

PAPER DETAILS

TITLE: *Cephalaria tchihatchewii* Boiss. Ekstrelerinin Antioksidan Aktivitesi, Metabolik Enzimler Üzerine Etkisi ve UPLC-MS/MS Analizi ile Kimyasal Karakterizasyonun Belirlenmesi

AUTHORS: Leyla Güven

PAGES: 2655-2672

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/3307051>

Atıf İçin: Güven L. (2023). *Cephalaria tchihatchewii* Boiss. Ekstrelerinin Antioksidan Aktivitesi, Metabolik Enzimler Üzerine Etkisi ve UPLC-MS/MS Analizi ile Kimyasal Karakterizasyonun Belirlenmesi. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2655-2672.

To Cite: Güven L. (2023). Determination of *Cephalaria tchihatchewii* Boiss.'s Extracts Antioxidant Activity, Effect on Metabolic Enzymes, and Chemical Characterization by UPLC-MS/MS Analysis. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2655-2672.

***Cephalaria tchihatchewii* Boiss. Ekstrelerinin Antioksidan Aktivitesi, Metabolik Enzimler Üzerine Etkisi ve UPLC-MS/MS Analizi ile Kimyasal Karakterizasyonun Belirlenmesi**

Leyla Güven^{1*}

Öne Çıkanlar:

- Cephalaria tchihatchewii* ekstrelerinin antioksidan aktivite ve enzim inhibisyon etkileri incelendi, kimyasal bileşenlerinin analizi yapıldı

Anahtar Kelimeler:

- Karbonik anhidraz II
- Kolinesteraz
- α -Glikozidaz
- Antioksidan
- Enzim inhibisyon
- UPLC-MS/MS
- Cephalaria*

ÖZET:

Bu çalışma, *Cephalaria tchihatchewii* Boiss.'in metanol ve su ekstrelerinin (MECT, WECT) UPLC-MS/MS kullanarak kapsamlı bir kimyasal karakterizasyonunu gerçekleştirmeyi ve bu ekstrelerin potansiyel antioksidan aktivitesinin ve bazı metabolik enzimler üzerindeki etkisini değerlendirmeyi amaçlamaktadır. Antioksidan aktivite, DPPH, ABTS, DMPD, FRAP, KUPRAK ve Fe^{3+} indirgeme testleri dahil olmak üzere çeşitli testler kullanılarak değerlendirilmiştir. MECT ve WECT'in enzim inhibisyon IC_{50} değerleri, sırasıyla α -glikozidaz için 28.98 ve 34.19 $\mu g/mL$, asetilkolinesteraz için 21.82 ve 26.52 $\mu g/mL$ ve karbonik anhidraz II için 27.75 ve 13.72 $\mu g/mL$ 'dir. MECT ve WECT'de bulunan fenolik bileşik miktarları sırasıyla 47.00 ve 46.00 μg GAE /mg ekstre, flavonoid miktarları 60.98 ve 49.34 μg KE/mg ekstre olarak belirlenmiştir. MECT ve WECT'in IC_{50} değerleri sırasıyla DPPH için 34.66 ve 57.76 $\mu g/mL$, ABTS için 20.39 ve 17.33 $\mu g/mL$ ve DMPD için 53.32 ve 57.76 $\mu g/mL$ 'dir. Ekstrelerin indirgeme yetenekleri ise sırasıyla Fe^{+3} indirgeme (λ_{700} :0.377 ve 0.680), FRAP (λ_{593} :0.690 ve 0.369) ve KUPRAK (λ_{450} :0.458 ve 0.333)'dür. UPLC-MS/MS analiziyle elde edilen sonuçlara göre ana bileşenler MECT'in kinik asit 0.39844 $\mu g/mL$, klorojenik asit 38.412 $\mu g/mL$, fumarik asit 0.301 $\mu g/mL$ ve WECT'in klorojenik asit 13.639 $\mu g/mL$, kinik asit 11.004 $\mu g/mL$, siyanidin-3-O-glukozit 0.778 $\mu g/mL$ olduğu belirlenmiştir. Ekstrelerin, antioksidan aktivite ve α -glikozidaz, asetilkolinesteraz, karbonik anhidraz II enzim inhibisyon etkisi dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu belirlenmiştir.

Determination of *Cephalaria tchihatchewii* Boiss.'s Extracts Antioxidant Activity, Effect on Metabolic Enzymes, and Chemical Characterization by UPLC-MS/MS Analysis

Highlights:

- Antioxidant activity and enzyme inhibition effects of extracts of *Cephalaria tchihatchewii* were investigated, chemical components were analyzed.

Keywords:

- Carbonic anhydrase II
- Cholinesterase
- α -Glycosidase
- Enzyme inhibition
- Antioxidant
- UPLC-MS/MS
- Cephalaria*

ABSTRACT:

The present study aims to perform a comprehensive chemical characterization of the methanol and water extracts of *Cephalaria tchihatchewii* Boiss. (MECT, WECT) using UPLC-MS/MS, besides evaluating the potential antioxidant activity of these extracts and their effect on some metabolic enzymes. The antioxidant activity was assessed using various assays including DPPH, ABTS, DMPD, FRAP, CUPRAC, and Fe^{3+} reducing assays. The inhibition effects of the extracts against α -glycosidase, acetylcholinesterase and carbonic anhydrase II enzymes were evaluated. The IC_{50} values of MECT and WECT were for α -glycosidase were 28.98 and 34.19 $\mu g/mL$, for acetylcholinesterase were 21.82 and 26.52 $\mu g/mL$, and for carbonic anhydrase, 27.75 and 13.72 $\mu g/mL$, respectively. The amounts of phenolic compounds present in MECT and WECT were determined to be 47.00 and 46.00 μg GAE /mg extract, respectively. The amounts of flavonoids present in MECT and WECT were determined to be 60.98 and 49.34 μg KE/mg extract, respectively. The MECT and WECT exhibited distinct activities on DPPH, ABTS, and DMPD. The IC_{50} values were for DPPH 34.66 and 57.76 $\mu g/mL$ for ABTS 20.39 and 17.33 $\mu g/mL$ and for DMPD 53.32 and 57.76 $\mu g/mL$, respectively. Reducing abilities of extracts were respectively Fe^{+3} reducing (λ_{700} :0.377 and 0.680), FRAP (λ_{593} :0.690 and 0.369), and CUPRAC (λ_{450} :0.458 and 0.333). UPLC-MS/MS revealed that the major components are MECT (quinic acid 39.844 $\mu g/mL$, chlorogenic acid 38.412 $\mu g/mL$, fumaric acid 0.301 $\mu g/mL$), and WECT (chlorogenic acid 13.639 $\mu g/mL$, quinic acid 11.004 $\mu g/mL$, cyanidin-3-O-glucoside 0.778 $\mu g/mL$). The extracts were determined to have various biological activities, including antioxidant activity and α -glycosidase, acetylcholinesterase, carbonic anhydrase II enzyme inhibition effect.

¹Leyla GÜVEN (Orcid ID: 0000-0002-3189-6415) Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, 25240 Erzurum, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Leyla GÜVEN, e-mail: leyla.guven@atauni.edu.tr

GİRİŞ

Türkiye, yaklaşık 10.000 tür ile bitki florası açısından en zengin ülkelerden biridir. Türkiye'de yayılan önemli familyalardan biri de Caprifoliaceae'dir. Dipsacaceae familyası ise bu familyanın alt familyası olarak kabul edilmektedir. (Göktürk ve ark., 2014; Sumer ve ark., 2018)

Dipsacaceae, *Cephalaria* Schrader ex Roemer & Schultes'in de üyesi olduğu 13 cins ve 250-350 türden oluşan küçük bir familyadır. Bu familya, ağırlıklı olarak Akdeniz bölgesinde ve Yakın Doğu'da yayılım gösteren 94 türden oluşur. Türkiye'de 40 tür vardır ve bunların 25'i endemiktir. Birçok *Cephalaria* (Pelemir) türü, antimikrobiyal, antifungal, antioksidan ve sitotoksik özellikleri nedeniyle geleneksel tıpta kullanılmıştır. *Cephalaria* türlerinin çoğu, Dipsacaceae familyasındaki son derece zengin bir kimyasal çeşitlilik ile karakterizedir. (Sarıkahya, 2014)

Yapılan birçok çalışma sonucunda bu türlerin bir kısmının eski zamanlarda boya, gıda katkı maddesi ve halk ilacı olarak kullanıldığı bildirilmiştir. *Cephalaria* türleri flavonoid (luteolin, kersetin, sinarosit, kersimeritrin), iridoit (loganin, loganik asit, sverosit, kantleyozit ve gentiopikrin), alkaloid, lignan ve özellikle saponinler gibi ikincil metabolitler açısından zengindir. *Cephalaria* türlerinden elde edilen sekonder bileşiklerin sitotoksik, antimikrobiyal, antifungal, antioksidan, hemolitik ve immünomodülatör özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. (Dagli ve ark., 2018; Sarıkahya ve ark., 2010)

Cephalaria cinsi zengin kimyasal bileşime ve biyolojik potansiyele sahiptir. *Cephalaria* türlerinin antibakteriyel, antiviral, antikonvülsif, antifungal, antiparazit, antioksidan, anti-enflamatuvar ve antitümör olduğu bildirilmektedir. Ayrıca immünomodülatör, sitotoksik, pestisit, hemolitik gibi çok çeşitli biyolojik aktiviteler sergilemektedir. (Atalan, 2019; Celenk ve ark., 2020; Chrzaszcz ve ark., 2020a; Dagli ve ark., 2019; Kasaplıgil ve ark., 2020; Sarıkahya ve ark., 2010; Sarıkahya ve ark., 2018)

Antioksidanlar, oksidasyon sürecini ve serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek metabolizmayı reaktif oksidatif türlerden ve oksidatif stresin zararlı etkilerinden korumaktadır. Ayrıca kanser, Parkinson hastalığı, katarakt, diyabet, kalp-damar hastalıkları ve Alzheimer hastalığı gibi kronik hastalıkları önlemede olumlu etkiye sahiptirler. Ek olarak, antioksidanlar, radikal zincir reaksiyonlarını kolayca sonlandırabilir ve hücrel biyomoleküllere zarar veren serbest radikalleri etkili bir şekilde nötralize edebilmektedir. Bitkilerin antioksidan aktivitesi, fenolikler, flavonoidler ve diğer doğal bileşikler gibi sekonder metabolitlerle ilişkilidir. Bu bağlamda sebze, meyve ve tıbbi bitkiler gibi doğal kaynaklardan elde edilen antioksidanların reaktif oksidatif veya serbest radikalleri kolayca ortadan kaldırdığı bilinmektedir. Bu nedenle zararlı etkileri olan sentetik antioksidanlara alternatif olarak bitkilerden elde edilen güvenilir doğal antioksidanlar tercih edilmektedir. (Okkay ve ark., 2021; Topal ve ark., 2022)

Yaşam süresi arttıkça, hafıza kaybı ve diğer bilişsel bozukluklarla karakterize olan Alzheimer hastalığının (AH) insidansı da artar. Nörodejenerasyon, Alzheimer hastalığı dahil olmak üzere birçok yıkıcı hastalıkla ilişkili nöronal ölüme neden olan karmaşık bir prosedürdür. Bu hastalık, beynin belirli bölgelerinde oksidatif stres, iltihaplanma ve asetilkolin (ACh) eksikliği ile ilişkilidir. Bu nedenle, antioksidan zengin besinler ve tıbbi bitkiler tüketmek potansiyel olarak AH'nin ilerlemesini ve nörodejenerasyonu yavaşlatabilir. ACh oluşumunu hidrolize edebilen asetilkolinesteraz (AChE), ACh'de azalmaya ve sinir sinyallemede bozulmaya neden olarak AH oluşumuna katkıda bulunur. AChE inhibitörleri, AChE enziminin aktivitesini inhibe eder ve ACh'nin bozulmasını azaltabilir. AH'nin tedavisinde Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanan rivastigmin, takrin ve donepezil gibi birçok ilaç kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu farmasötik ajanlar, daha düşük aktivite, daha düşük seçicilik ve potansiyel toksisite gibi olumsuz özelliklere sahip olabilir. Bu nedenle, AH tedavisini iyileştirmek

için daha düşük toksisiteye, daha yüksek seçiciliğe ve daha güçlü aktiviteye sahip yeni farmasötik ajanlara acil bir ihtiyaç vardır. (Eruygur ve ark., 2019; Sezer Senol ve ark., 2016)

Karbonik anhidraz enzimleri hemen hemen tüm canlı organizmalarda bulunur ve pH regülasyonu, karboksilasyon reaksiyonları, sıvı dengesi, kemik rezorpsiyonu, tümör oluşumu, kalsifikasyon, bikarbonat sentezi ve diğer birçok patolojik ve fizyolojik süreçte önemli roller oynar. Karbonik anhidraz inhibitörleri, glokom, epilepsi, obezite ve kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde farmasötik ajan olarak kullanılır. (Arabaci ve ark., 2014)

Diabetes mellitus, kandaki atipik glikoz seviyeleri ve nöropati, retinopati, kardiyovasküler hastalık, ateroskleroz ve sinir hasarı gibi ilişkili komplikasyonlarla karakterize edilen metabolik bir hastalıktır. DM'nin birincil etiyolojisinin oksidatif stres olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir. Hiperglisemide aşırı glukoz yüklenmesi, mitokondride reaktif oksidatif stres oluşumunu tetikleyerek mitokondriyal fonksiyonların bozulmasına yol açar. Polisakkaritler, sindirim enzimleri tarafından monosakkaritlere hidrolize edilir. Bu nedenle, sindirim enzimlerinin inhibisyonu, DM tedavisi için önemli bir terapötik yol sağlar. α -Glikozidaz enzimi bağırsak hücreleri tarafından salgınır. Her iki enzim de oligosakkaritleri ve polisakkaritleri glikoz gibi monosakkarit birimlerine hidrolize eder. α -Glikozidaz enzimine karşı inhibitör özelliklere sahip yeni tıbbi bitkilerin tanımlanması, hipergliseminin yönetimi için çok önemlidir. (Gulçin ve ark., 2018; Gülçin ve ark., 2020)

Cephalaria tchihatchewii ekstrelerinin antioksidan, antikolinesteraz, antidiyabetik ve antiglokom özellikleri açısından yaptığımız literatür araştırmasında, yeterli verilerin olmadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle araştırmamızın amacı, *Cephalaria tchihatchewii* bitkisinin metanol ve su ekstrelerinin kimyasal bileşimini ve biyoaktivitesini ortaya koymaktır.

MATERYAL VE METOT

Bitki materyali

Cephalaria tchihatchewii 1 Temmuz 2018 tarihinde Erzurum ili Şenyurt köyünde (40° 10' 27" K 41° 30' 27" D) koordinatlarında 2430 metre rakımda toplanmıştır. Prof. Dr. Yusuf Kaya (Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü) tarafından teşhis edilmiştir. Herbaryum örnekleri Atatürk Üniversitesi Biyoçeşitlilik Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde AUEF 1386 herbaryum numarası ile muhafaza edilmektedir.

Ekstraksiyon

Öğütücüyle toz edilen 50 g bitki materyalleri 1000 mL metanol/kaynar su ile manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında bir gece boyunca ekstre edilmiştir. Ardından metanol/su süzüntüsü ayrılmıştır. Metanol süzüntüsü 120 rpm'de döner buharlaştırıcı uçurularak, su süzüntüsü ise liyofilizatörde kurutulmuştur. *Cephalaria tchihatchewii* metanol ekstresinin (MECT) verimi %26.67, su ekstresinin (WECT) verimi ise %21.60'dir.

Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometresi (UPLC-MS/MS) Yöntemi

Cephalaria tchihatchewii bitkisinde, 35 fenolik bileşik ultra performanslı sıvı kromatografisi MS-MS sistemi ile analiz edildi. UPLC-MS/MS verileri LabSolutions yazılımı ile elde edildi.

Kromatografik koşullar

Cihazın UPLC kısmı bir otomatik örnekleyici, bir ikili pompa, bir gaz giderici ve bir termostatl kolondan oluşmaktadır. Fenolik bileşiklerin kromatografik ayrımı 30°C'de, C18 ters faz analitik kolon

(Zorbax SB-C18) üzerinde, % 0.1 formik asit içeren su (A) ve % 0.1 formik asit içeren asetonitrilden (B) oluşan mobil faz karışımının gradient elüsyonu ile gerçekleştirilmiştir. (Güven ve ark., 2023)

Antioksidan aktivite testi

Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kapasitesi

MECT ve WECT indirgeme kuvvetinin belirlenmesi, Oyaizu yönteminin değiştirilmiş bir versiyonuna göre gerçekleştirilmiştir (Gulcin, 2020; Oyaizu, 1986). Bu yöntemde $\text{Fe}^{3+}(\text{CN}^-)_6$ 'nın indirgenmesi ile azalan miktarı tespit edilmiştir. Ardından ferrik iyonların (Fe^{3+}) eklenerek, Perl'in Prusya mavisi kompleksi oluşturuldu. *Cephalaria* ekstrelerine (15-45 $\mu\text{g/mL}$), %1'lik $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, ve 0.2 M fosfat tamponu (pH 6.6) ile eklenmiştir. Karışım, 50°C'de yarım saat inkübe edildikten sonra üzerine %10 luk trikloroasetik asit ve %0.1 FeCl_3 de ilave edilmiş ve 700 nm'de absorbansı ölçülmüştür.

Cu^{2+} - Cu^+ indirgeme kapasitesi (KUPRAK metodu)

MECT ve WECT Cu^{2+} indirgeme kuvvetinin belirlenmesi, KUPRAK testi kullanılarak belirlenmiştir (Ak ve ark., 2008; Apak ve ark., 2006). Deneyde kromojenik oksitleyici ajan olarak neokuprin kullanılmıştır. 15-45 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarındaki ekstrele 1.0 M'lık asetat tamponu, 10 mM CuCl_2 çözeltisi ve 7.5 mM neokuprin çözeltisi eklendi ve karıştırıldı. Çözelti hacmi distile su ile 2 mL'ye tamamlandı ve karışım oda sıcaklığında yarım saat inkübe edilerek absorbans 450 nm'de ölçüldü. Absorbansın artması, indirgeme yeteneğinin oranı olarak tanımlanmaktadır.

Ferric indirgeme gücü (FRAP metodu)

MECT ve WECT'in ferric indirgeme aktivitesi, TPTZ- Fe^{+3} kompleksinin asidik koşullar altında indirgeme yöntemine göre değerlendirildi (Göçer ve ark., 2011). TPTZ- Fe^{3+} kompleksinin asidik ortamda indirgenmesi, FRAP yönteminin temelini oluşturur. Bu amaçla 15-45 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarındaki ekstrele, 10 mM taze TPTZ solüsyonu, 0.3 M fosfat tampon solüsyon (pH 3.6) ve 20 mM FeCl_3 solüsyonu eklendi. 37°C'de yarım saat inkübasyondan sonra 593 nm'de absorbanslar ölçülmüştür. Bitki ekstresi konsantrasyonu artmasıyla ölçülen absorbanslar da artmıştır.

1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH[•]) serbest radikal yakalama aktivitesi

MECT ve WECT'in DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi Blois yöntemi ile değerlendirildi (Blois, 1958). Yöntemin esası, DPPH serbest radikallerinin antioksidanlar ile uzaklaştırılmasına dayanır. 15-45 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyondaki ekstre içeren tüplere 0.1 mM DPPH[•] eklendi ve karışım da sıcaklığında 30 dakika karanlıkta inkübe edildi. 517 nm'de karışımın absorbansı ölçülerek ekstrelerin DPPH[•] temizleme potansiyelleri belirlendi. Absorbanstaki azalma, numunelerin DPPH[•] süpürme yeteneğini gösterir.

N,N'-dimetil-p-fenilendiamin dihidroklorür (DMPD⁺⁺) deradikalizasyon aktivitesi

MECT ve WECT'in DMPD radikal yakalama aktivitesinin belirlenmesi, Fogliona ve ark. tarafından geliştirilen yöntemle göre yapıldı (Fogliano ve ark., 1999). Örneklerin 15-45 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarına 0.1 M fosfat tampon, (pH 5.3), 0.05 M FeCl_3 ve DMPD⁺⁺ solüsyonu eklendi. Bir saatlik inkübasyonun ardından 505 nm'de absorbanslar kaydedildi.

Azino-bis (3-etilbenzo-tiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS^{•+}) radikal süpürme aktivitesi

MECT ve WECT'in ABTS radikal yakalama aktivitesi, Re ve ark. tarafından geliştirilen yöntemle göre belirlendi (Re ve ark., 1999). Bu teste göre ilk olarak ABTS^{•+} radikalleri oluşturulmuştur. Bunun

için 7.0 mM ABTS ve 2.45 mM $K_2S_2O_8$ reaksiyona sokuldu. Oluşan $ABTS^{++}$ radikallerini içeren solüsyonun absorbands değeri, spektrofotometrede 734 nm'de 0.1 M tamponla (pH 7.4,) 0.750 ± 0.025 'e ayarlandı. Ayarlanan $ABTS^{++}$ çözeltisine 15-45 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarındaki *Thymus Cephalaria* ekstreleri çözeltisi ve yarım saat inkubasyondan sonra, tüm numuneler 734 nm'de absorbandsları ölçüldü. Absorbandtaki azalma, örneklerin $ABTS^{++}$ radikal temizleme kabiliyetini göstermektedir.

Total fenolik bileşiklerin miktarının belirlenmesi

MECT ve WECT'deki toplam fenolik bileşik miktarı Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile belirlendi (Singleton ve ark., 1999). *Cephalaria* ekstresine Folin-Ciocalteu reaktifi, %1'lik karbonat ilave edildi ve karıştırıldı. Karışım, oda sıcaklığında karanlıkta 2 saat inkübe edildi ve 760 nm'de absorbandsı ölçülmüştür. Bir gram *Cephalaria* ekstraktındaki fenol miktarı, mg gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak hesaplandı.

Total flavonoit miktarının belirlenmesi

MECT ve WECT'in toplam flavonoit içeriği, %10 $AlCl_3$ ve 1.0 M potasyum asetatın ekstrelerdeki flavonoitlerle olan renk reaksiyonu ile belirlenmiştir (Kiziltas ve ark., 2021). *Cephalaria* ekstraktlarındaki toplam flavonoit içerik, %10 $AlCl_3$ ve 1.0 M potasyum asetatın ekstrelerdeki flavonoitlerle olan renk reaksiyonu ile 415 nm'de spektrofotometrik ölçüme dayanan bir metodla tespit edilmiştir. Bitki ekstrelerinin toplam flavonoit miktarı mg guercetin eşdeğeri (KE)/mg olarak hesaplandı.

In vitro enzim inhibisyon çalışmaları

Asetilkolinesteraz inhibisyon etkisi

MECT ve WECT'in AChE enzimi (*Electrophorus electricus* kaynaklı) üzerindeki inhibisyon etkisini incelemek için Ellman metodu kullanılmıştır (Ellman ve ark., 1961). Bu çalışmada ekstrelerle 1 M Tris/HCl tamponu (pH 8.0), 0.5 mM 5.5'-ditiobis (2-nitrobenzoik asit), 5.32×10^{-3} EU AChE solüsyonu, ve 1 μmol asetilkolin iyodat (substrat) karıştırıldı. Reaksiyonun oluşması için oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi ve 412 nm'de absorbandsı ölçülmüştür.

α -Glikozidaz inhibisyon etkisi

MECT ve WECT'in α -glikozidaz enzim üzerindeki inhibisyon etkisi Karageçili ve ark.'nın metoduna göre gerçekleştirildi (Karageçili ve ark., 2023). Çalışmada farklı miktarlardaki bitki ekstreleri, 0.15 U/mL α -glikozidaz (Sigma-Aldrich) solüsyonu, ve tampon (pH 7.4) ile karıştırıldı. Daha sonra 35°C'de reaksiyonun başlaması için substrat olarak kullanılan 5 mM p-NPG (p-Nitrofenil-D-glukopiranosid) eklendi ve 3 dakika inkübe edildi. Absorbandslar 405 nm'de izlendi.

Karbonik Anhidraz II inhibisyon etkisi

MECT ve WECT'in karbonik anhidraz II enzime karşı inhibisyon etkisi Topal ve ark. (2014) tarafından geliştirilen metoda göre yapılmıştır. Karbonik anhidraz II izozimi, Sepharose-4B-Tirozin-sülfanimit afinite kolon kromatografisi kullanılarak insan eritrositlerinden saflaştırılmıştır. Eritrositler santrifüj ile çöktürülmüş, serumu ayrılmış ve katı Tris ile pH 8.7'ye ayarlanmıştır. Daha sonra bu numune afinite kromatografisi kolonuna yüklenmiş ve Tris- Na_2SO_4 /HCl (pH 8.7, 22 mM/25 mM) ile dengelenmiştir. Karbonik anhidraz II, sodyum asetat/ $NaClO_4$ (0.5 M, pH 5.6, 25°C) ile yıkanmıştır. Saflaştırma çalışması sırasında protein miktarı Bradford yöntemiyle belirlenmiştir. Standart protein olarak sığır serum albümini kullanılmıştır. Karbonik anhidraz II saflığı, SDS-PAGE tarafından kontrol

edilmiştir. Karbonik anhidraz II'nin saflaştırma ve inhibisyon işlemi sırasında, 348 nm'de absorbans değişimi takip edilerek esterase etkileri gerçekleştirilmiştir (Topal ve Gulcin, 2014).

BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmamızda yer alan MECT ve WECT ekstrelerinde yer alan fenolik maddeler Çizelge 1'de verilmiştir. MECT ve WECT'te tanımlanan fenolik bileşiklerin UPLC-MS/MS yöntemi ile kantitatif analizi, her analit için farklı derişim seviyelerinde oluşturulan kalibrasyon eğrileri kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, MECT'te en yüksek miktardan en düşük miktara doğru sıralandıklarında, kinik asit 39.844 µg/mL, klorojenik asit 38.412 µg/mL, fumarik asit 0.301 µg/mL, rosmarinik asit 0.209 µg/mL, gallik asit 0.204 µg/mL, kafeik asit 0.197 µg/mL, ferulik asit 0.044 µg/mL, viteksin 0.011 µg/mL; WECT'te klorojenik asit 13.639 µg/mL, kinik asit 11.004 µg/mL, siyanidin-3-O-glukozit 0.778 µg/mL, kerasiyanin klorit 0.374 µg/mL rosmarinik asit 0.135 µg/mL, peonidin-3-O-glukozit 0.001 µg/mL, apigenin 0.0001 µg/mL olduğu belirlenmiştir. Ekstrelerde yer alan fenolik maddelerin kromatogramları UPLC-MS/MS'den yararlanılarak Şekil 1'de gösterilmiştir. MECT ve WECT ekstrelerinde farklı içerikte ve farklı miktarlarda fenolik bileşenlerin olması metanol ve su ekstrelerinin farklı polaritelere sahip olmasından kaynaklanmaktadır.

Yaptığımız bu çalışma ile ilk kez *Cephalaria tchihatchewii* methanol ve su ekstrelerinde UPLC-MS/MS analizi yapılmıştır. Farklı bir çalışmada ise *n*-BUOH ekstresi çalışılmış farklı içerikler tespit edilmiştir. Sarıkahya ve ark. (2019) tarafından yapılan bu çalışmada majör olarak hesperidin, siyanidin-3-O-glukozit, hiperozit, kersetin, luteolin, luteolin-7-O-glukozit, salisilik asit, jinsojenik asit ve kafeik asit gibi fenolik bileşikler içerdiği bildirilmektedir. (Sarıkahya ve ark., 2019) Van bölgesinden toplanan bitkinin fenolik bileşenleri yetiştiği yöre, iklim, toprak koşulları gibi faktörler sebebiyle farklı içeriklere sahip olduğu görülmektedir (Güven ve ark., 2021).

Çizelge 1. *Cephalaria tchihatchewii* ekstrelerindeki fenolik bileşiklerin UPLC-MS/MS ile kantitatif analizi sonuçları

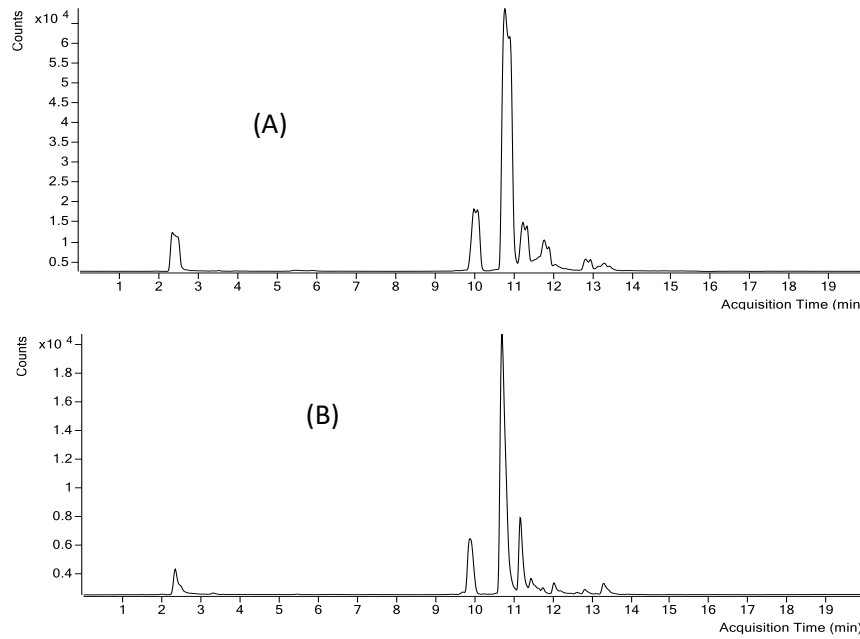
No	Analytes	AZ ^a	S.I. (m/z) ^b	F.I. (m/z) ^c	Ion. mode	MECT (µg/mL)	WECT (µg/mL)
1	Kinik asit	2.361	190.9	85.0	Neg	39.844	11.004
2	Fumarik asit	4.133	114.9	71.1	Neg	0.301	T.E.
3	Gallik asit	5.465	168.9	79.0	Neg	0.204	T.E.
4	Pirogallol	6.657	124.9	96.6	Neg	T.E.	T.E.
5	Klorojenik asit	10.707	352.9	190.9	Neg	38.412	13.639
6	Peonidin-3-O-glukozit	10.923	460.9	298.8	Neg	T.E.	0.001
8	Kateşin	10.986	289.1	244.9	Neg	T.E.	T.E.
7	4-OH-Benzoik asit	11.457	137.0	93.1	Neg	T.E.	T.E.
10	Kafeik asit	11.470	178.8	134.8	Neg	0.197	T.E.
9	Epigallokateşin gallat	11.532	456.8	304.9	Neg	T.E.	T.E.
12	Kerasiyanin klorit	11.546	592.8	284.7	Neg	T.E.	0.374
19	Hesperidin	11.560	609.	300.9	Neg	T.E.	T.E.
16	Epikateşin	11.595	289.0	244.9	Neg	T.E.	T.E.
15	Viteksin	11.663	430.9	310.9	Neg	0.011	T.E.
17	Naringin	11.894	579.0	270.8	Neg	T.E.	T.E.
11	Siyanidin-3-O-glucoside	12.040	447.1	283.8	Neg	T.E.	0.778
18	Ellajik asit	12.203	300.8	283.4	Neg	T.E.	T.E.
14	Şiringik asit	12.266	169.9	122.8	Neg	T.E.	T.E.
26	Mircetin	12.318	316.9	150.9	Neg	T.E.	T.E.
22	p-Kumarik asit	12.341	163.0	118.9	Neg	T.E.	T.E.
13	Vanilik asit	12.384	166.9	151.9	Neg	T.E.	T.E.
25	Taksifolin	12.435	302.9	124.7	Neg	T.E.	T.E.
24	Rosmarinik asit	12.462	358.8	160.8	Neg	0.209	0.135
21	Ferulik asit	12.469	193.0	134.0	Neg	0.044	T.E.
20	Sinapik asit	12.556	222.8	163.9	Neg	T.E.	T.E.
23	Vanilin	12.617	151.0	135.8	Neg	T.E.	T.E.
27	Resveratrol	13.121	226.8	184.8	Neg	T.E.	T.E.
28	Luteolin	13.307	284.9	132.9	Neg	T.E.	T.E.
29	Kersetin	13.392	300.9	150.7	Neg	T.E.	T.E.

***Cephalaria tchihatchewii* Boiss. Ekstrelerinin Antioksidan Aktivitesi, Metabolik Enzimler Üzerine Etkisi ve UPLC-MS/MS Analizi ile Kimyasal Karakterizasyonun Belirlenmesi**

Çizelge 1. *Cephalaria tchihatchewii* ekstrelerindeki fenolik bileşiklerin UPLC-MS/MS ile kantitatif analizi sonuçları (Devamı)

No	Analytes	AZa	S.I. (m/z) ^b	F.I. (m/z) ^c	Ion. mode	MECT (µg/mL)	WECT (µg/mL)
31	Naringenin	13.960	270.9	150.8	Neg	T.E.	T.E.
30	Apigenin	13.975	268.9	224.8	Neg	T.E.	0.0001
32	Izoramnetin	14.160	314.9	299.8	Neg	T.E.	T.E.
33	Krisin	15.514	252.8	208.8	Neg	T.E.	T.E.
34	Galangin	15.585	268.9	168.8	Neg	T.E.	T.E.
35	Kurkumin	15.623	366.9	148.9	Neg	T.E.	T.E.

^aA.Z.: Alıkonma zamanı. ^bS.I. (m/z): Standart analitlerin moleküler iyonları (m/z). ^cF.I. (m/z): Fragment iyonlar, ^dT.E.: Tespit edilemedi



Şekil 1. MECT (A), WECT (B)'nin çoklu reaksiyon izleme kromatogramı

Cephalaria türünün metanol ve su ekstrelerinin 6 farklı metotla antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiş ve genel olarak en yüksek aktivite metanol ekstrelerinde (MECT) görülmüştür. Ayrıca hem Folin metoduyla hem de UPLC-MS/MS metoduyla fenolik madde miktarları incelenmiş ve en yüksek fenolik maddenin antioksidan aktiviteki gibi MECT’de görülmüştür. Daha önceki çalışmalarda olduğu gibi fenolik madde miktarıyla antioksidan aktivite paraleldir. Alzheimer, glokom, diyabet gibi nörodejeneratif ve metabolik hastalıklar oksidatif hasarla bağlantılıdır (Izzotti ve ark., 2006; Rochette ve ark., 2014; Sezer Senol ve ark., 2016).

Herhangi bir antioksidan testi, bir bitki ekstresinin "toplam antioksidan kapasitesini" tam olarak yansıtamaz. Kapsamlı bir antioksidan testi yapmak istiyorsak, farklı mekanizmalarla (hidrojen/elektron transferi), hem lipofilik hem de hidrofilik bileşiklerin aktivitesi gösterilmelidir. Bu nedenle, bir bitki ekstresinin toplam antioksidan kapasitesini ortaya çıkarmak için farklı antioksidan yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır (Gulcin, 2020; Zengin ve ark., 2019).

Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kapasitesi deneyinde, reaksiyon karışımının absorbandsındaki artış, kompleks oluşumunu gösterir. Oluşan bu kompleks de indirgeme kapasitesindeki artışa işaret eder.(I. Gulcin, 2009) Antioksidan olarak kullanılan etanol içinde çözünmüş MECT ve WECT numunelerinin indirgeme gücünden dolayı numune içeren çözeltinin sarı rengi yeşil ve mavi tonuna dönüşmüştür (Gülçin ve ark., 2010). Bitki ekstrelerinin indirgeme kapasitesi konstrasyon artışına bağlı olarak artmıştır. Ekstrelerin ve standart antioksidanların (BHT (Bütil hidroksi toluen), BHA (Bütil hidroksi anisol), troloks ve α - tokoferol) indirgeme potansiyeli 15, 30, 45 µg/mL konsantrasyonlarında 700 nm’de olan absorbands değerleri ölçülerek belirlenmiştir.

30 µg/mL’de BHT (λ_{700} :2.018)> α -tokoferol (λ_{700} :1.895)> Troloks (λ_{700} :1.545)> BHA (λ_{700} :1.257)> WECT (λ_{700} :0.680)> MECT (λ_{700} :0.377) şeklinde bir sıralamaya sahip olduğu görülmüştür. (Şekil 2. Çizelge 2.)

KUPRAK metodu, antioksidan bileşik etkisi ile Cu^{2+} ’nın Cu^{+} ’a indirgenmesine veya polifenoller tarafından neokuprin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) varlığında sulu etanolik ortamda (pH 7.0) indirgemeye dayanır. 450 nm’de olan maksimum absorpsiyon pikine sahip olan bir Cu^{+} kompleksi verir (Gülçin, 2008).

Cephalaria ekstreleri Cu^{2+} iyonları indirgeme kapasitesi, artan konsantrasyon ile orantılı olarak absorbands vermiştir. Çalışmış olduğumuz ekstrelerin kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesi farklı konsantrasyonda (15-45 µg/mL) çözeltilerinin 450 nm’de absorbandsları ölçülmüştür. 30 µg/mL’de absorbandslar kıyaslandığında BHT (λ_{450} :2.912)> Troloks (λ_{450} :2.323)> BHA (λ_{450} :1.800)> α -tokoferol (λ_{450} :1.139)> MECT (λ_{450} :0.458)> WECT (λ_{450} :0.333) şeklinde bir sıralamaya sahip olduğu görülmüştür. (Şekil 2. Çizelge 2.)

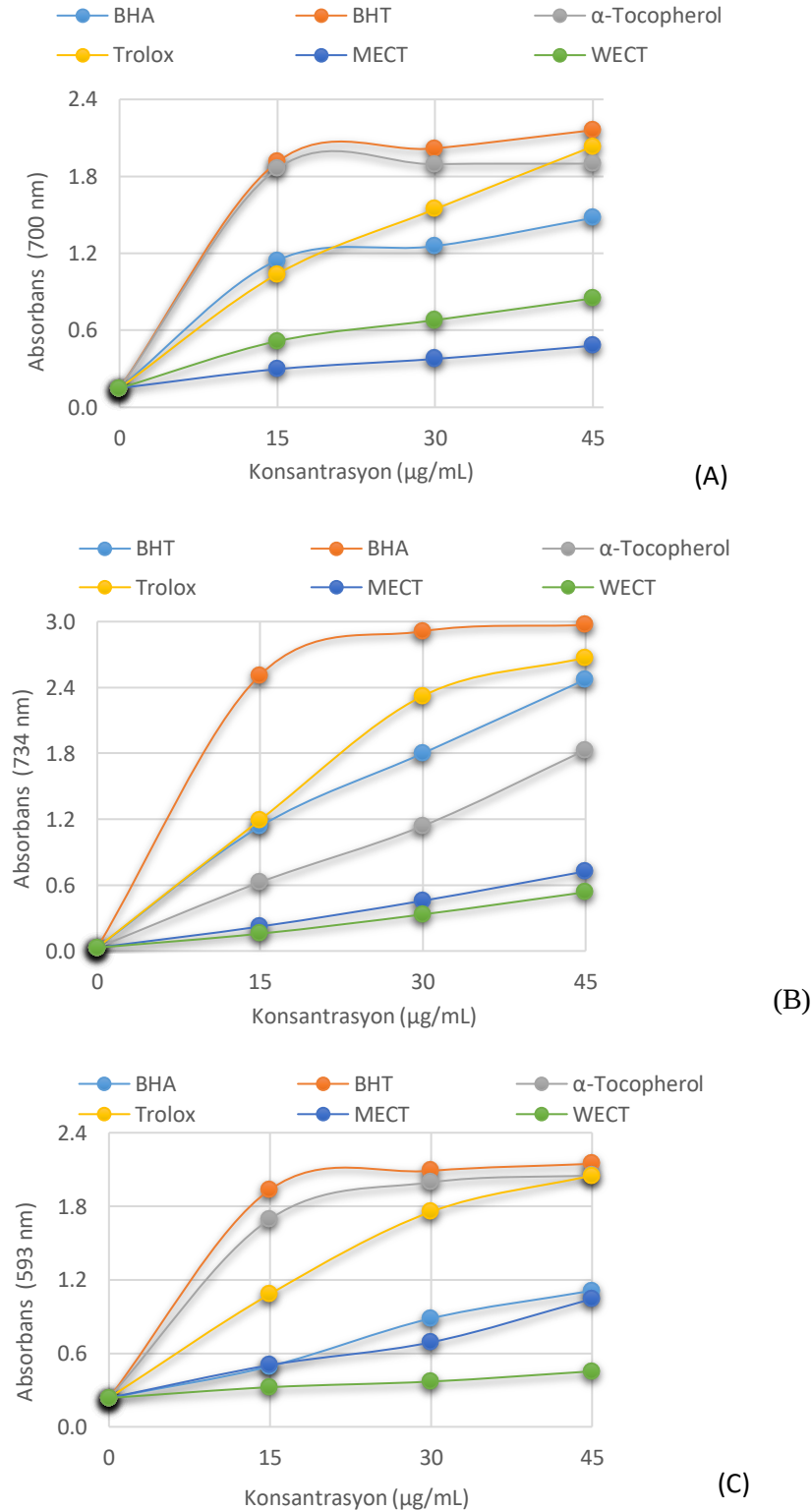
Türkiye’nin farklı bölgelerinden elde edilen *C. davisiana*, *C. elazigensis*, *C. paphlagonica* ve *C. stellipilis*’in n -hekzan ekstrelerinin KUPRAK analizi ile antioksidan kapasitelerinin belirlendiği çalışmada, antioksidan kapasitelerinin sırasıyla 0.334, 0.252, 0.136 ve 0.120 mmol Troloks/g kuru ekstre olduğu bildirilmiştir (Kırmızıgül ve ark., 2012).

FRAP testi, asidik ortamda antioksidanlar tarafından ferrik iyonlarının (Fe^{3+}) ligand kompleksinin, yoğun mavi renkli ferröz iyonları (Fe^{2+}) kompleksine indirgenmesini ölçen tipik bir elektron transfer bazlı yöntemdir. Başka bir deyişle, bu yöntem, antioksidan bileşiklerin asidik ortamda ferrik kompleksini ($[\text{Fe}^{3+}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$), yoğun mavi renkli ferröz komplekse ($[\text{Fe}^{2+}-(\text{TPTZ})_2]^{2+}$) indirgemesine dayanmaktadır. Spektrofotometre aracılığıyla 593 nm’de artan absorpsiyon ile bu indirgeme ölçülmektedir (Gulcin, 2020).

Cephalaria ekstrelerinin ferrik iyonlarının (Fe^{3+}) ligand kompleksinin ferröz iyonları (Fe^{2+}) kompleksine indirgenme kapasitesi artan konsantrasyon ile doğru orantılı şekilde artmıştır. Ayrıca çalışılan ekstrelerin ve standart antioksidanların indirgeme kapasitesi 30 µg/mL’de absorbandslarla karşılaştırıldığında BHT (λ_{593} :2.089)> α -tokoferol (λ_{593} :1.995)> troloks (λ_{593} :1.755)> BHA (λ_{593} :0.884)> MECT (λ_{593} :0.690)> WECT (λ_{593} :0.369) şeklinde bir sıralamaya sahip olduğu görülmüştür. (Şekil 2. Çizelge 2.)

Çizelge 2. *Cephalaria* ekstrelerinin ve standartların 30 µg/mL konsantrasyonda Fe^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} -TPTZ iyonlarını indirgeme yetenekleri.

Antioksidanlar	Fe^{3+} indirgeme		Cu^{2+} indirgeme (KUPRAK)		Fe^{3+} -TPTZ indirgeme (FRAP)	
	λ (700 nm)	r^2	λ (450 nm)	r^2	λ (593 nm)	r^2
BHA	1.257	0.9523	1.800	0.9742	0.884	0.9899
BHT	2.018	0.9466	2.912	0.9969	2.089	0.9581
α -Tokoferol	1.895	0.9402	1.139	0.9967	1.995	0.9807
Troloks	1.545	0.9966	2.323	0.9980	1.755	0.9990
MECT	0.377	0.9928	0.458	0.9947	0.690	0.9910
WECT	0.680	0.9920	0.333	0.9900	0.369	0.9872



Şekil 2. *Cephalaria* ekstrelerinin **A.** Fe³⁺ indirgeme, **B.** Cu²⁺ indirgeme and **C.** Fe³⁺-TPTZ indirgeme kabiliyetleri

DPPH radikal giderme yöntemi, antioksidan aktiviteyi ölçmek ve enzimatik olmayan antioksidanların radikal giderme aktivitesini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan basit, kolay, ekonomik ve hızlı bir deneydir. 517 nm'de maksimum absorbans göstermektedir. DPPH radikali, koyu mor renk taşıyan kararlı organik nitrojen radikallerinden biridir. Ticari olarak mevcuttur ve ABTS⁺ gibi testten önce üretilmesi gerekmemektedir. Yaygın olarak kullanılan renk giderme tahlili ilk olarak Blois tarafından rapor edilmiştir (Blois, 1958). DPPH radikal çözeltisi, hidrojen atomu verebilen bir

antioksidan molekül ile karıştırıldığında, menekşe rengi kaybolarak indirgenmektedir (Alam ve ark., 2013).

Cephalaria ekstrelerinin ve çeşitli standart antioksidanların (BHT, BHA, Troloks ve α -tokoferol) DPPH radikali giderme aktivite tayini çalışmasında standart grafiği oluşturulmuştur. (Şekil 5) *Cephalaria* ekstrelerinin DPPH radikali giderme aktivitesi konsantrasyon ile doğru orantılı bir şekilde artmaktadır. Grafiğe göre, ekstreler ve sentetik antioksidanlar için IC_{50} değerleri hesaplanmış ve karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucu DPPH' serbest radikal giderme aktivitesinin Troloks (IC_{50} : 5.92 μ g/mL) < BHA (IC_{50} : 9.0 μ g/mL) < α -tokoferol (IC_{50} : 9.63 μ g/mL) < BHT (IC_{50} : 21.0 μ g/mL) < MECT (IC_{50} : 34.66 μ g/mL) < WECT (IC_{50} : 57.76 μ g/mL) şeklinde olduğu tespit edilmiştir. (Şekil 3, Çizelge 3)

Cephalaria türleri antioksidan aktivitesi yüksek olan türlerdir. Yapılan bir çalışmada *C. syrica* türünde DPPH radikal süpürücü etki testinde neticesinde % 47 oranında inhibisyon gösterdiği bildirilmiştir (Rahimi ve ark., 2019).

On *Cephalaria* türünün (*C. anatolica*, *C. aristata*, *C. aytachii*, *C. elazigensis* var. *elazigensis*, *C. hirsuta*, *C. taurica*, *C. tuteliana*, *C. procera*, *C. speciosa*, *C. tchihatchewii*) heksan ekstrelerinin araştırıldığı bir çalışmada DPPH radikal temizleme ve KUPRAK yöntemlerini kullanarak antioksidan kapasiteleri açısından değerlendirilmiştir. DPPH testinde *C. tchihatchewii*, *C. hirsuta*, *C. anatolica*, *C. elazigensis* var. *elazigensis* ve *C. speciosa*'nın hekzan ekstrelerinin sırasıyla 3.77, 5.13, 5.20, 5.28 ve 6.17 mg/mL IC_{50} değerleriyle önemli radikal temizleme aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. CUPRAC testinde ekstreler içinde *C. aristate*'nin en yüksek TEAC değerine (1.005 mmol TE/g ekstre) sahip olduğu ve indirgeme gücünün fenolik içerikle (2.91 mg GAE/g ekstre) ilişkili olduğu bildirilmiştir (Sarıkahya ve ark., 2015).

DMPD radikal katyonu, potasyum persülfat ($K_2S_2O_8$) ve demir klorür ($FeCl_3$) ile oksidasyon yoluyla oluşturulabilen kararsız bir türdür. Ferrik iyonların (Fe^{3+}) varlığında, *N,N*- dimetil -*p*-fenilendiamin dihidroklorür (DMPD), renkli DMPD radikal katyonuna ($DMPD^{+}$) dönüştürülür. Test numunelerinde bulunan antioksidan moleküller, DMPD radikallerini kolayca temizleyerek $DMPD^{+}$ testinin prensibini oluşturur. ABTS testi ile karşılaştırıldığında bu yöntemin daha basit, daha hızlı ve daha ucuz olduğu bildirilmiştir. Bir oksidan veya asidik pH varlığında, DMPD, stabil ve renkli bir DMPD radikal katyonuna ($DMPD^{+}$) dönüştürülür. Bir hidrojen atomunu (veya bir elektronu) $DMPD^{+}$ 'ye aktarabilen antioksidan moleküller çözeltinin hızlı renk bozulmasına neden olmaktadır ve 505 nm'de bir absorbans düşüşü ile ölçülmektedir. Bununla birlikte, DMPD'nin sadece suda çözünür olması ve hidrofobik antioksidanlarla kullanılamaması bir dezavantajdır (Gulcin, 2020).

Ekstrelerin, DMPD radikal giderme aktivitesi derişimin artması ile doğru orantılı olarak artmıştır. Bu karşılaştırma sonucu [$DMPD^{+}$] serbest radikal giderme aktivitesinin Troloks (IC_{50} : 14.38 μ g/mL) < BHA (IC_{50} : 31.43 μ g/mL) < MECT (IC_{50} : 53.32 μ g/mL) < WECT (IC_{50} : 57.76 μ g/mL) şeklinde olduğu tespit edilmiştir. (Şekil 3, Çizelge 3)

ABTS, oksidanlar tarafından koyu renkli $ABTS^{+}$ radikal katyonuna oksitlenir. Antioksidan kapasite, numunenin ABTS radikali ile doğrudan reaksiyona girerek, renginin açılmasını sağlamaktadır. $ABTS^{+}$ hem yağda çözünen hem de suda çözünen bileşikler için uygundur. (I. Gulcin, 2009)

$ABTS^{+}$ ile reaksiyon oldukça hızlıdır ve 0.25-0.5 dakikada tamamlanmaktadır. Mavi-yeşil renkli $ABTS^{+}$ radikal katyonu çözeltisine numune içeren antioksidan ajanların konmasıyla rengi daha açık hale gelmektedir. Önceden oluşturulmuş radikalin serbest radikal süpürücülerle reaksiyonu, 734 nm'de numune absorbansının takip edilmesiyle kolayca görselleştirilmektedir (Gülçin ve ark., 2009).

ABTS⁺ radikali giderme aktivitesi sonuçlarına göre ekstrelerin ABTS⁺ radikali giderme aktivitesi konsantrasyon artışına bağlı olarak artmıştır. Ekste ve standart antioksidanlar için IC₅₀ değerleri hesaplanmış ve karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucu ABTS⁺ serbest radikal giderme aktivitesinin Troloks (IC₅₀: 7.71 µg/mL) = BHA (IC₅₀: 7.71 µg/mL) = BHT (IC₅₀: 7.71 µg/mL) < TCEO (IC₅₀: 7.75 µg/mL) < α-tokoferol (IC₅₀: 8.10 µg/mL) < WECT (IC₅₀: 17.33 µg/mL) < MECT (IC₅₀: 20.39 µg/mL) şeklinde olduğu bulunmuştur. (Şekil 3, Çizelge 3)

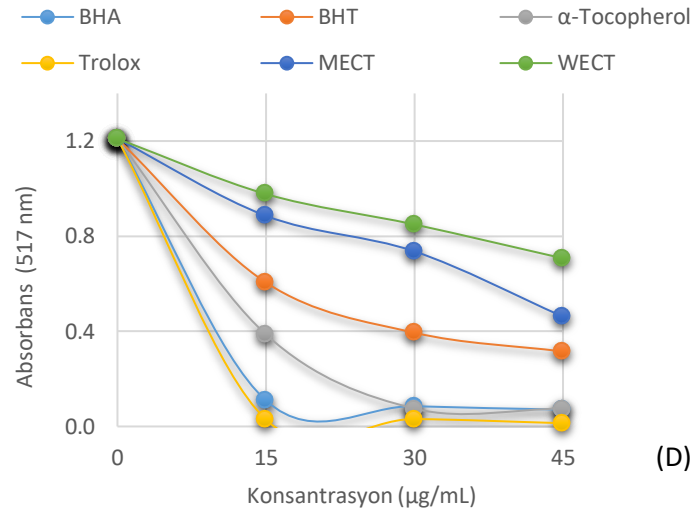
Cephalaria ekstrelerinin toplam fenolik bileşik madde miktarını tespit etmek için standart fenolik bileşik olarak gallik asit kullanılmıştır. Elde edilen standart grafik yardımıyla denklem elde edilmiştir ($y = 0.002x$, $r^2: 0.9917$). Elde edilen denklem ile ekstrelerin toplam fenolik bileşik miktarı, gallik asit eşdeğeri (GAE) alınarak hesaplanmıştır. MECT ve WECT sırasıyla 760 nm'de 0.094, ve 0.092 değerinde absorbans vermiştir. Bu da 47.00 µg, ve 46.00 µg/mg gallik asit eşdeğeri (GAE) fenolik madde içerdiğini göstermektedir.

On *cephalaria* türünün fenolik içeriğine bakıldığı çalışmada *C. tchihatchewii* (3.04 mg GAE/g ekstre), *C. aristata* (2.91 mg GAE/g ekstre) ve *C. speciosa*'nın (2.66 mg GAE/g ekstre) en yüksek fenolik içeriğe sahip olduğu bildirilmiştir (Sarıkahya ve ark., 2015). Türlerin farklı bölgelerden toplanmasıyla fenolik içerikleri değişebilmektedir (Guven ve ark., 2021).

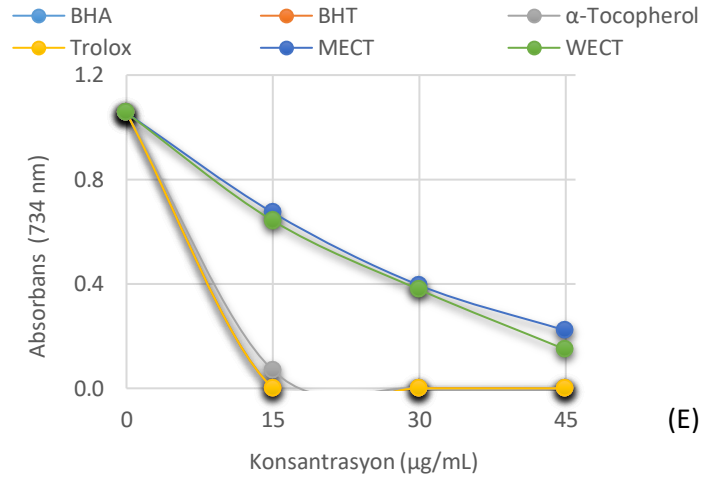
Cephalaria ekstrelerindeki flavanoit bileşiklerinin toplam miktarını belirlemek için standart flavanoit olarak kersetin kullanıldı. Elde edilen standart eğri kullanılarak denklem oluşturuldu ($y = 0.0061x$, $r^2: 0.9980$). Elde edilen denklem kullanılarak ekstrelerdeki toplam flavanoit bileşik miktarları kersetin eşdeğeri (KE) olarak hesaplandı. MECT (0.372), WECT (0.301) sırasıyla 415 nm'de absorbans değerleri vererek flavanoit maddelerin MECT (60.98 µg/mg KE) ve WECT (49.34 µg/mg KE) kersetin eşdeğerleri içerdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 3. *Cephalaria* ekstrelerinin ve standart antioksidanlar için DPPH[•], ABTS^{•+} ve DMPD^{•+} IC₅₀ (µg/mL) süpürücü değerleri

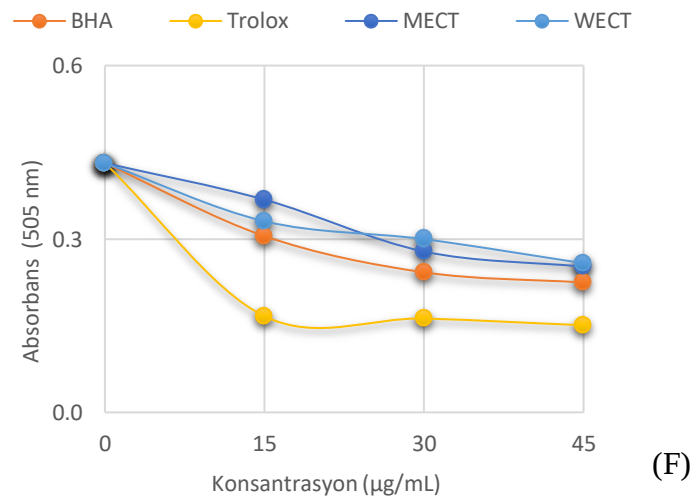
Antioksidanlar	DPPH [•] süpürme		ABTS ^{•+} süpürme		DMPD ^{•+} süpürme	
	IC ₅₀	r ²	IC ₅₀	r ²	IC ₅₀	r ²
BHA	9.00	0.9399	7.71	0.9330	43.32	0.9993
BHT	21.00	0.9668	7.71	0.9330	-	-
α-Tokoferol	5.92	0.9770	8.10	0.9550	-	-
Troloks	9.63	0.9947	7.71	0.9330	23.90	0.9349
MECT	34.66	0.9844	20.39	0.9969	53.32	0.9801
WECT	57.76	0.9935	17.33	0.9985	57.76	0.9800



(D)



(E)



(F)

Şekil 3. *Cephalaria* ekstrelerinin ve standartların radikal süpürücü etkileri. D. DPPH• süpürücü yetenek, E. ABTS•+ süpürücü yetenek, F. DMPD•+ süpürücü yetenek

Yaptığımız çalışmada genellikle metanol ekstresi su ekstresine göre daha etkin çıkmıştır. Ekstreler tahlil edilen standart maddelere göre yakın antioksidan etkilere sahiptir. Bu da yan etkileri nedeniyle tercih edilmeyen sentetik antioksidanların yerine alternatif olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

C. elazigensis var. *purpurea* toprak üstü kısmının antioksidan etkileri incelendiğinde DPPH süpürücü aktivitesinin 125.6 µmol/mg α-tokoferol eşdeğeri kuru ekstre, ABTS süpürücü aktivitesinin 34.09 µmol/mg α-tokoferol eşdeğeri kuru ekstre, FRAP indirgeme kuvvetinin 123.4 µmol/mg α-tokoferol eşdeğeri kuru ekstre olduğu bildirilmektedir. Çalışmada farklı parametreler üzerinden antioksidan aktivite belirtildiği için karşılaştırmada güçlük yaşanabilmektedir. Ayrıca çalışmada metanol ekstresinin AChE inhibisyon etkisinin IC₅₀ değerinin 10.54 mg/mL olduğu görülmektedir.(Erdogan ve ark., 2023) Bizim çalışmamızda ise bu IC₅₀ değeri 44.15 µg/mL ve 36.75µg/mL'dir. Buna göre MECT ve WECT ekstrelerinin daha etkili olduğu görülmektedir.

C. gigantea ve *C. uralensis* ekstrelerinin antioksidan etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada *in vitro* olarak DPPH[•], ABTS^{•+} ve metal şelatlama analizleri kullanılarak değerlendirilmiştir. *C. uralensis*'in toprak üstü kısımlarında daha yüksek DPPH radikal temizleme aktivitesi bulunmuştur (IC₅₀=2.86 mg/mL). *C. uralensis* çiçeklerinden elde edilen ekstrenin ise, ABTS^{•+}'de (IC₅₀=0.45 mg/mL) en yüksek serbest radikal temizleme etkisini göstermiştir (Chrząszcz ve ark., 2020b).

Yapılan farklı bir çalışmada *C. giganteae* yapraklarının metanol ve su ekstrelerinin sırasıyla total fenolik miktarının 198.1 mg/g, 227.2 mg/g, total flavanoit miktarının 269.6 mg/g ve 310.8 mg/g olduğu görülmektedir. *C. giganteae* yapraklarının metanol ve su ekstrelerinin sırasıyla DPPH süpürücü etkileri (IC₅₀ 6.3, 0.6 µg/mL), ABTS süpürücü etkileri (IC₅₀ 4.4, 2.8 µg/mL) ve Fe indirgeme kuvvetlerinin (IC₅₀ 3.7, 2.8 µg/mL), *C. tchihatchewii* türüne göre farklı etki gösterdiği görülmüştür. Ayrıca bitkinin antidiyabetik potansiyeli değerlendirildiği çalışmada α-amilaz ve α-glikozidaz enzimlerinin inhibisyon miktarına göre aktivite testi yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda türün köklerinden elde edilen sulu ekstrenin ve yapraklarından elde edilen etanol ekstresinin, sırasıyla α-amilaz ve α-glukozidaza karşı güçlü inhibisyon etki gösterdiği bildirilmiştir (Mbhele ve ark., 2015).

Doygun substrat konsantrasyonunda AChE enzimi için standart inhibitörü olan takrin ve *Cephalaria* ekstrelerinin inhibisyon etkisine bakılmıştır ve grafikleri çizilmiştir. Grafikten yararlanılarak MECT IC₅₀ değeri 44.15 µg/mL (r²=0.9960); WECT IC₅₀ değeri 36.75 µg/mL (r²=0.9906), takrinin IC₅₀ değeri ise 0.0246 µg/mL (r²=0.9706) olarak hesaplanmıştır. (Çizelge 4)

Cephalaria procera ekstrelerinin fenolik içerikleri ve antioksidan aktivite ve kolinesteraz enzim inhibisyon etkisinin incelendiği bir çalışmada suyun fenolik içeriği en yüksek olup 79.64 GAE/mg kuru ekstre'dir, metanol ekstresi ise en yüksek toplam flavonoit içeriğe 15.33 mg KE/g kuru ekstre sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca metanol ekstresi 83.21 µg/mL IC₅₀ değeriyle en yüksek radikal temizleme aktivitesi göstermiştir. Kolinesteraz enzim inhibisyon deneyinde ise su ekstresi, sırasıyla 134.63 µg/mL ve 62.76 µg/mL IC₅₀ değerleriyle en yüksek AChE ve BuChE inhibitör etkisini göstermiştir (Burak ve ark., 2021).

Enzim inhibisyon etkileri incelendiğinde incelediğimiz ekstrelerin genel olarak standartlardan daha düşük bir inhibe edici etkisi olduğu görülmektedir. Metanol ekstresi AChE ve α-glikozidaz enzimlerinde daha iyi inhibisyon etkisi göstermiştir. Ancak farklı olarak su ekstresi (WECT) CA II'yi daha iyi şekilde inhibe etmiştir. En iyi antioksidan kapasiteye sahip ekstre ile en iyi enzim inhibisyon etki sahip ekstrenin birbirinden farklı olması non-fenolik sekonder metabolitler ile ilişkili olabilir (Saleem ve ark., 2020).

Çizelge 4. *Cephalaria* ekstrelerinin karbonik anhidraz II (CA II), α -glikozidaz (α -Gly), asetilkolinesteraz (AChE) enzimlerine karşı inhibitör etki değerleri

Numuneler	IC ₅₀					
	CA II	r ²	AChE	r ²	α -Gly	r ²
MECT(μ g/mL)	27.75	0.9362	21.82	0.9960	28.98	0.9958
WECT(μ g/mL)	13.72	0.9760	26.52	0.9906	34.16	0.9307
Asetazolamid* (nM)	8.37	0.9825	-	-	-	-
Takrin** (nM)	-	-	5.97	0.9706	-	-
Akarboz*** (nM)	-	-	-	-	22800	0.9922

*Asetazolamid (AZA), CA II inhibisyonu için bir standarttır (Durmaz ve ark., 2022).

**Takrin, AChE enzimi için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Hatice Kiziltas ve ark., 2022).

***Akarboz, α -glikozidaz için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Durmaz ve ark., 2022).

Doygun substrat konsantrasyonunda karbonik anhidraz II için standart inhibitörü olan asetazolamid ve *Cephalaria* ekstrelerinin inhibisyon etkisine bakılmıştır ve grafikleri çizilmiştir. Grafikten yararlanılarak MECT IC₅₀=27.75 μ g/mL (r²=0.9372), WECT IC₅₀= 13.72 μ g/mL (r²=0.9760), asetazolamid IC₅₀=8.37 nM (r²=0.9825) olarak hesaplanmıştır. (Çizelge 4) Bilgimiz dahilinde yapılan literatür taramasında ilk kez bir *Cephalaria* türünün karbonik anhidraz II enzimi inhibisyon etkisi belirlenmiştir.

Doygun substrat konsantrasyonunda α -glikozidaz için *Cephalaria* ekstrelerinin inhibisyon etkisine bakılmıştır ve grafiği çizilmiştir. Grafikten yararlanılarak MECT IC₅₀=28.79 μ g/mL (r²=0.9958), WECT IC₅₀=34.16 μ g/mL (r²=0.9307), akarboz IC₅₀=14.72 nM (r²=0.9922), değeri olarak hesaplanmıştır. (Çizelge 4)

MECT ve WECT'in enzim inhibisyon etkileri standartlarla kıyaslandığında daha düşük etkiler gözlenmiştir. Ancak ilerleyen çalışmalarda izolasyon ile ekstrelerdeki etkin maddelerin yeniden enzim inhibisyon etkileri incelenerek etkilerin hangi maddelerden kaynaklandığı tespit edilmesi gerekmektedir.

SONUÇ

Bu çalışmada, yerel halk tarafından geleneksel olarak hem ilaç hem de gıda olarak kullanılan *Cephalaria* türünün metanol ve su ekstresi, biyoaktivitesi ve fenolik bileşikleri bakımından değerlendirilmiştir. Bitki ekstrelerinin potansiyel tıbbi kullanımını araştırmak için, altı farklı antioksidan aktivite yöntemi kullanılmıştır ve üç farklı enzim ile inhibisyon kapasitesi belirlenmiştir. Literatür taramamızda, *Cephalaria tchihatchewii* ekstrelerinin antioksidan aktivite ve enzim inhibisyonu ile ilgili kapsamlı bir çalışmanın yapılmadığı tespit edilmiştir. Böylece literatürdeki eksiklik bu çalışma ile giderilecek gibi görünmektedir. Bununla birlikte, gelecekteki çalışmalarda *in vivo* ve hücre kültürü çalışmaları ile desteklenmesi gerekmektedir.

TEŞEKKÜR

Bitkinin teşhis edilmesinde yardımcı olan Prof. Dr. Yusuf Kaya ve deneylerin yürütülmesinde katkı sununa Prof. Dr. İlhami Gülçin'e teşekkür ederim.

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

Ak, T., & Gülçin, İ. (2008). Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-Biological Interactions*, 174(1), 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.05.003>

- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi pharmaceutical journal*, 21(2), 143-152.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Esin Karademir, S., & Erçağ, E. (2006). The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 57(5-6), 292-304. <https://doi.org/10.1080/09637480600798132>
- Arabaci, B., Gulcin, I., & Alwasel, S. (2014). Capsaicin: A Potent Inhibitor of Carbonic Anhydrase Isoenzymes. *Molecules*, 19(7), 10103-10114.
- Atalan, E. (2019). Türkiye’de yetiştirilen pelemir bitkisinin [*Cephalaria syriaca* (L.)] antioksidan, antimikrobiyal, antifungal, antibiyofilm özelliklerinin ve tohum morfolojisinin araştırılması. Bartın Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- Burak, B., Emel, M. K., & Yeter, Y. C. (2021). Total phenolic, total flavonoid contents, and in vitro biological activities of *Cephalaria procera*. *İstanbul Journal of Pharmacy*, 51(3), 365-371.
- Celenk, V. U., Sarikahya, N. B., & Kirmizigul, S. (2020). Isolation and Structural Studies on Saponins from Three *Cephalaria* Species from Anatolia. *Chemistry of Natural Compounds*, 56(1), 180-182.
- Chrzęszcz, M., Miazga-Karska, M., Klimek, K., Granica, S., Tchórzewska, D., Ginalska, G., & Szewczyk, K. (2020a). Extracts from *Cephalaria Uralensis* (Murray) Roem. & Schult. and *Cephalaria Gigantea* (Ledeb.) Bobrov as Potential Agents for Treatment of Acne Vulgaris: Chemical Characterization and In Vitro Biological Evaluation. *Antioxidants*, 9, 796. doi:10.3390/antiox9090796
- Chrzęszcz, M., Miazga-Karska, M., Klimek, K., Granica, S., Tchórzewska, D., Ginalska, G., & Szewczyk, K. (2020b). Extracts from *Cephalaria Uralensis* (Murray) Roem. & Schult. and *Cephalaria Gigantea* (Ledeb.) Bobrov as Potential Agents for Treatment of Acne Vulgaris: Chemical Characterization and In Vitro Biological Evaluation. *Antioxidants*, 9(9), 796.
- Dagli, M., & Sarikahya, N. (2018). Elucidation and characterization of glycosidic compounds from *Cephalaria tuteliana* (dipsacaceae). (master of science thesis), Ege University, Bornova-İZMİR.
- Dagli, M., Sarikahya, N. B., Nalbantsoy, A., & Kirmizigul, S. (2019). Comparative Phytochemical Screening and Cytotoxic Efficacy of Endemic *Cephalaria tuteliana*. *Natural Product Communications*, 14(10), 1934578X19862647.
- Durmaz, L., Kiziltas, H., Guven, L., Karagecili, H., Alwasel, S., & Gulcin, İ. (2022). Antioxidant, Antidiabetic, Anticholinergic, and Antiglaucoma Effects of Magnofluorine. *Molecules*, 27(18), 5902.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Erdogan, M. K., Gundogdu, R., Yapar, Y., Gecibesler, I. H., Kirici, M., Behcet, L., . . . Taslimi, P. (2023). In vitro anticancer, antioxidant and enzyme inhibitory potentials of endemic *Cephalaria elazigensis* var. *purpurea* with in silico studies. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1-13. doi:10.1080/07391102.2022.2163700

- Eruygur, N., Koçyiğit, U. M., Taslimi, P., Ataş, M., Tekin, M., & Gülçin, İ. (2019). Screening the in vitro antioxidant, antimicrobial, anticholinesterase, antidiabetic activities of endemic *Achillea cucullata* (Asteraceae) ethanol extract. *South African Journal of Botany*, 120, 141-145. doi:<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.04.001>
- Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., & Ritieni, A. (1999). Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(3), 1035-1040.
- Göçer, H., & Gülçin, İ. (2011). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): correlation of structure and antioxidant properties. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(8), 821-825. doi:10.3109/09637486.2011.585963
- Göktürk, R. S., & Sümbül, H. (2014). A taxonomic revision of the genus *Cephalaria* (Caprifoliaceae) in Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 38, 927-968. doi:10.3906/bot-1310-6
- Gulcin, I. (2009). Antioxidant activity of L-adrenaline: a structure-activity insight. *chemicobiological interactions*, 179(2), 71-80.
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*, 94(3), 651-715. doi:10.1007/s00204-020-02689-3
- Gulçin, İ., Taslimi, P., Aygün, A., Sadeghian, N., Bastem, E., Kufrevioglu, O. I., . . . Şen, F. (2018). Antidiabetic and antiparasitic potentials: Inhibition effects of some natural antioxidant compounds on α -glycosidase, α -amylase and human glutathione S-transferase enzymes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 741-746. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.001>
- Güven, L., Özgen, U., Secen, H., Sener, S. Ö., Badem, M., Celik, G., & Yayli, N. (2021). Phytochemical studies on the seeds, pseudofruits, and roots of *Rosa pimpinellifolia*. *Journal of Research in Pharmacy*, 25(2), 153-163.
- Gülçin, I. (2008). Measurement of antioxidant ability of melatonin and serotonin by the DMPD and CUPRAC methods as trolox equivalent. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23(6), 871-876. <https://doi.org/10.1080/14756360701626223>
- Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., Taoubi, K., & Köksal, E. (2009). Antioxidant secoiridoits from fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.). *Wood science and technology*, 43(3), 195-212.
- Gülçin, İ., Gören, A. C., Taslimi, P., Alwasel, S. H., Kılıç, O., & Bursal, E. (2020). Anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities of Anatolian pennyroyal (*Mentha pulegium*)-analysis of its polyphenol contents by LC-MS/MS. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23, 101441. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101441>
- Gülçin, İ., Huyut, Z., Elmastaş, M., & Aboul-Enein, H. Y. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian journal of chemistry*, 3(1), 43-53.
- Güven, L., Ertürk, A., Miloğlu, F. D., Alwasel, S., & Gulcin, İ. (2023). Screening of Antiglaucoma, Antidiabetic, Anti-Alzheimer, and Antioxidant Activities of *Astragalus alopecurus* Pall—Analysis of Phenolics Profiles by LC-MS/MS. *Pharmaceuticals*, 16(5), 659.
- Izzotti, A., Bagnis, A., & Saccà, S. C. (2006). The role of oxidative stress in glaucoma. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 612(2), 105-114. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2005.11.001>
- Karagecili, H., Yılmaz, M. A., Ertürk, A., Kiziltas, H., Güven, L., Alwasel, S. H., & Gulcin, İ. (2023). Comprehensive Metabolite Profiling of Berdav Propolis Using LC-MS/MS: Determination of Antioxidant, Anticholinergic, Antiglaucoma, and Antidiabetic Effects. *Molecules*, 28(4), 1739.

- Kasapligil, G., Nalbantsoy, A., & Medine, E. I. (2020). *Davisianoside B ve aristatoside C monodezmozidik saponinlerin akciğer kanser hücreleri üzerinde sitotoksik ve apoptotik aktivitesinin incelenmesi*. (yüksek lisans tezi), EGE UNIVERSİTESİ, İZMİR.
- Kırmızıgül, S., Sarıkahya, N. B., Sümbül, H., Göktürk, R. S., Yavaşoğlu, N. Ü., Pekmez, M., & Arda, N. (2012). Fatty acid profile and biological data of four endemic *Cephalaria* species grown in Turkey. *Records of Natural Products*, 6(2), 151-155.
- Kiziltas, H., Bingol, Z., Goren, A. C., Pinar, S. M., Alwasel, S. H., & Gulcin, I. (2021). LC-HRMS profiling of phytochemicals, antidiabetic, anticholinergic and antioxidant activities of evaporated ethanol extract of *Astragalus brachycalyx* Fischer. *Journal of Chemical Metrology*, 15(2), 135-151. <https://doi.org/10.25135/jcm.62.2107.2155>
- Kiziltas, H., Bingol, Z., Goren, A. C., Pinar, S. M., Ortaakarsu, A. B., Alwasel, S. H., & Gulcin, İ. (2022). Comprehensive metabolic profiling of *Acantholimon caryophyllaceum* using LC-HRMS and evaluation of antioxidant activities, enzyme inhibition properties and molecular docking studies. *South African Journal of Botany*, 151, 743-755. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.10.048>
- Mbhele, N., Balogun, F. O., Kazeem, M. I., & Ashafa, T. (2015). In vitro studies on the antimicrobial, antioxidant and antidiabetic potential of *Cephalaria gigantea*. ||| *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 10(1), 214-221.
- Okkay, U., Ferah Okkay, I., Cicek, B., Aydin, I. C., Ertugrul, M. S., Bayram, C., . . . Hacimuftuoglu, A. (2021). *Achillea millefolium* alleviates testicular damage in paclitaxel-intoxicated rats via attenuation of testicular oxido-inflammatory stress and apoptotic responses. *Andrologia*, 53(5), e14028. doi:10.1111/and.14028
- Oyaizu, M. (1986). Studies on Products of Browning Reaction Antioxidative Activities of Products of Browning Reaction Prepared from Glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307-315. <https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>
- Rahimi, A., Siavash Moghaddam, S., Ghiyasi, M., Heydarzadeh, S., Ghazizadeh, K., & Popović-Djordjević, J. (2019). The Influence of Chemical, Organic and Biological Fertilizers on Agrobiological and Antioxidant Properties of Syrian *Cephalaria* (*Cephalaria Syriaca* L.). *Agriculture*, 9(6), 122.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rochette, L., Zeller, M., Cottin, Y., & Vergely, C. (2014). Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(9), 2709-2729. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.05.017>
- Saleem, H., Sarfraz, M., Ahsan, H. M., Khurshid, U., Kazmi, S. A. J., Zengin, G., . . . Ahemad, N. (2020). Secondary Metabolites Profiling, Biological Activities and Computational Studies of *Abutilon figarianum* Webb (Malvaceae). *Processes*, 8(3), 336.
- Sarikahya, N. B. (2014). Aristatosides A-C, hederagenin-type triterpene saponins from *Cephalaria aristata*. *Phytochem. Lett.*, 8, 149-155. doi:10.1016/j.phytol.2014.03.001
- Sarikahya, N. B., Goren, A. C., & Kirmizigul, S. (2019). Simultaneous determination of several flavonoits and phenolic compounds in nineteen different *Cephalaria* species by HPLC-MS/MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 173, 120-125.

- Sarikahya, N. B., & Kirmizigul, S. (2010). Antimicrobial triterpenoid glycosides from *Cephalaria scoparia*. *J. Nat. Prod.*, 73(5), 825-830. doi:10.1021/np900724u
- SARIKAHYA, N. B., & Kirmizigul, S. (2010). *Isolation and structural determination of Cephalaria gazipashensis, Cephalaria elmaliensis and Cephalaria scoparia glycosides and Their Biological Properties*. (Doctor of philosophy), Ege University, Bornova-İZMİR.
- Sarikahya, N. B., Nalbantsoy, A., Top, H., Gokturk, R. S., Sumbul, H., & Kirmizigul, S. (2018). Immunomodulatory, hemolytic and cytotoxic activity potentials of triterpenoid saponins from eight *Cephalaria* species. *Phytomedicine*, 38, 135-144. doi:10.1016/j.phymed.2017.11.009
- Sarikahya, N. B., Ucar, E. O., Kayce, P., Gokturk, R. S., Sumbul, H., Arda, N., & Kirmizigul, S. (2015). Fatty acid composition and antioxidant potential of ten *Cephalaria* species. *Records of Natural Products*, 9(1), 116-123.
- Sezer Senol, F., Orhan, I. E., Ozgen, U., Renda, G., Bulut, G., Guven, L., . . . Sekeroglu, N. (2016). Memory-vitalizing effect of twenty-five medicinal and edible plants and their isolated compounds. *South African Journal of Botany*, 102, 102-109. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.07.011>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent *Methods in Enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178): Academic Press.
- Sumer, G., & Kirmizigul, S. (2018). *Phytochemical investigations of biologically active natural products from Cephalaria anatolica Schchian*. (MASTER OF SCIENCE THESIS), Ege University, İzmir.
- Topal, M., & Gulcin, I. (2014). Rosmarinic acid: a potent carbonic anhydrase isoenzymes inhibitor. *Turkish Journal of Chemistry*, 38(5), 894-902. doi:10.3906/kim-1403-5
- Topal, M., & Gulcin, İ. (2022). Evaluation of the in vitro antioxidant, antidiabetic and anticholinergic properties of rosmarinic acid from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 43, 102417. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102417>
- Zengin, G., Atasagun, B., Zakariyyah Aumeeruddy, M., Saleem, H., Mollica, A., Babak Bahadori, M., & Mahomoodally, M. F. (2019). Phenolic profiling and in vitro biological properties of two Lamiaceae species (*Salvia modesta* and *Thymus argaeus*): A comprehensive evaluation. *Industrial Crops and Products*, 128, 308-314. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.11.027>