

PAPER DETAILS

TITLE: *Anthemis tinctoria* L. var. *tinctoria* L. Bitkisine Ait Fenolik Bilesiklerin LC-ESI-MS/MS ile Miktar Tayini ve Bitkinin Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi

AUTHORS: Ahmet EMIR,Ceren EMIR

PAGES: 996-1006

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/963114>

Anthemis tinctoria* L. var. *tinctoria* L. Bitkisine Ait Fenolik Bileşiklerin LC-ESI-MS/MS ile Miktar Tayini ve Bitkinin Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi*Quantification of Phenolic Compounds of *Anthemis tinctoria* L. var. *tinctoria* L. by LC-MS/MS and Determination of Biological Activities of the Plant****Ahmet EMİR^{*1,a}, Ceren EMİR^{1,b}**¹ Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, 35040, Bornova/İzmir, Türkiye

• Geliş tarihi / Received: 10.02.2020

• Düzeltilecek geliş tarihi / Received in revised form: 30.08.2020

• Kabul tarihi / Accepted: 04.09.2020

Öz

Mevcut çalışmada, Tire/İzmir'den toplanan ve halk arasında, boyacı papatyası veya sarı papatya olarak adlandırılan *Anthemis tinctoria* var. *tinctoria* bitkisi fenolik profili ve biyolojik aktiviteleri bakımından incelenmiştir. Toplam fenolik ve flavonoid içeriği spektrofotometrik olarak belirlenmiş olup, 30 adet fenolik bileşiğin dedeksiyonu ve miktar tayini LC-ESI-MS/MS cihazı ile yapılmıştır. Bitkinin metanol ekstresine ait asetilkolinesteraz, bütirilkolinesteraz ve tirozinaz enzim inhibisyonları 96 kuyucuklu mikroparka okuyucu ile saptanmıştır. Ayrıca bitkinin antioksidan kapasite tayini DPPH ve CUPRAC yöntemleriyle belirlenmiştir. Metanol ekstresinin toplam fenolik ve flavonoid miktarları sırasıyla 21.4±4.2 (mg GAE/g ekstre) ve 9.7±2.56 (mg QE/g ekstre) olarak bulunmuştur. Miktar tayininde, fenolik asit olarak 3-hidroksibenzoik asit (1167.3±0.72 µg/g ekstre) ve ferulik asit (845.8±1.98 µg/g ekstre), flavonoid olarak morin (1598.4±2.15 µg/g ekstre) ve kersetin (1416.0±1.83 µg/g ekstre) bileşikler en yüksek konsantrasyonda bulunmuştur. Asetilkolinesteraz, bütirilkolinesteraz ve tirozinaz enzim inhibisyonlarının IC₅₀ değerleri ise sırasıyla 254.7 ±4.86 µg/mL, 166.2±3.74 µg/mL ve 415.7±1.85 µg/mL olarak hesaplandı. Ayrıca bitkinin antioksidan kapasitesi sırasıyla 302.18±2.74 ve 514.62±3.82 mg TE/g ekstre olarak bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: *Anthemis tinctoria*, Fenolikler, Kolinesterazlar, Tirozinaz**Abstract**

In the present study, *Anthemis tinctoria* var. *tinctoria* plant, collected from Tire / İzmir and named as the painter's daisy or yellow daisy among the people, was examined in terms of its phenolic profile and biological activities. Total phenolic and flavonoids content were determined spectrophotometrically. Detection and quantification of 30 phenolic compounds were performed by LC-ESI-MS/MS. Acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and tyrosinase enzyme inhibition of methanol extract of the plant were determined by 96-well microplate reader. In addition, antioxidant capacity of the plant was determined by DPPH and CUPRAC methods. Total phenolic and flavonoid contents of methanol extract were 21.4±4.2 (mg GAE/g extract) and 9.7±2.56 (mg QE/g extract), respectively. In the quantification assay, 3-hydroxybenzoic acid (1167.3±0.72 µg/g extract) and ferulic acid (845.8±1.98 µg / g extract) as phenolic acid, morin (1598.4±2.15 µg/g extract) and quercetin (1416.0±1.83 µg/g extract) as flavonoids were found at the highest concentration. IC₅₀ values of acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and tyrosinase inhibition were 254.7±4.86 µg/mL, 166.2±3.74 µg/mL and 415.7±1.85 µg/mL, respectively. In addition, the antioxidant capacity of the plant was found as 302.18±2.74 and 514.62±3.82 mg TE/g extract, respectively.

Keywords: *Anthemis tinctoria*, Phenolics, Cholinesterases, Tyrosinase^{*a} Ahmet EMİR; ahmet.emir@ege.edu.tr, Tel: (0505) 393 21 09, orcid.org/0000-0002-0971-7716^b orcid.org/0000-0001-8516-9830

1. Giriş

Sekonder metabolitler, kimyasal yapıları birbirinden oldukça farklı olan ve bitkilerdeki farklı yollardan sentezlenen maddelerdir. Bu metabolitler bitkilerin temel işlevleri için doğrudan gerekli değildir, ancak fizyolojik faaliyetler için olduğu kadar insektisitlerden, oksidan ajanlardan ve ultraviyole radyasyon gibi dış etkenlerden korunmak amacıyla sentezlendiği düşünülmektedir. Bitki fenolikleri de biyogenetik olarak şikimik asit ya da malonat/asetat yolları aracılığıyla oluşturulan, temel kimyasal iskeletlerine göre 16 gruba ayrılan en büyük sekonder metabolit gruplarından biridir (Lattanzio, 2013). Günümüzde birçok araştırmacı, çok çeşitli biyolojik ve farmakolojik etkileri nedeniyle fenolik bileşiklere odaklanmıştır. Kimyasal yapılarındaki fenil halkaları ve hidroksil grupları, bu moleküllerin güçlü antioksidan aktivite göstermesine neden olur. Redoks özellikleri, reaktif oksijen türlerini etkisizleştirmeyi, oksidanları indirgemeyi ve metal şelatlamayı sağlar (Afanasev vd., 1989). Ayrıca, fenolik bileşiklerin α -amilaz ve α -glukosidaz, lipaz, kolinesterazlar ve tirozinaz gibi enzimlere karşı önleyici potansiyelleri ile ilgili çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır (Gonçalves ve Romano, 2017). Enzimler, çeşitli biyolojik yaşam süreçleri ve hastalıkların patofizyolojisindeki katalitik rolleri nedeniyle birçok kronik hastalıkta temel moleküler hedeflerdir. Bunu, pazarlanan tüm küçük molekülü ilaçların % 47'sinin enzimlerin inhibisyonunu etkilemesi açıkça desteklemektedir (Hopkins ve Groom, 2002). Yaygın olarak kullanılan bu ilaçlara örnek olarak kolinesteraz inhibitörleri verilebilir. Kolinesteraz inhibitörleri, belirgin ve kesin bir tedavisi olmayan nörodejeneratif Alzheimer hastalığının semptomatik tedavisinde en fazla kullanılan ilaçlardır. Bu ilaç etken maddelerinden takrin, rivastigmin ve memantin hem asetilkolinesteraz (AChE) hem de butirilkolinesteraz (BuChE) enzimleri üzerinde etkiliyken, galantamin ve donezepil AChE için seçicidir. Bu ilaçlar, kolinerjik etkinliği artırarak hastanın yaşam kalitesinde artış ve hastalık evresinde stabilizasyon sağlamaktadır. Bununla birlikte, bu ilaçların mide bulantısı, kusma, ishal, baş dönmesi, karın ağrısı ve baş ağrısı gibi hastaların yaşam kalitesini olumsuz etkileyen birçok yan etkisi vardır (Weinstock, 1999). Bu nedenle, minimal yan etkileri olan doğal enzim inhibitörlerini bulma çalışmaları birçok araştırmacının çalışma konusu olmuştur. Diğer yandan, glikoprotein yapısına sahip olan tirozinaz

enzimi ise, insanda temel olarak tirozinin monofenolaz etkisi ile hidroksilasyonu ve 3,4-dihidroksifenilalaninin (L-DOPA) difenolaz etkisi ile o-dopakinona oksidasyonu ile melanin sentezinde rol oynamaktadır. Melaninin fotoprotektif etkisine rağmen, fazla miktarda sentezlenmesi farklı deri hastalıklarına sebep olabilmektedir. Ayrıca meyve ve sebzelerde polifenolik bileşiklerin oksidasyonuna bağlı olarak gerçekleşen renk kararmasından yine tirozinaz enzimi sorumludur. Bu etkilerinin yanında, beyinde tirozinaz enziminin katalizlediği bir reaksiyon sonucu oluşan nöromelanin, Parkinson hastalığındaki duyarlı nöronlarda nörodejenerasyona neden olmaktadır (Martinez ve Whitaker, 1995; Asanuma vd., 2003; Zolghadri vd., 2019). Bu sebeplerden dolayı tirozinaz enzimini inhibe eden doğal ürünlerin araştırılması da önemli hale gelmiştir.

Anthemis cinsi, dünya genelinde yaklaşık 210 türle temsil edilen ve Compositae familyasının en geniş ikinci genusudur. Ülkemizde ise 83 taksonu bulunmakla birlikte bunların % 54'ü endemiktir (Bremer ve Humpries, 1993; Güner vd., 2000). Halk arasında, boyacı papatyası veya sarı papatya olarak adlandırılan *Anthemis tinctoria* var. *tinctoria* bitkisi grimsi-yeşil renkte, 20-50 cm yükseklikte, sarı çiçekli ve çok yıllık bir bitki olup, Anadolu'da yaygın bir şekilde bulunmaktadır (Baytop, 1999). Etnobotanik çalışmalarda *A. nobilis* bitkisinin diyaforetik, karminatif (Al-Snafi, 2016), *A. cretica*'nın karın ağrısı ve böbrek taşında (Uğurlu ve Seçmen, 2008), *A. cotula*'nın psöriazis, ateş, gastrointestinal sistem sorunlarında (Shawahna ve Jaradat, 2017) yine *A. cretica* ssp. *tenuiloba* ve *A. austriaca* bitkilerinin infüzyonlarının karın ağrısına dekoksasyonlarının hemoroid ve soğuk algınlığına karşı kullanıldığı belirtilmiştir (Honda vd., 1996). *A. tinctoria* var. *tinctoria* çiçeklerinden hazırlanan dekoksasyonun antidiyabetik ve antispazmodik amaçlı kullanıldığının rapor edildiği çalışmada endemik *A. wiedemanniana* bitkisinin sedatif, antispazmodik etkili ve üriner problemlerde kullanıldığı bildirilmiştir (Cakilcioglu vd., 2011). Daha önce yayınlanan bilimsel araştırmalarda, *Anthemis* türlerine ait yapılan fitokimyasal çalışmalar sonucu elde edilen polifenolik bileşikler ile mono- ve seskiterpenlerin antioksidan (Papaioannoua vd., 2007), antiproliferatif (Conforti vd., 2012), antidiyabetik (Afifi ve Kasabri, 2013), antiprotozoal (De Mieri vd., 2017), antispazmodik (Karim vd., 2010) potansiyellerine sahip olduğu rapor edilmiştir. Yine literatürde, farklı *Anthemis* türlerinin farklı çözücülerle hazırlanmış ekstraktlarının LC-MS ve

HPLC uygulamaları aracılığıyla fenolik bileşimlerinin incelendiği çalışmalar mevcuttur. *A. kotschyana* türünün etanol ve su ekstraktlarında LC-MS/MS dedeksiyonunda, 27 bileşik arasında ramnetin ve kinik asit majör maddeler olarak belirlenmiştir (Bursal vd., 2020). Bir diğer örnek ise nadir bir endemik olan *A. fulvida* (= *Cota fulvida*)'nın metanol ekstresine aittir. Bu çalışmada şiringik asit, kaftarik asit, kinik asit türevleri, kersetin glikozitleri ve luteolinin varlığının tespit edildiği belirlenmiştir (Özek vd., 2019). Bunlara ek olarak, polifenolik içeriğiyle birlikte seskiterpenik maddelerinde varlığının tespit edildiği makalelerde *A. tinctoria* var. *pallida*, *A. cretica* subsp. *tenuiloba* ve *A. cotula* bitkileri çalışılmıştır (Orlando vd., 2019; Sut vd., 2019). Görüldüğü gibi literatürde, *A. tinctoria* L. bitkisinin farklı varyeteleri ile ilgili çalışmalar yer alırken, *A. tinctoria* var. *tinctoria* taksonu hakkında sınırlı sayıda araştırma rapor edilmiştir. Bunlardan, Papaioannoua vd., (2007)'nin yapmış oldukları çalışmada, Yunanistan'dan toplanan *A. tinctoria* subsp. *tinctoria* var. *pallida* bitkisinin fitokimyasal izolasyonu sonucu kondurol glikozidi, nikotiflorin, izokersetin, rutin ve patulitrin maddeleri elde edilmiş ve antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. Yine Beypazarı/Ankara bölgesinden toplanan bu *Anthemis* türünün antiviral aktivitesi ve sitotoksitesi araştırılmıştır (Orhan vd., 2009). Bir diğer multidisipliner çalışmada ise, *A. tinctoria* var. *tinctoria* bitkisinin etanol ve su ekstraktlarıyla harmanlanmış viskoz, pamuk, yün gibi kumaşların boyama, dayanıklılık, sitotoksite özelliklerine bakılmıştır (Eser vd., 2017).

Tüm bu bilgiler ışığında, söz konusu *Anthemis tinctoria* var. *tinctoria* bitkisinin geniş kapsamda biyoaktif fenolik bileşiklerinin miktar tayini LC-ESI-MS/MS cihazıyla gerçekleştirilmiş olup spektrofotometrik yöntemlerle, bitkinin toplam fenolik içeriği, toplam flavonoid içeriği, antioksidan kapasitesi, asetilkolinesteraz, bütirilkolinesteraz ve tirozinaz enzim inhibitör aktiviteleri tarafımızdan saptanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Kimyasallar

LC-MS/MS çalışmalarında standart olarak kullanılan (+)-kateşin, (-)-epikateşin, (-)-epigallokateşin gallat, benzoik asit, 3-hidroksibenzoik asit, 4-hidroksibenzoik asit, kateşol, krisin, ferulik asit, 3-hidroksiflavon, galangin, genistein, izoramnetin, kemferol, luteolin, *p*-kumarik asit, morin, mirsetin,

naringenin, fenil asetat, daidzein, viteksin, kersetin, 3-*O*-metilkersetin, sirinjik asit, vanillik asit, gallik asit, fisetin, hesperidin, rutin; ve enzim inhibisyon aktivitelerinde kullanılan AChE (*Electrophorus electricus*), BuChE (at serumu), Asetiltiyokolin/Butiriltiyokolin iodyd, DTNB (Ellman reaktifi) [5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit)], galantamine hidrobromür, tirozinaz (mantar), L-Dopa ve α -kojik asit Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) markasından temin edilmiştir. Folin-Ciocalteu reaktifi, sodyum karbonat, alüminyum klorür, potasyum asetat ve dimetilsülfoksit (DMSO) ile antioksidan aktivite çalışmalarında kullanılan 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil, neokuprin ve bakır (II) klorür yine aynı firmadan alınmıştır. Ayrıca ekstraksiyonda ve MS analizinde kullanılan ultra saf su, metanol ve formik asit analitik (LC grade, Sigma-Aldrich) kalitede tercih edilmiştir.

2.2. Bitki Örneği

Anthemis tinctoria var. *tinctoria* bitkisi, Tire/İzmir' den Haziran 2018 tarihinde toplanmıştır. Toplanan bitki oda sıcaklığında ve karanlık ortamda saklanmıştır. Tür teşhisi Dr. Ahmet Emir tarafından yapılmış olup, bitkiye ait herbaryum örneği Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı'nda 1630 kod numarası ile bulunmaktadır.

2.3. Bitki Ekstresinin Hazırlanışı

Ekstraksiyon işlemi önceki çalışmamızda (Emir vd., 2020a) tarif edildiği şekilde gerçekleştirildi. Oda sıcaklığında kurutulmuş ve toz edilmiş bitkinin toprak üstü kısmından bir gram tartılarak falkon tüpe aktarıldı. Daha sonra tüp içerisine 20 mL metanol (LC grade) konulup, ekstraksiyon için rotator cihazında (ISOLAB Laborgeräte GmbH) bir saat süre ile çalkalandı ve metanollü kısım süzülerek 100 mL'lik balona aktarıldı. Ekstraksiyon işlemi 3 kez tekrarlandı ve süzüntü metanolden rotavapor (Büchi, Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) cihazında 40°C'de, düşük basınç altında kurtarıldı ve metanol ekstresi elde edildi. Bitkinin metanol ekstresi kromatografik analiz ve diğer biyolojik aktivitelerde kullanılmak üzere 4°C'de ve karanlık ortamda bekletildi. LC-MS/MS çalışması için 0.22 µm PTFE filtre kullanıldı.

2.4 Toplam Fenolik İçeriği

Ekstrenin toplam fenolik içerik tayini, bazı modifikasyonlar ile birlikte belirtilen metoda (Singleton vd., 1999) göre yapıldı. Flakonlara 1

mg/mL konsantrasyonda 1 mL ekstrakt, Folin-Ciocalteu reaktifi (1/10 oranında seyreltilmiş) ve 4 mL sodyum karbonat çözeltisi (%7.5) ilave edildi. 25°C'de 20 dakika inkübasyondan sonra, absorbans değerleri 765 nm'de (Thermo Scientific Evolution Array) ölçüldü. Kalibrasyon eğrisi için benzer prosedür uygulanmış olup, pozitif kontrol için gallik asit kullanıldı ve sonuçlar gallik asit eşdeğerleri (mg GAE/g ekstre) olarak ifade edildi.

2.5 Toplam Flavonoit İçeriği

Ekstrenin toplam flavonoit içeriği, $AlCl_3$ metoduna göre (Dziri vd., 2012) saptandı. Buna göre, 2 mL ekstrakt, 0.1 mL % 10' luk $AlCl_3$ çözeltisi, 0.1 mL potasyum asetat ve 2.8 mL distile su bir flakona ilave edildi. 30 dakika süre ile oda sıcaklığında inkübasyondan sonra, absorbans 415 nm'de (Thermo Scientific Evolution Array) ölçüldü. Kersetin pozitif kontrol olarak kullanıldı ve sonuçlar kersetin eşdeğerleri (mg KE/g ekstre) olarak ifade edildi.

2.6. Fenolik Bileşiklerin Saptanması ve Miktar Tayini

30 tane fenolik bileşiğin analizi, TSQ Quantum™ Access MAX Triple Quadrupole Mass Spectrometer (Thermo Scientific™) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Kromatografik ayırım için GL Sciences ODS C_{18} (150 mm×4.6 mm×5 μ m) kolon ve gradiyent mobil faz sistemi kullanıldı (Emir vd., 2020b). Solvan A olarak 0.1 % formik asit içeren su, solvan B olarak 0.1 % formik asit içeren metanol kullanıldı (Tablo 1). Mobil fazın akış hızı 1.0 mL/dk, enjeksiyon hacmi ise 5 μ L olacak şekilde ayarlandı. Kolon sıcaklığı 25°C'de sabitlendi. Cihaza ait ESI parametreleri: iyon kaynağı (HESI) 3000 püskürtme voltajı, kapiler sıcaklık 400°C, buharlaştırıcı sıcaklığı 500°C, sheath gazı, aux gazı ve sweep gazı akış hızı sırasıyla 75 arb, 20 arb ve 0 arb şeklindedir; bileşiklere ait MS parametreleri ise Tablo 2'de ayrıntılı şekilde yer almaktadır. Miktar tayini için, external standart yöntem kullanıldı. Her bir fenolik bileşiğin miktarı kalibrasyon eğrileri kullanılarak μ g/g ekstre şeklinde ifade edildi (Tablo 3).

2.7. Anti-kolinesteraz Aktivite

Ekstrelerin asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz inhibitör aktivitesi Ellman (1961) metodunda yapılan birtakım

modifikasyonlarla, 96 kuyucuklu mikrolaka okuyucu (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo Scientific, USA) kullanılarak yapıldı. Ekstreye, 0.05 M fosfat tamponu kullanılarak 0.001-1000 mg/mL konsantrasyon aralığında olacak şekilde seyreltmeler yapıldı. Plakaya aktarılan örnekler üzerine 0.25 U/mL enzim ilave edildi ve substrat konulmadan önce 30 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra substrat olarak 0.24 mM asetiltiyokolin iodyd/bütiriltiyokolin iodyd çözeltisi ve 0.2 mM Ellman reaktifi (5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid) (DTNB) ilave edildi. Son olarak mikrolaka okuyucu yardımıyla 405 nm'de absorbans değişimine dayalı ölçümler yapıldı. Standart olarak galantaminin kullanıldığı deneyde enzim inhibisyonlarına ait IC_{50} değerleri üç bağımsız ölçümden alınan sonuçlara göre GraphPad Prism V5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) yazılımı kullanılarak hesaplandı.

Tablo 1. Gradiyent faz değerleri

Zaman	A %	B%	Akış μ L/dk
0	95	5	1000
1.50	80	20	1000
3.00	70	30	1000
4.75	50	50	1000
6.25	30	70	1000
7.50	20	80	1000
10.0	10	90	1000
12.5	5	95	1000
15.0	95	5	1000

2.8. Anti-tirozinaz aktivite

Ekstrelerin tirozinaz inhibisyon aktivitesi modifiye edilmiş dopakrom yöntemi kullanılarak belirlendi (Masuda vd., 2005). Deneyler, 96 kuyucuklu mikrolaka okuyucu kullanılarak gerçekleştirildi. % 5 DMSO içeren 1/15 M potasyum fosfat tamponu (pH 6.8), 7 farklı konsantrasyondaki metanol ekstresi (1000, 750, 500, 250, 100, 10, 1 μ g / mL) ve tirozinaz enzim çözeltisi (46 U/mL) hazırlamak için kullanıldı. Ekstre ve enzim kuyucuklara eklendikten sonra 25 °C' de 10 dakika inkübe edilip, 2.5 mM L-Dopa substrat çözeltisi ilave edildi. Daha sonra tekrar 25 °C' de 20 dakika inkübe edildi ve absorbans 475 nm' de ölçüldü. Üç bağımsız ölçümden alınan sonuçlara göre GraphPad Prism V5.0 yazılımı kullanılarak IC_{50} değerleri hesaplandı. Pozitif standart olarak α -kojik asit kullanıldı.

Tablo 2. Bileşiklere ait MS/MS parametreleri

Molekül No	Molekül Adı	Kollezyon Enerjisi	İyonizasyon Modu	Prekürsör İyon	Prodak İyon
1	Kateşol	27	Negatif	109.22	108.10
2	(+)-Kateşin	22	Negatif	289.10	203.07
3	(-)-Epikateşin	15	Negatif	291.22	139.10
4	(-)-Epigallokateşin gallat	15	Negatif	549.18	139.10
5	Benzoik asit	15	Negatif	121.18	77.23
6	3-Hidroksibenzoik asit	15	Negatif	137.18	93.18
7	4-Hidroksibenzoik asit	15	Negatif	137.15	93.15
8	<i>p</i> -Kumarik asit	13	Negatif	163.01	119.08
9	Vanillik asit	7	Negatif	167.10	152.60
10	Gallik asit	15	Negatif	169.07	125.02
11	Ferulik asit	15	Negatif	193.04	134.10
12	Sirinjik asit	15	Negatif	191.11	182.18
13	Daidzein	34	Negatif	252.84	223.10
14	Krisin	35	Negatif	253.18	143.06
15	Kemferol	35	Negatif	285.10	238.95
16	Luteolin	30	Negatif	284.96	238.95
17	Fisetin	30	Negatif	285.10	135.01
18	Morin	23	Negatif	301.22	150.94
19	Kersetin	26	Negatif	301.20	150.94
20	3-O-Metilkersetin	20	Negatif	315.10	290.99
21	İzoramnetin	35	Negatif	315.09	300.02
22	Galangin	25	Negatif	271.20	153.11
23	Mirsetin	20	Negatif	317.05	191.00
24	Viteksin	20	Negatif	431.29	310.96
25	Hesperidin	20	Negatif	609.40	300.88
26	3-Hidroksiflavon	24	Negatif	239.10	165.08
27	Naringenin	22	Negatif	271.05	151.01
28	Genistein	30	Negatif	271.09	153.11
29	Rutin	35	Negatif	609.24	299.91
30	Fenil asetat	10	Negatif	137.12	95.15

2.9. Ekstrenin Antioksidan Aktivitelerinin Saptanması

2.9.1. DPPH Yöntemi

1000-1 ppm aralığındaki farklı konsantrasyonlarda hazırlanan metanol ekstraktlarında, kararlı yapıda bir azot radikali olan 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) kullanılarak Blois'in (1958) metoduna göre çalışıldı. Belirlenen konsantrasyondaki ekstreten 3 mL cam flakona konuldu. Üzerine, 1 mg tartılarak balon jojede hazırlanan 0.1 mM DPPH çözeltisinden 1 mL ilave edildi. Daha sonra karanlık ortamda 30 dk bekletildikten sonra absorbans değerleri spektrofotometrede (Thermo Scientific, Evolution Array) 517 nm' de ölçüldü. Kontrol grubunda ise 1 mL DPPH çözeltisi ile 3 mL metanolden oluşan karışım 30 dk karanlık ortamda bekletildikten sonra aynı şartlarda absorbans ölçümü gerçekleştirildi. Üç paralel ile gerçekleştirilen çalışmada pozitif standart olarak troloks kullanıldı ve sonuçlar troloks ekivalanı olarak (mg TE/g ekstre) verildi.

2.9.2. CUPRAC Yöntemi

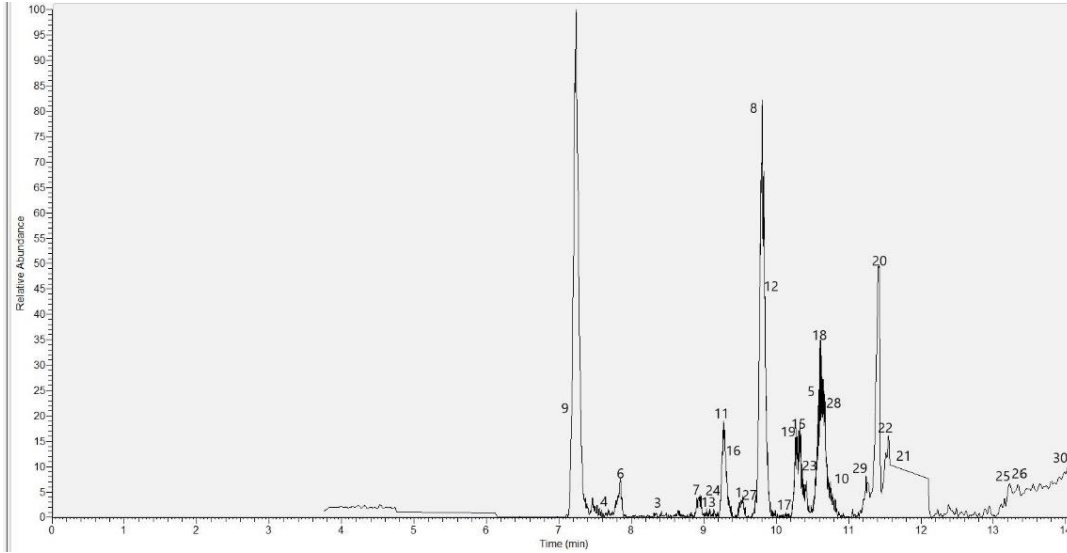
Bakır indirgeme antioksidan kapasite yöntemi olan (CUPRAC) metodunda, Cu (II)' nin indirgenmesi sonucu oluşan Cu (I)' in neokuprin ile kompleks oluşturma esasına göre çalışıldı (Apak vd., 2008). CUPRAC reaktifi düşük redoks potansiyeline sahip olduğu için, şeker ve sitrik asit gibi gerçekte antioksidan olmayan fakat indirgeyici özelliği bulunan maddelerin girişim yapmasını engeller. Ayrıca, bu yöntemde tiyol bazlı antioksidanlar hızlı bir şekilde reaksiyon verir. Ölçümler yapılmadan önce deneyde kullanılacak çözeltiler hazırlandı. Öncelikle CuCl₂' den 0.134 g tartılarak balonjojede 10 mM' lık çözeltisi hazırlandı. Daha sonra neokuprin 0.023 g tartılarak balon jojede 7.5 mM' lık çözeltisi elde edildi. Deney ortamının pH' ını ayarlamak için 19,27 g amonyum asetat tartılarak 1M amonyum asetat tamponu hazırlandı. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan metanol ekstraktları, pH=7.0' de neokuprin ile bakır (II)' nin karışımı ile muamele edildikten sonra 30 dk karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. Daha sonra absorbans değerleri 450 nm' de ölçüldü. Üç paralel ile gerçekleştirilen çalışmada pozitif standart olarak

troloks kullanıldı ve sonuçlar troloks ekivalanı olarak (mg TE/g ekstre) verildi.

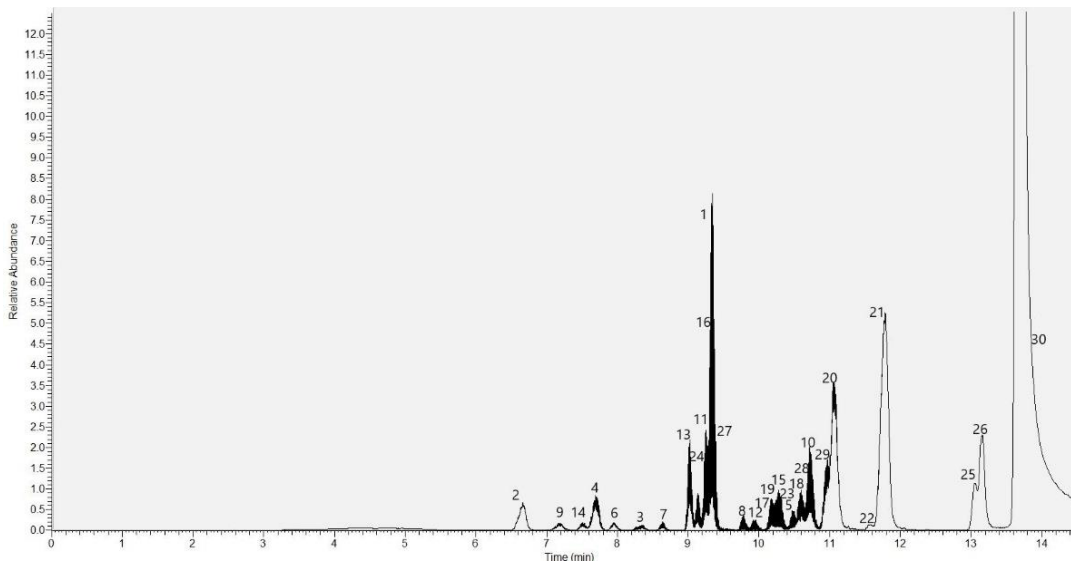
3. Bulgular

Kolay uygulanabilen, basit ve etkili bir ekstraksiyon metodu uygulanarak, ekstrede % 27 verim elde edildi. Ekstrenin toplam fenolik ve flavonit içeriği sırasıyla 21.4 ± 4.2 (mg GAE/g ekstre) ve 9.7 ± 2.56 (mg QE/g ekstre) olarak bulundu. Hazırlanan ekstre üzerinde 30 adet fenolik bileşiğin varlığı ve miktar tayini LC-MS/MS cihazı kullanılarak yapıldı ve sonuçlar $\mu\text{g/g}$ ekstre olarak verildi. Ekstre ve standart madde karışımına ait kromatogramlar sırasıyla Şekil 1 ve 2' de verilmiştir. Bunlardan 24 tanesinin miktar tayini gerçekleştirildi; (-)-epikateşin, (-)-epigallokateşin gallat, daidzein ve fisetin eser miktarda bulunurken, (+)-kateşin ve

krisin bileşiklerinin varlıkları örnekte saptanmadı (Tablo 3). Yapılan biyolojik aktivite deneylerine ait sonuçlar Tablo 4' de verilmiştir. DPPH ve CUPRAC yöntemleriyle yapılan antioksidan kapasite tayini deneylerinde ise sonuçlar sırasıyla 302.18 ± 2.74 ve 514.62 ± 3.82 mg TE/g ekstre olarak bulundu. Metanol ekstresinin, asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzim inhibisyonlarının çalışıldığı deneyde galantamin hidrobromür standart olarak kullanıldı ve IC_{50} değerleri sırasıyla 0.106 ± 0.05 $\mu\text{g/mL}$ ve 1.04 ± 0.12 $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplandı. Örneğimizde ise bu değerler 254.7 ± 4.86 $\mu\text{g/mL}$ ve 166.2 ± 3.74 $\mu\text{g/mL}$ olarak saptandı. Anti-tirozinaz aktivite deneyinde α -kojik asit pozitif standart olarak kullanıldı. Standart bileşiğe ve ekstreye ait IC_{50} değerleri sırasıyla 7.9 ± 0.54 $\mu\text{g/mL}$ ve 415.7 ± 1.85 $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplandı.



Şekil 1. Ekstreye ait MS/MS kromatogramı



Şekil 2. Standart madde karışımına ait MS/MS kromatogramı

Tablo 3. LC-MS/MS analiz sonuçları

Molekül No	Molekül Adı	Miktar (µg/g ekstre)	Doğrusal denklem	R ²	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	RSS, % (10 µg/ml)
1	Kateşol	53.3 ± 1.06	y = 2.7042x + 4.0149	0.9982	14	45	1.26
2	(+)-Kateşin	*	-	-	32	95	0.95
3	(-)-Epikateşin	T	-	-	18	55	0.58
4	(-)-Epigallokateşin gallat	T	-	-	21	62	0.73
5	Benzoik asit	82.9 ± 0.55	y = 50.437x + 99.762	0.9972	9	28	1.16
6	3-Hidroksibenzoik asit	1167.3 ± 0.72	y = 8.7122x - 170.8	0.9985	15	44	1.43
7	4-Hidroksibenzoik asit	246.7 ± 1.68	y = 14.089x + 106.25	0.9993	8	25	0.81
8	p-Kumarik asit	178.7 ± 0.23	y = 42.156x + 245.83	0.9995	17	53	0.26
9	Vanillik asit	51.0 ± 1.03	y = 2.9519x + 0.2917	0.9971	24	74	2.08
10	Gallik asit	139.2 ± 2.11	y = 1.9995x + 0.9041	0.9985	21	60	1.55
11	Ferulik asit	845.8 ± 1.98	y = 1.5133x + 10.198	0.9988	31	94	0.62
12	Sirinjik asit	38.9 ± 0.39	y = 2.0696x + 0.0417	0.9992	29	88	0.28
13	Daidzein	T	-	-	16	49	0.47
14	Krisin	*	-	-	35	104	1.52
15	Kemferol	37.4 ± 1.45	y = 0.9948x + 1.2839	0.9974	12	35	1.85
16	Luteolin	5.6 ± 0.31	y = 247.11x + 47.917	0.9993	6	19	2.19
17	Fisetin	T	-	-	9	28	2.07
18	Morin	1598.4 ± 2.15	y = 39.941x + 341.46	0.9994	23	69	0.88
19	Kersetin	1416.0 ± 1.83	y = 34.225x + 1813.4	0.9988	11	34	0.65
20	3-O-Metilkersetin	60.5 ± 0.94	y = 11.536x + 12.008	0.9985	27	83	0.36
21	İzoramnetin	492.8 ± 0.38	y = 18.054x + 64.6	0.9972	34	104	1.47
22	Galangin	22.6 ± 1.29	y = 259.14x - 44.5	0.9962	23	71	2.15
23	Mirsetin	4.7 ± 0.88	y = 77.896x + 4.3804	0.9992	19	59	0.73
24	Viteksin	1.6 ± 0.14	y = 254.92x + 26.189	0.9974	8	23	1.92
25	Hesperidin	7.4 ± 1.08	y = 131.49x - 20.833	0.9992	12	37	1.53
26	3-Hidroksiflavon	1.2 ± 0.33	y = 5604.8x + 625	0.9988	9	28	0.78
27	Naringenin	9.9 ± 0.78	y = 634.26x + 39.583	0.9954	33	99	0.49
28	Genistein	4.9 ± 0.69	y = 93.898x - 4.1667	0.9994	24	74	0.83
29	Rutin	4.7 ± 1.17	y = 1838.7x + 410.52	0.9985	7	23	2.17
30	Fenil asetat	19.2 ± 1.36	y = 356.35x + 708.33	0.9984	16	49	1.66

LOD (Limit of Detection): Tespit limiti, LOQ (Limit of Quantitation): Tayin limiti, T: Tayin edilebilir limitin altında, *: Tespit edilebilir limitin altında)

Tablo 4. *Anthemis tinctoria* var. *tinctoria* bitkisine ait biyolojik aktivite sonuçları

Biyolojik Aktivite	Fenolik Madde Miktar Tayini		Antioksidan Aktivite		Antikolinesteraz Aktivite ^d		Antitirozinaz Aktivite ^d
	TPC ^a	TFC ^b	DPPH ^c	CUPRAC ^c	AChE	BuChE	
Metanol ekstresi	21.7±4.2	9.7±2.56	302.18±2.74	514.62±3.82	254.7±4.86	166.2±3.74	415.7±1.85
Galantamin HBr*	-	-	-	-	0.106±0.05	1.04±0.12	-
Kojik asit*	-	-	-	-	-	-	7.9±0.54

^agallik asit eşdeğeri (mg GAE/g ekstre); ^bkersetin eşdeğeri (mg KE/g ekstre); ^ctröloks eşdeğeri (mg TE/g ekstre)

^dIC₅₀ (µg/mL ekstre); *pozitif standart

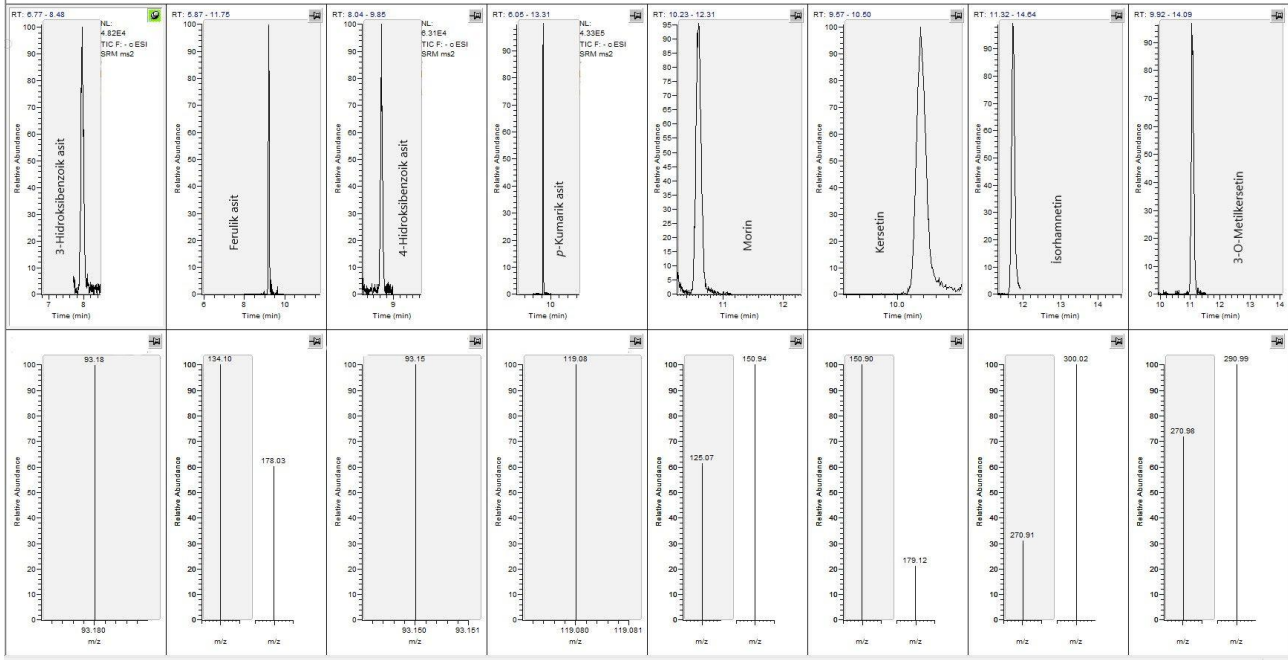
4. Tartışma ve Sonuçlar

Çalışmamızda, Tire/İzmir’ de yabani olarak yetişen *Anthemis tinctoria* var. *tinctoria* bitkisinin fenolik kompozisyonu, antioksidan kapasitesi ve çeşitli enzim inhibisyon aktiviteleri incelenmiştir. Bitkinin ekstraksiyonu için, analiz edilecek madde grubunun kimyasal yapısına bağlı olarak polar veya apolar karakterde farklı çözücüler kullanılabilir. Dolayısıyla, fenolik bileşiklerin bitkiden ekstraksiyonu için en uygun polar ve organik çözücü olarak metanol tercih edilmiştir.

Söz konusu türe ait, daha az sayıda bileşik miktar tayini deneyi literatürde bulunmakla birlikte kapsamlı bir fitokimyasal tarama ilk kez tarafımızdan rapor edilmektedir. LC-MS/MS çalışmamızda, bileşiklerin tayini referans standartlar kullanılarak ve kütle fragmentasyonları esas alınarak gerçekleştirildi. Buna göre, benzoik asit türevlerinden 3-hidroksibenzoik asit ve ferulik asit, flavonoidlerden ise morin ve kersetin majör bileşikler olarak tespit edilmiştir. Majör bileşiklerin kromatogramları ve kütle bölünmeleri Şekil 3’ de gösterilmiştir. Daha önce rapor edilen,

Çankırı'dan toplanan aynı tür üzerinde yapılan çalışmada, 7 polifenolik maddenin (gallik asit, *p*-kumarik asit, 4-hidroksibenzoik asit, vanillik asit, rutin, kersetin ve naringenin) miktar tayini gerçekleştirilmiştir ve 4-hidroksibenzoik asit maddesi diğerlerine göre en yüksek oranda bulunmuştur (Eser vd., 2017). Bu madde

miktarlarının bizim çalışmamızda farklı çıkmasının nedeni, oksidatif stres, tozlaşma, korunma gibi bitkiye ait faktörler olabileceği gibi çevresel etkenler de olabilir. Dolayısıyla farklı lokasyonlardaki aynı türlerin kendine özgü kimyasal profili ve biyolojik aktivitesi bulunabilir.



Şekil 3. Majör bileşiklerin kromatogramları ve kütle fragmentasyonları

Bitkide bulunan toplam biyoaktif maddelerin belirlenmesi amacıyla, spektrofotometrik olarak yapılan toplam fenolik ve flavonoid miktar tayini çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu tür üzerinde bu tayinlerin rapor edildiği bir çalışma yoktur ancak, değerler diğer *Anthemis* türlerinde rapor edilen çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu olarak bulunmuştur. Bunlara örnek olarak, *A. stiparum* subsp. *sabulicola* bitkisinde sırasıyla 13.6 (pirokateşol E/g) ve 5.9 (QE/g) (Chemsal vd., 2018), *A. fumariifolia* bitkisinde 31.94 (GAE/g) ve 12.88 (QE/g), *A. cretica* subsp. *argaea* bitkisinde 48.51 (GAE/g) ve 11.49 (QE/g) (Albayrak ve Aksoy, 2013), *A. cotula* bitkisinde ise 54.32 (GAE/g) ve 39.14 (RutinE/g) (Sut vd., 2019) değerlerini gösterebiliriz.

Miktar tayini dışında, örneğimizde asetilkolinesteraz, bütirikolinesteraz ve tirozinaz enzimlerinin inhibisyon değerleri saptanmıştır. Literatürde bu *Anthemis* türüne ait açıklanan aktivitelerle ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Kısıtlı sayıda farklı *Anthemis* türleri (Chemsal vd., 2018; Sut vd., 2019; Orlando vd., 2019) üzerinde bu çalışmalar yapılmış olup değişken aralıkta aktivite saptanmıştır. Ancak bu çalışmalarda

sonuçlar IC₅₀ değeri üzerinden değil, % inhibisyon veya kojik asit ve galantamin eşdeğeri olarak verilmiştir. Dolayısıyla çalıştığımız türün biyolojik aktivitesini diğer türlerle tam olarak karşılaştırmamız mümkün değildir. Bitkimizin enzim inhibisyon değerleri çok yüksek kapasitede bulunmamıştır ancak ekstrenin antikolinesteraz aktivitesine LC-MS/MS çalışmasında miktarlarını yüksek olarak belirlediğimiz morin ve kersetin bileşiklerini pozitif katkı sağlamış, düşük konsantrasyona sahip luteolin, kemferol, naringenin ve rutin bileşiklerini ise negatif yönde etkilemiş olabilir. Zira, bu bileşiklerin güçlü antikolinesteraz aktiviteye sahip olduklarının belirtildiği çalışmalar literatürde bulunmaktadır (Katalinic vd., 2010; Remya vd., 2012). Bunun yanı sıra, bu bileşiklerin birbirleriyle de etkileşime girebilecekleri de göz önünde bulundurulmalıdır. Antitirozinaz aktivitede ise fenolik asit grubundan yüksek konsantrasyondaki 4-hidroksibenzoik asit ve *p*-kumarik asit bileşiklerinin inhibisyon kapasitesini arttırmış olabileceği düşünülmektedir. Yine literatürde, bu bileşiklerin tirozinaz enziminin inhibisyonunda yer aldığı çalışmalar mevcuttur (Wang vd., 2011).

Son olarak bitkinin antioksidan kapasitesini belirlemek amacıyla, radikal süpürücü aktivite DPPH metodu ve indirgeme gücü CUPRAC metodu ile çalışıldı. Sonuçların troloks ekivalanı olarak verildiği *Anthemis* türleri incelendiğinde, farklı ekstraksiyon yöntemleri uygulanan *A. cotula* bitkisinin DPPH deneyi sonuçları 66.87-103.44, CUPRAC deneyi sonucu ise 307.66-435.32 mg TE/g ekstre aralığında çıkmıştır. Dolayısıyla çalıştığımız türün her iki aktivitesi de daha yüksek bulunmuştur. *A. tinctoria* var. *pallida* ve *A. cretica* subsp. *tenuiloba* türlerinin incelendiği başka bir çalışmada, metanol ekstrelerine ait DPPH deneyi sonuçları sırasıyla 407.07 ve 97.22, CUPRAC deneyi sonuçları ise 691.17 ve 223.09 mg TE/g ekstre olarak rapor edilmiş olup, bitkimizin antioksidan aktivitesi birinci türden düşük ikincisinden ise yüksek gözlenmiştir. Sonuç olarak, yapılan çalışmada İzmir kaynaklı *Anthemis tinctoria* var. *tinctoria* türü fitokimyasal olarak incelenmiş olup, bitkinin biyoaktif moleküller için kaynak olabileceği belirlenmiştir.

Kaynaklar

- Afanasev, I.B., Dcrozko, A.I., Brodskii, A.V., Kostyuk, V.A. ve Potapovitch, A.I., 1989. Chelating and Free Radical Scavenging Mechanisms of Inhibitory Action of Rutin and Quercetin in Lipid Peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, 38, 1763–1769.
- Afifi, F.U. ve Kasabri, V., 2013. Pharmacological and Phytochemical Appraisal of Selected Medicinal Plants from Jordan with Claimed Antidiabetic Activities. *Scientia Pharmaceutica*, 81(4), 889-932.
- Albayrak, S. ve Aksoy, A., 2013. Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Two Endemic *Anthemis* Species in Turkey. *Journal of Food Biochemistry*, 37(6), 639–645.
- Al-Snafi, A.E., 2016. Medical Importance of *Anthemis nobilis* (Chamaemelum nobile)-A review. *Asian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 6(2), 89–95.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. ve Çelik, S.E., 2008. Mechanism of Antioxidant Capacity Assays and the CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity) Assay. *Microchimica Acta*, 160(4), 413–419.
- Asanuma, M., Miyazaki, I. ve Ogawa, N., 2003. Dopamine- or L-DOPA-Induced Neurotoxicity: The Role of Dopamine Quinone Formation and Tyrosinase in a Model of Parkinson's Disease. *Neurotoxicity Research*, 5(3), 165-76.
- Baytop, T., 1999. Türkiye'de Bitkilerle Tedavi, Geçmişte ve Bugün: İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, s. 313.
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181, 1199-1200.
- Bremer, K. ve Humpries, C.J., 1993. Generic Monograph of the Asteraceae-Anthemideae. *Bulletin of the Natural History Museum*, 23(2), 71-177.
- Bursal, E., Aras, A., Kılıç, A. ve Buldurun, K., 2020. Chemical Constituent and Radical Scavenging Antioxidant Activity of *Anthemis Kotschyana* Boiss. *Natural Product Research*, doi: 10.1080/14786419.2020.1723089.
- Cakilcioglu, U., Khatun, S., Turkoglu, I. ve Hayta, S., 2011. Ethnopharmacological Survey of Medicinal Plants in Maden (Elazig-Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 137, 469-486.
- Chemsa, A.E., Zellagui, A., Öztürk, M., Erol, E., Ceylan, O., Duru, M. E. ve Lahouel, M., 2018. Chemical Composition, Antioxidant, Anticholinesterase, Antimicrobial and Antibiofilm Activities of Essential Oil and Methanolic Extract of *Anthemis stiparum* subsp. *sabulicola* (Pomel) Oberpr. *Microbial Pathogenesis*, 119(March), 233–240.
- Conforti, F., Menichini, F., Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Bruno, M., Rosselli, S. ve Çelik, S., 2012. *Anthemis wiedemanniana* Essential Oil Prevents LPS-Induced Production of NO in RAW 264.7 Macrophages and Exerts Antiproliferative and Antibacterial Activities *in vitro*. *Natural Product Research*, 26(17), 1594-1601.
- De Mieri, M., Monteleone, G., Ismajili, I., Kaiser, M. ve Hamburger, M., 2017. Antiprotozoal Activity-Based Profiling of a Dichloromethane Extract from *Anthemis Nobilis* Flowers. *Journal of Natural Products*, 80(2), 459-470.
- Dziri, S., Hassen, I., Fatnassi, S., Mrabet, Y., Casabianca, H., Hanchi, B. ve Hosni, K., 2012. Phenolic Constituents, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Rosy Garlic (*Allium roseum* var. *odoratissimum*). *Journal of Functional Foods*, 4(2), 423–432.
- Ellman, L., Courtney, K.D., Andres, Jr V. ve Featherstone, R.M., 1961. New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88–95.
- Emir, A., Emir, C. ve Yıldırım, H., 2020a. Characterization of Phenolic Profile by LC-ESI-MS / MS and Enzyme Inhibitory Activities of

- Two Wild Edible Garlic: *Allium Nigrum* L. and *Allium Subhirsutum* L. The Journal of Food Biochemistry, 44(4), e13165.
- Emir, A., Emir, C. ve Yıldırım, H., 2020b. Chemical and Biological Comparison of Different Parts of two *Allium* Species: *Allium Paniculatum* L. Subsp. *Villosulum* (Hal.) Stearn and *Allium Paniculatum* L. Subsp. *Paniculatum* L. Chemical Papers, doi: 10.1007/s11696-020-01311-1.
- Eser, F., Yaglioglu, A.S., Dolarslan, M., Aktas, E. ve Onal, A., 2017. Dyeing, Fastness, and Cytotoxic Properties, and Phenolic Constituents of *Anthemis Tinctoria* Var. *Tinctoria* (Asteraceae). The Journal of The Textile Institute, 108(9), 1489-1495.
- Gonçalves, S. ve Romano, A., 2017. Inhibitory Properties of Phenolic Compounds Against Enzymes Linked with Human Diseases, in: Soto-Hernández, M. (Ed), Phenolic Compounds - Biological Activity. IntechOpen, London, pp. 99-118.
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T. ve Başer, K.H.C., 2000. Flora of Turkey and The East Aegean Islands: Edinburgh, Edinburgh University Press, pp. 92-94.
- Honda, G., Yesilada, E., Tabata, M., Sezik, E., Fujita, T., Takeda, Y., Takaishi, Y. ve Tanaka, T., 1996. Traditional Medicine in Turkey. VI. Folk Medicine in west Anatolia: Afyon, Kütahya, Denizli, Muğla, Aydın provinces. Journal of Ethnopharmacology, 53(2), 75-87.
- Hopkins, A.L. ve Groom, C.R., 2002. The Druggable Genome. Nature Reviews Drug Discovery, 727-730.
- Karim, A., Berrabah, M., Mekhfi, H., Ziyat, A., Legssyer, A., Bouali, A., Haloui, B., Amrani, S. ve Aziz, M., 2010. Effect of Essential Oil of *Anthemis Mauritiana* Maire & Sennen Flowers on Intestinal Smooth Muscle Contractility. Journal of Smooth Muscle Research, 46(1), 65-75.
- Katalinic, M., Rusak, G., Barović, J.D., Sinko, G., Jelic, D., Antolovic, R. ve Kovarik, Z., 2010. Structural Aspects of Flavonoids as Inhibitors of Human Butyrylcholinesterase. European Journal of Medicinal Chemistry, 45(1), 186-192.
- Lattanzio, V., 2013. Phenolic Compounds: Introduction, in: Ramawat, K.G., Merillon, J.M. (Eds.), Handbook of Natural Products. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 1544-1573.
- Martinez, M.V. ve Whitaker, J.R., 1995. The Biochemistry and Control of Enzymatic Browning. Trends in Food Science & Technology, 6, 195-200.
- Masuda, T., Yamashita, D., Takeda, Y. ve Yonemori, S., 2005. Screening for Tyrosinase Inhibitors Among Extracts of Seashore Plants and Identification of Potent Inhibitors from *Garcinia Subelliptica*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 69(1), 197-201.
- Orhan, I., Deliorman-Orhan, D. ve Özçelik, B., 2009. Antiviral Activity and Cytotoxicity of The Lipophilic Extracts of Various Edible Plants and Their Fatty Acids. Food Chemistry, 115, 701-705.
- Orlando, G., Zengin, G., Ferrante, C., Ronci, M., Recinella, L. ve Menghini, L., 2019. Comprehensive Chemical Profiling and Multidirectional Biological Investigation of Two Wild *Anthemis* Species (*Anthemis tinctoria* var. *pallida* and *A. cretica* subsp. *tenuiloba*): Focus on Neuroprotective Effects. Molecules, 24, 2582.
- Özek, G., Özbek, M.U., Yur, S., Göger, F., Arslan, M. ve Özek, T., 2019. Assessment of Endemic *Cota fulvida* (Asteraceae) for Phytochemical Composition and Inhibitory Activities Against Oxidation, α -amylase, Lipoxygenase, Xanthine Oxidase and Tyrosinase Enzymes. Records of Natural Products, 13(4), 333-345.
- Papaioannou, P., Lazaria, D., Kariotib, A., Souleles, C., Heilmann, J., Hadjipavlou-Litina, D. ve Skaltsa, H., 2007. Phenolic Compounds with Antioxidant Activity from *Anthemis tinctoria* L. (Asteraceae). Zeitschrift für Naturforschung C-A Journal of Biosciences, 62c, 326-330.
- Remya, C., Dileep, K.V., Tintu, I., Variyar, E.J. ve Sadasivan, C., 2012. Design of Potent Inhibitors of Acetylcholinesterase Using Morin As The Starting Compound. Frontiers in Life Science, 6(3), 107-117.
- Shawahna, R. ve Jaradat, N.A., 2017. Ethnopharmacological Survey of Medicinal Plants Used by Patients With Psoriasis in The West Bank of Palestine. BMC Complementary and Alternative Medicine, 17(1), 4.
- Singleton, V.L., Orthofer, R. ve Lamuela-Raventos, R.M., 1999. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. Methods in Enzymology, 299, 152-178.
- Sut, S., Dall'Acqua, S., Zengin, G., Senkardes, I., Bulut, G., Cvetanović, A. ve Mahomoodally, F., 2019. Influence of Different Extraction Techniques on the Chemical Profile and Biological Properties of *Anthemis cotula* L.: Multifunctional Aspects for Potential

Pharmaceutical Applications. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 173(May), 75–85.

Ugurlu, E. ve Secmen, O., 2008. Medicinal Plants Popularly Used in The Villages of Yunt Mountain (Manisa-Turkey). Fitoterapia, 79(2), 126–131.

Wang, H.M., Chou, Y.T., Hong, Z.L., Chen, H.A., Chang, Y.C., Yang, W.L., Chang, H.C., Mai, C.T. ve Chen, C.Y., 2011. Bioconstituents From Stems of *Synsepalum Dulcificum* Daniell (Sapotaceae) Inhibit Human Melanoma Proliferation, Reduce Mushroom Tyrosinase Activity and Have Antioxidant Properties. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 42, 204–211.

Weinstock, M., 1999. Selectivity of Cholinesterase Inhibition: Clinical Implications for The Treatment of Alzheimer's Disease. CNS Drugs, 12(4), 307–323.

Zolghadri, S., Bahrami, A., Hassan Khan, M.T., Munoz-Munoz, J., Garcia-Molina, F., Garcia-Canovas, F. ve Saboury, A.A., 2019. A Comprehensive Review on Tyrosinase Inhibitors. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 34(1), 279–309.