genotoksik etkilere neden olan kromozom anormalliklerinin gözlemlenmesiyle birlikte *Allium* testi kullanılarak yapılmıştır [16, 44].

Onosma hispidum köklerinin kabuğunun etanolik özütünün antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Yine köklerin etanolik özüt ve ferulik asit içeren metanol fraksiyonunun vanilik asitle karşılaştırıldığında *corynebacteria*, enterokok, stafilokok ve streptokok türlerine karşı önemli biyoaktivite sergilemiş [24, 45]. Bununla birlikte, bu bitkinin etanol özütünden izole edilen bir flavanon olan hispidon, kolinesteraz inhibisyon özelliğine [13] sahipken; kök özütü ise, yara iyileştirici [46], antitussif [24] ve antidiyabetik aktivitelere sahiptir [47].

Onosma paniculatum hücre kültüründe shikonin ve türevinin oluşumu ile brassinolidin hücre büyümesi üzerine etkisi de incelenmiştir [48]. Kallus ve süspansiyon kültürü yapılan hücrelerin pigment verimlerinin arttığı sonucuna varılmış ve maksimum pigment verimi, ortama 10^{-6} M askorbik asit eklendiğinde elde edilirken [49], petrol eteri özütünün, kaspaz bağımlı bir şekilde hücre ölümünü indüklediği belirtilmiştir [50]. *Aspergillus* türü kültürünün bir elisitör preparatı da shikonin türevlerinin oluşumunu hızlandırabileceği, ancak *O. paniculatum* hücre kültürlerinde hücre büyümesini geri dönüşümsüz bir şekilde durdurabileceği bildirilmiştir [51].

Son on yılda ise literatürde yapılan çalışmalarda, *O. sieheana*, *O. stenoloba* [52], *O. pulchra* [53], *O. aucheriana*, *O. frutescens*, *O. sericea* [54], *O. tauricum* var. *tauricum* [55], *O. gigantea* [56], *O. heterophyllum* [57], *O. microcarpum*, *O. nana* [58], *O. cappadocica*, *O. rutilum* [59], *O. inexpectata*, *Onosma armenum* [60], *Onosma gracilis*, *O. oreodoxa* [61], *O. trapezuntea*, *O. rigidum* [62], gibi bazı türlerin ilgi çekici biyolojik/farmakolojik aktivitelere sahip oldukları tespit edilmiştir.

2.3.3. Geleneksel Kullanım

Geleneksel olarak, *Onosma* L. cinsi bitkiler, romatizma, mesane ağrısı, böbrek tahrişi, kalp çarpıntısı ve idrar söktürücü, serinletici ve yatıştırıcı etkileri için kökleri kullanılır [14, 26]. Hindistan'da hipertansiyon, ateş ve nörolojik rahatsızlıklarının tedavisinde kullanılır. Türkiye'de bu bitkiler bademcik iltihabı, hemoroid ve bronşit gibi iltihaplı rahatsızlıkları ve ağrıları tedavi etmek için kullanılmaktadır [63].

Ateş, ağrı kesici, yara, ısırık, enfeksiyon hastalıkları, sokma ve çiçeklerin tedavisinde kullanılan *O. hispidum* Wall., kalp toniği ve uyarıcısı olarak kullanılırken, ezilmiş kökler deri döküntülerine dışarıdan uygulanır [47].

Onosma argentatum Hub.-Mor. bitki kökleri Türkiye'de geleneksel olarak yara iyileşmesi, yanık için kullanılır ve Lorestan vilayeti geleneksel tıbbında Tashnehdary (*O. chlorotricum*) olarak bilinen bir bitkinin yağlı ekstresi yara iyileşmesi için topikal olarak kullanılmaktadır [39].

Onosma bracteatum, Unani tıp sisteminde “Gaozaban” ve Orta Doğu'da ise tipik olarak ıslak zeminde yetişen, üçgen gövdeli ve göze çarpmayan çiçekleri olan çimen benzeri bir bitki anlamına gelen “Sedge” olarak bilinir ve geleneksel olarak idrar çıkışının düzenlenmesi ile vücudun bağışıklık direncini oluşturmaya yardımcı olan bir tonik olarak kullanılır [34]. Ayrıca astım, bronşit, tonik, değiştirici, yatıştırıcı, idrar söktürücü ve spazmolitik tedavisinde de kullanıldığı bildirilmiştir [14]. Frengi, romatizma, cüzzam, ateşli febril hastalıkları, aşırı susuzluğu giderme, mesanenin tahriş olması, kalp çarpıntısı, mide ve boğaz ağrısı tedavisinde, ayrıca halk hekimliğinde yara ve cilt tedavisinde kullanılır [14, 37].

Onosma echioides'nin yaprakları alternatif tıpta kullanılır ve çocuklara müshil olarak tozu verilmiştir. Çiçekler kordiyal, uyarıcı madde olarak, romatizma ve kalp çarpıntılarının tedavisinde, kök çürüklerinde, deri döküntülerini tedavi etmek için kullanılır [64]. *O. paniculata*'ın kurutulmuş kökleri, geleneksel Çin tıbbında kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır [14, 21]. Türkiye'de halk ilacı olarak köylüler *O. armeniacum*'un köklerini tereyağı ile ısıtarak süzerler ve daha sonra yara, yanık, nefes darlığı, ses kısıklığı, hemoroid, karın ağrısı, mide ülseri ve kadın hastalıkları tedavisinde kullanırlar [14, 29].

2.3.4. Endüstriyel Kullanım

Onosma hispidum Wall., renklendirici olarak gıda maddelerinde, yağlarda ve tıbbi hazırlıklarda yaygın olarak kullanılan kırmızı bir boya veren kök olan Ratanjot'un kaynağı olduğu bildirilmiştir [14]. Renginden dolayı pul biber gibi baharatlarda ve gıda hazırlıklarında katkı maddesi olarak da kullanılmıştır.

Hidrojenlenmiş bitkisel bir yağ olan Vanaspati için görünür bir renklendirme ajanı olarak kullanımı önerilmiştir, ancak sıçanlar üzerinde yapılan besleme denemeleri, bu renklendirme maddesinin düşük dozlarda toksik olmadığını ve yüksek derişimlerde toksik olduğunu ve beslenmeye devam ettikten sonra karaciğer hücrelerinin tahrip olmasına neden olduğunu göstermiştir. Vanaspati'ye uygulanan renk, alkali solüsyonla basit kimyasal işlemle ve önemli ölçüde doğrudan güneş işığına veya ısıtmaya maruz bırakılarak tamamen giderilebilmektedir [14, 46, 65].



3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Çözücüler ve Kimyasallar

Gallik asit, (+)-kateşin, pirokatekol, klorojenik asit, 2,5-dihidroksibenzoik asit, 4-hidroksibenzoik asit, (-)-epikateşin, kafeik asit, şiringik asit, vanillin, taksifolin, sinapik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, rosmarinik asit, 2-hidroksisinnamik asit, pinosresinol, kuersetin, luteolin ve apigenin Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, MO, ABD) satın alındı. Vanillic acid, 3-hidroksibenzoik asit, 3,4-dihidroksifenilasetik asit, apigenin 7-glukosit, luteolin 7-glukosit, hesperidin, eriyodiktiyol ve kampferol ise Fluka'dan (St. Louis, MO, ABD) temin edildi. Son olarak, verbaskosit, protokateşik asit ve hiperosit HWI Analytik'ten (Ruelzheim, Almanya) satın alındı. Metanol Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, MO, ABD), etil asetat ve metanol, Carlo Erba Reagents'tan (Milan, İtalya) temin edildi. Millipore Milli-Q Plus su arıtma sistemi (Millipore Bedford Corp., Bedford, MA) kullanılarak ultra saf su elde edildi.

3.2. Bitkinin Toplanması ve Teşhis Edilmesi

Onosma demirizii bitkisinin toprak üstü kısımları çiçeklenme zamanında Haziran 2020'de Kayseri ili Pınarbaşı-Gürün karayolunun 5-10. km arasında 1550 m yükseltide toplanmıştır (37° 47' 26"N 36° 28' 27"E). Bitki, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Biyoloji Bölümü Öğretim elemanı Dr. Olcay CEYLAN tarafından teşhis edilmiştir (Herbaryum no: OC.5050)

3.3. Özütlerin Hazırlanması

Bitkinin toprak üstü kısımları, doğrudan güneş ışığının olmadığı ve iyi hava akışının sağlandığı bir yerde birkaç hafta kurutuldu. Daha sonra bir laboratuvar tipi bir blender kullanılarak küçük parçalara kesildi ve ardından özütleme aşamasına kadar saklandı.

Onosma demirizii'nin küçük parçalara ayrılmış örneklerinin etil asetat (EtOAc) ve metil alkol (MeOH) özütleri maserasyon ile gerçekleştirildi. Maserasyon işlemi, bitki/çözücü oranı 1/20 olacak şekilde 150 rpm'de 24 saatlik özütlemeyle gerçekleştirildi ve bu işlem 3 kez tekrar edildi. Sonra bir araya getirilen özütlerdeki çözücüler vakum altında buharlaştırılarak uzaklaştırıldı. Su ekstraktının hazırlanmasında maserasyonla özütlemekten farklı bir yol izlendi. Su özütü, küçük

parçalara ayrılmış toprak üstü kısımlarının 15 dakika kaynar suda demlendirilmesiyle hazırlandı. Bu işlem için beş gram bitki materyali 100 mL kaynar safsu (1:20) ile karıştırıldı ve 150 rpm'de çalkalandı. Özütleme işlemi tamamlandıktan sonra karışım liyofilize edildi ve tüm özütler kullanılıncaya kadar 4 °C'de muhafaza edildi [56].

3.4. Antioksidan Aktivite Analizleri

Özütlerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda, toplam antioksidan aktiviteleri fosfomolibdenyum testi ile analiz edildi [66]. Demir iyonu şelatlama analizinde [67] tarafından izlenen yöntem uygulandı. Özütlerin indirgeme potansiyellerinin test edileceği CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) ve FRAP (ferric reducing antioxidant power) testlerinde ise sırasıyla Apak ve ark. [68] ve Kocak ve ark. [69] tarafından izlenen yöntemler kullanıldı. Özütlerin serbest radikal giderim aktiviteleri DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ve ABTS [2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazolone-6-sulphonic acid) radical cation] yöntemleri aracılığıyla test edildi [66].

Antioksidan aktivite testlerinden elde edilen sonuçlar IC₅₀ veya EC₅₀ cinsinden ifade edilecektir. IC₅₀ ifadesi, radikal süpürüm ve demir (II) iyonları şelatlama testlerinde %50 etkinlik sağlayan örnek derişimini temsil etmektedir. EC₅₀ ise, aynı indirgeme gücü ve fosfomolybdenyum testlerinde 0.500 absorbans sağlayan örnek derişimi anlamına gelmektedir. Ayrıca sonuçlar, pozitif kontroller olan troloks ve EDTA eşdeğeri cinsinden de ifade edildi.

3.4.1. Toplam Antioksidan Aktivite Testi

Örneklerin toplam antioksidan aktivitesi fosfomolibdenyum yöntemi ile test edildi. Örnek çözeltisi (0.2 mL), 2.0 mL reaktif çözeltisi (0.6 M sülfürik asit, 28 mM sodyum fosfat ve 4 mM amonyum molibdat) ile karıştırıldı. Örnek absorbansı, 95 °C'de 90 dk inkübasyondan sonra 695 nm'de okutuldu.

3.4.2. DPPH Radikal Süpürüm Testi

DPPH radikal giderim aktivitesini tespit edebilmek için, 4.0 mL % 0.004 MeOH-DPPH çözeltisine 1.0 mL örnek çözeltisi ilave edildi. Örneğin absorbansı, karanlıkta ve oda sıcaklığında 30 dk inkübasyondan sonra 517 nm'de okutuldu.

3.4.3. Demir (II) İyonları Şelatlama Testi

Özütlerin metal şelatlama aktivitelerinin tespiti için, FeCl_2 çözeltisine (0.05 mL, 2.0 mM) örnek çözeltisi (2.0 mL) ilave edildi. Reaksiyon, 5.0 mM ferrozin (0.2 mL) ilave edilerek başlatıldı. Benzer şekilde, FeCl_2 çözeltisine (0.05 mL, 2.0 mM) ve ferrozin içermeyen distile suya (0.2 mL) örnek çözeltisi (2.0 mL) ilave edilerek kör hazırlandı ve daha sonra, örnek ve körün absorbansları, oda sıcaklığında 10 dk inkübasyondan sonra 562 nm'de okutuldu.

3.4.4. ABTS Katyon Radikal Süpürüm Testi

ABTS kation radikali giderme aktivitesi için öncelikle ABTS radikal katyonu elde edildi. Söz konusu radikal, 7.0 mM ABTS çözeltisinin 2.45 mM potasyum persülfat ile reaksiyona sokulması ve karışımın oda sıcaklığında ve karanlıkta 12-16 saat bekletilmesiyle elde edildi. Teste başlamadan önce, ABTS çözeltisi MeOH ile seyreltilerek 734 nm'de 0.700 ± 0.02 'lik bir absorbans sağlandı. ABTS çözeltisine (2.0 mL) örnek çözeltisi (1.0 mL) ilave edilerek karıştırıldı. Örneğin absorbansı, oda sıcaklığında 7 dakikalık inkübasyondan sonra 734 nm'de okutularak tespit edildi.

3.4.5. CUPRAC İndirgeme Gücü Testi

Örneklerin CUPRAC testlerini gerçekleştirebilmek için CuCl_2 (1.0 mL, 10.0 mM), neocuproin (1.0 mL, 7.5 mM) ve NH_4Ac tamponuna (1.0 mL, 1.0 M, pH 7.0) 0.5 mL örnek çözeltisi eklendi. Benzer şekilde, önceden hazırlanmış reaksiyon karışımına (3.0 mL) CuCl_2 içermeyen örnek çözeltisi (0.5 mL) ilave edilerek kör hazırlandı. Daha sonra, örnek ve körün absorbansları, oda sıcaklığında 30 dk inkübasyondan sonra 450 nm'de okutuldu.

3.4.6. FRAP İndirgeme Gücü Testi

FRAP testi için, asetat tamponu (0.3 M, pH 3.6), 2,4,6-tris (2-piridil), 40.0 mM HCl içinde s-triazin (TPTZ) (10.0 mM) ve 10:1:1 (v/v/v) oranında FeCl_3 (20.0 mM) içeren önceden hazırlanmış FRAP reaktifine (2.0 mL) örnek çözeltisi (0.1 mL) ilave edildi. Daha sonra, örneğin absorbansı, oda sıcaklığında 30 dk inkübasyondan sonra 593 nm'de okutuldu.

3.5. Enzim İnhibisyon Aktivite Analizleri

Enzim inhibisyon testleri kapsamında, kolinesteraz (AChE ve BChE), tirozinaz, α -amilaz ve α -glukosidaz enzimleri üzerine özütlerin inhibisyon aktivite testleri de literatürde verilen yöntemler izlenerek gerçekleştirildi [70].

Enzim inhibisyon aktivite testlerinden elde edilen sonuçlar, IC₅₀ cinsinden ifade edildi. IC₅₀ ifadesi, enzim inhibisyon testlerinde %50 etkinlik sağlayan örnek derişimini temsil etmektedir. Ayrıca sonuçlar pozitif kontroller olan galantamin, kojik asit veya akarboz eşdeğeri cinsinden de ifade edildi.

3.5.1. Kolinesteraz İnhibisyon Aktivite Testi

Kolinesteraz inhibitör aktivite, Ellman metodu kullanılarak tespit edildi. Örnek çözeltisi (50.0 μ L), 96 kuyucuklu bir mikropalak içinde, tris-HCl tamponu (pH 8.0) içinde DTNB (125.0 μ L) ve AChE (veya BChE) çözeltileri (25.0 μ L) ile karıştırılacak ve 25 °C'de 15 dk inkübe edildi. Reaksiyon daha sonra asetiltiyokolin iyodür (ATCI) veya butiriltiyokolin klorür (BTCl) (25.0 μ L) ilavesiyle başlatıldı.

Benzer şekilde, enzim çözeltileri (AChE veya BChE) olmadan tüm reaksiyon reaktiflerine numune çözeltisi ilave edilerek kör hazırlandı. Numune ve körün absorbansları, 25 °C'de 10 dk inkübasyondan sonra 405 nm'de okutuldu. Körün absorbansı örneğinkinden çıkartıldı.

3.5.2. Tirozinaz İnhibisyon Aktivite Testi

Tirozinaz inhibitör aktivite, substrat olarak L-DOPA ile modifiye edilmiş bir dopakrom yöntemi kullanılarak ölçüldü. Örnek çözeltisi (25.0 μ L), 96 kuyucuklu bir mikropalak içinde tirozinaz çözeltisi (40.0 μ L) ve fosfat tamponu (100.0 μ L, pH 6.8) ile karıştırılacak ve 25 °C'de 15 dk inkübe edildi. Reaksiyon daha sonra L-DOPA (40.0 μ L) ilave edilerek başlatıldı.

Benzer şekilde, tüm reaksiyon reaktiflerine enzim (tirozinaz) çözeltisi içermeyen örnek çözeltisi ilave edilerek kör hazırlandı. Örnek ve körün absorbansları, 25 °C'de 10 dk inkübasyondan sonra 492 nm'de okutuldu.

3.5.3. α -Glukosidaz İnhibisyon Aktivite Testi

α -Glukosidaz inhibitör aktivitenin tayini için, örnek çözeltisi (50.0 μ L), 96 kuyucuklu bir mikropalak içinde glutatyon (50.0 μ L), fosfat tamponu (pH 6.8) içinde hazırlanmış α -glukosidaz çözeltisi (50.0 μ L) ve PNPG (50.0 μ L) ile karıştırıldı ve 37 °C'de 15 dk inkübe edildi.

Benzer şekilde, tüm reaksiyon reaktiflerine enzim (α -glukosidaz) çözeltisi içermeyen örnek çözeltisi ilave edilerek kör hazırlandı. Reaksiyon daha sonra sodyum karbonat (50.0 μ L, 0.2 M) ilavesiyle durduruldu. Örnek ve körün absorbansı 400 nm'de okutularak körün absorbansı örneğinkinden çıkartıldı.

3.5.4. α -Amilaz İnhibisyon Aktivite Testi

α -Amilaz inhibitör aktivite, Caraway-Somogyi iyot/potasyum iyodür (I/KI) yöntemi kullanılarak çalışıldı. Örnek çözeltisi (25.0 μ L), 96 kuyucuklu mikropakta fosfat tamponu (6.0 mM sodyum klorür ile pH 6.9) içerisinde α -amilaz çözeltisi (50.0 μ L) ile karıştırıldı ve 10 dk boyunca 37 °C'de inkübe edildi. Ön inkübasyondan sonra reaksiyon, nişasta çözeltisi (50.0 μ L, % 0.05) ilave edilerek başlatıldı.

Benzer şekilde, tüm reaksiyon reaktiflerine enzim (α -amilaz) çözeltisi içermeyen örnek çözeltisi ilave edilerek kör hazırlandı. Reaksiyon karışımı 10 dk 37 °C'de inkübe edildi. Reaksiyon daha sonra HCl (25.0 μ L, 1.0 M) ilavesiyle durduruldu. Daha sonra, iyot-potasyum iyodür çözeltisi (100.0 μ L) ilave edilmiştir. Örnek ve körün absorbansları, 630 nm'de okutularak körün absorbansı örneğinkinden çıkartıldı.

3.6. Özütlerin Fenolik Bileşik İçeriklerinin Tespit Edilmesi

3.6.1. LC-ESI-MS/MS Analizi

Kromatografik analizler için 6420 Triple Quad Kütle Spektrometresi (MS) entegre edilmiş bir Agilent Technologies 1260 Infinity sıvı kromatografi sistemi kullanıldı [71]. Kromatografik ayırma, Poroshell 120 EC-C18 kolon (100 mm x 4.6 mm I.D., 2.7 µm) kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm izomerlerin tam olarak çözünmesi ve tüm hedef bileşikler için en yüksek hassasiyetin elde edilmesi için üç mobil faz test edildi: i) % 0.1 formik asit/MeOH, ii) % 0.1 asetik asit ve 5 mM amonyum asetat/asetonitril ve iii) % 0.1 formik asit, % 0.1 formik asit/asetonitril ve 10 mM amonyum format. Bu mobil fazlardan en iyi değerler, %0.1 formik asit/metanol karışımından elde edildi ve bu karışım mobil faz olarak seçildi. Mobil faz, çözücü A'dan (%0.1, v/v formik asit çözeltisi) ve çözücü B'den (metanol) meydana gelecek şekilde oluşturuldu. Gradyan profili şu şekilde ayarlandı: 0. dk %2.0 B çözücüsü, 3. dk %2.0 B çözücüsü, 6. dk %25.0 B çözücüsü, 10. dk %50.0 B çözücüsü, 14. dk %95.0 B çözücüsü, 17. dk %95.0 B ve 17.5 dk %2.0 B çözücüsü. Kolon sıcaklığı 25 ° C'de tutuldu. Akış hızı 0.4 ml/dk ve enjeksiyon hacmi 2.0 µL idi.

Tandem MS, bir ESI kaynağı aracılığıyla LC sistemine entegre edildi. MS'in elektrosprey kaynağı negatif ve pozitif çoklu reaksiyon izleme (MRM) modunda çalıştırıldı. Entegrasyon koşulları şu şekilde oluşturuldu: kapillar voltaj -3.5 kV, gaz sıcaklığı 300 °C ve gaz akışı 11.0 L/dk. Nebulizatör basıncı 40 psi olarak ayarlandı.

Negatif ve pozitif iyon modunda çalışılan tüm bileşikler tek bir enjeksiyon ile analizlenmiştir. MRM negatif ve pozitif iyonizasyon modu ile hedef analitlerin analizi, gerçek bir standart çözeltinin iyon çiftleri ile birlikte alıkonma sürelerinin karşılaştırılmasıyla tanımlandı.

3.6.2. Toplam Fenolik Bileşik Analizi

Toplam fenolik bileşik analizi için, örnek çözeltisi (0.25 mL), seyreltilmiş Folin-Ciocalteu reaktifi (1.0 mL, 1:9) ile karıştırılarak kuvvetlice çalkalandı. 3 dk sonra Na₂CO₃ çözeltisi (0.75 mL,% 1.0) ilave edildi ve örneğin absorbansı, oda sıcaklığında 2 saat inkübasyondan sonra 760 nm'de okutuldu. Toplam fenolik bileşik içeriği gallik asit eşdeğerleri olarak hesaplandı [54].

3.6.3. Toplam Flavonoit Bileşik Analizi

Toplam flavonoit içeriğinin analizi için, örnek çözeltisi (1.0 mL) MeOH içinde aynı hacimde $AlCl_3$ (%2.0) ile karıştırıldı. Benzer şekilde, $AlCl_3$ içermeyen MeOH'a (1.0 mL) örnek çözeltisi (1.0 mL) ilave edilerek kör hazırlandı. Örnek ve körün absorbansı, oda sıcaklığında 10 dk inkübasyondan sonra 415 nm'de okutuldu. Körün absorbansı örneğinkinden çıkartıldı ve toplam flavonoit içerik kuarsetin eşdeğeri cinsinden ifade edilecektir [54].

3.7. İstatistiksel Analizler

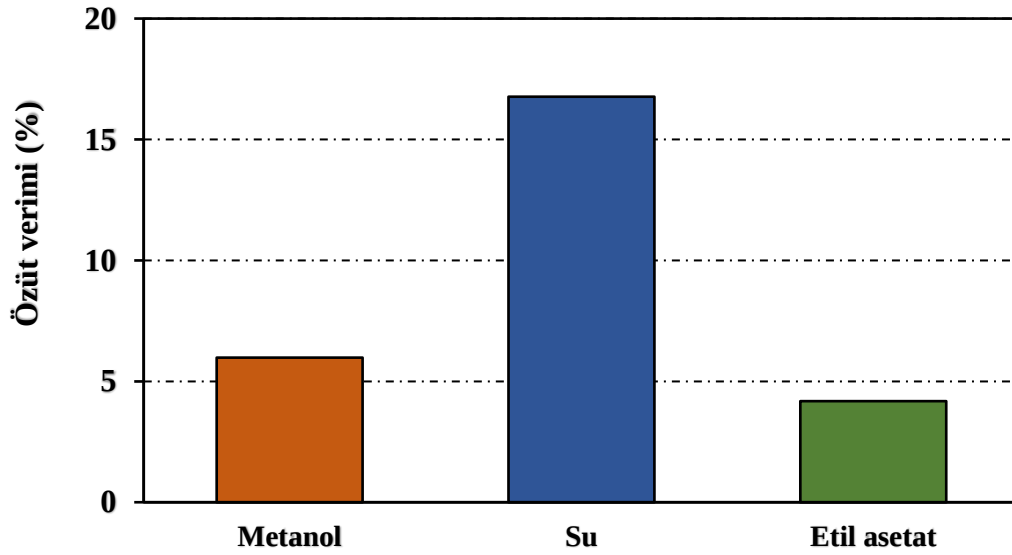
Sonuçların bilimsel tutarlılığını artırmak için tüm testler üç kez tekrarlanacaktır. Sonuçlar ortalama değer ve standart sapma (ortalama $\pm$ SD) olarak hesaplandı. Veriler arasındaki istatistiksel benzerlikleri/farklılıkları saptamak için ANOVA (tek yönlü varyans analizi), Tukey's honestly significant difference post hoc test ($\alpha = 0.05$) (SPSS v. 22.0) analizleri uygulandı. Antioksidan aktivite testlerinin her birinden elde edilen veriler bilimsel açıdan farklı değerler ihtiva ettiğinden, bunları doğrudan birbirleri ile kıyaslamak mümkün değildir. Bu nedenle, sonuçları karşılaştırılabilir bir forma dönüştürmek için bağıl antioksidan kapasite indeksi (RACI) analizi gerçekleştirildi. Fitokimyasalların antioksidan aktiviteye katkısı dikkate alındığından, özütlerin fenolik ve flavonoit içerikleri de hesaplama dâhil edildi [72, 73].

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Özütleme Verimleri

Onosma demirizii bitkisinin toprak üstü kısımlarından etil asetat ve metil alkol özütleri maserasyon yöntemiyle hazırlandı ve özüt verimleri sırasıyla; %4.18 ve %5.98 olarak tespit edildi. Bitkinin demleme yöntemiyle elde edilen su özüt verimi ise, %16.77 olarak tespit edildi (Şekil 4.1).

Literatürde farklı *Onosma* türlerinin su özüt verimlerinin diğer özütlerine oranla daha yüksek olduğuna dair veriler bulunmaktadır [53, 74].

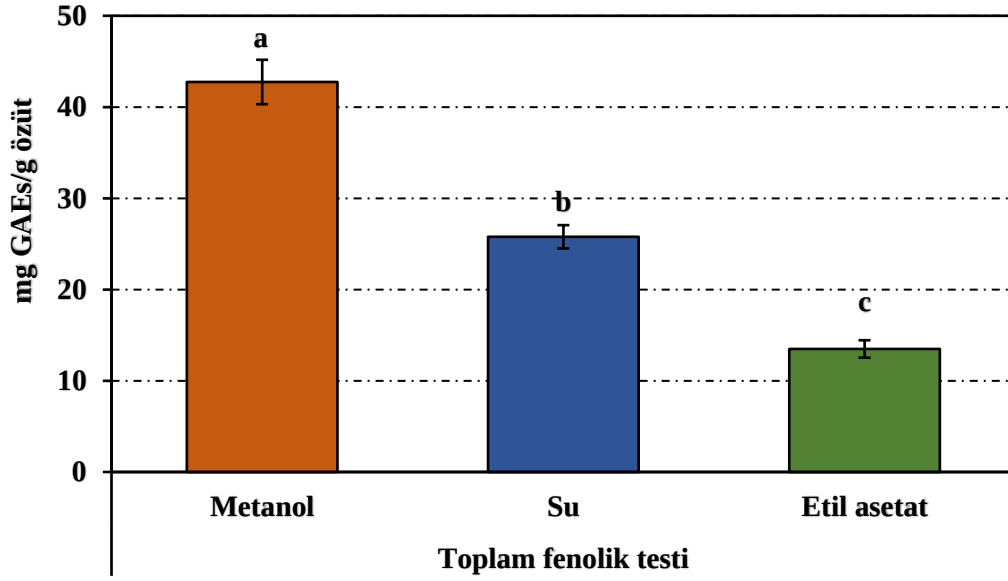


Şekil 4.1. Özütlerin özütleme verimleri

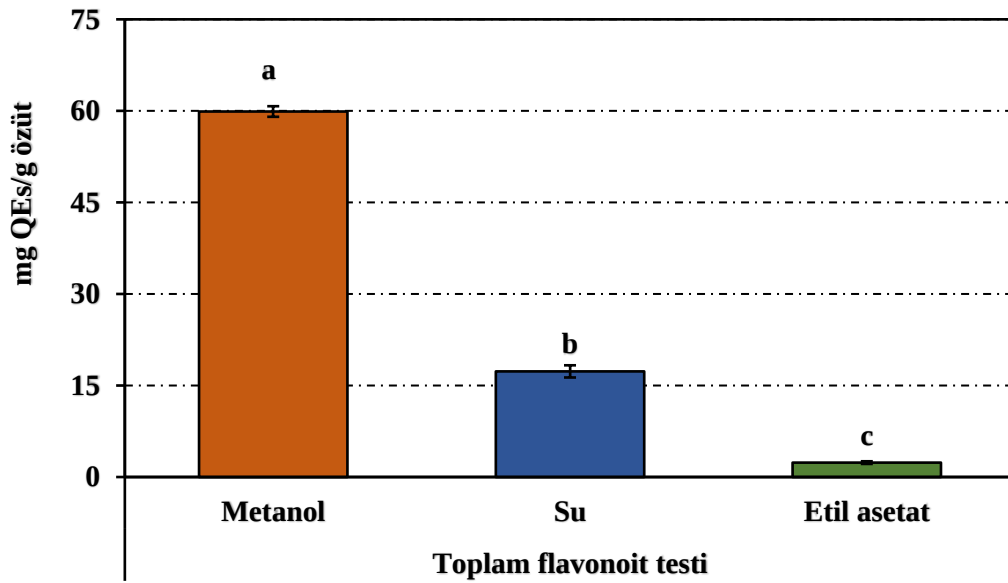
4.2. Özütlerin Toplam Fenolik ve Flavonoit İçerik Analizleri

Onosma demirizii özütlerinin toplam fenolik ve flavonoit bileşik miktarları Şekil 4.2 ve 4.3'te verilmiştir. Metanol özütünün hem toplam fenolik hem de flavonoit içeriği diğer özütlere nazaran daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Metanol özütünün toplam fenolik ve flavonoit içerikleri sırasıyla; 42.75 mg GAEs/g özüt ve 59.90 mg QEs/g özüt olarak tespit edilmiştir.

Literatürde çok sayıda *Onosma* türünün toplam fenolik ve flavonoit içerikleri belirlenmiş [52-57, 74-78] ve bu çalışmadan elde edilen verilerle uyum içerisinde olduğu görülmüştür.



Şekil 4.2. Özütlere toplam fenolik içerikleri



Şekil 4.3. Özütlere toplam flavonoit içerikleri

4.3. Özütlere LC-MS Analizleri

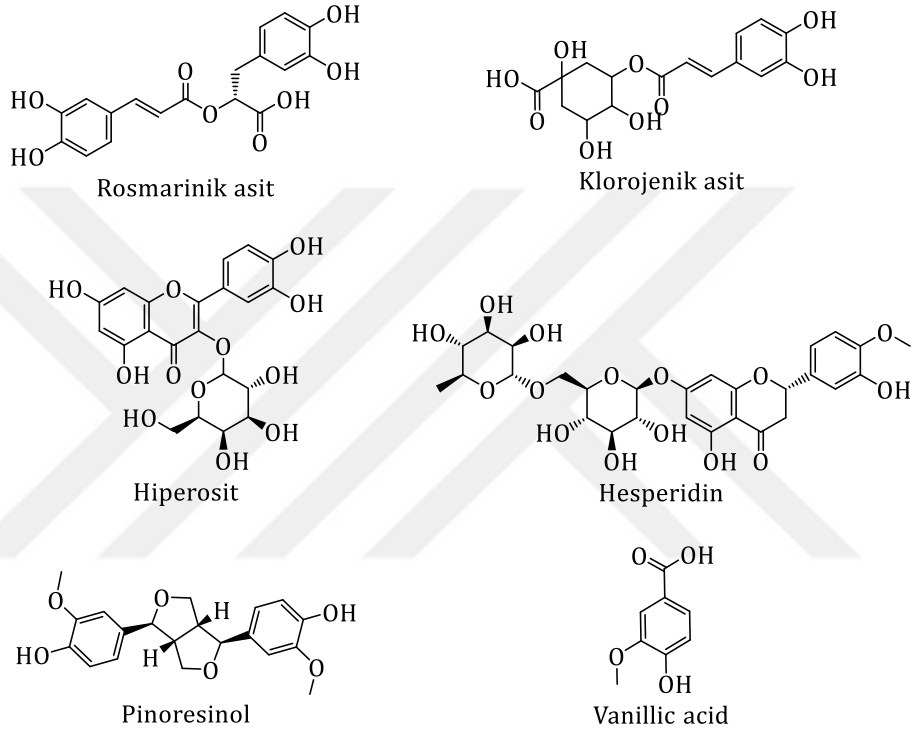
Çoklu reaksiyon izleme (MRM) modu, bir örnek içerisindeki analitlerin sıvı kromatografisi-kütle spektroskopisi (LC-MS/MS) ile kantitatif belirlenmesi için kullanılan en yaygın yöntemlerden biridir. Bu tez çalışmasında da, *O. demirizii* bitkisinin metanol, su ve etil asetat özütlərindeki fenolik bileşiklerin kantitatif analizleri LC-MS/ kullanılarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Özütlerdeki seçilen fitokimyasalların derişimleri (µg/g özüt)

Bileşikler	Metanol	Su	Etil asetat
Gallik asit	13.43±0.02 ^a	1.57±0.01 ^c	2.48±0.06 ^b
Protokateşuik asit	203±4 ^b	343±22 ^a	17.11±0.42 ^c
3,4-Dihidroksifenilasetik asit	5.79±0.32	nd	nd
(+)-Kateşin	20.2±1.6	nd	nd
Pirokatekol	nd	nd	nd
Klorojenik asit	31815±29 ^a	3012±38 ^b	614±37 ^c
2,5-Dihidroksibenzoik asit	235±1 ^a	40.9±0.1 ^b	6.13±0.13 ^c
4-Hidroksibenzoik asit	547±16 ^a	213±6 ^b	83.2±1.4 ^c
(-)-Epikateşin	5.15±0.27	nd	nd
Kafeik asit	194±1 ^a	144±3 ^b	6.46±0.26 ^c
Vanilik asit	803±47 ^a	281±3 ^b	100±1 ^c
Siringik asit	77.4±0.6 ^a	46.5±0.6 ^b	10.1±0.1 ^c
3-Hidroksibenzoik asit	10.8±0.1 ^b	16.3±0.2 ^a	3.05±0.17 ^c
Vanilin	76.4±1.4 ^a	4.38±0.19 ^c	15.7±0.1 ^b
Verbaskosit	nd	nd	nd
Taksifolin	nd	nd	nd
Sinapik asit	42.9±3.0 ^a	16.8±0.6 ^b	nd
p-Kumarik asit	119±2 ^a	43.5±1.2 ^b	16.9±0.1 ^c
Ferulik asit	381±20 ^a	40.5±0.2 ^b	54.6±0.3 ^b
Luteolin 7-glukosit	81.7±3.5 ^a	81.9±0.1 ^a	54.1±9.3 ^b
Hesperidin	177957±156 ^a	14255±54 ^b	10878±52 ^c
Hiperosit	10199±24 ^a	425±7 ^c	571±6 ^b
Rosmarinik asit	8857±103 ^a	77.0±3.9 ^b	146±8 ^b
Apigenin 7-glukosit	78.9±2.3 ^a	51.1±1.0 ^b	30.4±2.6 ^c
2-Hidrosinamik asit	nd	nd	nd
Pinoresinol	2502±60 ^a	681±1 ^b	318±13 ^c
Eriyodiktiyol	nd	nd	nd
Kuersetin	58.9±1.3 ^a	8.92±0.08 ^c	12.5±0.1 ^b
Luteolin	59.6±3.4 ^b	92.4±2.3 ^a	53.9±5.0 ^b
Kamferol	nd	nd	3.72±0.21
Apigenin	7.75±1.35 ^a	12.0±0.1 ^a	7.67±1.46 ^a

Aynı satırda aynı üst simgelerle işaretlenen değerler arasında istatistiksel fark yoktur. nd: tespit edilemedi.

Özütlerde genelde ana bileşenler olarak klojenik asit, hesperidin, hiperosit, rosmarinik asit ve pinoresinol tespit edilmiştir (Şekil 4.4). Her üç özütün de hesperidin bakımından zengin olduğu saptandı. Hesperidin miktarı metanol, su ve etil asetat özütlerinde sırasıyla; 177957, 14255 ve 10878 µg/özüt olarak belirlenmiştir. Metanol özütünün diğer iki özüte oranla fenolik ve flavonitler bakımından daha zengin olduğu ve bu sonucun da toplam fenolik ve flavonit test sonuçlarıyla uyumlu olduğu görülmektedir.



Şekil 4.4. Özütlerde bulunan ana fitokimyasalların açık yapıları

Literatürde, her ne kadar çok sayıda farklı *Onosma* türlerinin fitokimyasal içerikleriyle alakalı çalışmalar [52-57, 74-78] bulunsa da, *Onosma demirizii* özütlerinin fitokimyasal içeriği üzerine yapılan bu çalışmada tespit edilen fitokimyasallar bu çalışma ile ilk kez literatüre kazandırılmıştır.

Onosma sieheana, *O. stenoloba* [52], *O. pulchra* [53], *O. aucheriana*, *O. frutescens*, *O. sericea* [54], *O. tauricum* var. *tauricum* [55], *O. gigantea* [56], *O. heterophyllum* [57], *O. microcarpum*, *O. nana* [58], *O. cappadocica*, *O. rutilum* [59], *O. inexpectata*, *Onosma armenum* [60], *Onosma gracilis*, *O. oreodoxa* [61], *O. trapezuntea*, *O. rigidum* [62] gibi bazı türlerin de hesperidin, hiperosit, rosmarinik asit, klorojenik asit ve pinoresinol bakımından zengin oldukları rapor edilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen fitokimyasal içerik verileriyle literatürdeki verilerin birbirlerine benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, bazı araştırmacılar, bu cinsin özelliği olan alkaloidler, naftokinonlar, alkanninler ve shikoninler gibi bazı fitokimyasalların *Onosma* türlerinde varlığını ortaya çıkarmışlardır [12, 26, 79].

4.4. Özütlerin Antioksidan Aktivite Analizleri

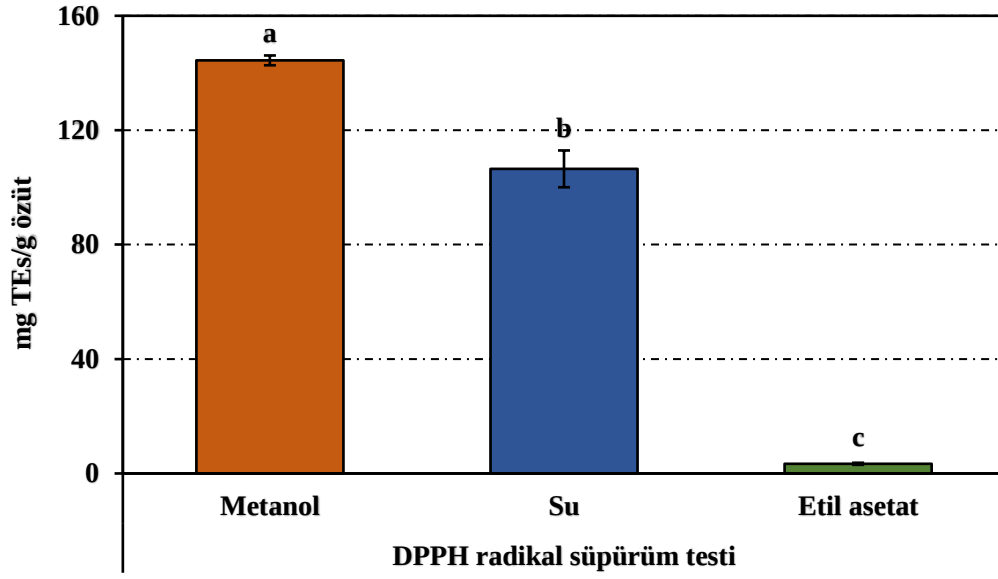
Özütlerin antioksidan aktivitelerini belirlemek için fosfomolibdenyum, DPPH ve ABTS katyon radikal süpürüm, CUPRAC ve FRAP indirgeme gücü ile demir (II) iyonları şelatlama kapasitelerini içeren farklı test sistemleri kullanıldı. Özütlerin IC₅₀ veya EC₅₀ derişimlerini gösteren sonuçlar Tablo 4.2’de verilmiştir. Özütlerin tüm test sistemlerindeki antioksidan kapasiteleri, testlerde kullanılan pozitif kontrollerden daha düşük tespit edilmiştir. Bununla birlikte, etil asetat özütünün radikal süpürüm testlerindeki IC₅₀ değerleri 20 mg/mL derişimden daha yüksek olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.2. Özütlerin ve standartların antioksidan kapasiteleri

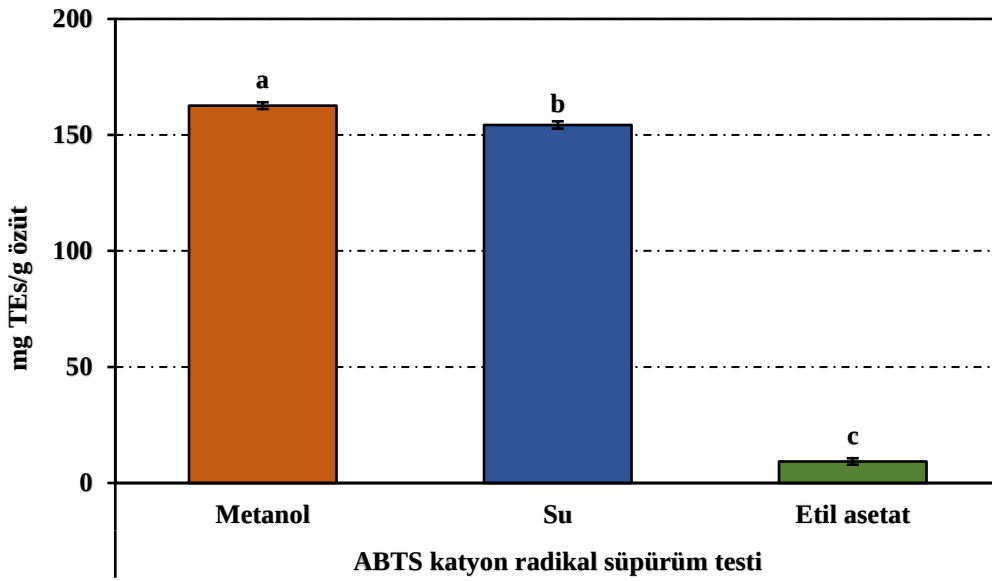
Testler	Metanol	Su	Etil asetat	Trolox	EDTA
Fosfomolibdenyum (EC ₅₀ : mg/mL)	1.47±0.05 ^a	2.35±0.03 ^b	5.58±0.33 ^c	1.01±0.02 ^a	-
CUPRAC indirgeme (EC ₅₀ : mg/mL)	0.85±0.01 ^{ab}	1.38±0.06 ^b	4.55±0.33 ^c	0.27±0.01 ^a	-
FRAP indirgeme (EC ₅₀ : mg/mL)	0.47±0.01 ^b	0.85±0.03 ^c	2.96±0.15 ^d	0.10±0.01 ^a	-
DPPH radikal (IC ₅₀ : mg/mL)	1.78±0.02 ^a	2.43±0.15 ^a	>20 ^b	0.29±0.02 ^a	-
ABTS radikal (IC ₅₀ : mg/mL)	1.67±0.01 ^a	1.76±0.02 ^a	>20 ^b	0.31±0.02 ^a	-
Fe(II) şelatlama (IC ₅₀ : mg/mL)	4.97±0.08 ^d	1.07±0.02 ^b	3.84±0.15 ^c	-	0.05±0.002 ^a

Aynı satırda aynı üst simgelerle işaretlenen değerler arasında istatistiksel bir fark yoktur.

DPPH radikal ve ABTS katyon radikal süpürüm testlerinde özütler benzer aktivite profili sergilemelerine karşın, metanol ve su özütlerinin etil asetat özütüne oranla oldukça yüksek aktivite göstermiştir (Şekil 4.5 ve 4.6). Etil asetat özütünün, DPPH radikal süpürüm testinde 9.28 mg TES/g özüt aktivite gösterdiği; ABTS katyon radikal testinde ise, en yüksek aktivite metanol özütünde (162.63 mg TES/g özüt) tespit edilmiştir.

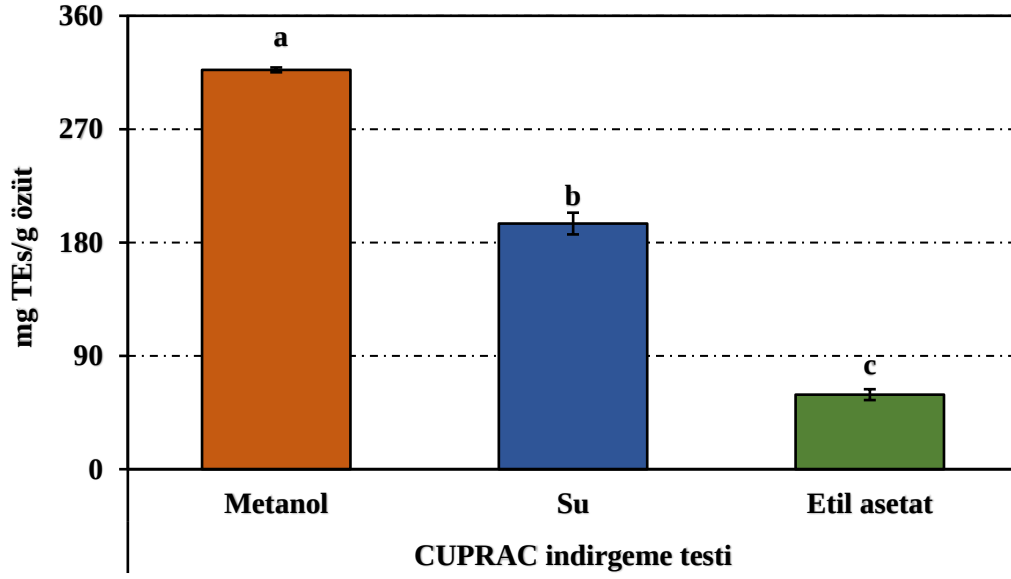


Şekil 4.5. Özütlerin DPPH radikal süpürüm aktiviteleri

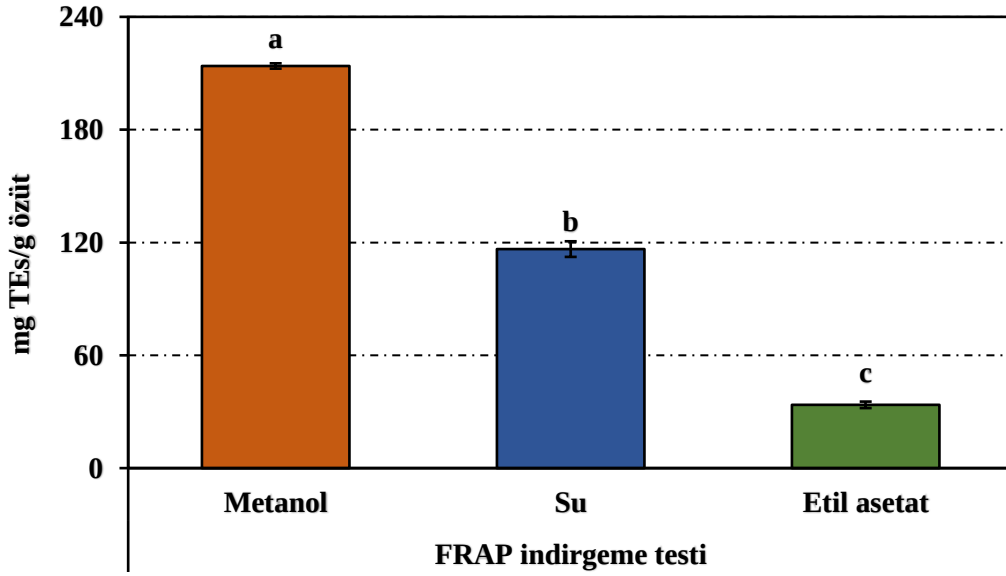


Şekil 4.6. Özütlerin ABTS katyon radikal süpürüm aktiviteleri

Şekil 4.7 ve 4.8’de de görüleceği üzere, özütlerin bakır (II) iyonlarını indirgeme güçlerinin demir (III) iyonlarını indirgeme güçlerinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Hem CUPRAC hem de FRAP testinde özütlerin indirgeme gücü kapasitelerinin metanol>su>etil asetat olarak değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Radikal süpürüm testlerinde olduğu gibi indirgeme gücü testlerinde de metanol özütünün su ve metanol özütlerine göre daha yüksek aktivite sergilemiştir.

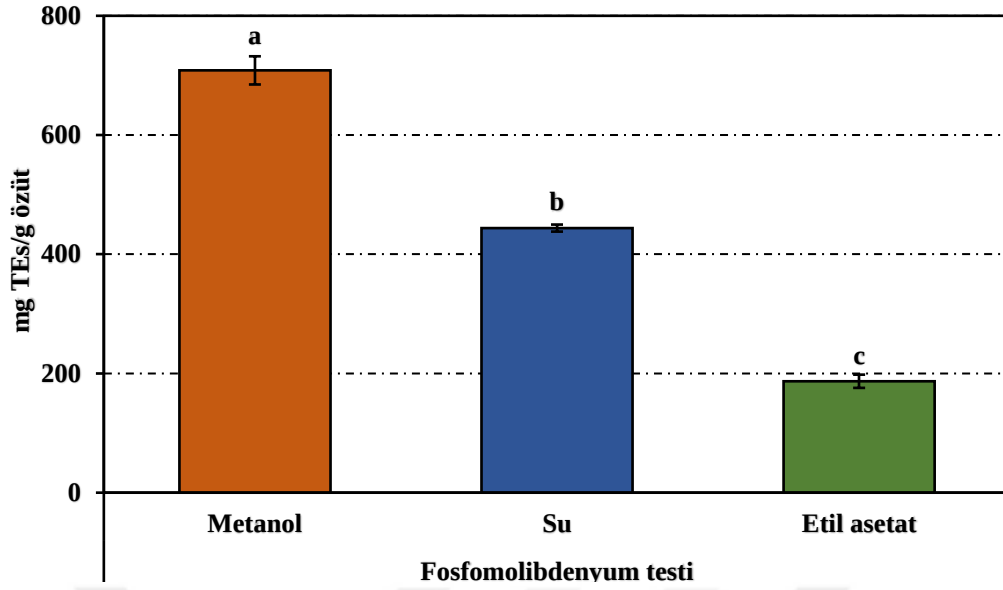


Şekil 4.7. Özütlarin CUPRAC indirgeme gücü kapasiteleri

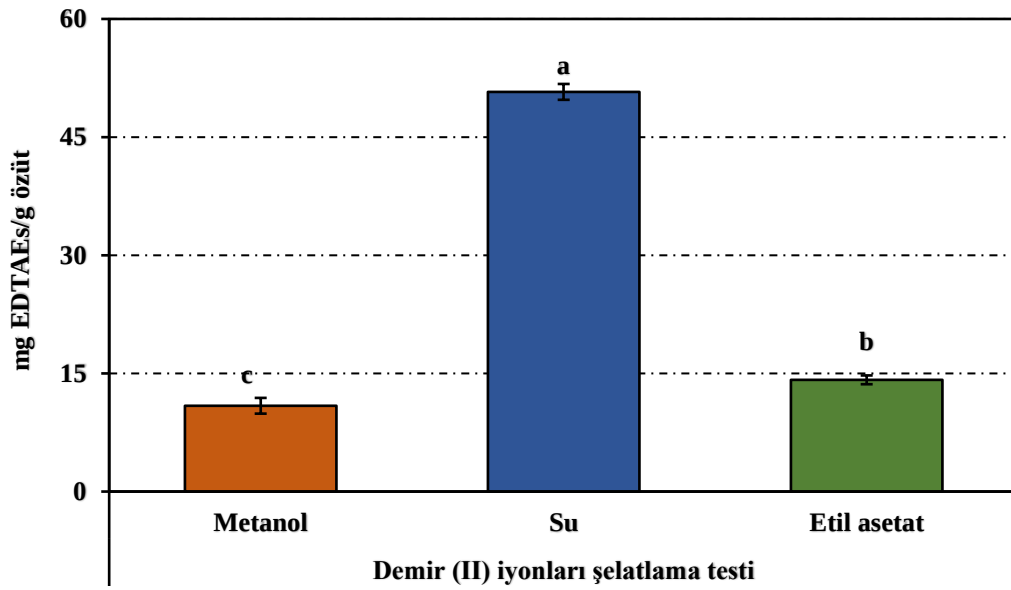


Şekil 4.8. Özütlarin FRAP indirgeme gücü kapasiteleri

Fosfomolibdenyum testinde metanol özütü (708 mg TE/g özüt) daha yüksek aktivite sergilerken; en düşük aktivite ise etil asetat özütünde (187 mg TE/g özüt) tespit edilmiştir. Diğer testlerin aksine demir (II) iyonları şelatlama testinde su özütü (51 mg EDTAEs/g özüt) en yüksek aktivite göstermiştir (Şekil 4.9 ve 4.10). Aynı test sisteminde, su özütünü etil asetat (14 mg EDTAEs/g özüt) ve metanol (11 mg EDTAEs/g özüt) özütleri takip etmiştir.



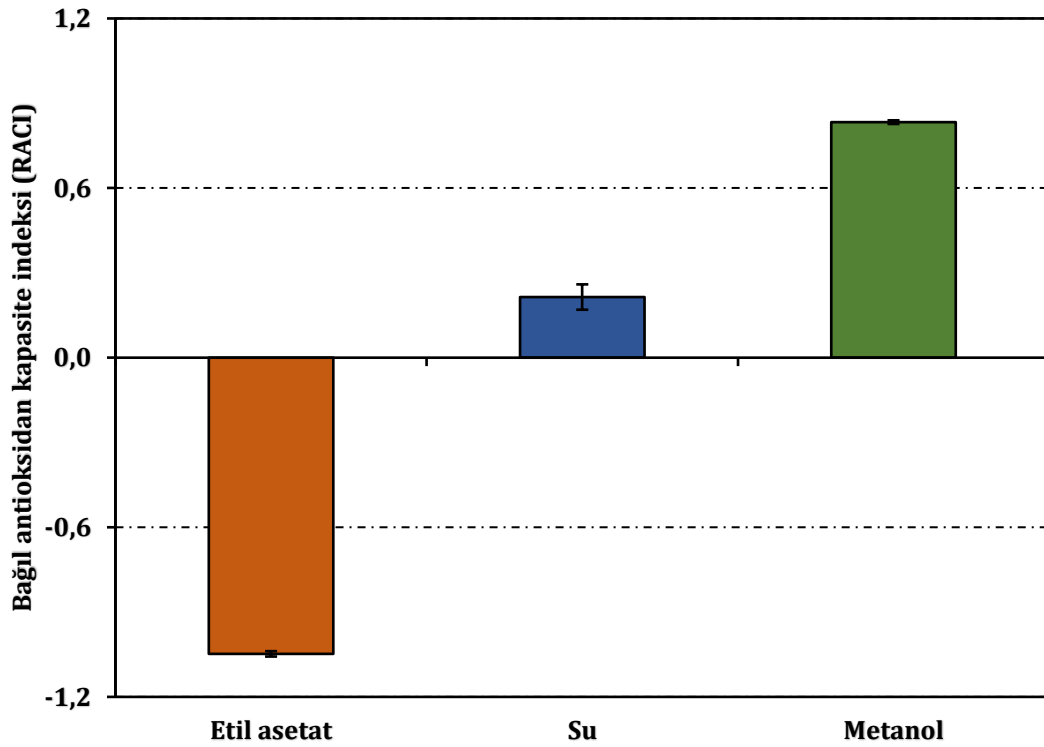
Şekil 4.9. Özütlere toplam antioksidan aktiviteleri



Şekil 4.10. Özütlere demir (II) iyonları şelatlama kapasiteleri

Antioksidan testlerinde elde edilen sonuçların her biri farklı bir aktivite mekanizması ortaya koyduğundan (örneğin radikal süpürüm, indirgeme gücü, şelatlama aktivitesi vb.), sonuçları sayısal olarak karşılaştırmak mantıksal olarak doğru değildir. Bu nedenle her bir özütlere için antioksidan test sistemlerinden elde edilen sonuçların üstünlüğünü karşılaştırmak için bağıl antioksidan kapasite indeksi (RACI) değerleri belirlendi. Bununla birlikte, her örneğin RACI değerleri ile antioksidan aktiviteleri arasındaki korelasyon da tespit edildi.

RACI değerleri hesaplanırken, ilk olarak her test için numunelerin ortalama ve standart sapma değerleri belirlenmiştir. Özütlerin ham verileri ortalama değerlerden çıkarılmış ve her özüt için standart sapmaya bölünerek RACI değeri elde edilmiştir. Bu işlem her test için ayrı ayrı uygulanmıştır. Toplam RACI değerleri, ilgili özütün (fenolik ve flavonoit dahil) tüm antioksidan testlerinden elde edilen ortalama değerler dikkate alınarak hesaplanmıştır ve sonuçlar Şekil 4.11’de verilmiştir. Şekilden de görüleceği üzere RACI değerleri bakımından metanol özütünün diğer özütlere oranla dah yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu görölmektedir.



Şekil 4.11. Özütlerin bağıl antioksidan kapasite indeksleri

Onosma demirizii bitkisinin metanol özütünün diğer özütlere oranla daha yüksek antioksidan aktivite sergilemesinin ana nedenleri arasında hem toplam fenolik ve flavonoit bileşik açısından zengin hem de LC-MS ile belirlenen fitokimyasal içerik bakımından daha yüksek oluğu sayılabilir. Bu tez çalışmada araştırılan *Onosma demirizii* bitkisinin antioksidan aktiviteleri ile ilgili literatürde herhangi bir veri bulunamamıştır.

Bununla birlikte, metanol özütünün daha yüksek antioksidan aktivite sergilemesine özütün içerdiği ana bileşenlerin katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Çünkü literatürde, hesperidin [80-82], hiperosit [83-85], rosmarinik asit [86-88], vanilik asit [89-91] bakımından zengin olan özütlerin dikkate değer antioksidan aktiviteler sergilediğini bildirmiştir [92, 93].

Literatür verileri, rosmarinik asidin antioksidan aktiviteye önemli ölçüde katkıda bulunabileceğini doğrulamaktadır [94-96]. Ayrıca literatürde, pinosinol veya bu bileşiğin bazı türevlerinin veya bu bileşiği yüksek miktarda içeren bazı ekstraktların oksidatif stres baskılanmasını ve buna bağlı olarak gelişen semptomların şiddetini azalttığına dair bazı raporlar da bulunmaktadır [97, 98]. Ayrıca son yıllarda diğer bazı *Onosma* türlerinin antioksidan aktiviteleri üzerine yapılan bazı çalışmalarda bu bileşiklerce zengin özütlerin antioksidan aktivitelerinin de yüksek olduğu rapor edilmiştir [52-54, 74].

Buna ilaveten, özütlerdeki toplam fenolik ve flavonit içerik ile fitokimyasalların antioksidan aktiviteye katkı sağladıkları yapılan Pearson korelasyon analizleriyle de tespit edilmiştir (Tablo 4.3). Hem total fenolik ve flavonoit içerik hem de özütlerdeki ana fitokimyasallar ile demir (II) iyonları şelatlama testi hariç diğer antioksidan testler arasında oldukça yüksek pozitif bir korelasyon ($r>0.50$) gözlenmiştir. Bu da aktiviteden özütlerdeki ana fitokimyasalların sorumlu olabileceği tezini desteklemektedir.

Tablo 4.3. Fitokimyasallarla biyolojik aktivite testleri arasındaki Pearson korelasyonu

Fitokimyasallar	TAP	DPPH	ABTS	CUPRAC	FRAP	FICA	ACHA	TIA	AAIA	AGIA
RACI	0.98	0.99	0.96	0.99	0.97	0.12				
Total flavonoit	0.97	0.86	0.73	0.95	0.98	-0.34	0.04	0.81	0.12	-0.36
Total phenolic	0.99	0.93	0.84	0.99	0.99	-0.16	-0.15	0.90	-0.06	-0.52
Chlorogenic acid	0.90	0.75	0.60	0.88	0.92	-0.50	0.22	0.69	0.30	-0.19
Hesperidin	0.88	0.72	0.56	0.86	0.90	-0.55	0.27	0.65	0.35	-0.14
Rosmarinic acid	0.87	0.70	0.54	0.85	0.89	-0.57	0.29	0.63	0.37	-0.11
Hyperoside	0.86	0.70	0.53	0.84	0.88	-0.57	0.30	0.63	0.37	-0.11
Pinosinol	0.94	0.81	0.67	0.92	0.95	-0.43	0.13	0.75	0.21	-0.27

TAP: Fosfomolibdenyum testiyle toplam antioksidan aktivite. AAIA, ACHA, AGIA ve TIA: Sırasıyla; α -amilaz, asetilkolinesteraz, α -glukosidaz, ve trozinaz inhibisyon aktiviteler. ABTS ve DPPH: ABTS ve DPPH radikal süpürüm aktiviteler. CUPRAC ve FRAP: CUPRAC ve FRAP indirgeme gücü potansiyelleri. RACI: Bağlı antioksidan kapasite indeks. FICA: Demir (II) iyonları şelatlama kapasitesi

4.5. Özütlerin Enzim İnhibisyon Aktivite Analizleri

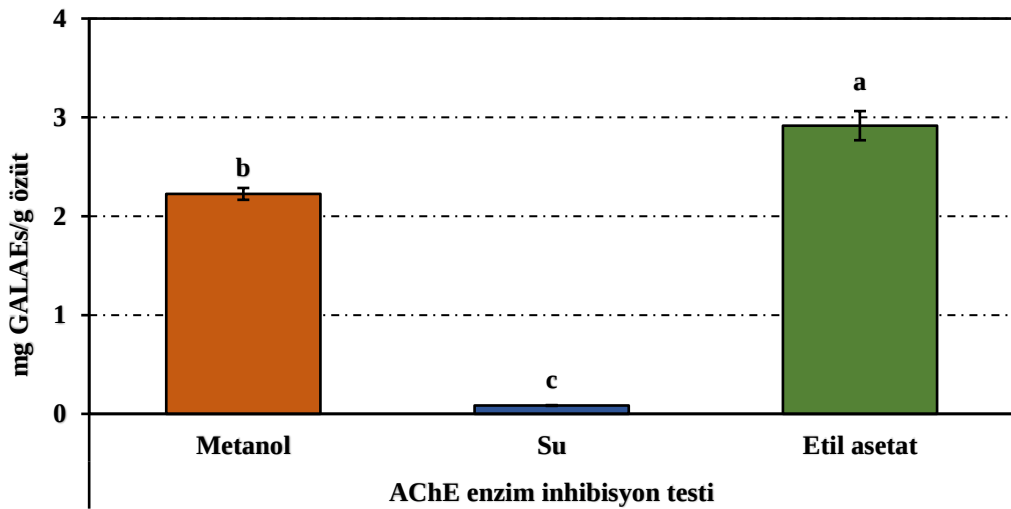
Metanol, su ve etil asetat özütlerinin kolinesteraz (ChEs), α -amilaz, α -glukosidaz ve tirozinaz enzimleri üzerine inhibisyon aktiviteleri de araştırılmıştır. Analiz sonuçları, hem %50 inhibisyon sağlayan derişime karşılık gelen IC₅₀ (mg/mL) cinsinden hem de pozitif kontrol eşdeğeri olarak hesaplanmıştır. IC₅₀ hesaplamaları Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.4. Standartların ve özütlerin enzim inhibisyon aktiviteleri

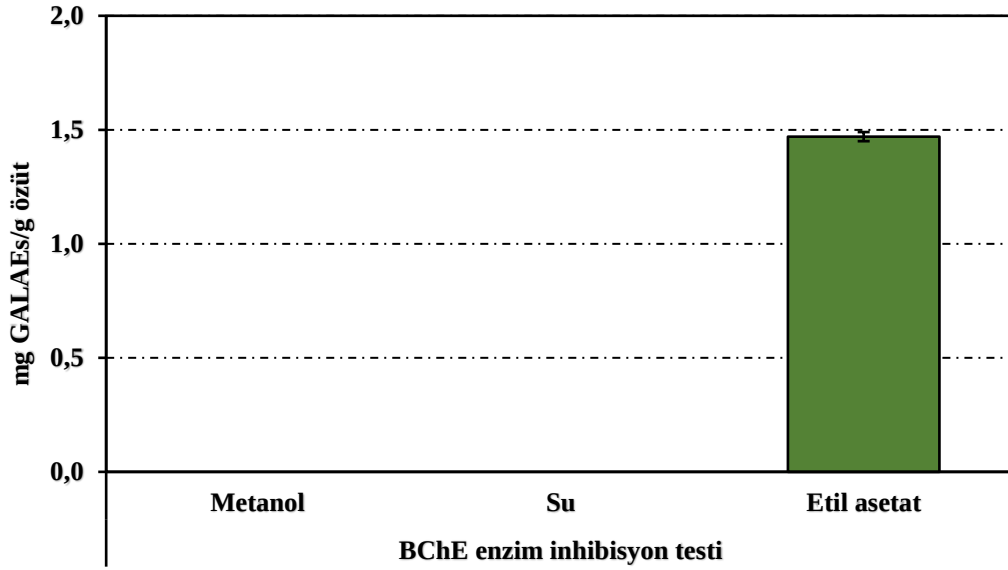
Testler	Metanol	Su	Etil asetat	Galanthamine	Kojic acid	Acarbose
AChE (IC ₅₀ : mg/mL)	1.37±0.04 ^a	>20 ^b	1.04±0.05 ^a	0.003±0.0003 ^a	-	-
BChE (IC ₅₀ : mg/mL)	na	na	1.47±0.02 ^b	0.006±0.0003 ^a	-	-
Tirozinaz (IC ₅₀ : mg/mL)	2.74±0.11 ^b	3.03±0.04 ^b	5.75±0.15 ^c	-	0.27±0.01 ^a	-
α -Amilaz (IC ₅₀ : mg/mL)	3.26±0.08 ^a	>20 ^b	2.80±0.22 ^a	-	-	1.05±0.07 ^a
α -Glukosidaz (IC ₅₀ : mg/mL)	2.02±0.08 ^c	5.28±0.01 ^d	1.04±0.01 ^a	-	-	1.77±0.03 ^b

Aynı satırda aynı üst simgelerle işaretlenen değerler arasında istatistiksel bir fark yoktur.

Her üç özüt de asetilkolinesteraz enzimi üzerine bütirilkolinesteraz enziminkinden daha yüksek inhibisyon aktivite sergilemiştir. Asetilkolinesteraz üzerinde en etkili inhibisyon etil asetat özütünün sergilediği; buna karşın metanol ve su özütlerinin bütirilkolinesteraz enzimi üzerinde hiçbir inhibisyon aktivite göstermediği belirlenmiştir (Şekil 12 ve 13). Her üç özütün bu test sistemindeki inhibisyon etkisi pozitif kontrol olan galantamininkinden oldukça düşüktür.

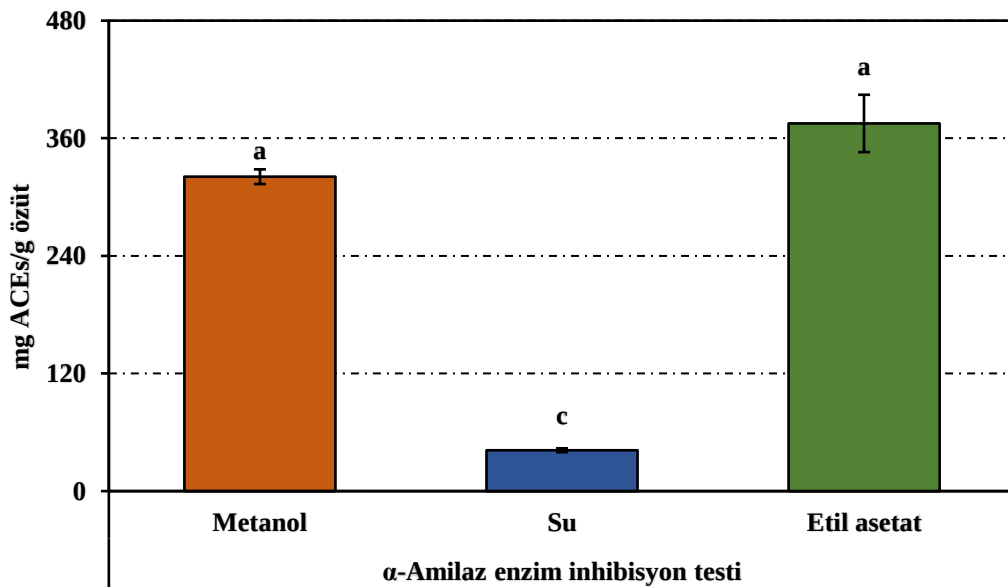


Şekil 4.12. Özütlerin asetilkolin esteraz inhibisyon aktiviteleri

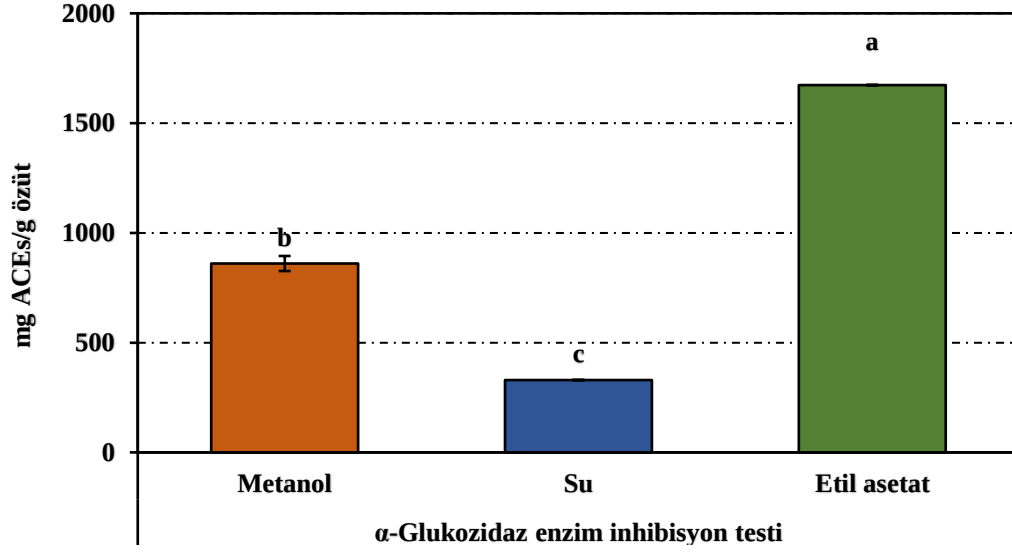


Şekil 4.13. Özütlerin bütirilkolin esteraaz inhibisyon aktiviteleri

Özütlerin sindirim enzimleri olan α -amilaz ve α -glukosidaz üzerine inhibisyon aktivite sonuçları Şekil 14 ve 15'te verilmiştir. Hem α -amilaz hem de α -glukosidaz enzimleri üzerine etil asetat özütünün daha yüksek inhibisyon aktivite sergilediği tespit edilmiştir /sırasıyla; 375 ve 1673 mg ACEs/g özüt). Aynı zamanda özütlerin α -glukosidaz üzerinde α -amilaza göre daha etkili olduğu görülmüştür. Su özütünün her iki enzim üzerinde de en düşük inhibisyon aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

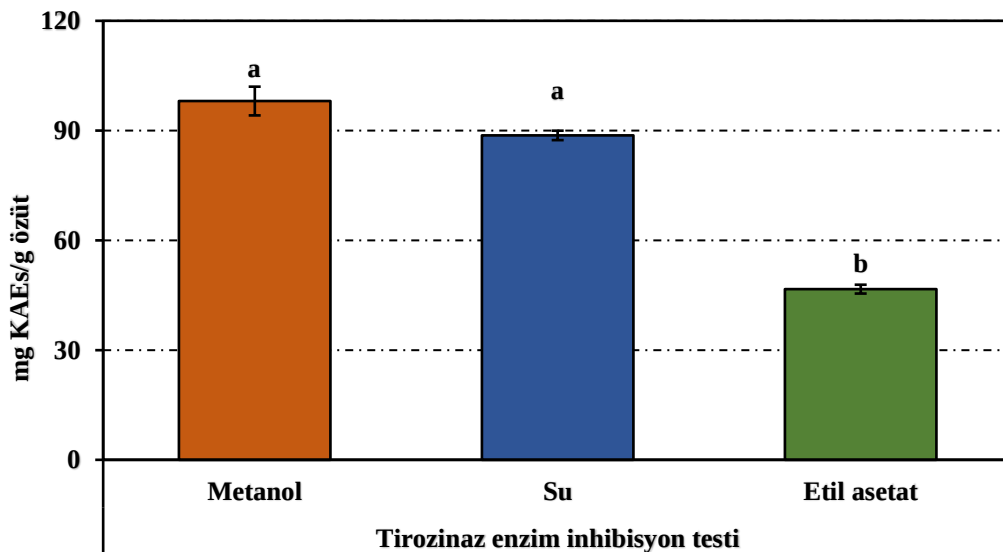


Şekil 4.14. Özütlerin α -amilaz inhibisyon aktiviteleri



Şekil 4.15. Özütlarin α -glukosidaz inhibisyon aktivitetleri

Metanol, su ve etil asetat özütlarinin tirozinaz enzimi üzerine inhibisyon aktivitetleri sırasıyla; 98, 89 ve 47 mg KAEs/g özütlük olarak belirlenmiştir (Şekil 16). Her üç özütlük IC_{50} değeri pozitif kontrol olan kojik asitten daha düşük hesaplanmıştır (Tablo 4.4). Pearson korelasyon analizlerinin verildiği Tablo 4.3 dikkatli incelendiğinde, özütlük tirozinaz enzimi üzerine inhibisyon etkileri ile içerdikleri fitokimyasallar arasında oldukça yüksek pozitif bir korelasyon gözlenmektedir ($r>0.60$). Buradan da özütlükte miktarca fazla bulunan bu fitokimyasalların bu inhibisyon aktiviteden sorumlu olduğu söylenebilir.



Şekil 4.16. Özütlük tirozinaz inhibisyon aktivitetleri

Yapılan detaylı literatür araştırmaları sonucunda, *Onosma demirizii* bitkisinin enzim inhibisyon aktivitesiyle ilgili hiçbir veriye ulaşılamamıştır. Ancak ztlerde miktarca fazla bulunan hesperidin, hiperosit, rosmarinik asit ve klorojenik asit gibi fitokimyasalların bu enzimler üzerine etkileri üzerine yayınlanmış literatür verilerini tartışmakta da yarar vardır. Fas'ta doğal olarak yayılış gösteren bazı bitki türlerinin tirozinaz inhibisyon aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada, *Fucus spiralis*'in yüksek tirozinaz inhibisyon aktivite sergilediği ve etanol özütünün önemli miktarda hesperidin içerdiği bildirilmiştir [99]. Öte yandan, daha önce yayınlanan birçok çalışmada, hiperosit ve rosmarinik asit açısından zengin bazı bitki türlerinin önemli tirozinaz inhibitör aktivite sergilediğini kanıtlamıştır [52-54, 100-104]. Hesperidin, hiperosit ve rosmarinik asitin enzim inhibisyon aktiviteye katkısını kanıtlamak amacıyla yapılan *in silico* moleküler docking analizlerinde, hiperosit'in tüm enzimlere bağlanma afinitesinin ve inhibisyon sabiti değerlerinin diğerlerine oranla oldukça yüksek olduğu saptanmıştır [61].

Asetilkolin esteraz enzimleri açısından, hem etil asetat ztnn Tablo 4.1'deki fitokimyasal içeriği hem de Tablo 4.3'teki Pearson korelasyon analiz sonuçları gözden geçirildiğinde ana bileşenler olan fitokimyasalların (rosmarinik asit, hesperidin, hiperosit gibi) kolinesterazlar üzerine inhibisyon aktiviteye bir katkı sağlamış olabileceği söylenebilir. *Scrophularia lucida* köklerinden ve toprak üstü kısımlarından elde edilen etil asetat, metanol ve su özütlerinin ChE inhibisyon aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada, bitkinin toprak üstü kısımlarından elde edilen etil asetat özütünün en yüksek BChE inhibisyon aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir [105]. Araştırıcılar bunun nedeni olarak etil asetat özütünün ana bileşikleri olan rosmarinik asit ve hesperidinin bu inhibisyon aktiviteye önemli ölçüde katkıda bulunduğunu belirtmişlerdir [105]. Bir başka çalışmada ise, *Euphorbia fistulosa* köklerinden elde edilen özütün hem AChE hem de BChE üzerinde önemli inhibisyon aktivite sergilediği ve özütün yüksek miktarda hesperidin ve hiperosit içerdiği bildirilmiştir [106]. Hiperosit'in BChE inhibitör aktivitesi üzerine yayınlanan başka bir çalışmada da %77.60 oranında inhibisyon aktivite kaydedilmiştir [107]. Ayrıca literatürdeki daha önceki raporlarda klorojenik asit, rosmarinik asit ve hiperosidin önemli enzim inhibitörleri olduğu bildirilmiştir [108-111].

Literatürde, yukarıda bahsedilen özütlerde bulunan ana fitokimyasalların sindirim enzimleri üzerindeki inhibisyon aktiviteye katkıda bulunabileceğini gösteren çalışmalar da vardır. *Stachys cretica* subsp. *mersinaea* bitkisi özütlerinin de α -amilaz ve α -glukosidaz üzerinde güçlü inhibisyon aktivite gösterdiği ve yüksek miktarlarda hesperidin içerdiği rapor edilmiştir [112]. *Artemisia capillaris*'in metanol özütünde α -amilaz inhibisyon aktiviteden sorumlu fitokimyasalların araştırıldığı bir başka çalışmada ise, hiperosit'in, potansiyel bir α -amilaz inhibitörü olduğu bildirilmiştir [113]. Rosmarinik asitin anti-hiperglisemik etkisinden dolayı sağlık üzerinde faydalı etkileri olduğunu bildirmiştir [114]. Yine literatürdeki bazı raporlarda, klorojenik asit bakımından zengin olan özütlerin, sindirim enzimleri üzerinde önemli inhibisyon aktivite sergilediği ifade edilmiştir [115-118].

Neticede, söz konusu fitokimyasalların bu çalışmada değerlendirilen enzimler üzerindeki inhibisyon aktivitesi bakımından katkısı da göz önünde bulundurularak bu çalışmadan elde edilen verilerin literatür verilerini destekler nitelikte olduğu söylenebilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, *Onosma demirizii* bitkisinin toprak üstü kısımlarından demleme yöntemiyle hazırlanan su özütünün ve maserasyon tekniğiyle elde edilen metanol ve etil asetat özütlerinin öncelikle LC-MS ile toplamda 31 fenolik türü bileşiğin araştırıldığı fitokimyasal analizleri gerçekleştirilmiştir. Daha sonra her üç özütün de hem farklı testler kullanılarak antioksidan kapasiteleri hem de 5 farklı enzim üzerine inhibisyon aktiviteleri araştırılmıştır.

Fitokimyasal analizler sonucunda, metanol özütünün daha yüksek olmak kaydıyla her üç özütün de hesperidin, hiperosit, rosmarinik asit, klorojenik asit ve pinosresinol bakımından oldukça zengin olduğu tespit edilmiştir.

Özellikle metanol ve su özütlerinin, etil asetat özütününkinden önemli ölçüde daha yüksek antioksidan aktivite sergilediği sonucuna ulaşılmıştır. Bu durumun söz konusu özütlerdeki yüksek polar fenolik bileşikler veya flavonoidlerden kaynaklanabileceği düşünülmüş ve gerek Pearson korelasyon ve gerekse de RACI hesaplamalarıyla bu fikir teyit edilmiştir.

Antioksidan aktivite testlerinin aksine enzim inhibisyon aktivite analizlerinde literatürdeki birçok çalışmada olduğu gibi etil asetat özütünün enzim inhibisyon aktivitesinin diğer özütlere oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Neticede, *Onosma demirizii* bitkisinin hem fitokimyasal içerik hem de biyolojik aktivite analizleri sonucu elde edilen veriler ilk kez bu tez çalışması ile literatüre kazandırılmıştır.

Her ne kadar özütler, *in vitro* yapılan testler sonucunda kaydadeğer bir hem antioksidan hem de enzim inhibisyon aktivite sergilemiş olsalar bile, bu özütlerin *in vivo* şartlarda da benzer etkiler sergileyeceği belli değildir. Ayrıca özütlerin hem toksik olup olmadıkları hem de aktiviteden sorumlu bileşenlerin net olarak neler olduğu belirsizdir. Dolayısıyla daha sonraki aşamalarda özütlerin öncelikle toksik etkilerinin belirlenmesi daha sonra ise *in vivo* deneylerle bu çalışmada elde edilen aktivite sonuçlarıyla uyumlarının tespit edilmesi ve detaylı kromatografik işlemlerle de özütlerde aktiviteden sorumlu bileşenlerin izalasyonu ve karakterizasyonunun yapılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Bagheri, S., Sanjarian, F., Haghbeen, K. Ebrahimi, M. A. Establishment of cell suspension culture from *Onosma dasytrichum* seed callus culture. International Research Journal of Applied & Basic Sciences. 2011, 2, 392-397.
- [2] Madsen, H. L. Bertelsen, G. Spices as antioxidants. Trends in Food Science & Technology. 1995, 6, 271-277.
- [3] Schwarz, K., Bertelsen, G., Nissen, L. R., Gardner, P. T., Heinonen, M. I., Hopia, A., Huynh-Ba, T., Lambelet, P., McPhail, D. Skibsted, L. H. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. European Food Research and Technology. 2001, 212, 319-328.
- [4] Tanabe, H., Yoshida, M. Tomita, N. Comparison of the antioxidant activities of 22 commonly used culinary herbs and spices on the lipid oxidation of pork meat. Animal Science Journal. 2002, 73, 389-393.
- [5] Sasaki, Y. F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., Taniguchi, K. Tsuda, S. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2002, 519, 103-119.
- [6] Wangenstein, H., Samuelsen, A. B. Malterud, K. E. Antioxidant activity in extracts from coriander. Food Chemistry. 2004, 88, 293-297.
- [7] Tarimcilar, G., Yilmaz, O. Kaynak, G. *Onosma demirizii* (Boraginaceae), A New Species From Central Anatolia, Turkey. Bangladesh Journal of Botany. 2015, 44, 261-265.
- [8] Stearn, W. T. The gender of the generic name *Onosma* (Boraginaceae). Taxon. 1993, 42, 679-681.
- [9] Özcan, T. Analysis of the total oil and fatty acid composition of seeds of some Boraginaceae taxa from Turkey. Plant Systematics and Evolution. 2008, 274, 143-153.
- [10] Yildirim, Ş. The chorology of the Turkish species to Boraginaceae family. Ot Sistematik Botanik Dergisi. 2000, 7, 257-272.
- [11] Aytac, Z. Türkmen, Z. A new *Onosma* (Boraginaceae) species from southern Anatolia, Turkey. Turkish Journal of Botany. 2011, 35, 269-274.
- [12] Mehrabian, A.-R., Sheidai, M., Noormohammadi, Z., Mozafarian, V. Asrei, Y. Palynological diversity in the genus *Onosma* L.(Boraginaceae) of Iran. Annals of Biological Research. 2012, 3, 3885-3893.

- [13] Authier, P. Catalogue commenté de la flore de la région des monts Timfi (parc national du Vikos-Aoos et environs-Epire-Nord-ouest Grèce). 4. Boraginaceae. Candollea. 2000, 55, 153-186.
- [14] Kumar, N., Kumar, R. Kishore, K. *Onosma* L.: A review of phytochemistry and ethnopharmacology. Pharmacognosy Reviews. 2013, 7, 140-151.
- [15] Ozcan, T. Characterization of *Onosma bracteosum* Hausskn. & Bornm. and *Onosma thracicum* Velen. Based on fatty acid compositions and α -tocopherol contents of the seed oils. IUFES J Biol. 2009, 68, 75-83.
- [16] El-Shazly, A., Abdel-Ghani, A. Wink, M. Pyrrolizidine alkaloids from *Onosma arenaria* (Boraginaceae). Biochemical Systematics and Ecology. 2003, 31, 477-485.
- [17] Larin, A. Aleutskii, N. On the efficacy of *Onosma* in experimental hypertension. Farmakologiya i toksikologiya. 1967, 30, 694-696.
- [18] Pavol, M., Mártonfióvá, L. Kolarčík, V. Karyotypes and genome size of *Onosma* species from northern limits of the genus in Carpathians. Caryologia. 2008, 61, 363-374.
- [19] Vural, M., Duman, H., Aytac, Z. ADIGÜZEL, N. A new genus and three new species from Central Anatolia, Turkey. Turkish Journal of Botany. 2012, 36, 427-433.
- [20] Maggi, F., Tirillini, B., Vittori, S., Sagratini, G. Papa, F. Analysis of the volatile components of *Onosma echioides* (L.) L. var. *columnae* Lacaita growing in central Italy. Journal of Essential Oil Research. 2009, 21, 441-447.
- [21] Gogala, A. Surina, B. Foraging behaviour of the bee *Osmia apicata* Smith, 1853 (Hymenoptera: Megachilidae). Acta Entomol Slov Ljubljana. 2011, 19, 139-144.
- [22] Attar, F. Joharchi, M. R. *Onosma khorassanica*, a new species from northeast of Iran. Rostaniha. 2006, 7, 111-114.
- [23] Dukas, R. Dafni, A. Buzz-pollination in three nectariferous Boraginaceae and possible evolution of buzz-pollinated flowers. Plant Systematics and Evolution. 1990, 169, 65-68.
- [24] Teppner, H. Karyology of some Greek *Onosma* species (Boraginaceae). Bot Chron. 1991, 10, 271-292.
- [25] Teppner, H. 1991. *Onosma* L. Mountain Flora of Greece. In: TAN K, S. A. (ed.) *Onosma L. Mountain Flora of Greece*. Edinburgh: Edinburgh University.
- [26] Zhou, L., Zheng, G., Wang, S. Gan, F. Metabolic regulation of pigment formation of *Onosma paniculatum* cultured cells. Chinese Journal of Biotechnology. 1992, 8, 263-268.
- [27] Christodoulakis, D. Flora of Ikaria (Greece, E. Aegean Islands). Phytos. 1996.

- [28] Yavari, A. Shahgolzari, S. Floristic study of Khan-Gormaz protected area in Hamadan province, Iran. *Int J Agric Biol.* 2010, 12, 271-275.
- [29] Kandemir, A. Türkmen, Z. The Flora of Üzümlü-Sakaltutan (Erzincan-Gümüşhane). *Turkish Journal of Botany.* 2008, 32, 265-304.
- [30] Ahmad, I., Nawaz, S. A., Afza, N., Malik, A., Fatima, I., Khan, S. B., Ahmad, M. Choudhary, M. I. Isolation of onosmins A and B, lipoxygenase inhibitors from *Onosma hispida*. *Chemical and pharmaceutical bulletin.* 2005, 53, 907-910.
- [31] Joharchi, M. R. Amiri, M. S. Taxonomic evaluation of misidentification of crude herbal drugs marketed in Iran. *Avicenna journal of phytomedicine.* 2012, 2, 105.
- [32] Ghahraman, A., Heydari, J., Atar, F. Hamzehei, B. A floristic study of the southwestern slopes of Binaloud elevations (Iran: Khorassan Province). 2006.
- [33] Mamariani, F., Joharchi, M. R., Ejtehad, H. Emadzade, K. Contributions to the flora and vegetation of Binaloud mountain range, NE Iran: Floristic and chorological studies in Fereizi region. *Journal of Cell and Molecular Research.* 2009, 1, 1-18.
- [34] Teppner, H. Remarks to the *Onosma* species *O. bourgaei*, *O. spruneri* and *O. stellulata* (Boraginaceae) offered. *Samentauschverzeichnis.* 1996, 33-39.
- [35] Riedl, H., Binzet, R. Orcan, N. A new species of *Onosma* (Boraginaceae–Lithospermeae) from southern Turkey. *Edinburgh journal of botany.* 2004, 61, 127-130.
- [36] Morteza-Semnani, K., Saeedi, M., Akbarzadeh, M. Moshiri, K. The essential oil composition of *Onosma microcarpum* DC. *Flavour and Fragrance Journal.* 2006, 21, 314-316.
- [37] Riza, B., Ouml, znur, E. A. in. The anatomical properties of two *Onosma* L.(Boraginaceae) species from Turkey. *Journal of Medicinal Plants Research.* 2012, 6, 3288-3294.
- [38] Kahyaoglu, M. Turkoglu, İ. ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF SOME PLANTS COLLECTED IN ELAZIĞ REGIONS. *Journal of Science and Technology of Dumlupınar University.* 2008, 1-8.
- [39] Riedl, H. Additional notes on *Cwoiswa*-species (Boraginaceae) from Turkey. *Linzer Biol Beitr.* 1987, 19, 461-465.
- [40] Soueges, R. Embryogeny of the Boraginaceae; development of the embryo in *Onosma nanum* DC (*O. decipiens* Schott et Kotschy). *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences.* 1951, 232, 2164-2167.
- [41] Teppner, H. Tuzlaci, E. *Onosma propontica* Aznavour (Boraginaceae–Lithospermeae). *Landesmuseums NF.* 1994, 76, 77-83.

- [42] Lopez, G. Notas Sobre El Genero *Onosma* L. (Boraginaceae) En El Mediterraneo Occidental. *An Jard Bot Madrid*. 1994, 52, 43-52.
- [43] Tiwari, U., Adhikari, B. Rawat, G. On the recollection and rediscovery of *Onosma pyramidale* Hook. f., Boraginaceae from Chamoli, Uttarakhand. *Asian Journal of Pharmacy and Life Science*. 2011, 1, 406-408.
- [44] Papageorgiou, V. P., Assimopoulou, A. N., Couladouros, E. A., Hepworth, D. Nicolaou, K. The chemistry and biology of alkannin, shikonin, and related naphthazarin natural products. *Angewandte Chemie International Edition*. 1999, 38, 270-301.
- [45] Mroczek, T., Baj, S., Chrobok, A. Glowniak, K. Screening for pyrrolizidine alkaloids in plant materials by electron ionization RP-HPLC-MS with thermabeam interface. *Biomedical Chromatography*. 2004, 18, 745-751.
- [46] Khalili, M. A., Miresmaeili, S. M., Hekmati Moghaddam, H., Rezaei, S. Vahidi, A. R. The study of burn healing of *Onosma stenosisiphon* on type II burn of back and testis areas in rats. *Journal of Medicinal Herbs*. 2010, 1, 23-27.
- [47] Ghahremaninejad, F., Joharchi, M. Vitek, E. New plant records for Khorassan province, Iran. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien. Serie B für Botanik und Zoologie*. 2005, 255-293.
- [48] Pavlova, D., Kozuharova, E. Dimitrov, D. A floristic catalogue of the serpentine areas in the Eastern Rhodope Mountains (Bulgaria). *Polish Botanical Journal*. 2003, 48, 21-41.
- [49] Petrova, A. Vladimirov, V. Balkan endemics in the Bulgarian flora. *Phytologia Balcanica*. 2010, 16, 293-311.
- [50] Ančev, M. Polatschek, A. *Erysimum bulgaricum* (Brassicaceae), a newly distinguished species for the Balkan Peninsula. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien. Serie B für Botanik und Zoologie*. 2002, 691-698.
- [51] Porto, M., Pereira, A. J., Jacinto, M. Tauleigne Gomes, C. *Onosma tricerospma* subsp. *tricerospma* Lag.(Boraginaceae), a new species and genus to the Portuguese Flora. 2012.
- [52] Sarikurkcu, C., Sahinler, S. S., Husunet, M. T., Istifli, E. S. Tepe, B. Two endemic *Onosma* species (*O. sieheana* and *O. stenoloba*): A comparative study including docking data on biological activity and phenolic composition. *Industrial Crops and Products*. 2020, 154, 112656.
- [53] Sarikurkcu, C., Sahinler, S. S., Ceylan, O. Tepe, B. *Onosma pulchra*: Phytochemical composition, antioxidant, skin-whitening and anti-diabetic activity. *Industrial Crops and Products*. 2020, 154, 112632.
- [54] Sarikurkcu, C., Sahinler, S. S. Tepe, B. *Onosma aucheriana*, *O. frutescens*, and *O. sericea*: Phytochemical profiling and biological activity. *Industrial Crops and Products*. 2020, 154, 112633.

- [55] Kirkan, B., Sarikurkcu, C., Ozer, M. S., Cengiz, M., Atilgan, N., Ceylan, O. Tepe, B. Phenolic profile, antioxidant and enzyme inhibitory potential of *Onosma tauricum* var. *tauricum*. Industrial Crops and Products. 2018, 125, 549-555.
- [56] Sarikurkcu, C., Kirkan, B., Ozer, M. S., Ceylan, O., Atilgan, N., Cengiz, M. Tepe, B. Chemical characterization and biological activity of *Onosma gigantea* extracts. Industrial Crops and Products. 2018, 115, 323-329.
- [57] Ozer, M. S., Kirkan, B., Sarikurkcu, C., Cengiz, M., Ceylan, O., Atilgan, N. Tepe, B. *Onosma heterophyllum*: Phenolic composition, enzyme inhibitory and antioxidant activities. Industrial Crops and Products. 2018, 111, 179-184.
- [58] Kirkan, B., Sarikurkcu, C., Binzet, R. Tepe, B. Two *Onosma* Species (*Onosma microcarpum* and *O. nana*) as an Alternative Source of Multifunctional Agents: Biological and Phytochemical Evaluation. Biointerface Research in Applied Chemistry. 2023, 13.
- [59] Kirkan, B., Sarikurkcu, C. Tepe, A. S. Phytochemical analysis and biological evaluation of two endemic *Onosma* species (*Onosma cappadocica* and *O. rutilum*). Biointerface Research in Applied Chemistry. 2023, 13.
- [60] Sarikurkcu, C. Tlili, N. *Onosma inexpectata* and *Onosma armenum* as novel sources of phytochemicals with determination by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS/MS) with evaluation of the antioxidant and enzyme inhibitory capacities. Analytical Letters. 2022, 55, 1068-1079.
- [61] Baltaci, N., Aydogdu, N., Sarikurkcu, C. Tepe, B. *Onosma gracilis* (Trautv.) and *O. oreodoxa* (Boiss. & Heldr.): Phytochemistry, in silico docking, antioxidant and enzyme inhibitory activities. South African Journal of Botany. 2021, 143, 410-417.
- [62] Kirkan, B., Sarikurkcu, C. Zengin, G. Bioactive constituents, antioxidant effects and enzyme inhibitory properties of two *Onosma* species (*Onosma trapezuntea* and *O. rigidum*). South African Journal of Botany. 2022, 145, 142-148.
- [63] Favarger, C. Recherches cytologiques sur quelques *Onosma* d'Europe occidentale. Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien. 1971, 59-65.
- [64] Kandemir, A. Hedge, I. C. An anomalous new *Ferulago* (Apiaceae) from eastern Turkey. Willdenowia. 2007, 37, 273-276.
- [65] Redzic, A., Redzic, S. Sejdic, N. Genotoxic effects of aquatic extract of endemic plant *Onosma stellulata* Waldst. & Kit.(Boraginaceae). African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines. 2009, 6, 346-347.

- [66] Zengin, G., Sarikurkcü, C., Gunes, E., Uysal, A., Ceylan, R., Uysal, S., Gungor, H. Aktumsek, A. Two *Ganoderma* species: Profiling of phenolic compounds by HPLC-DAD, antioxidant, antimicrobial and inhibitory activities on key enzymes linked to diabetes mellitus, Alzheimer's disease and skin disorders. *Food & Function*. 2015, 6, 2794-2802.
- [67] Tepe, B., Sarikurkcü, C., Berk, S., Alim, A. Akpulat, H. A. Chemical composition, radical scavenging and antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus boveii* and *Thymus hyemalis*. *Records of Natural Products*. 2011, 5, 208-220.
- [68] Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Esin Karademir, S. Erçağ, E. The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2006, 57, 292-304.
- [69] Kocak, M. S., Sarikurkcü, C., Cengiz, M., Kocak, S., Uren, M. C. Tepe, B. *Salvia cadmica*: Phenolic composition and biological activity. *Industrial Crops and Products*. 2016, 85, 204-212.
- [70] Zengin, G., Sarikurkcü, C., Uyar, P., Aktumsek, A., Uysal, S., Kocak, M. S. Ceylan, R. *Crepis foetida* L. subsp *rhoeadifolia* (Bleb.) Celak. as a source of multifunctional agents: Cytotoxic and phytochemical evaluation. *Journal of Functional Foods*. 2015, 17, 698-708.
- [71] Cittan, M. Çelik, A. Development and validation of an analytical methodology based on Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometry for the simultaneous determination of phenolic compounds in olive leaf extract. *Journal of Chromatographic Science*. 2018, 56, 336-343.
- [72] Sun, T. Tanumihardjo, S. An integrated approach to evaluate food antioxidant capacity. *Journal of Food Science*. 2007, 72, R159-R165.
- [73] Petrovic, M., Suznjevic, D., Pastor, F., Veljovic, M., Pezo, L., Antic, M. Gorjanovic, S. Antioxidant Capacity Determination of Complex Samples and Individual Phenolics - Multilateral Approach. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2016, 19, 58-65.
- [74] Sarikurkcü, C., Sahinler, S. S., Ceylan, O. Tepe, B. *Onosma ambigens*: Phytochemical composition, antioxidant and enzyme inhibitory activity. *Industrial Crops and Products*. 2020, 154, 112651.
- [75] Saravanakumar, K., Sarikurkcü, C., Sarikurkcü, R. T. Wang, M. H. A comparative study on the phenolic composition, antioxidant and enzyme inhibition activities of two endemic *Onosma* species. *Industrial Crops and Products*. 2019, 142, 111878.
- [76] Sarikurkcü, C., Sahinler, S. S., Ozer, M. S. Tepe, A. S. Nutraceutical extracts from some endemic *Onosma* (*O. circinnata*, *O. bornmuelleri*, and *O. angustissima*) species: LC-ESI-MS/MS-based polyphenol profile, antioxidant and enzyme inhibition activities. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2021, 45, e15709.

- [77] Tlili, N., Sarikurkcü, R. T., Ceylan, O. Sarikurkcü, C. *Onosma polyantha* vs. *Onosma mollis*: Analysis of Phenolic Compounds Using Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (LC-ESI-MS/MS) and Assessment of the Antioxidant Activity. *Analytical Letters*. 2021, 54, 1389-1400.
- [78] Tlili, N., Sarikurkcü, R. T., Ozer, M. S. Sarikurkcü, C. Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (LC-ESI-MS/MS) Identification of Phytochemicals and the Effects of Solvents on Phenolic Constituents, Antioxidant Capacity, Skin-Whitening and anti-Diabetic Activity of *Onosma mitis*. *Analytical Letters*. 2022, 55, 32-46.
- [79] Kumar, N., Kumar, R. Kishore, K. *Onosma* L.: A review of phytochemistry and ethnopharmacology. *Pharmacognosy Reviews*. 2013, 7, 140.
- [80] Buyukkurt, O. K., Guclu, G., Kelebek, H. Selli, S. Characterization of phenolic compounds in sweet lime (*Citrus limetta*) peel and freshly squeezed juices by LC-DAD-ESI-MS/MS and their antioxidant activity. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2019, 13, 3242-3249.
- [81] Elhelaly, A. E., AlBasher, G., Alfarraj, S., Almeer, R., Bahbah, E. I., Fouda, M. M., Bungău, S. G., Aleya, L. Abdel-Daim, M. M. Protective effects of hesperidin and diosmin against acrylamide-induced liver, kidney, and brain oxidative damage in rats. *Environmental Science and Pollution Research*. 2019, 26, 35151-35162.
- [82] Tsai, Y.-F., Chen, Y.-R., Chen, J.-P., Tang, Y. Yang, K.-C. Effect of hesperidin on anti-inflammation and cellular antioxidant capacity in hydrogen peroxide-stimulated human articular chondrocytes. *Process Biochemistry*. 2019, 85, 175-184.
- [83] Kwon, S.-H., Lee, S. R., Park, Y. J., Ra, M., Lee, Y., Pang, C. Kim, K. H. Suppression of 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress by hyperoside via activation of Nrf2/HO-1 signaling in dopaminergic neurons. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, 20, 5832.
- [84] Qi, X.-C., Li, B., Wu, W.-L., Liu, H.-C. Jiang, Y.-P. Protective effect of hyperoside against hydrogen peroxide-induced dysfunction and oxidative stress in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2020, 48, 377-383.
- [85] Shi, Y., Qiu, X., Dai, M., Zhang, X. Jin, G. Hyperoside attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury by suppressing oxidative stress and inhibiting apoptosis in rats. *Transplantation Proceedings*, 2019. Elsevier, 2051-2059.
- [86] Adımcılar, V., Kalaycıoğlu, Z., Aydoğdu, N., Dirmenci, T., Kahraman, A. Erim, F. B. Rosmarinic and carnosic acid contents and correlated antioxidant and antidiabetic activities of 14 *Salvia* species from Anatolia. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2019, 175, 112763.

- [87] Li, Y., Darwish, W. S., Chen, Z., Hui, T., Wu, Y., Hirotaka, S., Chiba, H. Hui, S.-P. Identification of lead-produced lipid hydroperoxides in human HepG2 cells and protection using rosmarinic and ascorbic acids with a reference to their regulatory roles on Nrf2-Keap1 antioxidant pathway. *Chemico-Biological Interactions*. 2019, 314, 108847.
- [88] Veras, K. S., Fachel, F. N. S., Delagustin, M. G., Teixeira, H. F., Barcellos, T., Henriques, A. T., Bassani, V. L. Koester, L. S. Complexation of rosmarinic acid with hydroxypropyl- β -cyclodextrin and methyl- β -cyclodextrin: Formation of 2: 1 complexes with improved antioxidant activity. *Journal of Molecular Structure*. 2019, 1195, 582-590.
- [89] Daoud, A., Malika, D., Bakari, S., Hfaiedh, N., Mnafigui, K., Kadri, A. Gharsallah, N. Assessment of polyphenol composition, antioxidant and antimicrobial properties of various extracts of Date Palm Pollen (DPP) from two Tunisian cultivars. *Arabian Journal of Chemistry*. 2015, 12, 3075-3086.
- [90] Ebadi, M.-T., Mollaei, S. Khurizadeh, S. Evaluation of volatile and phenolic compounds, and antioxidant activity of different parts of *Ferulago angulata* (schlecht.) Boiss. *Industrial Crops and Products*. 2019, 140, 111589.
- [91] Kirkan, B. Antioxidant potential, enzyme inhibition activity, and phenolic profile of extracts from *Stachys cretica* subsp. *vacillans*. *Industrial Crops and Products*. 2019, 140, 111639.
- [92] Pavlenko-Badnaoui, M., Protska, V., Burda, N., Zhuravel, I. Kuznetsova, V. The study of phenolic compounds and antioxidant activity of raw materials of *Heliopsis helianthoides* (L.) sweet. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*. 2021, 34, 28-33.
- [93] Salamatullah, A. M., Uslu, N., Ozcan, M. M., Alkaltham, M. S. Hayat, K. The effect of oven drying on bioactive compounds, antioxidant activity, and phenolic compounds of white and red-skinned onion slices. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2021, 45, e15173.
- [94] Tzima, K., Brunton, N. P., McCarthy, N. A., Kilcawley, K. N., Mannion, D. T. Rai, D. K. The Effect of Carnosol, Carnosic Acid and Rosmarinic Acid on the Oxidative Stability of Fat-Filled Milk Powders throughout Accelerated Oxidation Storage. *Antioxidants*. 2021, 10, 762.
- [95] Wang, J. J., Wang, S. Q., Guo, H. Y., Li, Y., Jiang, Z. H., Gu, T., Su, B. X., Hou, W. G., Zhong, H. X., Cheng, D. D., Zhang, X. J. Fang, Z. P. Rosmarinic acid protects rats against post-stroke depression after transient focal cerebral ischemic injury through enhancing antioxidant response. *Brain Research*. 2021, 1757, 147336.
- [96] Zhuang, H., Wang, M. H., Nan, B., Yang, C. Y., Yan, H. Y., Ye, H. Q., Xi, C. Y., Zhang, Y. Yuan, Y. Rosmarinic acid attenuates acrylamide induced apoptosis of BRL-3A cells by inhibiting oxidative stress and endoplasmic reticulum stress. *Food and Chemical Toxicology*. 2021, 151, 112156.

- [97] Lei, S. Y., Wu, S. L., Wang, G. Z., Li, B., Liu, B. Lei, X. Pinoresinol diglucoside attenuates neuroinflammation, apoptosis and oxidative stress in a mice model with Alzheimer's disease. *Neuroreport*. 2021, 32, 259-267.
- [98] Youssef, F. S., Ashour, M. L., El-Beshbishy, H. A., Hamza, A. A., Singab, A. N. B. Wink, M. Pinoresinol-4-O-beta-D-glucopyranoside: a lignan from prunes (*Prunus domestica*) attenuates oxidative stress, hyperglycaemia and hepatic toxicity in vitro and in vivo. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2020, 72, 1830-1839.
- [99] Grina, F., Ullah, Z., Kaplaner, E., Moujahid, A., Eddoha, R., Nasser, B., Terzioğlu, P., Yilmaz, M. A., Ertaş, A., Öztürk, M. Essamadi, A. *In vitro* enzyme inhibitory properties, antioxidant activities, and phytochemical fingerprints of five Moroccan seaweeds. *South African Journal of Botany*. 2020, 128, 152-160.
- [100] Sarikurkcu, C. *Anthemis chia*: Biological capacity and phytochemistry. *Industrial Crops and Products*. 2020, 153, 112578.
- [101] Sarikurkcu, C., Hanine, H., Sarikurkcu, R. B., Sarikurkcu, R. T. Amarowicz, R. *Micromeria myrtifolia*: The influence of the extracting solvents on phenolic composition and biological activity. *Industrial Crops and Products*. 2020, 145, 111923.
- [102] Sarikurkcu, C., Ozer, M. S. Tlili, N. Comparison of the influence of the solvent on the extraction of the bioactive compounds from *Marrubium lutescens* using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). *Analytical Letters*. 2020, 53, 2222-2234.
- [103] Sarikurkcu, C., Sahinler, S. S. Tepe, B. *Astragalus gymenolobus*, *A. leporinus* var. *hirsutus*, and *A. onobrychis*: Phytochemical analysis and biological activity. *Industrial Crops and Products*. 2020, 150, 112366.
- [104] Sarikurkcu, C. Zengin, G. Polyphenol profile and biological activity comparisons of different parts of *Astragalus macrocephalus* subsp. *finitimus* from Turkey. *Biology*. 2020, 9, 1-15.
- [105] Zengin, G., Stefanucci, A., Rodrigues, M. J., Mollica, A., Custodio, L., Aumeeruddy, M. Z. Mahomoodally, M. F. *Scrophularia lucida* L. as a valuable source of bioactive compounds for pharmaceutical applications: In vitro antioxidant, anti-inflammatory, enzyme inhibitory properties, *in silico* studies, and HPLC profiles. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2019, 162, 225-233.
- [106] Yener, İ., Ölmez, Ö. T., Ertas, A., Yilmaz, M. A., Firat, M., Kandemir, S. İ., Öztürk, M., Kolak, U. Temel, H. A detailed study on chemical and biological profile of nine *Euphorbia* species from Turkey with chemometric approach: Remarkable cytotoxicity of *E. fistulosa* and promising tannic acid content of *E. eriophora*. *Industrial Crops and Products*. 2018, 123, 442-453.

- [107] Akdeniz, M., Yilmaz, M. A., Ertas, A., Yener, I., Firat, M., Aydin, F. Kolak, U. Method validation of 15 phytochemicals in *Hypericum lysimachioides* var. *spathulatum* by LC–MS/MS, and fatty acid, essential oil, and aroma profiles with biological activities. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2020, 14, 3194-3205.
- [108] Khan, H., Marya, Amin, S., Kamal, M. A. Patel, S. Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors: Current therapeutic standing and future prospects. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018, 101, 860-870.
- [109] Martinez-Gonzalez, A. I., Díaz-Sánchez, Á. G., de la Rosa, L. A., Bustos-Jaimes, I. Alvarez-Parrilla, E. Inhibition of α -amylase by flavonoids: Structure activity relationship (SAR). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2019, 206, 437-447.
- [110] Oboh, G., Agunloye, O. M., Adefegha, S. A., Akinyemi, A. J. Ademiluyi, A. O. Caffeic and chlorogenic acids inhibit key enzymes linked to type 2 diabetes (in vitro): A comparative study. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*. 2015, 26, 165-170.
- [111] Şöhretoğlu, D., Sari, S., Barut, B. Özel, A. Tyrosinase inhibition by some flavonoids: Inhibitory activity, mechanism by in vitro and in silico studies. *Bioorganic Chemistry*. 2018, 81, 168-174.
- [112] Bahadori, M. B., Kirkan, B., Sarikurkcü, C. Ceylan, O. Metabolite profiling and health benefits of *Stachys cretica* subsp. *mersinaea* as a medicinal food. *Industrial Crops and Products*. 2019, 131, 85-89.
- [113] Nurul Islam, M., Jung, H. A., Sohn, H. S., Kim, H. M. Choi, J. S. Potent α -glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from *Artemisia capillaris*. *Archives of Pharmacal Research*. 2013, 36, 542-552.
- [114] Mishra, L. K., Sarkar, D., Mentreddy, R. Shetty, K. Evaluation of phenolic bioactive-linked anti-hyperglycemic and *Helicobacter pylori* inhibitory activities of Asian Basil (*Ocimum* spp.) varieties. *Journal of Herbal Medicine*. 2020, 20, 100310.
- [115] Chokki, M., Cudalbeanu, M., Zongo, C., Dah-Nouvlessounon, D., Ghinea, I. O., Furdul, B., Raclea, R., Savadogo, A., Moussa, L., Avamescu, S. M., Dinica, R. M. Moussa, F. Exploring Antioxidant and Enzymes (α -Amylase and β -Glucosidase) Inhibitory Activity of *Morinda lucida* and *Momordica charantia* Leaves from Benin. *Foods*. 2020, 9, 434.
- [116] Liu, S. W., Yu, J. C., Guo, S., Fang, H. L. Chang, X. D. Inhibition of pancreatic alpha-amylase by *Lonicera caerulea* berry polyphenols in vitro and their potential as hyperglycemic agents. *LWT-Food Science and Technology*. 2020, 126, 109288.

- [117] Liu, X. C., Wang, Y. H., Zhang, J. C., Yang, L. L., Liu, S. Q., Taha, A. A., Wang, J. Ma, C. Subcritical water extraction of phenolic antioxidants with improved alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitory activities from exocarps of *Castanea mollissima* Blume. *Journal of Supercritical Fluids*. 2020, 158, 104747.
- [118] Si, F. L., Duan, S. L., Wang, X. Wang, L. L. Phenolic Antioxidants of *Auricularia* Species and Their Inhibitory Effects on alpha-Amylase, alpha-Glucosidase and Acetylcholine Esterase Activities. *Current Topics in Nutraceutical Research*. 2020, 18, 132-140.

