

**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2014-YL-004**

***HELIOTROPIUM HIRSUTISSIMUM'* DAN ELDE
EDİLEN FARKLI EKSTRELERİN FİTOKİMYASAL
ANALİZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Semih UZUNHAN

**Tez Danışmanı:
Yrd. Doç. Dr. Tülay AŞKIN ÇELİK**

AYDIN

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Semih UZUNHAN tarafından hazırlanan “*Heliotropium hirsutissimum*’ dan Elde Edilen Farklı Ekstrelerin Fitokimyasal Analizi ve Biyolojik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi” başlıklı tez, 27.12.2013 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan : Prof. Dr. Betül BÜRÜN	MÜ Fen. Ed. Fak
Üye : Doç. Dr. Serdar KOCA	DÜ Fen. Ed. Fak.
Üye : Yrd. Doç. Dr. Tülay AŞKIN ÇELİK	ADÜ Fen. Ed. Fak.

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans Tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun.....sayılı kararıyla/...../..... tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cengiz ÖZARSLAN
Enstitü Müdürü

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

...../...../.....

Semih UZUNHAN

ÖZET

HELIOTROPIUM HIRSUTISSIMUM'DAN ELDE EDİLEN FARKLI EKSTRELERİN FİTOKİMYASAL ANALİZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Semih UZUNHAN

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Tülay AŞKIN ÇELİK
2013, 104 sayfa

Bu çalışmada, *Heliotropium hirsutissimum*'dan toprak üstü kısımlar kullanılarak elde edilen ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ekstrelerin (petrol eteri, dietil eter, etil asetat, metanol, su (infüzyon ve dekoksasyon)) fitokimyasal madde analizleri yapılmış ve ekstrelerin antioksidan aktivitesi, toplam fenolik madde miktarı, hidrojen peroksidi (H₂O₂) süpürme ve metal şelatlama aktiviteleri belirlenmiştir. *H. hirsutissimum* bitkisinin sitotoksik etkisinin olup olmadığı da *Artemia salina* Brine Shrimp Lethality Assay (BSLA) yöntemiyle araştırılmıştır.

Bitkiden elde edilen farklı ekstrelerin DPPH serbest radikal süpürücü aktivitesi, H₂O₂ süpürme ve metal şelatlama aktiviteleri kontrol ile karşılaştırıldığında gerek ekstre tipine ve gerekse uygulama konsantrasyonu artışına bağlı olarak farklılıklar göstermiştir. Denenen ekstreler içerisinde en yüksek radikal süpürücü aktiviteye sahip ekstre, infüzyon ekstresi olurken, diğer ekstrelerin gerek serbest radikal süpürücü aktiviteleri gerekse H₂O₂ süpürme ve metal şelatlama aktivitelerinin düşük olduğu bulunmuştur.

H. hirsutissimum'dan elde edilen ekstreler için yapılan fitokimyasal analizlerde ekstre tipine göre farklılıklar gözlenmiş, metanol ekstresi dışındaki diğer ekstrelerde en fazla alkaloidlerin bulunduğu saptanmıştır. Ekstrelerde alkaloidlerden sonra en fazla fenollerin (petrol eteri, infüzyon ve dekoksasyon ekstrelerinde) ve saponinlerin (metanol, infüzyon ve dekoksasyon ekstrelerinde) bulunduğu saptanmıştır. Tanen ve antrakınonların az miktarda olduğu ve flavonoidlerin ise hiçbir ekstrede bulunmadığı tespit edilmiştir.

H. hirsutissimum'dan elde edilen petrol eteri, dietil eter, etil asetat, metanol, su (infüzyon ve dekoksasyon) ekstrelerinin, uygulanan konsantrasyon aralıkları içinde

(100µg/ml–1000µg/ml) pozitif kontrol olan umbelliferon ile karşılaştırıldığında, *Artemia salina* larvaları üzerinde sitotoksik etkisinin olmadığı görülmüştür.

Anahtar sözcükler: Antioksidan aktivite, Brine Shrimp Lethality Assay, DPPH süpürücü aktivite, *Heliotropium hirsutissimum*, fitokimyasal analiz, sitotoksik etki

ABSTRACT

PHYTOCHEMICAL SCREENING AND ASSESSMENT OF BIOLOGIC ACTIVITY OF DIFFERENT EXTRACTS OBTAINED FROM *HELIOTROPIUM HIRSUTISSIMUM*

Semih UZUNHAN

M. Sc. Thesis, Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Tülay AŞKIN ÇELİK

2013, 104 pages

In this study, Phytochemical content screening of extracts (petroleum ether, diethyl ether, ethyl acetate, methanol and water (infusion and decoction) which were obtained by using aerial parts from *Heliotropium hirsutissimum* and prepared on different concentration was performed, and antioxidant activity, total phenolic content, hydrogen peroxide (H₂O₂) scavenging and iron chelating activities of extracts were determined. Whether the cytotoxic effect of *H. hirsutissimum* plant exists or not was investigated by *Artemia salina* Brine Shrimp Lethality Assay (BSLA) method.

When DPPH free radical scavenging activity of different extracts obtained from plants was compared with H₂O₂ scavenging and iron chelating activities control, it showed differences depending on either the extract type or the application concentration increase. It was also found that while the extract with the highest radical scavenging activity became the infusion extract, free radical scavenging activities and H₂O₂ scavenging and iron chelating activities of the other extracts were weak.

In the phytochemical analyses performed for extracts obtained from *Heliotropium hirsutissimu*, differences according to the extract type were observed ,and it was determined that mostly alkaloids existed in other extracts except methanol extract. Following alkaloids, phenols (in petroleum ether, infusion and decoction extracts) and saponins (in methanol, infusion and decoction extracts) were the most encountering phytochemicals in the extracts. It was determined that the antraquinon existence was weak ,and flavonoids did not exist in any extracts as well.

Brine Shrimp toxicity test showed that petroleum ether, diethyl ether, ethyl acetate, methanol and water (infusion and decoction) extracts obtained from *H.hirsutissimum* did not have a cytotoxic effect on *Artemia salina* by comparison with umbelliferone which is the positive control in applied concentration ranges (100µg/ml–1000µg/ml).

Key Words: Antioxidant activity, Brine Shrimp Lethality Assay, DPPH scavenging activity, *Heliotropium hirsutissimum*, Phytochemical analysis, cytotoxic effect.

ÖNSÖZ

Bu çalışmada emeği geçen ve desteğini esirgemeyen herkese teşekkürlerimi sunmadan önce belirtmek isterim ki, yaşayıp öğrendiğimiz her şey dünyanın üzerine kurulduğu kültür ve medeniyet mirasının eseridir ve bu eser, insanlar var olup dünya döndükçe çığ gibi büyümeye devam edecektir.

İlk olarak bu tez çalışması boyunca bilgi, sabır ve desteğini benden esirgemeyen ve bana bilim yolculuğunda çokça tecrübe katan çok değerli Sayın Hocam Yrd. Doç. Dr. Tülay AŞKIN ÇELİK'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması süresince gerek bilgisiyle gerek yardımseverliğiyle benden desteğini esirgemeyen Değerli Hocam Arş. Gör. Dr. Özlem Sultan ASLANTÜRK'e teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışması süresince Adnan Menderes Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyokimya, Mikrobiyoloji ve Doku Kültürü laboratuvarını bana açan ve makine-teçhizat kullanımı konusunda desteğini esirgemeyen, bitki ekstralarının liyofilizasyon işlemlerinde yardımcı olan Sayın Hocalarım Doç. Dr. Kubilay METİN'e, Doç. Dr. Halil BIYIK'a, Arş. Gör. Dr. Yelda ÇALMAZ EMEK'e, Arş. Gör. Dr. M. Evrim DEMİR'e, Arş. Gör. Rukiye YAVAŞER'e ve ayrıca Yüksek Lisans öğrencisi Kazım Şahin KARASÜLEYMANOĞLU'na, içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmada kullandığım bitkinin sistematik tayinini yapan ve bilgi ve desteğini esirgemeyen sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Özkan EREN'e ve bitkinin herbaryum örneklerinin yapımında çokça katkısı olan Yüksek Lisans öğrencisi Birsen KARAKUŞ ve Yüksek Lisans öğrencisi Muhiyettin ŞENTÜRK'e teşekkürü borç bilirim.

Yine tez çalışması esnasında benden maddi ve manevi anlamda desteklerini esirgemeyen çok değerli arkadaşlarım Yüksek Lisans öğrencisi M. Nihan BAĞDATLI ve Yüksek Lisans öğrencisi İlknur KUZU'ya içtenlikle teşekkür ederim.

Tez projemizi (FEF-13017 No'lu Proje) destekleyen Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim ve geldiğim noktada her

anlamda yanımda olan maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen aileme
yetmeyecek sonsuz teşekkürlerimle

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xvii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xxi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxiii
1. GİRİŞ	1
2. KONU VE AMAÇ	4
3. GENEL BİLGİ	6
3.1. Fitokimya ve Fitokimyasallar	6
3.1.1. Alkoloidler	7
3.1.2. Glikozidler.....	8
3.1.3. Flavonoidler	8
3.1.4. Fenolikler	8
3.1.5. Saponinler	9
3.1.6. Tanenler.....	10
3.2. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar	11
3.3. Bitkilerden Fitokimyasalların İzolasyonu	13
3.4. Boraginaceae (Hodangiller) Familyasının Özellikleri	16
3.4.1. <i>Helitropium</i> sp.	17
3.5. <i>Artemia Salina</i> (Brine shrimp)	18
3.5.1. Organizmanın Özellikleri	18
3.5.2. Brine-shrimp (<i>Artemia salina</i>) Lethality Assay(BSLA)	23
4. KAYNAK ÖZETLERİ	27
5. MATERYAL VE YÖNTEM	38
5.1. Materyal	38

5.1.1. <i>Heliotropium hirsutissimum</i> GRAUER Bitkisinin Toplanması, Kurutulması ve Saklanması	38
5.1.1.1. Bitkilerin toplanması	38
5.1.1.2. Bitkilerin kurutulması.....	40
5.1.2. Kurutulan Bitkilerin Muhafaza Edilmesi	41
5.2. Denemelerde Kullanılan Bitkilerden Farklı Yöntemlerle Ekstrelerin Elde Edilmesi	42
5.2.1. Kimyasallar ve Makine-Teçhizat	42
5.2.1.1. Kimyasallar	42
5.2.1.2. Makine-Teçhizat.....	43
5.2.2. <i>Heliotropium hirsutissimum</i> Bitkisinin Ekstraksiyonu	43
5.2.2.1. Dietil eter ekstraksiyonu.....	43
5.2.2.2. Petrol eteri ekstraksiyonu	45
5.2.2.3. Etil asetat ekstraksiyonu	46
5.2.2.4. Metanol ekstraksiyonu.....	47
5.2.2.5. İnfüzyon ve Dekoksiyonu.....	48
5.2.2.5a. İnfüzyon (Demleme) Ekstraksiyonu	49
5.2.2.5b. Dekoksiyon (Kaynatma) ekstraksiyonu.....	49
5.3. <i>Heliotropium hirsutissimum</i> 'dan Elde Edilen Farklı Ekstrelerin Fitokimyasal Taramasının Yapılması	50
5.3.1. Fenol İçeriğinin Belirlenmesi	50
5.3.2. Tanen İçeriğinin Belirlenmesi	50
5.3.3. Alkaloid İçeriğinin Belirlenmesi	50
5.3.4. Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi	51
5.3.5. Antrakinin İçeriğinin Belirlenmesi	51
5.3.6. Saponin İçeriğinin Belirlenmesi	51
5.4. <i>Heliotropium hirsutissimum</i> 'dan Elde Edilen Farklı Ekstrelerin Toplam Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi.....	51
5.4.1. Standart Grafik İçin Gallik Asit Çözeltisinin Hazırlanması	52
5.4.2. Toplam Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi için Ekstrelerin Hazırlanması	52

5.5. <i>Heliotropium hirsutissimum</i> ' dan Elde Edilen Farklı Ekstrelerin DPPH (1,1-diphenyl-2 picrylhydrazyl) Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi	53
5.6. <i>Heliotropium hirsutissimum</i> ' dan Elde Edilen Farklı Ekstrelerin H ₂ O ₂ Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi	54
5.7. <i>Heliotropium hirsutissimum</i> ' dan Elde Edilen Farklı Ekstrelerin Metal Şelatlama Aktivitesinin Belirlenmesi.....	55
5.8. <i>Heliotropium hirsutissimum</i> ' dan Elde Edilen Farklı Ekstrelerinin Brine Shrimp (<i>Artemia salina</i>) Lethality Assay ile Biyolojik Aktivitesinin Belirlenmesi	56
5.8.1. Biyolojik Aktivitenin Belirlenmesi için Kullanılan Kimyasal Maddeler	56
5.8.2. <i>Heliotropium hirsutissimum</i> 'dan Elde Edilen Farklı Ekstrelerinin Brine Shrimp (<i>Artemia salina</i>) Lethality Assay ile Biyolojik Aktivitesinin Belirlenmesi	56
5.9. İstatistiksel Analiz.....	59
6. BULGULAR.....	60
6.1. <i>Heliotropium hirsutissimum</i> 'dan Elde Edilen Farklı Ekstrelerin Kuru Ağırlıkları.....	60
6.2. <i>Heliotropium hirsutissimum</i> 'dan Elde Edilen Farklı Ekstrelerin Fitokimyasal Analizleri	61
6.3. <i>Heliotropium hirsutissimum</i> 'dan Elde Edilen Farklı Ekstrelerde Toplam Fenolik Madde Miktarı	63
6.4. <i>Heliotropium hirsutissimum</i> 'dan Elde Edilen Farklı Ekstrelerin DPPH serbest Radikalini Süpürme Aktivitesi.....	65
6.5. <i>Heliotropium hirsutissimum</i> 'dan Elde Edilen Farklı Ekstrelerin H ₂ O ₂ Süpürme Aktivitesi	68
6.6. <i>Heliotropium hirsutissimum</i> 'dan Elde Edilen Farklı Ekstrelerin Metal Şelatlama Aktivitesi.....	71
6.7. <i>Heliotropium hirsutissimum</i> 'dan Elde Edilen Farklı Ekstrelerin Brine Shrimp (<i>Artemia salina</i>) Lethality Assay Yöntemiyle Akut Toksisitesinin Belirlenmesi	74
7. TARTIŞMA	78
8. SONUÇ VE ÖNERİLER	87
KAYNAKLAR	89
ÖZGEÇMİŞ.....	103

SİMGELER DİZİNİ

Abs	Absorbans
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
ADP	Adenozin difosfat
A-H	Antioksidan (formül)
ATP	Adenozin trifosfat
B-16	Fare melanoma hücre hattı
BHA	Bütillenmiş hidroksianizol
BHT	Bütillenmiş hidroksitoluen
BSLA	Brine Shrimp Lethality Assay
°C	Santigrat derece
CuSO₄	Bakır sülfat
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH	1-difenil-2-pikrilhidrazil (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)
DPPH-H	İndirgenmiş DPPH
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
FeCl₂	Demir klorür
FFA	Serbest yağ asitleri
FRAP	Demir indirgeyici antioksidan gücü
FTC	Ferrik tiyosiyonat
GAE	Gallik asit eşdeğer miktarı
GC-MS	Gaz kromatografi-Kütle spektrometresi
GLC	Gaz-sıvı kromatografisi
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HE	Hekzan ekstraktı

HepG2	İnsan hepatoblastoma hücre hattı
HCl	Hidroklorik asit
HO[·]	Hidroksil radikali
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
HRT-18	İnsan kolarektal karsinoma hücre hattı
HT-29	İnsan kolon adenokarsinoma hücre hattı
IC₅₀	Medyan inhibitör konsantrasyon
IL-6	İnterlökin 6
IE	İnhibisyon etkisi
L-1210	İnsan lösemi hücre hattı
LC₅₀	Medyan letal konsantrasyon
LD₅₀	Medyan letal doz
LDH	Laktat dehidrogenaz
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
MDK	Metilendiklorid
ME	Metanol ekstraktı
mg	Miligram
MKS	Metanol/kloroform/su karışımı
mM	Minimolar
MMD	Minimal mortal doz
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromür
N-256	Walker 256 karsinosarkoma hücre hattı
NaCl	Sodyum klorür
Na₂CO₃	Sodyum karbonat
nm	Nanometre
O₂^{·-}	Süperoksit anyonu

OHCl	Minimal mortal doz
ONOO⁻	Peroksinitrit
ORAC	Peroksil radikali süpürme gücü
P-388	Fare lösemi hücre hattı
P-1534	İnsan lösemi hücre hattı
PAL	Fenilalanin amonyak liyaz
PC	Kağıt kromatografisi
PC12	Sıçan feokromositoma hücre hattı
POV	Peroksit değeri
ppm	Milyon zcde znen madde miktarı
RNA	Ribonükleik asit
RO⁻	Alkoksil radikali
ROO⁻	Peroksil radikali
ROS	Reaktif oksijen türleri
rpm	dakikada dönme hızı
Sarkoma 180	Fare sarkoma hücre hattı
TBA	Tiyobarbitürik asit
TBARS	TBA reaktif madde testi
THP-1	İnsan Leukemia Monosit hücre hattı
TLC	İnce kolon kromatografisi
WHO	Dünya Sağlık rgt
V79	Çin Hamster fibroblast hücre hattı
µg	Mikrogram

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Artemia salina genel görünümü	19
Şekil 3.2. Henüz olgunlaşmamış Artemia yumurtası	20
Şekil 3.3. Artemia salina gelişim evreleri	21
Şekil 3.4. Ticari olarak satılan Artemia salina yumurtaları.....	22
Şekil 5.1. Heliotropium hirsutissimum doğadaki genel görünümü.....	39
Şekil 5.2. Heliotropium hirsutissimum bitkisinin çiçek görünümü.....	40
Şekil 5.3. Kurumaya bırakılan Heliotropium hirsutissimum örnekleri.. ..	41
Şekil 5.4. Kurutulmuş Heliotropium hirsutissimum toprak üstü kısımlarının cam kavanozda muhafazası... ..	42
Şekil 5.5. Brine Shrimp Lethality Assay’de kullanılan Artemia salina tuzlu kistleri	58
Şekil 5.6. Artemia salina yetiştirme ortamı	58
Şekil 5.7. Kistlerden çıkan canlı Artemia salina’lar.....	59
Şekil 5.8. 96’lık well-plate’e inoküle edilmiş Artemia salina larvaları.....	59
Şekil 6.1. Gallik asit standart grafiği.....	63
Şekil 6.2. Heliotropium hirsutissimum’dan elde edilen farklı ekstralarının gallik asit eşdeğeri olan fenolik madde içerikleri... ..	65
Şekil 6.3. Heliotropium hirsutissimum örneklerinden elde edilen ekstraların ve standardın DPPH süpürme aktivitesi	68
Şekil 6.4. Heliotropium hirsutissimum ‘dan elde edilen farklı ekstraların ve standardın H ₂ O ₂ süpürme aktiviteleri	71
Şekil 6.5. H. hirsutissimum ‘dan elde edilen farklı ekstraların ve EDTA’nın konsantrasyon % inhibisyon grafiği	72
Şekil 6.6. Heliotropium hirsutissimum ‘dan elde edilen farklı ekstraların ve EDTA’nın metal şelatlama kapasitesi.....	74

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 5.1. Toplanan <i>Heliotropium hirsutissimum</i> örneklerinin koordinat ve yükseklik bilgisi ve toplanma tarihi.....	39
Çizelge 5.2. Dietil eter solventinin başlıca fiziksel ve kimyasal özellikler.....	43
Çizelge 5.3. Petrol eteri solventinin başlıca fiziksel ve kimyasal özellikleri.	45
Çizelge 5.4. Etil Asetat solventinin başlıca fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	46
Çizelge 5.5. Metanol solventinin başlıca fiziksel ve kimyasal özellikleri	47
Çizelge 5.6. Su solventinin başlıca fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	48
Çizelge 6.1. <i>Heliotropium hirsutissimum</i> 'dan elde edilen farklı ekstrelerin ham verim (%) ve net ekstrakt miktarları (g)	60
Çizelge 6.2. <i>H. hirsutissimum</i> 'dan elde edilen farklı ekstrelerin içerdiği kalitatif fitokimyasallar	62
Çizelge 6.3 <i>Heliotropium hirsutissimum</i> 'dan elde edilen farklı ekstrelerinin gallik asit eşdeğeri olan fenolik madde miktarları	64
Çizelge 6.4. <i>Heliotropium hirsutissimum</i> örneklerinden elde edilen ekstrelerin ve standardın DPPH süpürme aktivitesi ve IC50 değerleri	67
Çizelge 6.5. <i>Heliotropium hirsutissimum</i> 'dan elde edilen farklı ekstrelerin ve standardın H2O2 süpürme aktiviteleri... ..	70
Çizelge 6.6. <i>Heliotropium hirsutissimum</i> 'dan elde edilen ekstrelerin ve EDTA'nın metal şelatlama kapasitesi.....	73
Çizelge 6.7. Toksikite derecesi değerlendirilmesinde kullanılan referans değerleri	75
Çizelge 6.8. <i>Heliotropium hirsutissimum</i> 'dan elde edilen ekstrelerin ve umbelliferon'un Brine Shrimp (<i>Artemia salina</i>) Lethality Assay (BSLA) LD10 ve LD50 limitleri	76
Çizelge 6.9. <i>Heliotropium hirsutissimum</i> 'dan elde edilen farklı ekstrelerin ve umbelliferon'un <i>Artemia salina</i> larvalarındaki % ortalama canlılık değerleri	77

1. GİRİŞ

İlk çağlardan kalan arkeolojik bulgulara göre insanlar besin elde etmek ve sağlık sorunlarını gidermek için öncelikle bitkilerden faydalanmışlardır (Koçyiğit, 2005). Kuzey Irak'ta Sanidar Mağarası'nda 1957-1961 yılları arasında yapılan kazılarda bulunan Neandertal insan kalıntıları yanında mezarda bulunanlar, bitki-insan ilişkisinin başlangıcına ait ilk veriler olarak kabul edilmektedir. 60 bin yıl öncesinden günümüze gelen ve bir şamana ait olduğu düşünülen bu mezarda civanperçemi, kanarya otu, mor sümbül, gül hatmi, peygamber çiçeği ve efedra gibi bitki türlerinin bulunduğu tespit edilmiştir (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011). Tarih boyunca Yontmataş (Paleolitik) çağından beri başlayarak, Mezopotamya, Eski Mısır, Hitit, Yunan, Roma, Selçuklu ve Osmanlı dönemlerinde bitkiler pek çok amaçla kullanılmıştır (Özbek, 2005; Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011).

Bitki kaynaklı maddeler çok amaçlı kullanıma sahip olmalarından dolayı her zaman büyük ilgi uyandırmaktadır. İnsanlık tarihi boyunca birçok hastalık (şeker hastalığı, sarılık, nefes darlığı vb) bitkiler kullanılarak tedavi edilmeye çalışılmış ve çalışılmaktadır. Bugünkü modern tıbbın kullandığı önemli birçok etken madde, ilk defa bitkilerden elde edilmiş bileşiklerdir. Bütün bu bilgiler ışığında düşünüldüğünde, tıbbi amaçla kullandığımız bitkiler birinci planda ayrı bir yere sahipken, beslenme amacıyla kullandığımız bitkilerin de tıbbi önem ve/veya faydaları olabileceği fikri ortaya çıkmıştır. Bu açıdan tıbbi bitkiler modern tıbbın, uygulamalı tıbbın, besin uygulamalarının, halk tıbbının ve sentetik ilaçların yapımına örnek oluşturmasıyla ilaç araştırmalarının en zengin kaynaklarıdır (Ncube vd., 2008). Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization; WHO), dünyada yaklaşık 4 milyar insanın (dünya nüfusunun yaklaşık % 80'i) sağlık sorunlarını ilk etapta bitkisel droglarla gidermeye çalıştıklarını bildirmektedir. Gelişmiş ülkelerde reçeteli ilaçların yaklaşık % 25'ini bitkisel kökenli etken maddeler (vimblastin, rezepin, kinin, aspirin vb) oluşturmaktadır (Farnsworth vd., 1985). Özellikle 1990'lı yıllardan sonra tıbbi ve aromatik bitkilerin yeni kullanım alanlarının bulunması, doğal ürünlere olan talebin artması bu bitkilerin kullanım hacmini her geçen gün arttırmaktadır. Günümüzde tıbbi bitkiler piyasasının yıllık yaklaşık 60 milyar dolarlık bir rakama sahip olduğu tahmin edilmektedir (Kumar, 2009).

Bitkisel kökenli ilaç, işlenmemiş ya da işlenerek bir veya daha fazla bitkiden oluşturulan bileşim maddesi içeren tedavi edici özelliği olan veya insanların

sağlığına yararı olan bitkilerden türetilen maddeler veya ürünler olup (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011); bitkisel materyal, işlenmiş bitkisel materyal ve tıbbi şifalı ot (herbal) ürünleri olmak üzere farklı çeşitleri bulunmaktadır (Van Overwalle, 2006).

İnsanlar tarihin çok eski dönemlerinden beri bitkilerden sadece gıda temininde değil, ayrıca koku ve tat verici, yakacak, silah, ilaç, barınak yapımı gibi alanlarda da yararlanmışlardır. Özellikle tıbbi bitkilerden elde edilen özütler ile birçok hastalık tedavi edilmeye çalışılmıştır. 1800'lü yıllardan itibaren bitkilerden ilk etken maddelerin daha sonra sentetik olarak üretilmeye başlanmasıyla ilaç endüstrisi doğmuş ve eski geleneksel metotlar büyük ölçüde bir kenara bırakılmıştır. Halk hekimliği uygulamaları, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de doğal florada bulunan bitkilerin halk arasında tedavi amaçlı, gıda, çay, baharat, boya, insektisit, hayvan hastalıklarının tedavisi, reçine, zamk, uçucu sabit yağlarından faydalanma, meşrubat ve kozmetik sanayinde kullanımı uzun yıllardan beri süregelen geleneksel kültürel zenginliğimizin bir parçası olmuştur. Ancak, özellikle son 25-30 yılda, modern tıpta kullanılan sentetik ilaçların tedavide istenen başarıyı sağlayamamaları, bir çok olumsuz yan etkiye sahip olmalarına karşın, genelde tek olumlu etkiye sahip olmaları ve benzeri nedenlerle, "alternatif tıp" adıyla bilinen geleneksel metotlara, yani bitkilerden elde edilen özütlerle tedaviye karşı gittikçe artan bir ilgi ortaya çıkmıştır.

"Tıbbi bitkilerle tedavi" anlamına gelen "Fitoterapi" terimi ilk kez Fransız hekim Henri Leclerc (1870-1955) tarafından kullanılmıştır. Bitkilerin ürettiği doğal ürünler olan primer ve sekonder metabolitler doğrudan ve dolaylı olarak endüstrinin en temel ürünleridir. Tıbbi amaçla kullandığımız birçok bitki, aynı veya benzer familyalarda bulunmaktadır. Aynı veya benzer familyalarda bulunmaları, bitkilerin kemotaksonomik olarak benzer ve/veya aynı grup bileşikleri de taşıyabileceklerini düşündürmektedir. Bitkiler, topraktan aldıkları su, mineral ve bazı öğeleri kendi metabolizmalarında insan vücudunun özümleyebileceği bileşimlere dönüştürmektedirler. Temel besin öğelerinden, karbohidratlar, proteinler, yağlar, vitaminler ve mineraller bunlara örnektir. Bitkilerin ürettiği doğal ürünler olan primer ve sekonder metabolitler, doğrudan ve dolaylı olarak endüstrinin en temel ürünleridir. Bu maddeler (alkoloid, glikozid, tanin ve fenolik bileşikler vb) genellikle bitkinin kök, gövde, yaprak ya da kabuk gibi kısımlarında bulunmaktadır. Bu yüzden çoğu bitki, sentetik ilaç yapımında kullanılan biyoaktif ajan kaynağı olarak, farmasötik endüstride ilaçların önemli bir

kaynağını oluşturmaktadır (Aboaba vd., 2006). Bu etken maddeler vücudun savunma gücünü arttırarak, organların işlevlerini destekleyerek ve/veya iyileşmeyi hızlandırmakta, böylece organizmadaki belirli dokuların ve organların işlevlerine olumlu etki yapmaktadırlar (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011). Bitkilerin içerdikleri fitokimyasal maddeler sadece insanların değil ve aynı zamanda hayvan sağlığı yönünden de önemli maddelerdir.

Son yıllarda bütün dünyada, antibiyotiklerin gelişi güzel kullanımı nedeniyle, insan patojeni bakterilerin, ilaçlara karşı direnç kazandığı tespit edilmiştir. Yine ilaçlara dirençli patojen fungus ve bakteriler nedeniyle özellikle immun sistemin zayıflaması sonucunda AIDS ve kanser gibi hastalıkları tedavisini zorlaştırdığı bilinmektedir (Facey vd. 1999; Ahmad and Beg 2001). Bütün bu nedenlerin yanı sıra hastalıkların tedavisi için kullanılan sentetik ilaçların yan etkilerinin fazla oluşu, bitkisel droglardan elde edilen bazı ilaç ham maddelerinin sentetik olanlardan daha ucuza ve daha kolaylıkla elde edilebilir olması ve drogların birkaç etkiye birden sahip olması nedeniyle son yıllarda dünya ülkelerinde olduğu gibi ülkemizde de tıbbi bitkiler ve bunlardan elde edilen aktif maddeler üzerindeki çalışmalar artmıştır (Baytop,1999; Kara, 2002).

Dünya ülkelerinde olduğu gibi Türkiye’de de tıbbi açıdan önemli olan bitkiler yüzyıllardan beri halk arasında çeşitli hastalıkların tedavisinde her bölgede farklı amaçlar ve yöntemlerle kullanılmaktadır. Türkiye 174 familyaya ait 1251 cins ve 12.000’den fazla tür ve tür altı taksonu (alt tür ve varyete) ile oldukça zengin bir floraya sahiptir (Davis, 1985., Güner vd., 2000). Bu taksonların 234’ü yabancı kaynaklı ve kültür bitkisidir. Geriye kalan diğer türler ise, yurdumuzda doğal yayılış gösteren bitkilerdir (Ekim vd., 1989, Erik ve Tarıkahya, 2004). Tüm Avrupa kıtasının yaklaşık 12.000 kadar bitki taksonuna sahip olduğu düşünüldüğünde yurdumuzun bitki örtüsü bakımından ne kadar zengin olduğu görülmektedir (Ekim vd., 2000). Endemizm bakımından da yurdumuz oldukça zengindir. Tüm Avrupa ülkelerindeki toplam endemik takson sayısı yaklaşık 2750 iken ülkemizdeki endemik tür sayısı 2891’dir. Bu sayıya endemik olan 497 alt türü ve 390 varyeteyi dâhil ettiğimizde toplam endemik takson sayısı 3750’den fazladır (Güner vd., 2000).

2. KONU VE AMAÇ

Tıbbi bitkiler ve tıbbi bitkilerden elde edilen ekstre, drog vb. ürünler tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de çeşitli hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, tıbbi bitkilerden elde edilen ekstrelerin çoğunun biyolojik etkileri ve etki mekanizmaları hakkındaki bilimsel veriler hala yetersizdir. Bu nedenle, tıbbi bitkiler ve tıbbi bitkilerden elde edilen ürünlerin biyolojik etkilerinin bilimsel olarak araştırılmasına olan ilgi her geçen gün artmaktadır.

Bitki ekstrelerinden elde edilen doğal ilaçlar, çoğunlukla çok önemli bir yan etkiye sahip olmamakla birlikte, olumlu birden fazla etkiyi bünyelerinde taşımaktadırlar ve bu durum onları sentetik olan ilaçlara göre daha cazip hale getirmektedir. Bundan dolayı yıllardır tıbbi etkiye sahip bitkisel ilaç araştırmaları oldukça ilgi duyulan bir araştırma alanı haline gelmiştir (Diken, 2009). Tıbbi bitkiler, özellikle antioksidan moleküller içeriği açısından zenginliği nedeniyle, birçok çalışmanın odak noktası olmuş ve doğal antioksidanların araştırılmasına karşı gösterilen ilgi artmıştır. Ancak tedavi amacı ile kullanılan bitkiler her zaman sağlık verici etkilerde bulunmazlar, kullanılan bitkilerin bazıları sağlık açısından potansiyel risk taşıyan ve ciddi yan etkilere sahip olabilen bazı kimyasal içeriklere de sahip olabilirler. Bitkilerin uzun süreli kullanımlarında toksik etki gösterebilme olasılığı artmaktadır. Genellikle yeşil bitkilerin doğal toksik ajanlar olarak başlıca antimutajen kaynağı olduğu bilinmektedir, ancak son zamanlarda yapılan çalışmalarda, tıbbi amaçlı ya da gıda olarak kullanılan çoğu bitkinin, mutajenik, sitotoksik ve genotoksik etkilerinin olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur (Higashimoto vd.,1993; Schimmer vd., 1994; Kassie vd., 1996; Başaran vd.,1996; Zink ve Chaffin, 1998; Çelik ve Aslantürk, 2007; Çelik ve Aslantürk, 2010; Celik, 2012). Uzun süreli kullanımlarında bu tip bitkilerin içerdiği mutajenik ve karsinojenik maddeler, insanlardaki tümör oluşumu ile de ilişkilendirilmektedir (Wynder vd., 1983; Ames, 1986; Nagao vd., 1986; Nguyen vd., 1989; Brito vd.1990; Ferreira ve Vargas, 1999; Çelik ve Aslantürk, 2010).

Bu tezde; ülser, yara iyileşmesi, lokal inflamasyon, ürtiker, saçkıran, romatizma, ateşlenme, sedef hastalığı ve arı sokması gibi hastalıklarının tedavisi amacıyla halk tıbbında çok çeşitli amaçlarla kullanılan *Heliotropium hirsutissimum* GRAUER (Bambıl, Devebambılı, Delibambıl, Siğil otu) bitkisinin toprak üstü kısımlarından farklı polaritelere sahip olan çözücülerle elde edilen ekstrelerde (petrol eteri, dietil

eter, etil asetat, metanol, su (infüzyon ve dekoksasyon) ekstreleri) fitokimyasal madde analizleri ve ekstrelerin antioksidan aktivitesi, toplam fenolik madde miktarı, hidroksil radikalini ve hidrojen peroksidi (H_2O_2) süpürme ve metal şelatlama aktiviteleri belirlenmiştir. *H. hirsutissimum* bitkisinin sitotoksik etkisinin olup olmadığı da *Artemia salina* Brine Shrimp Lethality Assay (BSLA) yöntemiyle araştırılmıştır.

Günümüzde antioksidan maddelerin gıda ve ilaç sanayiinde kullanımı oldukça yaygın olup hemen hemen tükettiğimiz ürünlerin çoğuna sentetik antioksidan maddeler katılmaktadır. Bunlar gıdaları bozulmaya karşı korumakta ve onların daha uzun süreli saklanması sağlamaktadır ancak bunların toksik etkilerinden şüphelenilmektedir. Antioksidanlar sadece gıda değil ayrıca sağlık alanında da önemli maddelerdir. Bu nedenle yeni, daha güvenli ve ucuz antioksidan maddelerin bulunması için doğal ürünler üzerinde yaygın çalışmalar yapılmaktadır. Son yıllarda doğal yeni antioksidan maddelerin doğal kaynaklardan elde edilmesi ve bu maddelerin sitotoksik karaktere sahip olmaması oldukça önem kazanmış olup, bu konuyla ilgili çok sayıda araştırma yapılmaktadır. Tüm bu konular göz önüne alındığında araştırmanın önemi açıkça görülmektedir.

3. GENEL BİLGİ

3.1. Fitokimya ve Fitokimyasallar

Fitokimya (Yunancada: phyton: bitki; chemeia: dönüşme) ya da başka bir deyişle bitki kimyası, doğal organik ürün kimyası ve bitki biyokimyası arasında bir yerde, belirli disiplinlerle birlikte son yıllarda gelişmiştir. Bitkiler tarafından üretilen organik maddelerin biyosentezinin, metabolizmasının ve biyolojik fonksiyonlarının, kimyasal yapılarıyla ele alınması fitokimyanın konusu içindedir (Harborne, 1998). Bitkilerin ikincil metabolik faaliyetleri sırasında ortaya çıkarak depolanan, sadece besin olarak tüketildikleri zaman insan sağlığı için yararlı etkilerde bulunan biyoaktif bileşiklere bitki kimyasalları (fitokimyasallar) denir (Visioli vd., 2000). Bitkilerin kendilerine özgü renk, koku ve tatlarının oluşmasında biyolojik aktif maddeler olan fitokimyasallar etkili bir role sahiptir (Balch ve Balch, 1997). . Fitokimyasallar sahip oldukları antioksidan aktiviteleri sayesinde birçok olumsuz duruma karşı koruyucu ve iyileştirici bir etkiye sahiptirler. Bitkilerde bulunan fitokimyasallar sağlık üzerindeki olumlu etkilerini; biyokimyasal reaksiyonlarda substrat, enzimatik reaksiyonlarda ko-faktör, bazı enzimatik reaksiyonların inhibitörü, bağırsaklarda zararlı ve istenmeyen maddeleri bağlayıp uzaklaştıran absorban/sekestran, hücre membranı ve hücre içinde bulunan reseptörleri agonize veya antagonize eden ligandlar olarak, reaktif toksik ajanları yakalayarak, esansiyel besin öğelerinin absorpsiyon ve stabilitesini artırarak, yararlı gastro-intestinal bakterilerin çoğalmasını artırarak, yararlı oral, gastrik ve intestinal bakteriler için substratları fermente ederek ve zararlı mikroorganizmaları özgül olarak inhibe ederek gösterirler (<http://www.kimyaevi.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFF7EE1F1486EE5030EB856E08843ECBADB> Erişim tarihi: 15.11.2013).

Fitokimyasallar barsak florasını, safra asitlerini ve pH'yı düzenledikleri gibi, intrasellüler matrikslerin bütünlüğünün korunmasını üstlenerek hücrenin dış etkenlere karşı korunmasını da sağlarlar. Ayrıca karsinojen özelliği gideren enzimlerin aktivitesini arttırarak tümör oluşumu ve kanserleşmede önemli rol oynayan nitrozamin oluşumunu engelleyici etkide bulunurlar (Güney vd., 2003).

Fitokimyasal kavramı ve diyetteki yerinin son yıllarda oldukça önem kazanması, bilim ve teknolojideki hızlı gelişmeler; Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün önerdiği sağlıklı diyetin sebze ve meyvelerden oluşması, sağlık giderlerinin oldukça yüksek

olması, toplumun diyet seçeneği ve sağlık alanında daha bilinçli hale gelmesi, kanser ve kardiyovasküler sorunlar gibi yaygın risklerin çoğunda hayvansal gıdaların yoğun olarak tüketilmesinin rol aldığına anlaşılmıştır, hayvansal ürünlere karşı hissedilen doygunluk, tüketicilerin bu yeni beslenme tarzına gösterdikleri talep gibi faktörlere bağlanmaktadır (Sarah, 2001; Kırışoğlu ve Velioğlu, 2001). Yıllardır sürdürölmekte olan çalışmalar sonunda bitkilerdeki bu maddelerden kimileri saflaştırılabilmiş, böylece fitokimyasalların saf halde elde edilerek kullanılmaları tartışmaya açılmıştır. Sayıları binleri bulan bitkisel besinler bugün yaşamımızda yer almaktadır. Sadece domateste 10 bini aşkın fitokimyasal maddenin bulunduğu göz önüne alındığında çeşitliliğin rakamlarla ifadesi güçleşmektedir (Dündar, 2001).

Fonksiyonel gıda özelliği gösteren fitokimyasallar; alkaloidler, karotenoidler, flavonoidler, polifenoller, fitosteroller, fitoestrogenler, indoller ve sülfidler gibi pek çok şekilde gruplandırılabilir.

3.1.1. Alkaloidler

Sekonder kimyasal bitki içerikleri arasında en geniş grubu oluşturan alkaloidler, çoğu oksijen içeren, peptid halkasında radikallerle yer değiştirebilen bir ya da daha fazla hidrojen atomu bulunduran nitrojen bazlı bileşiklerdir. Bu bileşiklerin en temel özellikleri alkali olmaları ve mavi turnusol kağıdını kırmızıya evirmeleridir. Günümüzde fitokimyasal araştırmalarla tanımlanan, farmakolojik açıdan önemli 10000'in üzerinde alkaloid bulunmaktadır ve bunlara her gün bir yenisi eklenmektedir. Olası biyolojik etkilerinden dolayı alkaloidler, bitkileri herbivor ve patojenlere karşı korumaktadır ve farmasötik, stimulant, anestetik, narkotik ve zehirli etkileri bulunmaktadır (Doughari, 2012). Alkaloidler klinikte, analjezik (morfin ve kodein), kas gevşetici (tubokurarin), antibiyotik (sanguinafin ve berberin), antikanser ajanı (vinblastin), antiaritmik (ajmalin) ve sedatif (skopolamine) etkileri nedeniyle kullanılmaktadırlar. Bitki kökenli diğer önemli alkaloidlere örnek olarak kafein, nikotin, kodein, atropin, morfin, ergotamin, kokain ve efedrin verilebilir.

3.1.2. Glikozidler

Glikozidler genellikle organik hidroksi bileşiklerinin farklı türlerine sunucu olan şekerlerin yoğun ürünleri olarak tanımlanmaktadır. Glikozidler bitki öz suyunda bulunan renksiz, kristal karbon, hidrojen ve oksijen içeren (bazen nitorjen ve sülfür de içerebilmektedirler) ve suda çözünebilen bitkisel içeriklerdir. Kimyasal olarak glikozidler bir karbohidrat (glukoz) ve bir de karbohidrat olmayan (aglikon ya da genin) kısımlardan oluşmaktadır. Glikozidler reaksiyonlarda nötral davranmaktadır ve ferment ya da mineral asitlerle bileşik oluşturarak hidroliz olabilmektedirler. Kimyasal olarak diterpen lakton ve triterpen lakton gruplarını içerebilmektedirler. Acı esaslılar olarak da adlandırılan glikozidlerin tiroksin ve metabolizmayı azaltıcı (tannik asit), kalp üzerinde etki edici (kardiyak glikozidler), cilt rahatsızlıklarında etkin (antrasen glikozidler), antikanser (şalkon glikozidler) gibi özellikleri mevcuttur. Aynı zamanda siyanojenik bir glikozid olan amigdalinin antikanser etkisi olduğu ve kullanımının uygun miktarlarda olmadığı durumlarda öldürücü etkisinin olduğu bilinmektedir (Kar, 2007; Firm, 2010, Doughari, 2012).

3.1.3. Flavonoidler

Flavonoidler bitki floraları arasında genişçe yayılmış olan polifenollerin önemli bir grubudur. Yapısında birden fazla benzen halkası bulunduran ve birçok kaynaktan antioksidan ya da serbest radikal süpürücü olarak kullanıldığı rapor edilen bileşiklerdir. Bu bileşikler flavan olarak bilinen ana bileşenlerden meydana gelmektedirler. 4000'in üzerinde flavonoidin olduğu ve bunlardan bazılarının yüksek bitkilerde pigment olarak bulunduğu bilinmektedir. Kuersetin, kaemferol ve kuersitrin bitkilerin %70'inde bulunan yaygın flavonoidlerdir. Flavonoidlerin diğer bilinen grupları, flavonlar, dihidroflavonlar, flavanlar, flavonoller, antosiyandinler, proantosiyandinler, kalşonlar, kateşinler ve lökoantosiyandinlerdir (Kar, 2007; Doughari, 2012).

3.1.4. Fenolikler

Fenolikler, fenoller ya da polifenoller (ya da polifenol ekstraktları) bitkilerin meyve kısımlarının renklenmesinden sorumlu renk pigmentlerini hali hazırda doğal olarak meydana getiren kimyasal bileşiklerdir. Bitkilerdeki fenolikler çoğunlukla fenilalanin amonyak liyazın (PAL) hareketi aracılığıyla fenilalaninden

sentezlenmektedir. Bu bileşikler bitkiler için çok önemlidir ve birden fazla görevleri vardır. En önemli rolü bitkiyi patojen, herbivor ve predatörlere karşı korumaktadır ve ayrıca insan patojenik enfeksiyonlarının kontrolünde kullanılmaktadır (Puupponen-Pimia vd., 2008; Doughari, 2012). Fenolikler, fenolik asitler, flavonoid polifenolikleri (flavononlar, flavonlar, ksantonlar ve kateşinler) ve flavonoid olmayan polifenolikler şeklinde sınıflandırılmaktadır. Kafeik asit bilinen en yaygın fenolik bileşiklerden bir tanesidir. Doğal antioksidanların kaynakları olan fenolikler nutrasötik (temel besleyici özelliğine ilave olarak sağlık yararları sağlayan gıda maddeleri) olarak kullanılmaktadırlar. Elma, yeşil çay ve kırmızı şarapta bulunabilen bu bileşikler, kalp rahatsızlıkları ve antienflamatuar ajanı olarak ve hatta kanserle savaşmada etkilidirler.

3.1.5. Saponinler

Saponin terimi, içinde bol miktarda saponin bulunduran ve eskiden sabun olarak kullanılan *Quillaja saponaria* bitkisinden türemiştir. Bu bileşikler suda sabun özelliği göstermektedirler. Hidroliziyle bir aglikon olan sapogenin meydana gelmektedir. Bu sapogeninlerin steroidal ve terpenoidal olmak üzere iki tipi bulunmaktadır. Genelde saponinlerin C-3 atomuna bir şeker bağlıdır. Bunun nedeni olarak sapogeninlerdeki C-3 atomunda hidroksil grubunun bulunması gösterilmektedir. Saponinler, triterpenler ve steroid aglikonlar ile birlikte şeker yapısıyla birleşmiş büyük yapılu bileşiklerdir. Steroid saponinler ve triterpen saponinler olmak üzere iki büyük gruba ayrılmaktadırlar. Bu bileşikler suda çözünebilirken eterde çözümemektedirler ve glikozidlerde olduğu gibi hidrolizleri sonucunda ortama aglikonları vermektedirler. Yüksek seviyede zehirli oldukları, kanı hemoliz ettikleri ve büyükbaş hayvanlarda zehirlenmelere sebep oldukları bilinmektedir. Acı-ekşi tadlarının yanında mukoz membranda irritasyona neden olmaktadır. Saponinlerin hipolipidemik ve antikanser aktivite gibi önemli terapötik etkileri bulunmaktadır. Steroidal saponinlerin iki büyük grubunu diosgenin ve hekogenin oluşturmaktadır. Steroidal saponinler klinik uygulama amacıyla, progesteronun diosgeninden elde edilmesi gibi, cinsiyet hormonlarının ticari üretiminde kullanılmaktadır (Kar, 2007; Doughari, 2012).

3.1.6. Tanenler

Tanenler, polifenolik bileşikler olup, kolza, bakla, çay ve sorgum gibi bitkilerden elde edilen, açık sarı-kahverengi toz, pul ya da süngersi bir kütle halindeki biçimsiz (amorf) maddelerdir. Tanenler genellikle bitkilerin kök, odun, kabuk, yaprak ve meyvelerinde bulunur. Tanenler kimyasal açıdan, hidroliz olabilen tanenler ve kondanse tanenler olmak üzere iki ana grupta incelenir. Birinci grupta yer alan tanenler bir asit ya da enzim eşliğinde hidroliz olarak gallik asit, pirokateşik asit ve şeker gibi, suda çözünebilen bileşikler verirler. Reaksiyona girdiklerinde asidik özellik göstermelerinin nedeni fenoliklerin ve karboksilik grupların varlığından kaynaklanmaktadır (Doughari, 2012). Suda az, alkolle asetonda iyi çözünmekte ve tanen özelliklerinden dolayı bileşikleri bağlayabilmektedirler. Protein, karbohidrat, jelatin ve alkaloidlerle kompleks formlar oluşturmaktadırlar (<http://tr.wikipedia.org/wiki/Tanen> Erişim tarihi, 15.09.2013).

Tanenler hidroliz edilebilir ve yoğun tanenler olarak ayrılırlar. Hidroliz edilebilir tanenler, gallik asit ya da ellagik asit oluşturma durumuna göre; gallotaninler ya da ellagitanninler olarak isimlendirilmektedirler. Isıya maruz bırakıldığında ise, pirogallik aside dönüşmektedirler. Hidroliz edilebilir tanenlere en yaygın örnekler; teaflavinler (çayda), daidezein, genistein ve glisiteindir. Çok daha geniş bir grup olan kondanse tanenler ise, hidroliz olamazlar. Bunlar ısı karşısında kuvvetli asitlerle ya da bazı yükseltgeyici maddelerle flobafen denen koyu kırmızı renkli çözümez bileşikler oluşturur (Doughari, 2012).

Başlıca kullanım alanı olan dericilik ve boyacılık dışında tanenler şarap ve biranın berraklaştırılmasında, petrol kuyularındaki sondaj çamurunun akışkanlığının artırılmasında ve buhar kazanlarının çeperlerinde birikinti oluşumunun engellenmesinde kullanılır. Tıpta damarları ve mukozayı büzücü etkilerinden ötürü bademcik, farenjit, basur ve bazı deri hastalıklarının tedavisinde kullanılan ilaçlarının bileşimine girer. Taninler antiseptik olarak da kullanılmaktadırlar ve bu aktiviteleri içerdikleri fenolik gruplardan kaynaklanmaktadır. Sentetik tannik asitler egzama tedavisi kapsamında çeşitli preparatlar içinde bulunurlar. Tanenler, ayrıca tripsin ile α -amilazların sindirimdeki aktivitesini substratlarla kompleks yaparak önlerler veya onlara bağlanarak protein ve nişasta sindirimini aksamasına yol açarlar. Tanenler vitamin B ile de kompleks oluşturarak, emilimini önlerler (<http://tr.wikipedia.org/wiki/Tanen> erişim tarihi, 15.09.2013).

3.2. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

Serbest radikallerin biyolojik sistemlerdeki varlığı ve önemi 1950'lerin ortalarına kadar kabul görmese de, reaktif oksijen biyokimyasını kuran bir grup bilim adamının katkıları ile varlıkları ve önemleri aydınlatılmıştır. Yirminci yüzyılın ikinci yarısının büyük bir kısmında, reaktif oksijen türevlerine, doku hasarı ve hastalığına yol açan bir tür biyokimyasal “oksitleyici ajan” gözüyle bakılmıştır. Yirmi birinci yüzyıla girerken reaktif oksijen biyokimyası bir disiplin olarak olgunlaşmış ve biyomedikal bilimler arasındaki önemi yerleşmiştir. Günümüzde hemen her hastalığın bir dereceye kadar oksidatif strese bağlı olduğu kabul edilmektedir. Ayrıca günümüzde, reaktif oksijen türevlerinin (ROS) homeostazisini devam ettirmeye yardımcı olmak üzere, normal ve sağlıklı dokuların hücrelerinde sıkı-kontrollü bir şekilde oluştuğu kabul görmeye başlamıştır. Ortaya çıkan yeni teknolojilerin, özellikle proteomik teknolojilerin, reaktif oksijen biyokimyası alanında ilerideki gelişmeleri kolaylaştıracağı konusu bilimsel çevrelerce tartışılmaktadır (Çakatay ve Kayalı, 2006).

ROS'lar aerobik organizmaların elektron taşıma zinciri ve aktif fagositoz gibi metabolik yollarında devamlı olarak oluşmaktadır (Lichtenthaler vd., 2003; Albayrak vd., 2010). Bu süreçlerde oluşan başlıca ROS'lar süperoksit anyon (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikal (HO^\cdot), peroksil radikal (ROO^\cdot), alkoksil radikal (RO^-) ve peroksinitrit ($ONOO^-$)'tir (Aruoma, 1998; Schoneich, 1999; Albayrak vd., 2010). ROS'lar DNA, protein ve lipit gibi makromolekülleri etkileyerek oksidatif hasara neden olurlar. Normal olarak ROS'lar spesifik enzim sistemleri (süperoksit dismutaz ve katalaz), suda ve lipitte çözünebilir bazı protein yapısında olmayan bileşikler (ürik asit ve tokoferol) tarafından engellenmektedir (Lichtenthaler vd., 2003; Albayrak vd., 2010). Bu ROS'ların antagonistleri vücudun ROS temizleyicisi olan, antioksidanlar'dır.

Antioksidanlar, küçük miktarlarda, kolayca okside olabilen materyallerin oksidasyonunu büyük ölçüde geciktiren ya da engelleyen maddeler olarak tanımlanmaktadır (MacDonald-Wicks vd., 2006; Albayrak vd., 2010). Antioksidanlar tarafından sunulan koruma sınırlıdır. Eğer ROS oluşumu biyolojik sistemlerin antioksidan kapasitesini aşarsa, oksidatif stres oluşur. Bu nedenle gıdalarla antioksidanların vücuda alınımı kanser, kardiovasküler hastalıklar gibi çeşitli hastalıkları önlemede ve yaşlanma sürecini geciktirmede önemli rol oynamaktadır (Lichtenthaler vd., 2003, Price vd., 2006; Albayrak vd., 2010).

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak elde edilebilen stabil organik nitrojen radikalidir. 515 nm'de maksimum absorbansa sahiptir (Huang vd., 2005; Albayrak vd., 2010). Molekülde bir serbest elektronun yer değiştirmesi menekşe renginin oluşmasına neden olur. DPPH solüsyonu hidrojen atomu verebilen madde (antioksidan) ile karıştırıldığı zaman koyu menekşe rengin kaybı ile indirgenmiş form oluşur. Antioksidan (A-H) tarafından DPPH serbest radikaline proton transferi reaksiyonu 517 nm'de absorbansın azalmasına neden olur. Bu süreç görünür alanda spektrofotometre ile absorbans sabitlenene kadar takip edilir (MacDonald-Wicks vd., 2006, Scalzo, 2008; Albayrak vd., 2010). DPPH-H indirgenmiş formudur. A' ise ilk adımda oluşturulan serbest radikaldir. Daha sonra bu radikal daha başka reaksiyonlara girecektir (Frankel ve Meyer, 2000, Molyneux, 2004; Albayrak vd., 2010). DPPH, bitkiler ve gıdalardan elde edilen ekstraktlar ya da bileşiklerdeki serbest radikal söndürücü aktiviteyi belirlemek için araştırmacılar tarafından yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Scalzo, 2008; Albayrak vd., 2010). Teknik olarak basit ve hızlı bir yöntemdir. Fakat uygulamasını sınırlandıran bazı dezavantajlara sahiptir. Uzun ömürlü nitrojen radikali olan DPPH, lipid peroksidasyonu ile ilişkili olan hayli reaktif ve kısa ömürlü peroksil radikallerine benzerlik göstermez. Peroksil radikalleri ile hızlı reaksiyona giren birçok antioksidan DPPH ile yavaş reaksiyona girebilir, hatta hiç reaksiyona girmeyebilir (Prior vd., 2005, Huang vd., 2005, Magalhães vd., 2008; Albayrak vd., 2010).

Demir ve bakır gibi geçiş metal iyonları da canlı sistemde serbest radikal oluşturan güçlü birer oksidatif katalist olarak görev yapmaktadırlar. Biyolojik sistemlerde oksijen taşınması, ATP üretimi, DNA ve klorofil sentezinde önemli role sahip olan demirin serbest formları canlı hücrelerde toksik etki yapabilmektedir (Miller, 1996). Bu toksisite sonucunda oluşan aktif oksijen türleri lipid oksidasyonunu teşvik edebilmekte veya DNA moleküllerine saldırabilmektedir. Şelat oluşumu antioksidan savunma sistemine önemli katkıda bulunmakla birlikte, vücutta travma, toksinler, hastalık gibi çeşitli nedenlerle oksidatif reaksiyonları katalizleyebilen serbest metal iyon formlarına dönüşümler gerçekleşebilmektedir (Lindsay, 1996). Katarakt, ateroskleroz, diyabet gibi patolojik koşullar altında metal iyonlarının serbest ve zararlı formlarda bulunduğu dair güçlü kanıtlar bulunmaktadır (Lavelli vd., 2000).

Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan OH⁻, su dahil ortamda rastladığı her biyomolekülle difüzyon limiti hızı ile tepkimeye girer. Bu nedenle 10⁻⁹ saniyeden daha kısa bir ömre sahiptir. Hidroksil radikalının tepkimeleri başlıca:

- Elektron transfer tepkimeleri
- Hidrojen çıkarma tepkimeleri ve
- Katılma tepkimeleri şeklinde gerçekleşir.

Bütün bu tepkimeler, OH⁻'in paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır. Katılma tepkimeleri özellikle elektronca zengin moleküllerle (pürin ve pirimidin bazları, aromatik amino asitler gibi) gerçekleşir. Hidroksillenmiş bileşiklerin, örneğin 8 oksoguanin ve hidroksillenmiş aromatik amino asitlerin biyolojik örneklerde tayini, in vivo koşullarda OH⁻'in ne kadar üretildiği veya radyasyona ne kadar maruz kaldığı hakkında bilgi vermektedir (Kılınç ve Kılınç, 2002).

3.3. Bitkilerden Fitokimyasalların İzolasyonu

Bitkilerden alkoloid, amino asit, kinon ve terpenoid gibi maddelerin izolasyonu oldukça kolay yapılabilirken, bazı durumlarda istenilen maddenin bitkinin hücre duvarında olmasından ve izole edilmesi için mekanik uygulamalara gereksinim duyulmasından dolayı, bitkilerde bulunan fitokimyasalların izolasyonu oldukça zor olabilmektedir.

Bitki bileşiklerinin ayrıştırılması ve saflaştırılması için tek başına ya da birlikte kullanılan genellikle dört farklı kromatografi tekniği bulunmaktadır. Seçilecek teknikler, çoğunlukla çözünme özellikleri ve ayrışan bileşenlerin uçuculuğuna bağlı olarak değişmektedir. Bu teknikler:

- **Kağıt kromatografisi (PC);** karbohidrat, amino asit, nükleik asit, organik asit ve fenolik bileşikler gibi suda çözünebilir bitki bileşenlerinin belirlenmesinde kullanılır.

- **İnce kolon kromatografisi (TLC);** yağda çözünebilir lipitler, steroidler, karotenoidler ve basit kinon ve klorofil gibi bitki bileşenlerinin ayrışmasında kullanılır.

- **Gaz-sıvı kromatografisi (GLC);** yağ asitleri, mono ve seskuterpenler, hidrokarbon ve sülfür bileşikleri gibi uçuculuğu yüksek bitki içeriklerinin ayrışması ve izolasyonunda kullanılmaktadır.

- **Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC);** uçuculuğu az olan bileşikler için kullanılmaktadır.

Kromatografi yöntemlerinin yanında bitki bileşenlerinin ayrıştırılması ve saflaştırılmasında “**kapiler elektroforezis**” de kullanılan yöntemlerden bir tanesidir (Harborne, 1998).

Ekstraksiyon, standart prosedürler ile seçici çözügen kullanılarak bitki bileşenlerini tıbbi olarak aktif kısımlarından ayırmak anlamına gelmektedir. Bitkiden elde edilen ürünler; sıvıda, yarı katı olarak ya da çözügeni uçurularak toz haldeki metabolitlerin ilgili kompleks karışımlarıdır ve dahili (oral) ya da dıştan (harici) kullanım amacıyla kullanılmaktadırlar. Bu kompleks karışımlar; dekoksasyon, infüzyon, sıvı ekstrakt, tentür, hap (yarı katı) ekstrakt ya da toz ekstrakt olarak bilinmektedir. Bu şekilde hazırlanan preparatlar çoğunlukla ikinci yüzyılda yaşamış olan Yunan fizikçi Galen'in adından gelen “galenikal” olarak adlandırılmaktadırlar (Handa vd., 2008).

Ekstraksiyon metodları, seçici çözücüler kullanılarak, bitki dokularının tıbbi açıdan aktif kısımlarını inaktif/durağan bileşenlerden ayrılmasını kapsamaktadır. Ekstraksiyon sırasında çözücü, benzer polariteye sahip çözünebilir bileşiklere ve sert bitki materyaline difüze olmaktadır (Ncube vd., 2008). Toz ilaçlar için standardize edilmiş ekstraksiyon prosedürlerinin amacı, menstrum olarak bilinen seçici çözügenlerin kullanımıyla, istenmeyen maddelerin uzaklaştırılması ve terapötik olarak arzu edilen kısımların elde edilmesidir. Bu ürünler alkoloidler, glikozidler, terpenoidler, flavonoidler ve ligandlar gibi bir çok tıbbi bitki metabolitinin kompleks karışımlarını içermektedir (Handa vd., 2008).

Çözücülerle ekstraksiyon, bitki antioksidan içeriklerinin izolasyonunda sıklıkla kullanılan bir tekniktir. Polar çözücüler, polifenollerin bitki matriksinden kazanımında kullanılmaktadır. Sulu olarak kullanılan etanol, metanol, aseton ve etil asetat en çok kullanılan çözücülerdendir (Peschel vd., 2006). Metanol ve etanol daha çok besin olarak kullanılan bitkilerdeki antioksidan bileşiklerinin bitkiden kazanımında kullanılmaktadır. Etil asetat ise, fenolik bileşiklerin

eldesinde kullanılmaktadır (Abdille vd., 2005, Rehman vd., 2006, Peschel vd., 2006, Li vd., 2006).

Bir ekstraktın sekonder metabolit kompozisyonu ve miktarını etkileyecek olan farklı ekstraksiyon metodlarındaki farklılıklar; ekstraksiyon tipine, ekstraksiyon süresine, sıcaklığına, çözücünün niteliğine, çözücü konsantrasyonuna ve polaritesine bağlıdır (Ncube vd., 2008).

Genel tıbbi bitki ekstraksiyon teknikleri, maserasyon, infüzyon, perkolasyon, dijesyon, dekoksasyon, daimi sıcak ekstraksiyon (Soxhlet), fermentasyonla sulu alkolik ekstraksiyon, ters akıntı ekstraksiyonu, mikrodalga aracılı ekstraksiyon, ultrason ekstraksiyonu, süperkritik sıvı ekstraksiyon ve fitonik ekstraksiyonunu (hidroflorokarbon çözücülerle) içermektedir. Aromatik bitkiler için, hidrodistilasyon teknikleri (su distilasyonu, buhar distilasyonu, su ve buhar distilasyonu), distilasyonu takiben hidrolitik maserasyon, ekspresyon ve yağda bekletme metodları kullanılabilir (Handa vd., 2008).

Bir ekstraktın kalitesini etkileyen temel parametreler:

- Bitki kısımları
- Ekstraksiyon için kullanılan çözücü
- Ekstraksiyon prosedürü'dür.

Ekstrakte bitki fitokimyasallarının etkisi:

- Bitki materyalinin doğasına
- Orjinine
- İşleme derecesine
- Su içeriğine ve
- Parça büyüklüğüne bağlıdır.

Bitki bazlı doğal içerikler bitkinin aktif bileşenlerini içeren gövde, yaprak, çiçek, kök, meyve, tohum gibi kısımlarından elde edilebilmektedir. Bitkiler doğadan

rastgele ya da bulunduğu coğrafik bölgede halk hekimliğinde kullanımına bağlı olarak toplanmaktadır (Parekh vd., 2006). Sekonder bitki bileşenlerinin ekstraksiyonu için taze ya da kuru bitki materyali kaynak olarak kullanılmaktadır. Çoğu araştırmacı ekstraktın taze bitki materyalinden hazırlanması gerektiğini belirtmektedir. Ancak çoğu bitki kuru halde (ya da sulu ekstrakt olarak) geleneksel hekimlerce kullanılmaktadır ve farklı su içeriklerine bağlı olarak ekstraksiyon öncesi 40 °C'de 72 saat kurutulmaktadır.

Bitki ekstraksiyonunda iyi bir çözücünün özellikleri; düşük toksisite, düşük sıcaklıkta evaporasyon kolaylığı, ekstraktın hızlı fizyolojik absorpsiyonunu artırma, koruyucu etki ve ekstraktla kompleks oluşturmama ya da çözünmemesi'dir. Çözücü seçiminde etkilenen faktörler, ekstrakte edilen fitokimyasalların miktarı, ekstraksiyon oranı, farklı ekstrakte bileşenlerin ayrışması, ekstrakte inhibitör bileşenlerin ayrışması, ekstraktın daha sonraki kullanımının kolaylığı, biyolojik test sürecinde çözücünün toksisitesi ve ekstrakte edilen bitkinin sağlığa olan olası tehlikesidir (Eloff, 1998). Çözücü, kullanım amacına uygun olarak seçilmelidir. Çözücü kalıntı içereceği için zehirsiz olmalı ve biyolojik testlerde sorun çıkarmamalıdır (Ncube vd., 2008; Das vd., 2010).

3.4. Boraginaceae (Hodangiller) Familyasının Özellikleri

Boraginaceae – Hodangiller familyasına ait bitkiler, genellikle otsu, bazen çalimsı veya tırmanıcı bitkilerdir. Yapraklar basit, stipulsuz ve alternat'tır. Bitkinin gövdesi ve yaprakları genellikle sert, kaba tüylerle kaplıdır. Yapraklar alternat ya da nadiren karşılıklı, basit, syipulasızdır. Çiçekler skorpioid ya da helezoni kimozlarda ya da tirsus durumlarında, genellikle erdişi, ışınsal ya da nadiren zigomorf simetridir. Sepaller genellikle 5, serbest ya da kaidede birleşiktir. Petaller 5, birleşiktir. Stamenler 5, korollaya bağlıdır. Pistik 1, ovaryum üst durumlu, 4 (nadiren 2) lokuluslu, 2 karpelli, ovüller 4, anatrop, plasentasyon eksenseldir. Stilus genellikle ginobaziktir. Meyve nüks ya da nadiren drupa veya şizokarptır (http://www.ehow.com/about_4623603_heliotrope.html).

Dünyada 100 cins ve 2000 kadar türle tropikal, subtropikal ve ılıman bölgelerde yayılmış bir familyadır. Türkiye'de 34 cins ve 300'den fazla türü bulunmaktadır. Genellikle süs bitkisi olarak yetiştirilirler, sebze olarak kullanılırlar ve bu bitkilerden kırmızı boya elde edilir.

3.4.1. *Heliotropium* sp.

Heliotropium sp. Boraginaceae (Hodangiller) familyasına ait bir cins olup, yaz mevsiminin en kurak döneminde vejetasyon gösteren, bir veya iki yıllık çalı benzeri bitkiler olup, siğil otu olarak da isimlendirilmektedir. *Heliotropium* türleri, dünyada sıcak ve ılıman bölgelerde yayılış göstermektedir ve 220 civarında bilinen türü bulunmaktadır. Türkiye’de *H. circinatum*, *H. dolosum*, *H. hirsutissimum* gibi 14 farklı *Heliotropium* türü bulunmaktadır (http://www.ehow.com/about_4623603_heliotrope.html).

Kingdom: Plantae

Subkingdom: Tracheobionta

Division: Magnoliophyta

Class: Magnoliopsida

Subclass: Asteridae

Order: Lamiales

Family: Boraginaceae

Genus: *Heliotropium*

Species: *Heliotropium hirsutissimum* GRAUER

Ömür: Tek yıllık

Çiçeklenme: 5-10

Habitat: Tarlalar ve tarla kenarları, çorak yerler, çakıllı kenarlar

Yükseklik: 0-2200 m

Element: Doğu Akdeniz

Türkiye dağılımı: Türkiye

Genel Dağılımı: Bulgaristan, Yunanistan, Ege, Kuzey Afrika, Suriye, Filistin

Heliotropium türleri içerdikleri pirolizidin alkaloidleri sayesinde antitümör, antibakteriyel, antifungal, insektisit, antispazmodik, mutajenik, teratojenik ve hepatotoksik aktivite göstermektedirler (Tosun ve Tamer, 2004). *Heliotropium* türlerinin pirolizidin alkaloidlerinden olan heliotrine, europine (Jain ve Prohit, 1986, Jain ve Singh, 1998; Singh vd., 2002), heliotridine, lasiocarpine (Reina vd., 1995; Singh vd., 2002), subulacine, subulacine-N-oxide (Malik ve Rehman, 1988; Singh vd., 2002) (Pandey vd., 1983; Singh vd., 2002), monocrotaline, spectabiline ve senecionine bileşiklerini (Marquina vd., 1989; Singh vd., 2002) içermektedir. Hindistan'da yayılış gösteren *H. indicum*'un yaprak ekstralarının ülser, yara iyileşmesi, lokal inflamasyon, ürtiker, saçkıran, romatizma, ateşlenme, sedef hastalığı ve arı sokması gibi rahatsızlıklarda kullanıldığı bildirilmektedir (Das, 2011).

3.5. *Artemia salina* (Brine shrimp)

3.5.1. Organizmanın Özellikleri

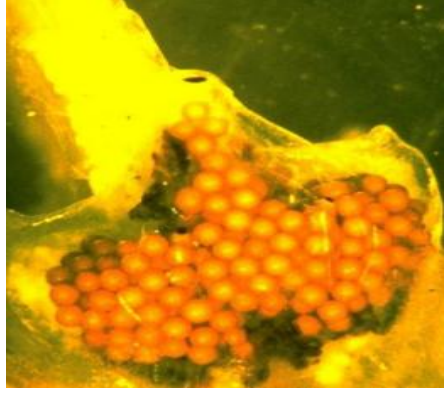
Artemia salina Crustacea alt şubesi, Branchiopoda sınıfı, Anostraca takımına bağlı primitif kabuklular arasında yer alan, doğada tropik ve ılıman bölgelerde 500'ün üzerinde doğal ve yapay tuz gölünde yaşayan bir kabuklu türüdür (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *Artemia salina* genel görünümü

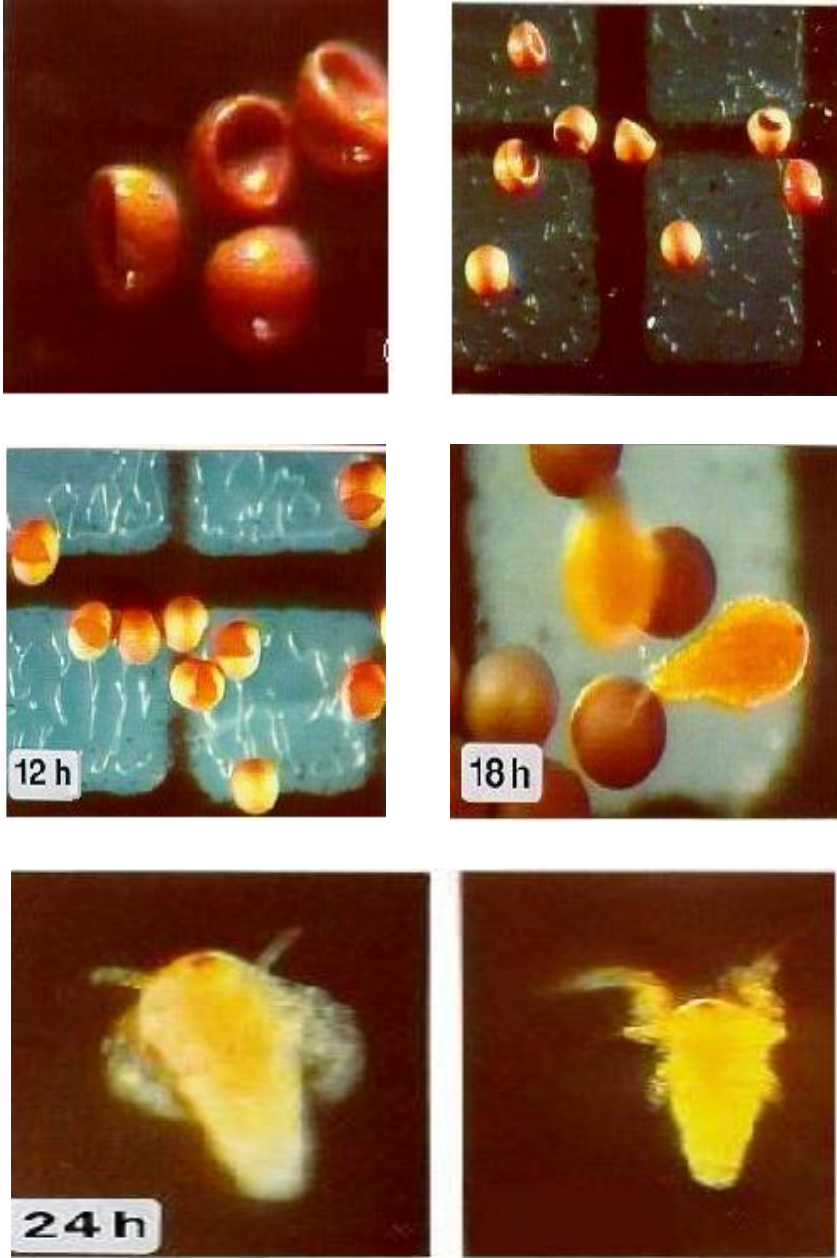
(http://www.hlasek.com/artemia_salina_bh0184.html, Erişim tarihi: 04.07.2013)

Ergin bireyleri %1 ile %235 tuzluluk ve 10-35 °C sıcaklık aralıklarında yaşayabilir. Böylesine geniş bir yaşam aralığına sahip olan bu zooplankton, su canlılarının üretilmesinde larva besleme aşamasında çok önemli bir yer almaktadır. *Artemia salina* su canlılarının, özellikle de balıkların kültür çalışmalarında 1920'den bu yana canlı yem olarak kullanılmaktadır. *Artemia*'nın yaşam devri boyunca dayanıklı yumurtalar (kistler) oluşturması, balık kültüründe kullanılmasındaki en önemli özelliktir (Anonim, 2008). Dünya genelinde 4000 ton civarında kuru *Artemia* yumurtası (kisti), 0.4 mm *A. salina* larvası (nauplii) üretiminde kullanılır. Dişi bireylerin bıraktığı kış yumurtaları suyunu kaybetmediği için, küreseldir. Olağanüstü koşullarda (çok yüksek tuzluluk ve çok düşük oksijen seviyesi vb) embriyo sadece gastrula evresine kadar gelişir ve etrafı yumurta kesesi etrafında bulunan bir bez tarafından salgılanan kalın bir kabukla çevrilir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Henüz olgunlaşmamış *Artemia* yumurtaları (Anonim, 2008)

Artemia kistleri yılın belli zamanlarında doğal ortamında su yüzeyinde yüzerken rüzgar ve dalgalar tarafından kıyıya atılır. Bu kistler metabolik olarak aktif değildirler ve gelişimlerine izin vermeden toplanıp kurutulurlar. Deniz suyuna karıştırıldıktan sonra, bikonkav şeklindeki kistler su alarak küreselleşir ve kabuk içindeki embriyo metabolizması kesintiye uğramadan devam eder ve 24 saat içinde *Artemia salina* larvaları (nauplii) çıkar ve kullanılabilir hale gelir. Bu yumurtalar yüksek tuzluluktaki sulara bırakıldığında su kaybeder ve büzüşürler. Su üzerinde yüzen bu kistler, kahverengi kitleler halinde suyun durgun bölgelerinde birikirler (Anonim, 2008) (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. *Artemia salina* gelişim evreleri
(<http://www.eeob.iastate.edu/faculty/DrewesC/htdocs/Artemph.jpg>, Erişim tarihi:
04.07.2013)

Uygun şartlarda yıkanan ve kurutulan yumurtaların ömrü, havası alınmış ambalajlarda 15 yıla kadar ulaşabilmektedir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Ticari olarak satılan *Artemia salina* yumurtaları

A. salina vitamin, yağ asitleri ve renk maddeleri (pigmentler) bakımından oldukça zengindir (Üren, 2011). *Artemia*'lar besin değeri ve kalitesi nedeniyle akvaryum balıkları, tatlısu balıkları ve deniz balıkları üretiminin larva besleme ve büyütme aşamasında en yoğun olarak kullanılan canlı yemdir (Anonim, 2008). Daha önceki yıllarda sazan ve akvaryum balıklarının beslenmesinde kullanılan *Artemia*, son yıllarda deniz balıkları ve karides yetiştiriciliğinde ikinci canlı yem olarak kullanılmaktadır. Deniz suyunda 24 saatlik inkübasyondan sonra, yumurtalardan çıkan larvalar (nauplii), çeşitli deniz ve tatlı su organizmaları için doğrudan besleyici bir canlı yem olarak verilebilir. Bunun nedeni çeşitli büyüklüklerdeki çok sayıda balık türünün ağız açıklıklarına uygun olmaları (350-400 mikron), vücutlarını çevreleyen dış kabuğun sindirim salgılarınca kolayca sindirilebilir olması ve besin içeriğinin özellikle protein yönünden çok zengin olmasıdır.

2008'de dünya genelinde *Artemia salina* nauplii'nin en fazla üretildiği yerler, ABD'deki "Büyük Tuz Gölü" (Great Salt Lake) ve San Francisco Körfezi'dir. Bunu dışında Çin, İran gibi ülkelerde belli oranlarda üretim yapabilmektedir. Ülkemizde ise İzmir Çamaltı Tuzlası'nda az da olsa *A. salina* yumurtası elde edilmektedir (Üren, 2011).

3.5.2. Brine-shrimp (*Artemia salina*) Lethality (BSL) Assay

Her yıl endüstriyel, ilaç, kozmetik ve gıda katkı maddesi olarak üretilen pek çok kimyasal madde bir yandan yaşamımız için avantaj sağlarken, bir yandan da daha çok kimyasal maddeye maruz kalmamıza neden olmaktadır. Bu maddeler az veya çok oranda toksik etki meydana getirebilmekte ve sağlığımız için tehlikeli sonuçlar oluşturabilmektedirler. Bu kimyasal maddelerin etkilerini bilmek ve onlarla toksik düzeyde teması önlemek, toksik etki oluşum riskini azaltmaktadır. Bu anlamda zararlı etkenlerden korunmak, olası riskleri belirlemek ve bilgilendirmek ve zehirlenmelerde yeni tedavi yaklaşımları geliştirmek toksikolojinin ilgi alanına girmektedir (ue.anadolu.edu.tr/eKitap/ECH207U.pdf, erişim tarihi: 05.09.2013).

Toksik etkiler, toksik madde ve/veya onların metabolitleri ile organizmanın belli yapıları arasındaki biyokimyasal etkileşim sonucunda meydana gelir. Bu toksik cevapların çoğu hücre ölümü ve kritik bir organın hasarı şeklinde olduğu gibi, hücre ölümüne neden olmayan, fakat normal fizyolojik süreçlerdeki biyokimyasal ve fizyolojik dengenin bozulması şeklinde de ortaya çıkabilir. Toksik maddeler ile meydana gelen etkiler eğer organizma bu maddeye düşük konsantrasyonda ve/veya kısa süre maruz kalmış ise, etki genelde geri dönüşümlüdür. İrreversibl (geri dönüşümsüz) toksik etkiler ise, maddeye daha uzun süre ve/veya daha yüksek konsantrasyonlarda maruziyet sonucu meydana gelir. Toksik maddelerin reversibl etkileri, maddeye maruziyet kesildikten sonra kaybolurken, irreversibl etkiler maruziyet dursa bile devam eder ve hatta ilerler. Karsinomalar, mutasyonlar, nöron hasarı ve karaciğer sirozu gibi etkiler, irreversibldir. Bazı etkiler ise, maddeyle maruziyet bittikten bir süre sonra yok olsa da, irreversibl olarak değerlendirilir. Reversibl etkiler; oksidatif fosforilasyonda azalma, ATP sentezinde azalma, protein sentezinde azalma, iyon konsantrasyon değişiklikleri ve su alımı sonucu hücresel şişme, steatozistir. İrreversibl etkiler; nekroz ve apoptoz gibi etkiler olabilir. Ksenobiyotikler, hem nekrotik hem de apoptotik hücre ölümünü, konsantrasyon, maruz kalma süresi, spesifik doku ve hücre tipine bağlı olarak tetikleyebilirler (ue.anadolu.edu.tr/eKitap/ECH207U.pdf, erişim tarihi: 05.09.2013).

Genel olarak toksisitesi araştırılacak bir kimyasal maddenin etkileri, hayvanlarda ve birden fazla türde in vivo olarak incelenir. Akut toksisitede mortalite testi, kronik toksisitede ise, dokulardaki patolojik incelemeler yapılır. Toksikolojide

akut toksisite deneyleri; ilaç, kozmetik, bitkisel ekstratlar, hijyenik maddeler ve çeşitli amaçla kullanılan diğer kimyasal maddelerin toksik etkilerini belirlemek için yapılmaktadır (ue.anadolu.edu.tr/eKitap/ECH207U.pdf, erişim tarihi: 05.09.2013).

Akut toksisite araştırılmasında, deney hayvanlarında tek dozla alınan cevap (etki) ilişkisi değerlendirilir. Doz, toksisiteyi belirleyen temel faktördür. En sık kullanılan akut toksisite testleri;

- Minimal Mortal Doz (MMD)
- Letal Doz 50 (LD₅₀)' dir.

1926 yılında Knaş-Lenz tarafından ortaya konan Minimal Mortal Doz (MMD), damar içi yolla sürekli ve yavaş akımla bir ilacın, hayvanın ölmesine kadar verilmesiyle elde edilir. Tavşan, kedi, köpek gibi hayvanlarda kolay uygulanabilir ve fizyolojik parametrelerdeki değişiklikler izlenebilir. Ancak çok sayıda hayvana uygulanmasının biyoistatistik zorunluluğu yanında, damar içi verilmesi nedeniyle kimyasal maddenin inert bir solvent içinde erimesi ve etkisini çabuk göstermesi gerekir. Hayvana enjekte edilen total sıvı hacmi dolaşım kapasitesini geçmemelidir. Bu nedenlerden ötürü fazla kullanılan bir akut toksisite yöntemi değildir (Dökmeci, 1994).

Bir maddenin ne kadar toksik olduğunu yani toksisite derecesini ifade etmek için, akut toksisite letalite birimi olan LD₅₀ ifadesi kullanılır. LD₅₀ kavramı ilk kez 1927 de Trevan tarafından bazı ilaç ve toksinlerin standardizasyonu ile ilgili olarak ortaya atılmıştır. LD₅₀ değerini etkileyen birçok bireysel (deney hayvanı ile ilgili) ve dış faktörler vardır. Ayrıca kesin sonuç almak için de çok sayıda deney hayvanlarına ihtiyaç vardır. Birçok nedenlerle, bugün akut toksisite testlerinde değişiklik yapma gereğini ileri süren birçok araştırıcı olmasına karşın, birçok durumlarda LD₅₀ tayinine ihtiyaç vardır. Bu nedenle doz-cevap ilişkisi ve semptomolojinin araştırılması bugün de toksikoloji ve farmakolojinin temelini oluşturmaktadır.

LD₅₀; solunum yolu dışında diğer tüm yollarla vücuda girerek etki gösteren katı veya sıvı haldeki kimyasal maddelerin belirli koşullarda bir kez verildiğinde bir gruptaki deney hayvanlarının % 50' sini öldüren dozunu ifade eder ve bu değer mg/kg olarak belirtilir. Ksenobiyotik vücuda hangi yol ile giriyorsa o yoldan

deney hayvanlarına uygulanması daha stabil LD₅₀ değeri elde edilmesine olanak sağlar. LD₅₀ değeri maddelerin toksik etki oluşturma potansiyellerini karşılaştırmayı sağlar ve bu ifade ile bir maddenin hangi dozlarda zararlı olduğunu anlamak mümkündür. Ancak LD₅₀, her zaman için bir kimyasal maddenin tüm toksisite veya zararlılık spektrumunu yansıtmayabilir. Toksisitesi düşük olan bazı kimyasal maddeler, akut toksisite göstermedikleri dozda karsinojenik veya teratojenik olabilir (ue.anadolu.edu.tr/eKitap/ECH207U.pdf, erişim tarihi: 05.09.2013) .

LC₅₀ (Letal Konsantrasyon 50): LC₅₀ solunum yolu ile vücuda girerek etkisini gösteren maddelerin akut toksisite ölçüsünü tanımlar. Belli koşullarda solunum yolu ile vücuda verildiğinde bir gruptaki deney hayvanlarının % 50'sini öldüren konsantrasyondur ve birim olarak ppm veya mg/mm³ olarak ifade edilir.

Kimyasal bir maddenin toksik dozu, ilaç ile zehir kavramını ayırmada da önemlidir. Fizyolojik bozuklukları düzeltmek, yani hastalıkları tedavi için kullanılan ilaç ancak belirli bir dozda (tedavi dozu: *dosis therapeutica*) verildiği zaman, beklenen biyolojik etkiyi gösterir. Ancak bu dozun üstüne çıkıldığında, ilacın toksik etkisi (toksik dozda) ve öldürücü etkisi (letal dozda) görülür. Her ilaç, belirli koşullarda -toksik etki- gösterdiği halde, her kimyasal (toksik) maddenin ilaç olamayacağı durumu da ilaç ile zehir arasındaki nitel farkı gösterir.

Kimyasal maddenin toksik etki göstermesinde doz önemlidir. Ancak yeterli bir faktör değildir, toksik etkinin görülmesinde, kimyasal maddenin organizmaya giriş yolu (oral, inhalasyon, deri yolu gibi) da aynı derecede önemlidir. Ayrıca toksik maddenin temasta olduğu biyolojik sistem (hücre, doku, organ ve tür düzeyinde) de önemlidir. Lewin (1854-1927) zehirleri "dışardan alındığı zaman, belirli koşullarda insanlarda zararlı etkileri ile hastalığa veya ölüme neden olan kimyasal maddelerdir" şeklinde tanımlayarak, kimyasal maddelerin ancak belirli koşullarda toksik etki göstereceğini belirtmiştir (ue.anadolu.edu.tr/eKitap/ECH207U.pdf, erişim tarihi: 05.09.2013) .

Bitkilerde bulunan fitokimyasalların biyolojik aktiviteleri ile bitki bileşiklerini taramak için geliştirilmiş basit biyo-testler, bitki ekstraktları için bir klavuz olarak kullanılabilir. Biyo-testlerin pratik kullanımında seçilecek olan canlı modelin yaşam döngüsünün herhangi bir aşamasının olası kontaminantlara karşı dayanıklı olması, kolay elde edilebilir olması ve kolay kültüre edilebilmesi

gerekmektedir (Wells, 1999). Bitkisel ilaçların olası advers (yan) etkilerinin hızlı sonuç veren bir belirteci olarak (*Artemia salina*) Brine Shrimp Lethality (BSLA) Assay, uygun bir test yöntemidir. Brine shrimp (*Artemia salina*), kültürünün kolay yapılabilmesi, kısa jenerasyon zamanı, kozmopolit yayılım ve ticari olarak dormant yumurtalarının elde edilebilmesi nedeniyle kısa süreli toksisite testi için bir test organizması olarak popülaritesini arttırmıştır (Persoone vd., 1989).

A. salina larvaları, memelilerle aynı pürin metabolizmasına sahip olduğundan antitümör aktiviteyle iyi bir korelasyon gösterse de ilaçların karaciğerdeki metabolik aktivasyon gereksinimi, *A. salina*'da karşılanamamaktadır (Sharififar vd., 2009). Bunun yanında *A. salina*'daki DNA-bağımlı RNA polimerazlar, memelilerdekine oldukça benzerdir (Solis vd., 1993, Mc Laughlin vd., 1998). *A. salina* larvaları, farklı mikotoksinlere karşı da geniş bir yelpazede duyarlılık gösterirler (Harwig ve Scott, 1971a).

BSLA, LD₅₀ düzeyinin tespitinde de kullanılan toksisite testlerindedir. Bu larvalar, günümüzde biyolojik aktiviteleri araştırılan örneklerin ve bitkisel içeriklerin sitotoksitesinin belirlenmesinde etkili bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Sharififar vd., 2009). Ayrıca fungal toksinlerin, ağır metallerin, cyanobacteria toksinlerinin, pestisitlerin ve diş hekimliğinde kullanılan bazı maddelerin, sitotoksik etkilerinin araştırılmasında kullanılmaktadır (Harwing ve Scott, 1971b; Solis vd, 1993; Martinez vd 1998; Jaki vd, 1999; Barahona ve Sacher-fortun, 1999; Pelka vd, 2000; Gürkan vd, 2000; Uğur vd, 2000, Ulusoylu vd 2001). Bunlara ek olarak, embriyonel gelişim sürecini etkileyen teratojen maddelerin (Sleet ve Brendel, 1983) organofosfor insektisitlerin (Sanchez-fortun vd, 1996) ve zirai amaca yönelik olarak oldukça sık kullanılan birçok antibiyotiğin, toksisite düzeylerinin tespitinde de kullanılmaktadır (Solis vd. 1993; Migliore vd, 1997).

4. KAYNAK ÖZETLERİ

Eloff (1998), *Anthocleista grandiflora* ve *Combretum erythophyllum*'un yaprak kısımlarından aseton, etanol, metilendiklorid (MDK), metanol/kloroform/su (MKS) ve 1-10 V/V oranlarında sulu ekstrelerini elde etmiştir. Ekstrelerin içeriğindeki bileşikleri ayırmada ve miktarını belirlemede ince kolon kromatografisini kullanmıştır. Biyo-otografi yöntemiyle ekstrelerin *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterileri üzerinde antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu gözlemlemiştir. Ekstrakt veriminin sırasıyla MKS, etanol, metanol, MDK, su ve aseton şeklinde olduğunu; ekstraksiyon oranının ise MDK ve aseton diğerlerine göre yüksek olduğunu belirlemiştir. Bakteriler üzerinde yapılan biyo-testte en aktif ekstrenin MKS olduğunu görmüş ve bunu solventin farklı hidrofilik, lipofilik, uçuculuk vb. özelliklere sahip çözücülerden oluşmasına bağlamıştır. Asetonun ise, yüksek hidrofilik çözen olma özelliği nedeniyle, metanol, etanol ve suya tercih edilebileceğini ileri sürmüştür.

Goffin vd. (2003), *Tithonia diversifolia*'nın toprak üstü, yaprak, çiçek ve gövde kısımlarının her bir için dietil eter, diklorometan, metanol ve sulu ekstraktları (dekoksasyon) elde etmişlerdir. Tagitin C saflaştırması için seskuiterpen lakton mobil fazını kullanarak HPLC analizini gerçekleştirmişlerdir. Tagitin C'nin eldesinde en yüksek ekstre veriminin dietil eter yaprak ekstresinde (% 30.85) bulunduğunu saptamışlardır. Tagitin C miktarının bitkinin toprak üstü kısımları için, dietil eter ekstresinde (Kasım % 30.53; Temmuz, % 31.30); diklorometan ekstresinde % 0.492, metanol ekstresinde % 1.987, sulu (dekoksasyon) ekstrede % 0.492; çiçek kısımları için; dietil eter ekstresinde % 5.080 ve gövde kısmında ise; dietil eter ekstresinde % 0.060 olduğunu gözlemlemiştir.

Dorman vd. (2003), Lamiaceae familyasından *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* ve *Thymus vulgaris*'in sulu ekstrelerinde, ekstre veriminin *O. vulgare*'de % 36, *R. officinalis*'te % 24, *S. officinalis*'te % 25 ve *T. vulgaris*'te % 29 olduğunu belirlemişlerdir. Ekstrelerin toplam fenolik içeriğinin ise yukarıdaki sıralamaya göre 149, 185, 166 ve 95,6 mg olduğunu saptamışlar ve bu içeriklerin tümüne baktıklarında en fazla bulunan bileşiğin Rosmarinic asit olduğunu tespit etmişlerdir. Ekstrelerin indirgeme kapasitesini belirleme amacıyla Fe(III)'ten Fe(II)'ye indirgeme testini uygulamışlar ve en yüksek indirgeme aktivitesini *S. officinalis* ve *R. officinalis*'in gösterdiğini ve onları takiben *O.*

vulgare 'nin, en düşük aktiviteyi ise, *T. vulgaris*'in gösterdiğini rapor etmişlerdir. Uygulanan serbest radikali süpürme aktivite testlerinden DPPH ve ABTS'nin ve LDL oksidasyonun *ex vivo* ortamda inhibisyon testlerinde, Fe indirgeme testi sonuçlarına paralel sonuçların ortaya çıktığını belirtmişlerdir.

Ljubuncic vd. (2005), *Asphodelus microcarpus* (soğan ve kök), *Ecbalium elaterium* (meyve), *Eryngium creticum* (yaprak ve gövde), *Mercurialis annua* (yaprak), *Pistacia lentiscus* (yaprak ve tomurcuk), *Rhamnus alaternus* (yaprak), *Teucrium polium* (yaprak ve gövde) ve *Urtica pilulifera* (yaprak ve gövde) bitkilerinin su ekstralarını elde etmişlerdir. Bu sekiz bitkiden elde edilen ekstraların antioksidan kapasitesini belirlemek amacıyla, sıçan karaciğer homojenatında Fe⁺² tetikli lipid peroksidasyonunu belirleyen tiyobarbitürik asit reaktif madde testini (TBARS) uygulamışlardır ve istatistiksel açıdan lipid peroksidasyonunu engelleyici aktivitenin kayda değer olmadığını görmüşlerdir (*Mercurialis annua* 'da maksimum %79). Denemelerde bu yedi bitkiden elde edilen ekstraların PC12 (sıçan feokromositosması) ve HepG2 (insan hepatoblastoması) hücre hatları üzerinde hücre bütünlüğü araştırmak ve sitotoksik etkinliğinin belirlenmesi amacıyla MTT ve LDH (laktat dehidrogenaz) test yöntemlerini kullanmışlardır. Sonuç olarak *E. elaterium* (1 mg/mL) ve *P. lentiscus* (0,5 ve 1 mg/mL) haricinde hiçbir ekstrenin mitokondriyal respirasyonu inhibe etmediğini ve LDH eksikliğine neden olmadığını dolayısı ile, tıbbi olarak kullanılan bu bitkilerin halk arasındaki kullanım şekli ve konsantrasyona bağlı olarak, bir tehlike oluşturmadığını ileri sürmüşlerdir.

Rehman (2006), meyve işleme endüstrisinden alınan turuncgil kabuklarından etanol (% 11,00), metanol (% 19,87), aseton (% 15,00), hekzan (% 9,12), petrol eteri (% 7,88) ve dietil eter (% 12,75) ekstraksiyonlarını elde etmiştir. Araştırmacı rafine edilmiş mısır yağını 6 aylık bir otooksidasyon periyoduna bırakmış ve serbest yağ asitleri (FFA), peroksit değeri (POV) ile iyodin değerlerini hesaplamıştır. Kontrol grubu olarak da sentetik olarak kullanılan bütillenmiş hidroksitoluen ve bütillenmiş hidroksianizolu kullanmıştır. Elde ettiği ekstraların, kontrole göre 8-10 kat daha etkili olduğunu bulmuştur ve yapay antioksidanların yerine kullanılabileceklerini ileri sürmüştür.

Peschel vd. (2006), endüstriyel olarak kullanılan *Malus sp.* (elma), *Fragaria sp.* (çilek), *Pyrus sp.* (armut) ve *Beta vulgaris*'in (pancar) meyve suyu üretiminden arta kalan kısımlarını, *Asparagus officinalis* (kuşkonmaz), *Cynara scolymus*'un

(enginar) konserve üretiminden arta kalan kısımlarını, *Brassica oleracea* ssp. (brokoli), *Cucumis sativus* (salatalık), *Cichorium endivia* (hindiba) ve *Cichorium intybus*'un (beyaz hindiba) hasatından arta kalan kısımları ve tıbbi bitki olarak kullanılan *Solidago virgaurea* (altın başak) ve *Isatis tinctoria*'nın (çivitotu) birincil kullanılan kısımlarını, ilk olarak 2 aşamalı ekstraksiyon (1.ekstraksiyon: metanol, etanol, su, aseton ve hekzan ve CO₂ basınçlı ekstraksiyonu, 2.ekstraksiyon: %50 metanol/su ve %80 aseton/su ekstraksiyonu) ve su/butanol ve su/butanon fraksiyonlamasına tabi tutmuşlardır. Her bir ekstraksiyon aşamasında ekstrelerin, Folin Ciocalteu metoduyla toplam fenol içeriğini, neotetrazolium ajanı kullanılarak süperoksit radikali süpürme aktivitesini, Ferrotiyosiyonat (FTC) kullanılarak linoleik asit sistemde antioksidan aktivitesini, DPPH metoduyla serbest radikal süpürme aktivitesini, Tiyobarbiturik asit (TBA) kullanılarak FeCl₂/H₂O₂ ile uyarılmış linoleik asit peroksidasyonu inhibisyonu araştırmışlardır. Sonuç olarak endüstriyel gıda üretimi atıklarının gıdalar için antioksidan kaynağı olarak olmasa da, kozmetik ürünlerde kullanılabileceği sonucuna ulaşmışlardır.

Çelik ve Aslantürk (2007), *Lavandula stoechas*'ın çiçek kısımlarından infüzyon ekstresi elde etmiş ve bu ekstrenin *Allium cepa* kök meristemi hücreleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkilerini incelemişlerdir. 40, 80 ve 120 g/L'lik konsantrasyonlarda denenen infüzyon ekstresinin *Allium cepa* kök meristem hücrelerinde sitotoksik ve genotoksik aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

Çelik ve Aslantürk (2009), *Ecballium elaterium*'un meyve kısımlarından farklı konsantrasyonlarda (10 mL/L, 20 mL/L ve 50 mL/L) elde ettikleri su ekstresinin soğan kök meristemi üzerindeki genotoksik ve sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla Allium Test yöntemini kullanmışlardır. Sonuçta, *E. elaterium*'un su ekstresinin konsantrasyon artışına bağlı olarak, kök büyümesi üzerinde önemli ölçüde inhibisyona neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Sitotoksik seviyenin ölçülmesinde mitotik indeksi kullanmışlar ve ekstre konsantrasyonu artışına bağlı olarak, mitotik indekste önemli bir düşüş gerçekleştiğini, özellikle seyreltilmemiş *E. elaterium* meyve suyu ekstrelerinin bölünmeyi tamamen durdurduğunu belirlemişlerdir. Genotoksik etkinin belirlenmesinde kromozom aberasyonları değerlendirilmiş ve yine ekstre konsantrasyonuna bağlı olarak, kontrol gruplarına göre önemli ölçüde kırk oluşumu, yapışma, yanlış kutuplaşma ve mikronükleus oluşumu gibi aberasyonların meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak tıbbi bitkilerin olası toksik etkilerinin araştırılmasının, halk sağlığını korumada önemli bir ölçüt olduğunun üzerine dikkat çekmişlerdir.

Ravishankara vd. (2002), *Hemidesmus indicus*'un kök kabuğu kısımlarından elde ettikleri metanol ekstreslerinde bulunması muhtemel olan fenollerin, taninlerin, steroid ve terpenoidlerin, alkaloidlerin, antrakinonların ve flavonoidlerin varlığını tayin etmede fitokimyasal tarama yöntemini kullanmışlardır. Bitkinin metanol ekstresinde en yüksek miktarda bulunan fitokimyasal içeriklerin, fenolikler ve taninlerin olduğunu tespit etmişlerdir. Toplam fenol içeriğinin tayininde Folin Ciocalteu metodunu ve toplam fenol içeriğinin bant profillerini oluşturmada da TLC finger print profile yöntemini kullanmışlardır. Metanol ekstresinin etkinliğinin DPPH için 18.87 µg/mL, süperoksit radikali süpürme aktivitesi için 19,9 µg/mL, nitrik oksit süpürme aktivitesi için 188 µg/mL, ferrik ADP ve askorbatla lipid peroksidasyonu tetiklenmiş fare karaciğer preparatında 43.8 µg/mL olduğunu gözlemlemişlerdir. *Hemidesmus indicus*'un antioksidan aktivitesinin özellikle tanin ve hemidesmin 1 ve 2 ve de 2-hidroksi-4-metoksi benzoik asit gibi fenolik bileşiklerin varlığından kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir.

Li vd. (2006), nar kabuğu ve özünden etanol/metanol/aseton ekstraksiyonu yapmışlardır. Antioksidanların ekstraksiyonunu daha etkili kıldığını düşünerek, farklı tipte çözücülerini kullanmışlardır. Toplam fenol içeriğinin tayininde Folin Ciocalteu yöntemini, flavonoid, proantosyanidin ve askorbik asidin tayininde kolorimetrik fitokimyasal tarama yöntemlerini, antioksidan aktivite ve radikal süpürme aktivitesini belirlemede FRAP (demir indirgeyici antioksidan gücü), süperoksit radikali süpürme, hidroksil radikali engelleme, peroksil radikali süpürme (ORAC testi) yöntemlerini kullanmışlar ve ayrıca düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonunun, inhibisyon aktivitelerini ölçmüşlerdir. Sonuç olarak, bitkinin kabuk ve öz kısımları içeriklerinin hem nicelik hem de nitelik bakımından ayrımsal farklara sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Seçilen farklı tipteki antioksidan aktivite, kapasite ve radikal süpürme aktivitelerinde yöntemleri sonucunda elde ettikleri veriler, kabuk ekstresinin diğer ekstreye göre 10 kat daha etkili olduğunu, bunun nedeninin de kabuk ekstresinin öz ekstresine göre flavonoid ve proantosyanidin içeriği bakımından daha zengin olmasından kaynaklandığını rapor etmişlerdir.

Pooja vd. (2010), *Dalbergia sissoo* köklerinden sırasıyla metanol ve petrol eteri ekstrelerini elde etmişlerdir. Ekstrelerin flavonoid ve tanin içeriğini saptamak amacıyla standart olarak rutin kullanıldığı, kalitatif fitokimyasal analiz yöntemlerini kullanmışlardır. Antioksidan aktivitenin belirlenmesi amacıyla, nitrik oksit radikali inhibisyonu ve hidrojen peroksit süpürme aktivitesini belirleme

yöntemlerini kullanmışlardır. Kalitatif fitokimyasal tarama sonuçlarına göre *D. sissoo*'da flavonoid, tanin ve fenollerin olduğunu saptamışlardır. 16-250 µL/mL arasındaki farklı konsantrasyonlarda denenilen ekstrelerin hidrojen peroksit süpürme aktivitesinin ortalama değerlerde olduğunu ancak, nitrik oksit radikali inhibisyonunun yüksek oranda gerçekleştiğini rapor etmişlerdir.

Rahman vd. (2011), *Heliotropium indicum*'un toprak üstü kısımlarından elde ettikleri metanol ekstresinde fitokimyasal tarama yöntemiyle ekstrede alkaloid, steroid, flavonoid, saponin ve tanenlerin varlığını tespit etmişlerdir. Antinosiseptif aktiviteyi belirlemek amacıyla, farelerde asetik asit tetikli yangı inhibisyonunu incelemişlerdir. Pozitif kontrol olarak diklofenak bileşiğinin kullanıldığı testte, ekstrenin 500 mg/kg dozda %64,67'lik yangı inhibisyonu gösterdiğini ve bu etkinin diklofenak ile karşılaştırıldığında önemli olduğunu ileri sürmüşlerdir (p<0,05). Bitkinin sitotoksik aktivitesini belirlemek amacıyla da Brine Shrimp Lethality Assay yöntemini kullanmışlardır. Sonuçta, metanol ekstresinin LC₅₀ değerinin 47,86 µg/mL ve LC₉₀ değerinin 75,85 µg/mL olduğunu saptamışlardır.

Bolivar vd. (2011), *Gallium mexicanum*'dan fraksiyonlu olarak sırasıyla n-hekzan, kloroform ve metanol ekstrelerini elde etmiştir. Kloroform ekstresinin fitokimyasal içerik taramasında, triterpen, saponin, flavonoid, seskiterpen lakton ve glukozidlerin varlığını gözlemlenmişken, taninlerin bulunmadığı görülmüştür. Ekstrelerin (metanol, kloroform ve altı diğer fraksiyonda) özellikle kullanılan Gram (+) bakteri suşlarında etkili olduğunu, HE 5, ME 13-15 ve ME 40-41 fraksiyonlarının *Trichophyton rubrum* ve HE 14b ve ME 13-15 fraksiyonlarının *Candida albicans*'ı inhibe ederek antifungal aktivite gösterdiğini ancak ekstrelerin hiç birinin *Aspergillus fumigatus*'a karşı aktivite göstermediğini belirlemişlerdir. HE 5 ve HE 14b fraksiyonlarının ise, *Leishmania donovani*'ye karşı antiparazitik etki gösterdiğini belirlemiştir. Ekstrelerin sitotoksik aktivitesi, THP-1 monosit hücre hatlarında incelenmiş ve HE 5, ME 13-15 ve ME 40-41 haricindeki fraksiyonların % 75'ten daha fazla sitotoksik etki gösterdiği; HE 5 ve ME 13-15 fraksiyonlarının IL-6 sekresyonun %50-%90 seviyelerinde azaltarak antienflamatuar etki gösterdiği belirtilmiştir. Araştırmacılar, araştırmadan elde edilen veriler sonucunda halk hekimliğinde sıkça kullanılan *G. mexicanum*'un özellikle, antiparazitik ve antienflamatuar etkisinin yüksek olduğunu rapor etmişlerdir.

Lavelli vd. (2000), taze ve ısıya maruz bırakmış *Lycopersicon esculantum* Rita ve *Lycopersican esculantum* Cencara varyetelerinin (ticari domates) hidrofilik ve

lipofilik antioksidan içeriğini belirleyebilmek için, fosfat tamponu ekstraksiyonu (pH: 3.0 ve 7.4) ve petrol eteri fraksiyonunu takiben tetrahidrofuran ekstraksiyonu yapmışlardır. Ekstrelerin karotenoid ve askorbik asit analizini spektrofotometrik ve elektrokimyasal dedektörlerle HPLC’de yapmışlardır. Ekstrelerin toplam fenol içeriğinin tayininde Folin Ciocalteu yöntemini, antioksidan aktiviteyi belirlemede ise, ksantin oksidaz/ksantin, myeloperoksidaz/NaCl/H₂O₂ ve linoleik asit/CuSO₄ model sistemlerini kullanmışlardır. Sonuç olarak iki varyete arasında toplam fenol içeriği ve antioksidan aktivite bakımından istatistiksel olarak kayda değer farkların bulunmadığını, ekstrelerin hidrofilik antioksidanlarının ve ısıtma işlem görmüş formunun, taze formuna göre daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

Miliauskas vd. (2004), tıbbi ve aromatik bitkiler grubu içerisinde yer alan, *Salvia officinalis*, *Salvia sclarea*, *Salvia glutinosa*, *Salvia pratensis*, *Lavandula angustifolia*, *Calendula officinalis*, *Matricaria recutita*, *Echinacea purpurea*, *Rhaponticum carthamoides*, *Juglans regia*, *Melilotus officinalis*, *Geranium macrorrhizum* ve *Potentilla fruticosa* bitkilerinin aseton, etil asetat ve metanol ekstrelerini elde etmişlerdir. Antioksidan aktivitenin belirlenmesi amacıyla DPPH radikali süpürme aktivitesi ve ABTS radikal katyonu dekolizasyonu yöntemlerini kullanmışlardır. DPPH ve ABTS testleri sonuçlarının yüksek kolerasyon gösterdiğini ancak ekstrelerin özellikle ABTS katyonunu süpürmede daha etkin olduklarını gözlemlemişlerdir. Ayrıca antioksidan aktivitenin en yüksek görüldüğü ekstrenin, *Echinacea purpurea* hariç metanol ekstresi olduğunu gözlemlemişlerdir. Ekstrelerin toplam fenolik, flavonoid ve flavonol içeriğinin belirlenmesinde sırasıyla Folin-Ciocalteu, Pharmacopeia ve Yermakov yöntemlerini kullanmışlardır. Denemeler sonucunda, en yüksek fenolik ve flavonoid içeriğe *Geranium macrorrhizum*’un (% 25.9 ve % 13.8), en yüksek flavonol içeriğine ise *G. macrorrhizum* ve *S. Glutinosa*’nın sahip olduğunu ve *G. macrorrhizum* ve *P. fruticosa*’nın yüksek antioksidan aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Abdille vd. (2005), *Dillenia indica*’nın meyve kısımlarından elde ettikleri etil asetat, metanol ve su ekstrelerinin toplam fenolik içeriğini Folin Ciocalteu yöntemi ile, antioksidan kapasitesini fosfomolibdenum yöntemi ve β -karoten-linoleat model sistemini kullanarak ve ekstrelerin serbest radikal süpürme aktivitesini de DPPH yöntemi ile belirlemişlerdir. *D.indica*’dan elde ettikleri ekstrelerin veriminin sırası ile metanol (% 21,5), etil asetat (% 4.9) ve su ekstreleri (% 4.3)

şeklinde olduğunu tespit etmişlerdir. Antioksidan aktivite, toplam fenol içeriği ve radikal süpürme aktivitesi bakımından da sırasıyla metanol, etil asetat ve su ekstrahelerin etkili olduklarını gözlemlemişlerdir. Fenolik içerik ve antioksidan aktivite arasında pozitif korelasyon olduğunu saptamışlardır. Bu nedenle de *D. indica* meyvesinin, antioksidan fenolikleri bakımından iyi bir kaynak olduğu düşünülmüştür ve in vivo çalışmalar için bu bileşiklerin izolasyonu ve tanılmasının, mekanizmalarının anlaşılması bakımından önemli olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Asjad vd. (2012), Unani sistem olarak bilinen alternatif tıp yönteminde, karaciğer hastalığı ve epilepsi gibi rahatsızlıklarda kullanılan Habbe Sara ilacının serbest radikal süpürme aktivitesi ve metal şelatlama aktivitesi üzerinden antioksidan aktivite tayinini gerçekleştirmişlerdir. Sonuç olarak; Habbe Sara'nın gerçekten de anti-epileptik ve antioksidan aktivite gösterdiğini, serbest radikal oluşumunu azalttığını ve dolayısıyla sinirsel hasarı engelleyebileceğini rapor etmişlerdir.

Brand-Williams vd. (1995), antioksidan aktiviteyi belirlemek için 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl'i (DPPH) kullanmışlardır. Antiradikal aktiviteyi belirlemede antioksidan özelliği olduğu bilinen fenol, BHT, BHA, p-kumarik asit, vanilin, vanilik asit, izogenol, ferülik asit, eugenol, zingeron, guaiacol, protocatehuic asit, kafeik asit, gallik asit ve gentisik asit bileşiklerini kullanmışlardır. Kullanılan bileşiklerin antiradikal gücünü belirlerken, bileşiklerin 3 farklı kinetik aktivite gösterdiklerini ve bunun zamana bağlı olarak çok hızlı (1 dakika), orta hızda (5-30 dakika) ve yavaş hızda (1-6 saat) kararlı duruma geçiş gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Bunun yanında aktivite hızı ile antiradikal güç arasında doğrudan bir korelasyon olmadığını, dolayısıyla zamana bağlı olarak etki gösteren (yavaş hızda) bazı bileşiklerin, hızlı aktivite gösteren bileşiklere göre daha etkin olduğunu rapor etmişlerdir.

Das (2011), *Heliotropium indicum*'un yaprak kısımlarından petrol eteri, kloroform, metanol ve su ekstrahelerini elde etmiştir. Üç farklı konsantrasyonda hazırlanan (100 µg/mL, 200 µg/mL, 300 µg/mL) bitki ekstrahelerinin her birinin antibakteriyel aktivitelerinin belirlenebilmesi için; iki Gram (-) bakteri (*Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*) ve iki Gram (+) bakteri (*Staphylococcus aureus* ve *Bacillus subtilis*) kullanarak disk difüzyon testi yapmışlar ve denemeler, 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Sonuçta, doza bağlı olarak ekstrahelerin antibakteriyel etkisinin arttığını gözlemlemiştir. Oluşturduğu

inhibisyon zonun çapına göre antibakteriyel etkinlik sırasının; metanol, petrol eteri, sulu ve kloroform ekstresi olduğunu belirlemiş ve *H. indicum* ekstrelerinin gösterdiği antibakteriyel etkiye bağlı olarak, içerdiği doğal ajanların izolasyonu ve tanılanması için ileride yapılacak çalışmaların önemli olduğunu belirtmiştir.

Lee vd. (2004), *Platycodon grandiflorum*'un kök kısımlarından petrol eteri ekstresini ve 5 fraksiyonlu ekstrelerini elde etmişlerdir. Ekstre verimi bakımından fraksiyonlardan F1'in (% 33), F2'in (% 11), F3'in (% 26), F4'in (% 5) ve F5'in (% 2) olduğunu tespit etmişlerdir. Lipit peroksidasyonunun belirlenmesi amacıyla, Ferrik tiyosiyonat yöntemini (FTC) ve Tiyobarbitürik asit yöntemini (TBA), serbest radikal süpürme aktivitesini belirlemek amacıyla da DPPH yöntemini kullanmışlardır. FTC ve TBA test sistemlerine göre lipit peroksidasyonu aktivitesi için fraksiyon sırasının 2>5>4>3>1 olduğunu, DPPH süpürme aktivitesi için ise fraksiyon sırasının 2>3>5>1>4 olduğunu, toplam fenolik içerik bakımından fraksiyonların sıralamasının ise 2>5>4>3>1 olduğunu belirlemişlerdir. Ekstrelerin Sitotoksik etkinliğinin belirlenmesi amacıyla HT-29, Hep-G2 ve HRT-18 hücre hatlarıyla yapılan MTT yöntemi sonucunda, en fazla sitotoksik etkinin 2 ve 3. fraksiyonlarda olduğunu ve F1'in özellikle negatif etki yaparak proliferasyonu arttırdığını saptamışlardır.

Tosun ve Tamer (2004), *Heliotropium europaeum*'un tohumlarından alkoloid eldesi için ilki % 25'lik amonyak (pH 10.5) ve ikincisi çinko tozuyla indirgenmiş % 25'lik amonyakla (pH 10.5) diklorometanda ekstrakte edilmiş iki fraksiyon elde etmişlerdir. GC-MS analiziyle tohumlardan toplam % 0.28 ve % 0.02'lik prolizidin alkoloidlerinin eldesini gerçekleştirmişlerdir ve *H.europaeum*'dan elde edilen alkoloidlerin % 92.86'sının N-oksitler olduğunu rapor etmişlerdir.

Artemia salina'nın kullanıldığı bazı akuatik toksisite testleri ile, rodentlerin (fare veya rat) kullanıldığı toksisite testleri arasında bir korelasyon olup olmadığını anlamak üzere bazı çalışmalar yapılmış ve mit verici sonuçlar elde edilmiştir. Her iki testten elde edilen LD₅₀ değerleri, aynı kimyasalların insanlar için geçerli olan akut oral letalite verileriyle kıyaslandığında, sonuçlar arasında genellikle iyi bir korelasyon olduğu gözlenmiştir. Benzer olarak, bu kimyasalların, oral akut toksisite potansiyellerinin test edilip, insanlar için geçerli olan akut dozlarla kıyaslandığında; akuatik testlerin, rodent testlerine nispeten biraz daha iyi sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Ancak akuatik toksisite testlerinin, suda çözünebilir maddelerin toksisite değerlerinin saptanmasında daha uygun olduğuna da

değnilmiştir (Calleja ve Persoone, 1992; Lagarto vd, 2001). Yine başka bir çalışmada ise, *Artemia salina* ile yapılan bu testin modifiye edilmiş şekli ile alınan sonuçlar, memeli hücre kültürleri ile yapılan toksisite testlerinde alınan sonuçlarla karşılaştırılmış ve birbiriyle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir (Lewan vd., 1992). Bütün bu veriler göz önüne alındığında toksik maddelerin in-vivo olarak *A. salina* larvalarına olan öldürücü etkisi, hızlı ve basit bir yöntem olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır (Choundhary ve Thomsen, 2001).

Kıvçak ve Akay (2002), *Pistacia lentiscus*, *Pistacia lentiscus* var *chia* ve *Pistacia terebinthus* bitkilerinden *n*-hekzan, metanol, etanol, etil asetat ve su (infüzyon) ekstrelerini elde etmişlerdir. Bu ekstrelerin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla Brine Shrimp Lethality Assay yöntemini kullanmışlardır. Sonuçta kullanılan üç bitkinin *n*-hekzan, etanol ve metanol ekstrelerinin sitotoksik aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Pour ve Sasidharan (2011), *Lantana camara*'nın kök, gövde, yaprak, çiçek ve meyve kısımlarından metanol ekstrelerini elde etmişlerdir. Bitkinin sitotoksik etkisini belirleyebilmek amacıyla Brine Shrimp Lethality Assay yöntemini kullanmışlardır. Çalışmada negatif kontrol olarak vitamin C ve referans kontrol olarak da kloramfenikol bileşiğinin kullanıldığı yöntemde, en yüksek sitotoksik aktiviteyi (940,7 µg/mL) bitkinin köklerinden elde edilen ekstrelerin gösterdiğini belirlemişlerdir Kök ekstrelerini takiben sırasıyla yaprak, çiçek, meyve ve gövde ekstrelerinin sitotoksik aktivite gösterdiğini saptamışlardır. Vitamin C'nin (221,7 µg/mL) ve kloramfenikol bileşiğinin (748,1 µg/mL) kullanılan tüm ekstrelere göre (p<0,05) daha yüksek seviyede sitotoksik aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Köklerden elde edilen ekstrelerin sitotoksik aktivitesi göz önüne alındığında olası antikanser fitokimyasal içeriklerini barındırabileceğini ve bu ekstrelerinin üzerinde çalışılması gerektiği konusuna dikkat çekmişlerdir.

Erdoğan (2009), *Fumaria densiflora* DC. ve *Fumaria officinalis* L. bitkilerinden hekzan, etil asetat, etanol, metanol ve su (infüzyon) ekstrelerini elde etmiş ve ekstrelerin toksik etkilerini, Brine Shrimp Lethality Assay yöntemiyle değerlendirmiştir. *F. densiflora*'nın etil asetat ve *F. officinalis*'nin hekzan ekstreleri *Artemia* larvalarına karşı sitotoksik etki gösterirken (LC₅₀<1000), su ekstrelerinin hiçbir sitotoksik etki göstermediği saptanmıştır.

Moshi vd. (2009), Diklorometan, etanol ve etil asetat ekstraksiyonları yapılan *Canarium schweinfurthii*, *Dissotis brazzae*, *Iboza urticifolia*, *Isoglosa lacteal*, *Strombosia scheffleri* ve *Whitfieldia elongata*'nın antibakteriyel aktivitesini mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemleri ile, bitkilerin akut toksisitesini de Brine Shrimp Lethality Assay yöntemiyle araştırmışlardır. Her iki antibakteriyel test sisteminde de diklorometan ekstresinin antibakteriyel aktivitesi, etanol ekstresine göre yüksek olmuştur. Brine shrimp larvalarına uygulanan ekstrelerin LC₅₀ değerlerine bakıldığında (*Dissotis brazzae* ve *Strombosia scheffleri*'nin etanol ekstrelerinde LC₅₀>1000 toksik etki gözlenmemiştir) ise, çok düşük seviyede toksik etki gösterdikleri görülmüştür.

Ullah vd. (2009), *Centella asiatica* bitkisinden metanol ekstresinin n-hekzan, karbon tetraklorid, kloroform ve su fraksiyonlarını elde etmişlerdir. Antioksidan aktiviteyi belirleme amacıyla DPPH yöntemini, antimikrobiyal aktiviteyi belirlemek amacıyla disk difüzyon yöntemini ve sitotoksik aktiviteyi belirlemek amacıyla da Brine Shrimp Lethality Assay yöntemini kullanmışlardır. Tüm fraksiyonların ortalama antioksidan etki gösterdiğini, kloroform ve sulu fraksiyonların sırasıyla 4 ug/ml ve 7 ug/ml IC₅₀ değeriyle en güçlü antioksidan etkiyi gösterdiğini rapor etmişlerdir. Antimikrobiyal aktivite sonuçları ise, fraksiyonların 16 mikroorganizmaya karşı kayda değer şekilde antibakteriyel ve antifungal etki gösterdiğini belirlemişlerdir. Yukarıdaki fraksiyon sırasına göre 400 ug/disk'lık konsantrasyonda, 7-15 mm, 8-12 mm, 8-16 mm ve 8-13 mm'lik inhibisyon zon çapı gözlemlenmişlerdir. Ekstrelerin Brine Shrimp Lethality Assay sonuçlarına göre, yüksek sitotoksik aktivite gösterdiğini bulmuşlar ve LC₅₀ değerlerinin yukarıdaki fraksiyon sırasını takiben 1.254, 0.826, 3.866 ve 5.366 ug/ml olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar çalışma sonucunda geleneksel kullanımlarını destekler şekilde *Centella asiatica* bitkisinin antioksidan, antimikrobiyal ve sitotoksik etki gösterdiğini ve önemli bir ilaç kaynağı olarak kullanılabilceği görüşünü ileri sürmüşlerdir.

Lemos vd. (2006), *Magonia glabrata*'nın meyve kısımlarından elde ettikleri etanol ekstresinden şikimik asit, skopoletin, 2-O-Metil-L-inositol bileşiklerini belirlemiş ve 2-O-Metil-L-inositol bileşiğini ekstreten izole ederek, değerlendirmişlerdir. Ektrenin antioksidan aktivitesini belirlemek amacıyla DPPH serbest radikalini süpürme yöntemini kullanmışlardır. Bütillenmiş hidroksitoluenin kontrol olarak kullanıldığı yöntemde, etanol ekstresinin kontrolle karşılaştırıldığında, serbest radikal süpürme aktivitesi oldukça yüksek olduğu bulunmuştur (p<0,01). 2-O-

Metil-L-inositol bileşiminin antioksidan aktivitesi ise ortalama seviyede bulunmuştur. Yine bitkiden elde ettikleri etanol ekstresinin ihtiyotoksik etkisinin belirlenmesi amacıyla *Molinesia latipinna* ve sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla da *Artemia salina* yöntemlerini kullanmışlardır. Ekstre için her iki testte en yüksek ölüm oranının 100 ppm'lik konsantrasyonda gerçekleştiğini, buna karşın bitkinin etanol ekstresinden izole ettikleri 2-O-Metil-L-inositol bileşiminin her iki testte de toksik etki göstermediğini rapor etmişlerdir.

Pisutthanan vd. (2004), Meliaceae ailesinden olan ve Thailand tıbbi bitkileri arasında yer alan *Azadirachta indica*, *Azadirachta indica* var. *siamensis*, *Melia azedarach* (yalnızca kök kısmı), *Sandoricum indicum* ve *Swietenia macrophylla*'da tüm bitkiden metanol ekstraksiyonunu yapmışlardır. Metanol ekstraksiyonundan arta kalan bitki kısımlarından ise sırasıyla su: diklorometan (1:1) fraksiyonu, ardından da hekzan ve % 90'lık metanol fraksiyonlarını elde etmişlerdir. Sitotoksikite testi için Brine Shrimp Lethality Assay yöntemini kullanmışlar ve sitotoksik açıdan *M. azedarach* kök kabuğu % 90'lık metanol fraksiyonunun en yüksek sitotoksik aktiviteyi gösterdiğini rapor etmişlerdir.

5. MATERYAL VE YÖNTEM

5.1. Materyal:

Bu çalışmada test materyali olarak, *Heliotropium hirsutissimum* GRAUER bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen farklı ekstratler ve *H. hirsutissimum*'un sitotoksik etkisini araştırmak için de, test materyali olarak *Artemia salina* (*Brine shrimp*) larvaları kullanılmıştır.

5.1.1. *Heliotropium hirsutissimum* GRAUER Bitkisinin Toplanması, Kurutulması ve Saklanması

5.1.1.1. Bitkilerin toplanması

Tez çalışmasında kullanılmak üzere seçilen *H. hirsutissimum* bitkisinin toprak üstü kısımları çiçeklenme döneminde (Şekil 5.1 ve Şekil 5.2) Adnan Menderes Üniversitesi Merkez Kampüsü civarında bitkilerin yetişme alanlarından ve farklı üç lokasyondan toplanmıştır (Çizelge 5.1). Bitki yol kenarına uzak, trafiğin ve insan faaliyetlerinin en az olduğu alanlar tercih edilerek, kirlilikten en az düzeyde etkilenmiş ve ağır metal vb. maddeleri bünyesinde biriktirmemiş alanlardan toplanmaya özen gösterilmiştir. Arazi çalışması tamamlandıktan sonra, toplanan bitki örneklerinin sistematik tayini Adnan Menderes Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Özkan EREN tarafından yapılmıştır. Toplanan bitkiler birer örnek numara verilerek etiketlenmiş ve Adnan Menderes Üniversitesi, Biyoloji Bölümü Herbariumu'nda (AYDN-2266) kayıt altına alınarak, saklanmıştır. Arazi çalışmaları sonucunda toplanan bitkilerin toplandıkları koordinat, yükseklik ve toplanma tarihleri Çizelge 5.1.'de yer almaktadır.

Çizelge 5.1. Toplanan *H. hirsutissimum* örneklerinin koordinat ve yükseklik bilgisi ve toplanma tarihi

Bitkinin Adı	Bölge Adı	Koordinat	Yükseklik	Toplanma Tarihi
<i>Heliotropium hirsutissimum</i> GRAUER	1. Lokasyon	37°51'24.76" K 27°51'18.08" D	182 m	07.08. 2012
<i>Heliotropium hirsutissimum</i> GRAUER	2. Lokasyon	37°51'22.97" K 27°51'12.99" D	184 m	07.08. 2012
<i>Heliotropium hirsutissimum</i> GRAUER	3. Lokasyon	37°51'17.72" K 27°51'13.53" D	183 m	10.08.2012



Şekil 5.1. *H. hirsutissimum* bitkisinin doğadaki genel görünümü



Şekil 5.2. *H. hirsutissimum* bitkisinin çiçek görünümü

5.1.1.2. Bitkilerin kurutulması

Çiçeklenme dönemlerine göre buldukları bölgelerden toplanan *H. hirsutissimum*, laboratuvara getirildikten sonra bitkinin toprak üstü kısımları temizlenerek, yıkanmıştır. Temizlenip, yıkanan bitkilerin ekstraksiyon yapılacak kısımları ayrıldıktan sonra, bitki kısımları doğrudan güneş ışığı almayan havadar bir odada kurutma kâğıtları üzerinde yığın oluşturmayacak şekilde kurutulmuştur. Kurutma ortamı daimi olarak kuru şekilde tutulmuş ve kurutma kâğıtları düzenli olarak değiştirilmiştir (Şekil 5.3.).



Foto: Semih UZUNHAN

Şekil 5.3. Kurumaya bırakılan *H. hirsutissimum* örnekleri

5.1.2. Kurutulan Bitkilerin Muhafaza Edilmesi

Gölge ve havadar bir odada kurutulan bitki kısımları denemelerde kullanılınca kadar, numara verilerek etiketlenen temiz kavanozlarda ve ışıktan etkilenmeyecek şekilde kapalı dolaplarda muhafaza edilmişlerdir (Şekil 5.4.)

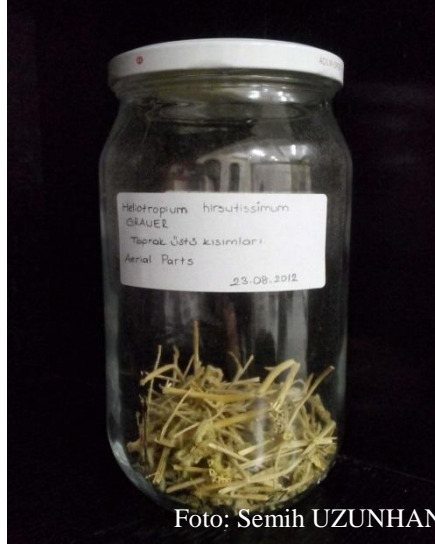


Foto: Semih UZUNHAN

Şekil 5.4. Kurutulmuş *H. hirsutissimum* toprak üstü kısımlarının cam kavanozda muhafazası

5.2. Denemelerde Kullanılan Bitkilerden Farklı Yöntemlerle Ekstrelerin Elde Edilmesi

5.2.1. Kimyasallar ve Makine-Tecizat

5.2.1.1. Kimyasallar

Dietil Eter (Riedel-de Haën, CAS NO: 24005), Petrol Eteri (Merck, CAS NO:1.00909.5000), Etil Asetat (Riedel-de Haën, CAS NO: 27227), Metanol (Merck, CAS NO: 1.06009.2500), DPPH (Fluka, CAS NO: 1898-66-4), Rutin (Fluka, CAS NO: 250249-75-3), Hidrojen Peroksit (Sigma, CAS. No. 7722-84-1), Askorbik asit (Sigma, A92902), Ferrozin (Fluka, 82950), $FeCl_2$ (Sigma, CAS. No. 7758-94-3), EDTA (Merck, 1.08421.1000), Bizmut nitrat (Sigma, 95379), Potasyum iyodür (Sigma, CAS. No. 7681-11-0), Ferrik klorür (Sigma, CAS. No. 7705-08-0), Magnezyum şerit (Sigma, CAS. No. 7539-95-4), Hidroklorik asit (Merck, 1.00314.2500), Amonyak (Merck, 1.05422.2500), Gallik asit (Sigma, CAS. No. 149-91-7), Na_2CO_3 (Sigma, CAS. No. 497-19-8), Fosfomolibdik asit (Sigma, SLBC7915), Folin Ciocalteu reaktifi (Sigma, 078K0042), Umbelliferon

(Sigma CAS. No. 93-35-6). Tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasalların tümü analitik saflıktadır.

5.2.1.2. Makine-Teçhizat

Isıtcılı manyetik karıştırıcı (BİOSAN MSH-300), rotary evaporatör (Ika Werke RV 05-ST), liyofilizatör (LABCONCO Freeze Dry System), ultrasonikatör (Bandelin D-12207), ultrasonik su banyosu (Elma D-78224), hassas terazi (Denver Instruments TP 214), terazi (Scaltec SPB 54), pH metre (HANNA HI 2211), çalkalamalı inkübatör (Innova 43), UV-Visible spektrofotometre (Shimadzu PharmaSpec UV-1700), mikropipet seti (Eppendorf).

5.2.2. *Heliotropium hirsutissimum* Bitkisinin Ekstraksiyonu

Tez çalışması kapsamında kullanılan *H. hirsutissimum*'dan dietil eter, petrol eteri, etil asetat ekstresi elde etmek için 60 g bitki, metanol ve su (infüzyon ve dekoksasyon ekstresi) için de 30 g kuru bitki kullanılmıştır. Ekstraksiyon için kullanılan miktarlar, kuru bitki ağırlığıdır. Bitkiler, ekstreler elde edilmeden önce öğütülmüştür. Bitkilerden ekstrelerin eldesi için kullanılan çözücüler polarite özellikleri göz önünde bulundurularak seçilmiştir.

5.2.2.1. Dietil eter ekstraksiyonu

Çizelge 5.2. Dietil eter solventinin başlıca fiziksel ve kimyasal özellikler

Molekül formülü	$C_4H_{10}O$
Molekül Ağırlığı	74
Kaynama noktası	$34.6^{\circ}C$
Polarite İndeksi	2.8
Dielektrik sabiti	4.191

H. hirsutissimum örneklerinden dietil eter (Çizelge 5. 2.) ekstraksiyonu için; Goffin ve arkadaşlarının (2003) yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. Dietil ekstraksiyonu için izlenen işlem basamakları aşağıdaki gibidir:

- 1- 60 g bitki örneği bir erlenin içerisine alınarak, bitkinin üzerini kaplayacak kadar absölü dietil eter ilave edilmiş ve şişenin ağzı sıkıca kapatılmıştır.
- 2- Dietil eter içerisindeki bitki örneği karanlık bir ortamda ekstraksiyon için 24 saat bekletilmiştir.
- 3- Süre sonunda elde edilen ekstrakt huni yardımıyla filtre kağıdından geçirilerek süzölmüş ve koyu renkli bir şişeye aktarılmıştır.
- 4- Filtre kağıdında kalan bitki kalıntısı tekrar erlene alınmış ve üzerine dietil eter ilave edilerek, dietil eter renksizleşinceye kadar ekstraksiyona devam edilmiştir.
- 5- Toplanan ekstrakttaki dietil eterin uzaklaştırılması için karışım evaporatör balonuna aktarılmış ve evaporasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.
- 6- Dietil eterin uzaklaştırılmasının ardından ham ekstrakt evaporatör balonundan toplanmıştır.
- 7- Dietil eterin buharlaşma sıcaklığı düşük olduğundan kalan çözücünün uzaklaşması için ekstrakt, karanlık ortamda ve oda sıcaklığında bekletildikten sonra tartım işlemi yapılmıştır.
- 8- Tartımı yapılan ekstrakt falkon tüpe alınmış ve denemeler yapıncaya kadar -20°C 'de saklanmıştır.

5.2.2.2. Petrol eteri ekstraksiyonu

Çizelge 5. 3. Petrol eteri solventinin başlıca fiziksel ve kimyasal özellikleri

Molekül Formülü	C_7H_7
Molekül Ağırlığı	-
Kaynama Noktası	40-60 °C
Polarite İndeksi	0,1
Dielektrik Sabiti	2.0-2.2

H. hirsutissimum bitki örneklerinden petrol eteri (Çizelge 5. 3.) ekstraksiyonu için; Lee ve arkadaşlarının (2004) yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. Petrol eteri ekstraksiyonu için izlenen işlem basamakları aşağıdaki gibidir:

- 1- 60 g bitki örneği bir erlenin içerisine alınmış ve bitkinin üzerini kaplayacak kadar petrol eteri ilave edilerek, şişenin ağzı sıkıca kapatılmıştır.
- 2- Petrol eteri içerisindeki bitki örneği karanlık bir ortamda ekstraksiyon için 24 saat bekletilmiştir.
- 3- Süre sonunda elde edilen ekstrakt huni yardımıyla filtre kağıdından geçirilerek süzölmüş ve koyu renkli bir şişeye aktarılmıştır.
- 4- Filtre kağıdında kalan bitki kalıntısı tekrar erlene alınmış ve üzerine (bitkinin üzerine geçecek kadar) petrol eteri ilave edilerek, petrol eteri rensizleşinceye kadar, ekstraksiyona devam edilmiştir.
- 5- Toplanan ekstrakttaki petrol eterini uzaklaştırmak amacıyla karışım, evaporatör balonuna aktarılmış ve evaporasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.
- 6- Petrol eterinin uzaklaştırılmasının ardından karışım evaporatör balonuna aktarılmış ve evaporasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

- 7- Petrol eterinin buharlaşma sıcaklığı düşük olduğundan kalan çözücünün uzaklaşması için ekstrakt, karanlık ortamda ve oda sıcaklığında bekletildikten sonra tartılmıştır.
- 8- Tartımı yapılan ekstrakt falkon tüpe alınmış ve denemeler yapıncaya kadar -20°C 'de saklanmıştır.

5.2.2.3. Etil asetat ekstraksiyonu

Çizelge 5. 4. Etil Asetat solventinin başlıca fiziksel ve kimyasal özellikleri

Molekül Formülü	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$
Molekül Ağırlığı	88
Kaynama Noktası	77°C
Polarite İndeksi	4.4
Dielektrik Sabiti	6.02

H. hirsutissimum bitki örneklerinden etil asetat (Çizelge 5. 4.) ekstraksiyonu için; Miliauskas ve arkadaşlarının (2004) yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. Etil asetat ekstraksiyonu için izlenen işlem basamakları aşağıdaki gibidir:

- 1- 60 g bitki örneği bir erlenin içerisine alınarak, bitkinin üzerini kaplayacak kadar etil asetat ilave edilmiş ve şişenin ağzı sıkıca kapatılmıştır.
- 2- Etil asetat içerisindeki bitki örneği karanlık bir ortamda ekstraksiyon için 24 saat bekletilmiştir.
- 3- Süre sonunda elde edilen ekstrakt huni yardımıyla filtre kağıdından geçirilerek süzölmüş ve koyu renkli bir şişeye aktarılmıştır.
- 4- Filtre kağıdında kalan bitki kalıntısı tekrar erlene alınmış ve üzerine (bitkinin üzerine geçecek kadar) etil asetat ilave edilerek, etil asetat renksizleşinceye kadar, ekstraksiyona devam edilmiştir.

- 5- Toplanan ekstrakttaki etil asetatı uzaklaştırmak amacıyla karışım, evaporatör balonuna aktarılmış ve evaporasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.
- 6- Etil asetatın uzaklaştırılmasının ardından, ham ekstrakt evaporatör balonundan toplanmıştır.
- 7- Kalan çözücünün de uçması için ekstrakt bir beherin içine konmuş ve sıcak su banyosunda bekletildikten sonra tartılmıştır.
- 8- Tartımı yapılan ekstrakt, falkon tüpe alınmış ve denemeler yapıncaya kadar -20°C 'de saklanmıştır.

5.2.2.4. Metanol ekstraksiyonu

Çizelge 5.5. Metanol solventinin başlıca fiziksel ve kimyasal özellikleri

Molekül Formülü	CH_3OH
Molekül Ağırlığı	32
Kaynama Noktası	64°C
Polarite İndeksi	5.1
Dielektrik Sabiti	32.6

H. hirsutissimum bitkisi örneklerinden metanol (Çizelge 5. 5.) ekstraksiyonu, Avcı ve arkadaşlarının (2006) yöntemi modifiye edilerek yapılmıştır. Metanol ekstraksiyonu için izlenen işlem basamakları aşağıdaki gibidir.

- 1- 30 g bitki örneği bir erlenin içerisine alınmış ve bitkinin üzerini kaplayacak kadar absölü metanol ilave edilerek, şişenin ağzı sıkıca kapatılmıştır.
- 2- Metanol içerisindeki bitki örneği karanlık bir ortamda ekstraksiyon için 24 saat bekletilmiştir.

- 3- Süre sonunda elde edilen metanol ekstresi huni yardımıyla filtre kağıdından geçirilerek süzölmüş ve koyu renkli bir şişeye aktarılmıştır.
- 4- Filtre kağıdında kalan bitki kalıntısı tekrar erlene alınmış ve üzerine (bitkinin üzerine geçecek kadar) metanol ilave edilerek, metanol renksizleşinceye kadar, ekstraksiyona devam edilmiştir.
- 5- Toplanan ekstredeki metanolü uzaklaştırmak amacıyla karışım, evaporatör balonuna aktarılmış ve evaporasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.
- 6- Metanolün uzaklaştırılmasının ardından geriye kalan ham ekstre, evaporatör balonundan toplanmıştır.
- 7- Ekstrakta kalması muhtemel çözücünün de uçması için ekstre, bir beherin içine alınmış ve sıcak su banyosunda çözücünün tümüyle uçması beklendikten sonra tartım işlemi yapılmıştır.
- 8- Tartımı yapılan ekstre falkon tüpe alınmış ve denemeler yapıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

5.2.2.5. İnfüzyon ve Dekoksiyonu

Çizelge 5. 6. Su solventinin başlıca fiziksel ve kimyasal özellikleri

Molekül Formülü	H ₂ O
Molekül Ağırlığı	18
Kaynama Noktası	100°C
Polarite İndeksi	9,0
Dielektrik Sabiti	79.7

H. hirsutissimum bitkisi örneklerinden su (infüzyon ve dekoksasyon) ekstraksiyonları Ljubuncic ve arkadaşlarının (2005) yöntemi modifiye edilerek yapılmıştır. Su (Çizelge 5.6) ekstraksiyonları için izlenen işlem basamakları aşağıdaki gibidir:

5.2.2.5a. İnfüzyon (Demleme) Ekstraksiyonu

- 1- 30 g bitki örneği elektrikli ısıtıcıda daha önceden kaynama noktasına kadar ısıtılmış olan 300 mL distile suyun içerisine konulmuştur.
- 2- 10 dakika bekletildikten sonra çözelti kabaca süzölmüştür, elde edilen süzöntü filtre kâğıdı ve huni yardımıyla 200 mL'lik beherlere paylaştırılacak şekilde tekrar süzölmüştür.
- 3- Karışımın karanlık bir ortamda soğuması beklendikten sonra, beher içine alına karışım, -20 °C'de bir gece bekletilmiştir.
- 4- Ertesi gün -20⁰C'den çıkarılan örnekler ham ekstrakt elde etmek amacıyla liyofilizatöre konulmuştur.
- 5- Liyofilizasyon işlemi sonrası toz haline gelen ekstraktlar tartılmış ve tartılan ekstrakt falkon tüpe alınmış ve denemeler yapıncaya kadar - 20°C'de saklanmıştır.

5.2.2.5b. Dekoksasyon (Kaynatma) ekstraksiyonu

- 1- 30 g bitki örneği 300 mL soğuk distile suyun içerisine konulduktan sonra, on (10) dakika süreyle kaynatılmıştır.
- 2- Süre sonunda bitki karışımı süzölmüş ve elde edilen süzöntü filtre kâğıdı ve huni yardımıyla 200 mL'lik beherlere paylaştırılacak şekilde tekrar süzölmüştür.
- 6- Karışımın karanlık bir ortamda soğuması beklendikten sonra, beher içine alına karışım, -20 °C'de bir gece bekletilmiştir.
- 7- Ertesi gün donmuş olan örnekler ham ekstrakt elde etmek amacıyla liyofilizatöre konulmuştur.

- 8- Liyofilizasyon işlemi sonrası toz haline gelen ekstraktlar tartılmış ve tartılan ekstrakt falkon tüpe alınmış ve denemeler yapılincaya kadar - 20°C'de saklanmıştır.

5.3. *Heliotropium hirsutissimum*'dan Elde Edilen Farklı Ekstrelerin Fitokimyasal Taramasının Yapılması

H. hirsutissimum'dan elde edilen ekstrelerde alkaloidlerin, saponinlerin, tanenlerin, fenoller ve flavonoidlerin varlığını belirlemek için gereken fitokimyasal analizler, Bolivar vd.'nin (2011) Dominguez (1973)'den alıntılacağı yöntemlere göre yapılmıştır.

5.3.1. Fenol İçeriğinin Belirlenmesi

Etanol içerisinde 10 mg/mL'lik konsantrasyonda hazırlanan farklı ekstrelerden filtre kağıdının üzerine birer damla damlatılmıştır. Damlaların her biri üzerine fosfomolibdik asitten birer damla damlatılmış ve filtre kağıdı amonyak buharına tabi tutulmuştur. Lekenin maviye dönüşmesi fenol içeriğinin mevcut olduğunu göstermektedir.

5.3.2. Tanen İçeriğinin Belirlenmesi

2-3 mL metanolde içerisinde 10 mg/mL'lik konsantrasyonda hazırlanan farklı ekstrelerin üzerine, 1 damla % 10' luk alkolik ferric chloride çözeltisi eklenmiştir. Koyu mavi veya yeşilimsi gri renk oluşumu tanin içeriğinin mevcut olduğunu göstermektedir.

5.3.3. Alkaloid İçeriğinin Belirlenmesi

2 mL Metanol içerisinde 10 mg/mL'lik konsantrasyonda hazırlanan farklı ekstrelerden filtre kağıdına birer damla olacak şekilde damlatılmıştır. Daha sonra Dragendorff's reaktifi ile filtre kağıdı üzerindeki ekstre damlaları, spreyleneştir. Portakal renginin oluşumu alkaloid içeriğinin mevcut olduğunu göstermektedir.

5.3.4. Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi

2-3 mL metanol içerisinde 10 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan farklı ekstrelerin bulunduğu tüpün içerisine, bir parça magnezyum şerit ve 1 mL konsantre HCl ilave edilmiştir. Pembe-kırmızı ya da kırmızı renk oluşumu flavonoid içeriğinin mevcut olduğunu göstermektedir.

5.3.5. Antrakinon İçeriğinin Belirlenmesi

1:1 metanol: su ozeltisinde 50 mg/mL'lik konsantrasyonda hazırlanan farklı ekstreler, % 10' luk ferric chloride ozeltisi ile ısıtılmıştır. Ekstrelerin bulunduğu her bir tüpün üzerine 1 mL konsantre HCl ilave edilmiştir. Karışım süzölmüş ve sznt dietil eter eklenerek çalkalanmış ve de amonyakla ekstrakte edilmiştir. Sulu tabakadaki pembe veya koyu kırmızı renk oluşumu antrakinon içeriğinin mevcut olduğunu göstermektedir.

5.3.6. Saponin İçeriğinin Belirlenmesi

Sıcak suda 10 mg/mL'lik konsantrasyonda hazırlanan farklı ekstreler tüpün içerisinde 30 saniye boyunca hızlıca çalkalanmıştır. Köpük oluşumu saponin içeriğinin mevcut olduğunu göstermektedir.

5.4 *Heliotropium hirsutissimum*'dan Elde Edilen Farklı Ekstrelerin Toplam Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi

H. hirsutissimum'dan elde edilen farklı ekstrelerin toplam fenolik içeriğinin belirlenmesi için gereken analizler, Singleton vd (1999)'nin belirttiği şekilde Dorman vd. (2003)'nin uyguladığı yöntemden modifiye edilerek yapılmıştır. Standart bileşik olarak gallik asidin kullanıldığı yöntemin işlem basamakları aşağıdaki gibidir:

5.4.1. Standart Grafik İçin Gallik Asit özeltisinin Hazırlanması

- 1- Çözelti derişimi 0,25 mg/mL olacak şekilde gallik asit stok çözeltisi hazırlanmıştır.
- 2- 5 ayrı gallik asit konsantrasyonu 46 mL'de 0,001, 0,002, 0,004 ve 0,005 mg/mL şeklinde ayarlanmıştır (son konsantrasyon 50 mL'ye göre).
- 3- Her bir çözeltinin üzerine 1'er mL Folin Ciocalteu özeltisi eklenmiş ve 3 dk beklenmiştir.
- 4- Çözeltilerin her birine 3 mL % 2'lik Na_2CO_3 eklenmiş ve karışımlar 2 saat süreyle 25 °C 120 rpm'de, çalkalamalı inkübatöre (Innova 43, shaker incubator) konulmuştur.
- 5- Karışım özeltisinin absorbansı 760 nm'de distile suya karşılık okunmuş ve bu işlem 3 tekrarlı olacak şekilde tekrarlanmıştır. 3 değerin ortalaması alınarak gallik asit derişimine karşı standart absorbans çalışma grafiği çizilmiştir.

5.4.2. Toplam Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi için Ekstrelerin Hazırlanması

- 1- Ekstrelerin her biri 100 µg içerecek şekilde 46 mL distile suda çözdürülmüştür.
- 2- Çözeltinin üzerine 1 mL Folin Ciocalteu özeltisi ilave edilip 3 dakika bekletilmiştir.
- 3- Oluşan çözeltinin üzerine 3 mL % 2'lik Na_2CO_3 ilave edilmiş ve 2 saat süreyle karışım çalkalanmıştır.
- 4- 3 tekrarlı olacak şekilde karışımların absorbansı 760 nm'de distile suya karşı okunmuştur.
- 5- Standart grafik denklemi baz alınarak örneklerdeki toplam fenolik içerik hesaplanmıştır.

5.5. *Heliotropium hirsutissimum*'dan Elde Edilen Farklı Ekstrelerin DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi

Bir maddenin antioksidan aktivitesi ortamdaki serbest radikalleri süpürebilmesine bağlıdır. *H. hirsutissimum*'dan elde edilen farklı ekstrelerin antioksidan aktiviteleri, günümüzde özellikle doğal bileşiklerin antioksidan aktivitesini belirlemede yaygın olarak kullanılan DPPH (1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical) serbest radikal süpürme aktivitesi üzerinden DPPH yöntemi ile spektrofotometrik olarak tayin edilerek, Brand-Williams ve ark. (1995)'na göre belirlenmiştir. Yöntemde pozitif kontrol olarak bir flavonoid olan, rutin kullanılmıştır ve deney düzeneğinde DPPH, rutin ve ekstraktlar her seferinde taze hazırlanmıştır. İşlem basamakları aşağıdaki gibidir.

- 1- 0,1 mM DPPH solüsyonu hazırlamak için 0.0039 g DPPH 100 mL metanolde çözdürülmüştür. 1mM rutin solüsyonunu hazırlamak için 0.066 g rutin yine 100 mL metanolde çözdürülmüştür.
- 2- Hazırlanan DPPH solüsyonundan her tüpe 1'er mL konulmuştur ve üzerlerine daha önceden konsantrasyonları son konsantrasyona göre ayarlanmış olan ekstrelerden 3'er mL eklenmiştir.
- 3- Aynı şekilde rutin solüsyonundan da 3 mL tüpe eklenmiştir ve blank olarak kullanılacak olan tüpe de 3 mL metanol ilave edilmiştir.
- 4- Karışımlar eklendikten sonra düzenek 30 dk oda sıcaklığında karanlıkta bekletilmiştir.
- 5- 30 dakika sonunda, karışımın absorbansı spektrofotometrede 517 nm dalga boyunda ölçülmüştür.
- 6- Ölçümler üç tekrarlı yapılmıştır.
- 7- Pozitif kontrol olarak standart bir antioksidan olan Rutin'in 50 µg/ml ve 100 µg/ml'lik konsantrasyonları kullanılmıştır.
- 8- Ekstrelerin % DPPH serbest radikal süpürücü aktiviteleri aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir:

$$\% \text{IE} = \left(\frac{\text{Ac}-\text{As}}{\text{As}} \right) \times 100$$

% IE: DPPH serbest radikal süpürücü aktivite yüzdesi

Ac: Kontrolün 517 nm'deki absorbansı

As: Örneğin 517 nm'deki absorbansı

- 9- Her bir bitkiden elde edilen ekstratlar için, DPPH metoduna göre yapılan serbest radikal süpürücü deneylerinde ölçülen absorbanslara bağlı olarak, 30 dakika içerisinde DPPH'nin kalibrasyon grafiğinden faydalanılarak IC₅₀ değerleri (ortamdaki serbest radikallerin yarısını süpüren örnek konsantrasyonu) hesaplanmıştır. IC₅₀ değeri ne kadar küçükse ortamdaki bileşiklerin antioksidan aktivitesi de o kadar fazladır denilebilir. Bu, aynı miktarda serbest radikali en düşük konsantrasyonda süpürebilen madde daha kuvvetli aktivite göstermektedir anlamına gelmektedir (Pourmorad vd., 2006).

5.6. *Heliotropium hirsutissimum*'dan Elde Edilen Farklı Ekstrelerin H₂O₂ Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi

H. hirsutissimum'dan elde edilen petrol eteri, dietil eter, etil asetat, metanol, su (infüzyon ve dekoksiyon) ekstratlarının H₂O₂ süpürme aktivitesi (Ruch vd., 1989) yöntemine göre belirlenmiştir. Standart antioksidan olarak askorbik asidin kullanıldığı yöntemin işlem basamakları aşağıdaki gibidir:

- 1- Fosfat tamponu (pH: 7,4) ve 40 mM H₂O₂ taze olarak hazırlandıktan sonra tartılan ekstratlar fosfat tamponunda (1,5 mL) çözdürülmüştür.
- 2- Ekstratların her birinin üzerine 0,5 mL H₂O₂ eklenerek reaksiyon başlatılmıştır.
- 3- Vortekslenerek kuvvetlice karıştırıldıktan sonra karanlıkta 10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.

- 4- Ekstrelerin her bir konsantrasyonu için ölçümler 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır.
- 5- H_2O_2 süpürme aktivitesi = $[(Abs_{kontrol} - Abs_{örnek})/Abs_{kontrol}]$ formülüne göre değerlendirilmiştir.

5.7. *Heliotropium hirsutissimum*'dan Elde Edilen Farklı Ekstrelerin Metal Şelatlama Aktivitesinin Belirlenmesi

H. hirsutissimum'dan elde edilen petrol eteri, dietil eter, etil asetat, metanol, su (infüzyon ve dekoksasyon) ekstralarının metal şelatlama aktivitesi Dinis vd (1994)'nin yönteminden modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Standart şelatlayıcı ajan olarak EDTA'nın kullanıldığı yöntemin işlem basamakları aşağıdaki gibidir:

- 1- 1 mL distile suda çözdürülen ekstraların üzerine 2 mM 0,05 mL $FeCl_2$ ilave edilmiştir.
- 2- 5 mM 200 μ L ferrozin tüplerin üzerine ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır.
- 3- Ekstreler vortekslenerek kuvvetlice karıştırıldıktan sonra karanlıkta ve oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiştir.
- 4- Ekstraların her bir konsantrasyonu için ölçümler 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır.
- 5- Metal şelatlama aktivitesi = $[(Abs_{kontrol} - Abs_{örnek})/Abs_{kontrol}]$ formülüne göre değerlendirilmiştir.

5.8. *Heliotropium hirsutissimum*'dan Elde Edilen Farklı Ekstrelerinin Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality Assay ile Biyolojik Aktivitesinin Belirlenmesi

5.8.1. Biyolojik Aktivitenin Belirlenmesi için Kullanılan Kimyasal Maddeler

- I. **Kaya tuzu:** Aydın'da bulunan ticari akvaryumculardan temin edilmiştir.
- II. **Yapay *Artemia salina* yaşam ortamı:** Steril edilmiş distile suyun her 1 litresi için, kaya tuzunun 3,8 g' ı çözülerek elde edilmiştir (pH: 8,8).
- III. ***Artemia salina* kistleri:** *H.hirsutissimum*'un sitotoksik aktivitesinin araştırılması için kullanılan JBL Artemio Mix marka *Artemia salina* kistleri Aydın'da bulunan ticari akvaryumculardan temin edilmiştir (Şekil 5. 5).

5.8.2. *Heliotropium hirsutissimum*'dan Elde Edilen Farklı Ekstrelerinin Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality Assay ile Biyolojik Aktivitesinin Belirlenmesi

H. hirsutissimum'dan elde edilen petrol eteri, dietil eter, etil asetat, metanol, su (infüzyon ve dekoksiyon) ekstrelerinin akut sitotoksik aktivitesi, Solis vd.'nin (1993) yöntemine göre belirlenmiştir. İşlem basamakları aşağıdaki gibidir:

- 1- 28 °C'ye ısıtıcı yardımıyla ayarlanmış olan akvaryumun içerisine yaşam ortamını barındırması amacıyla konik, dipten havalandırmalı bir şişe yerleştirilmiştir (Şekil 5.6).
- 2- Şişenin içerisine daha önceden pH'sı 8,8'e ayarlanmış distile su konmuştur.
- 3- JBL marka Brine Shrimp kistleri, 3,6 g/100 mL konsantrasyonda olacak şekilde havalandırmalı konik şişenin içerisine konulmuştur ve kistler 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- 4- İnkübasyonun ardından shrimplerin kolaylıkla toplanması için ışığa yönelim hareketlerinden faydalanılmıştır ve kabın yüzeyinde toplanmaları için ışık kaynağı kullanılmıştır.

- 5- Küçük bir petri içerisine yaşam ortamı ile birlikte bir pasteur pipeti yardımıyla alınan shrimpler (Şekil 5.7), seçilmek üzere 100 μL 'lik bir mikropipet yardımıyla petriden alınıp (shrimpleri yaralamamak ve öldürmemek için pipet ucu bir makasla hafifçe kesilmiştir) binoküler altındaki daha geniş bir petriye küçük damlalar halinde bırakılmışlardır.
- 6- Petride gözle sayılabilecek şekilde damlacıklar içerisinde bulunan shrimpler, 10'ar tane seçilmek suretiyle 96'lık bir well-plate içerisine her bir kuyucuğa 100 μL olacak şekilde konulmuştur (Şekil 5.8) ve test gruplarının her biri 3 tekrarlı olacak şekilde ayarlanmıştır.
- 7- Konsantrasyonların ayarlanması için (sulu ekstreler ve metanol hariç), etil asetat, dietil eter ve petrol eteri ekstrelerinin suda çözünmesi amacıyla bir gün öncesinden ekstreler %1'lik DMSO'da çözdürülmüştür ve DMSO etkisinin göz önünde bulundurulması amacıyla kontrol gruplarına da uygulanmıştır.
- 8- Konsantrasyonlar 2x olacak şekilde 1000, 500, 250, 100, 50, 25 ve 10 ppm olarak her bir ekstre için ayrı ayrı ayarlanmıştır. Pozitif kontrol için yine örneklerin konsantrasyon aralığında umbelliferon kullanılmıştır.
- 9- Kuyucuklardaki son konsantrasyon 200 μL olacak şekilde ekstreler eklenmiş ve 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.
- 10- 24 saatlik uygulamanın ardından well-platelerdeki her bir kuyucuktaki canlı ve ölü shrimpler binoküler altında sayılıp not edilmiştir.
- 11- Sonuçlar SPSS 16.0 paket programında bulunan Probit analiziyle değerlendirilmiştir.

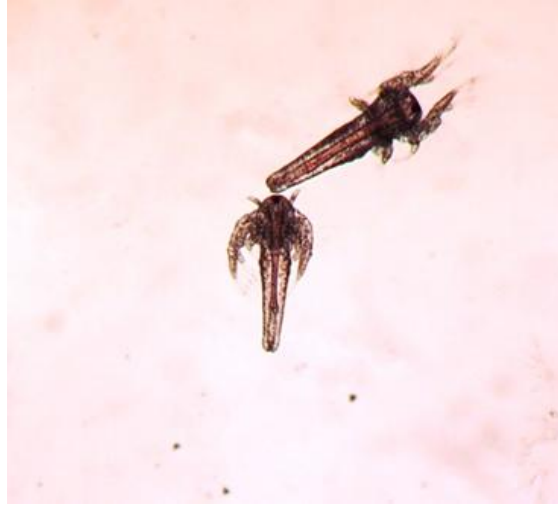


Şekil 5.5. Brine Shrimp Lethality Assay'de kullanılan *Artemia salina* tuzlu kistleri

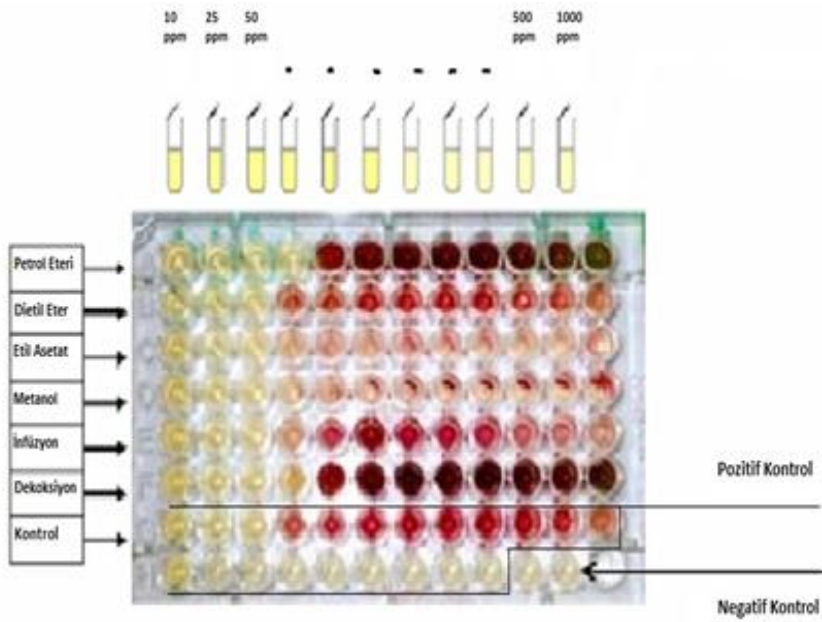


Foto: Semih UZUNHAN

Şekil 5. 6. *Artemia salina* yetiştirme ortamı



Şekil 5.7. Kistlerden çıkan canlı *Artemia salina*'lar



Şekil: 5. 8. 96'lık well-plate'e inoküle edilmiş *Artemia salina* larvaları

5.9. İstatistiksel Analiz

Ekstrelerin DPPH süpürme aktivitesi, H_2O_2 süpürme aktivitesi ve metal şelatlama aktivitesi testlerinin sonuçları One Way ANOVA ile, Brine Shrimp Lethality Assay sonuçları ise Probit Analizi kullanılarak değerlendirilmiştir (SPSS 16.0).

6. BULGULAR

6. 1. *Heliotropium hirsutissimum*'dan Elde Edilen Farklı Ekstrelerin Kuru Ağırlıkları

H. hirsutissimum bitkisinden elde edilen dietil eter, etil asetat, ve petrol eteri ekstre miktarları, gerçekleştirilecek tayin ve sitotoksisite denemeleri için yeterli görülmediğinden, işlem tekrarlanarak elde edilen ekstre miktarı arttırılmaya çalışılmıştır. Bu nedenle metanol, su (infüzyon ve dekoksiyon) ekstresi elde etmek için 30 g bitki kullanılırken, dietil eter, etil asetat, ve petrol eteri ekstre eldesi için, 60 g bitki kullanılmıştır.

Gerçekleştirilen ekstraksiyonlar sonucu, bitkiden ekstrakte edilebilen bileşiklerin miktarı 4.920-0.954 mg/g kurutulmuş bitki materyali aralığında değişmektedir. Elde edilen ekstre verimleri incelendiğinde en fazla ham verimin, metanol ekstresine (% 16.40) ait olduğu ortaya çıkmıştır. Metanol ekstresini sırasıyla sulu dekoksiyon (% 8.36), sulu infüzyon (% 6.04), etil asetat (% 2.79), dietil eter (% 1.94) ve petrol eteri (% 1.59) ekstreleri izlemektedir (Çizelge 6.1).

Çizelge 6.1. *H. hirsutissimum*'dan elde edilen farklı ekstrelerin ham verim (%) ve net ekstre miktarları (g)

Ekstraksiyon Tipi	Kullanılan Bitki Miktarı (g)	Ham Verim (%)	Net Ekstre Miktarı (g)
Petrol eteri	60	1.59	0.954
Dietil eter	60	1.94	1.162
Etil asetat	60	2.79	1.678
Metanol	30	16.40	4.920
Su (dekoksiyon)	30	8.36	2.507
Su (infüzyon)	30	6.04	1.811

6.2. *Heliotropium hirsutissimum*'dan Elde Edilen Farklı Ekstrelerin Fitokimyasal Analizleri

H. hirsutissimum bitkisinden elde edilen petrol eteri, dietil eter, etil asetat, metanol, su (infüzyon ve dekoksasyon) ekstralarının fitokimyasal içerikleri Çizelge 6.2.'de yer almaktadır.

Metanol ekstresi hariç, geriye kalan tüm ekstralarda ve özellikle petrol eteri, dietil eter, etil asetat ve dekoksasyon ekstresinde en fazla alkaloidlerin bulunduğu gözlemlenmiştir. İnfüzyon ekstresinde de alkaloidler olmasına karşın, infüzyon ekstresindeki alkaloidlerin miktarının diğer ekstralara göre, oldukça düşük miktarlarda olduğu tespit edilmiştir. Alkaloidlerden sonra ekstralarda en fazla rastlanan fitokimyasaların ise; fenol (petrol eteri, infüzyon ve dekoksasyon ekstralarında) ve saponinler (metanol, infüzyon ve dekoksasyon ekstralarında) olduğu saptanmıştır. Tanin ve antrakınonların varlığının zayıf olduğu ve flavonoidlerin ise hiçbir ekstrada bulunmadığı görülmüştür.

Çizelge 6.2. *H. hirsutissimum*'dan elde edilen farklı ekstrelerin içerdiği kalitatif fitokimyasallar

Aranan Fitokimyasal	Fitokimyasal İçeriği Belirlemek İçin Kullanılan Yöntem	Ekstrelerin İçerdiği Fitokimyasallar					
		Petrol eteri	Dietil eter	Etil asetat	Metanol	Su (infüzyon)	Su (dekoksiyon)
Fenol	Fosfomolibdrik asit	+	-	-	-	+	+
Tanenler	Demir klorür	-	*	-	+	-	-
Alkoloid	Dragendorff's	+	+	+	-	*	+
Flavonoid	Magnezum şerit ve Konsantre HCl	-	-	-	-	-	-
Antrakinon	Demir klorür ve Konsantre HCl	-	-	+	+	-	-
Saponin	Köpükleşme	-	-	-	+	+	+

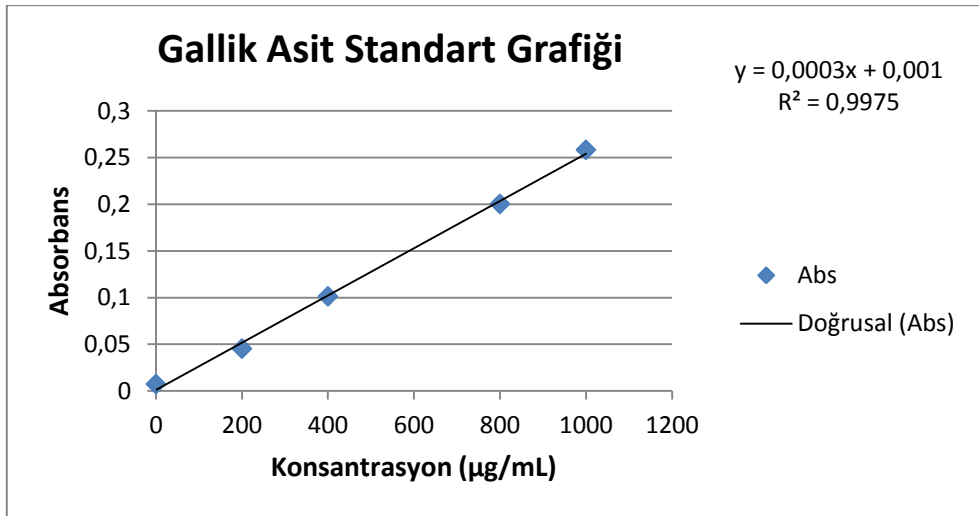
(*): Fitokimyasal içeriğin ekstrede az miktarda bulunduğunu göstermektedir.

(+): Fitokimyasal içeriğin ekstrede bulunduğunu göstermektedir.

(-): Fitokimyasal içeriğin ekstrede bulunmadığını göstermektedir.

6.3. *Heliotropium hirsutissimum*'dan Elde Edilen Farklı Ekstrelerde Toplam Fenolik Madde Miktarı

H. hirsutissimum'dan elde edilen farklı ekstrelerin toplam çözünebilir fenolik madde miktarı, Folin-Ciocalteu (FC) reaktifi ile tayin edildi (Singleton vd., 1999). FC reaktifi, fosfotungustik ($H_3PW_{12}O_{40}$) ve fosfomolibdik ($H_3PMo_{12}O_{40}$) asitlerin karışımı olup, fenol oksidasyonu sırasında bu oksitler mavi renkli bileşiklere indirgenir. Bu renk değişimi polifenolik bileşik miktarı ile orantılı olup 760 nm'de spektrofotometrede ölçülmektedir. Toplam çözünebilir fenolik maddelerin tespitinde standart bileşik olarak olarak gallik asit kullanılmış ve standart grafikler hazırlanmıştır. Bu standart grafikler kullanılarak, örneklerin toplam fenolik madde miktarları mg gallik asit (gr GAE/g ekstrakt) eşdeğeri şeklinde hesaplanmıştır (Şekil 6.1.).



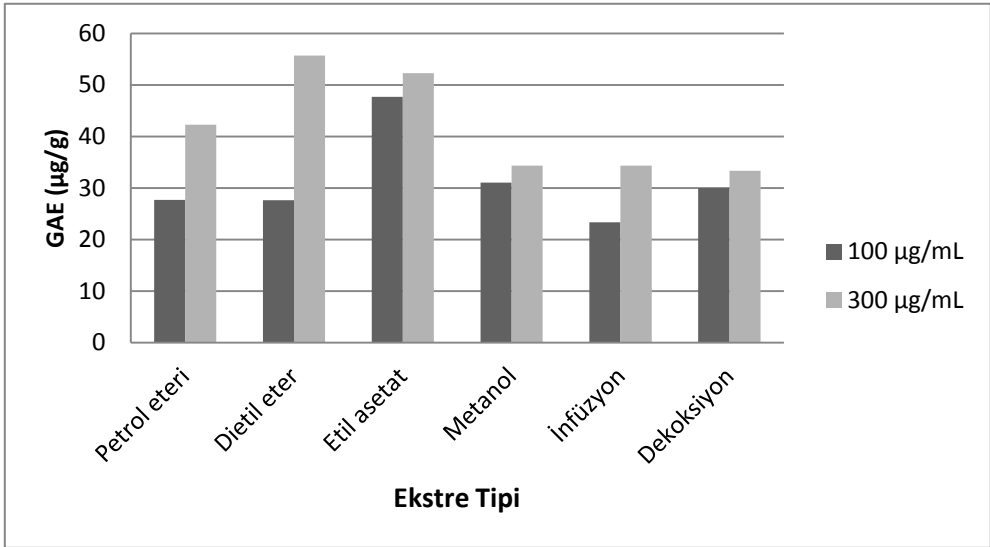
Şekil 6.1. Gallik asit standart grafiği

H. hirsutissimum petrol eteri, dietil eter, etil asetat, metanol, su (infüzyon ve dekoksasyon) ekstralarının (100-300 µg/mL) gallik asit eşdeğeri olan fenolik madde miktarlarına ait olan değerler Çizelge 6.3 ve Şekil 6.2' de verilmiştir. Bu grafikten görüldüğü üzere, çalışılan bitkinin farklı ekstralarının fenolik bileşik içeriği karşılaştırıldığında; denenen bütün ekstradaki fenolik içeriğin oldukça düşük miktarda bulunduğu tespit edilmiştir. Gallik asit eşdeğer (GAE) alınarak sırasıyla fenolik içeriğin dietil eter ekstresinde 55.7 µg/g, etil asetat ekstresinde

52.3 µg/g, petrol eteri ekstresinde 42.3 µg/g, metanol ve su infüzyon ekstresinde 34.3 µg/g ve su dekoksiyon ekstresinde 33.3 µg/g olduğu hesaplanmıştır.

Çizelge 6.3. *H. hirsutissimum*'dan elde edilen farklı ekstralarının gallik asit eşdeğeri olan fenolik madde miktarları

Ekstre Tipi	Konsantrasyon (µg/mL)	Toplam Fenolik Madde Miktarları (µg/g)
Petrol eteri	100	27.7
	300	42.3
Dietil eter	100	27.6
	300	55.7
Etil asetat	100	47.7
	300	52.3
Metanol	100	31.0
	300	34.3
İnfüzyon	100	23.3
	300	34.3
Dekoksiyon	100	30.0
	300	33.3



Şekil 6.2. *H. hirsutissimum*'dan elde edilen farklı ekstrelerinin gallik asit eşdeğeri olan fenolik madde içerikleri

6.4. *Heliotropium hirsutissimum*'dan Elde Edilen Farklı Ekstrelerin DPPH Serbest Radikalini Süpürme Aktivitesi

Antioksidan maddelerin antioksidan özelliklerinden bir tanesi de, ortamda oluşan radikalleri süpürmeleridir. Radikaller eşleşmemiş elektron içeren atom ya da moleküllerdir. Örneğin, hidrosil (OH^\bullet), süperoksit ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroksil (RO_2^\bullet), alkoksil (RO^\bullet) radikalleri gibi. Radikalle bu eşleşmemiş elektronlarını eşleştirme eğiliminde oldukları için reaktiftirler. Bu sebeple radikaller çevrelerindeki atom ya da moleküllerden elektron kopararak onların yapılarını bozabilirler. Birçok antioksidan, aynı zamanda anti-radikaldir. Bu antioksidanlar radikallerin elektronlarını eşleyerek, onları etkisiz hale getirirler. Ekstrelerimizin anti-radikal özelliklerinin olup olmadığını belirleyebilmek için 517 nm'de maksimum absorbans veren DPPH radikali kullanılmıştır. DPPH konsantrasyonu azaldıkça, absorbans da azalmaktadır. Bu nedenle antioksidan maddeler, 517 nm'de DPPH absorbansında azalmaya neden olurlar. DPPH radikalinin ortamdaki miktarının azalması ile absorbansın azalması belli bir antioksidan derişimine kadar doğru orantılıdır. Absorbansın düşmesinin sebebi, radikal ile antioksidan moleküllerin reaksiyonu sonucu hidrojen bağlanması ile radikalın giderilmesidir.

Çalışmada kullanılan bitkinin her bir ekstresinin serbest radikal süpürücü etkileri, DPPH radikali üzerinden tayin edilmiştir. Standart madde olarak rutin kullanılmıştır. *H. hirsutissimum*'dan elde edilen ekstrelerin serbest radikal süpürme aktivitesi, 1, 1- diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radikali kullanılarak araştırılmıştır (Brand-Williams vd., 1995). Yöntem, aktivitesi araştırılan örneğin bir proton veya elektron verebilme yeteneğinin, mor renkli DPPH çözeltisinin rengini açması esasına dayanmaktadır. Reaksiyon karışımının absorbansının düşmesi, yüksek serbest radikal süpürme aktivitesinin göstergesidir. Ekstrelerinin denenen konsantrasyonlarının (25, 50, 100 ppm) % DPPH radikal süpürme aktivitesi aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ DPPH Radikal Süpürme Aktivitesi} = \frac{\text{Abs}_{\text{Kontrol}} - \text{Abs}_{\text{Örnek}}}{\text{Abs}_{\text{Kontrol}}} \times 100$$

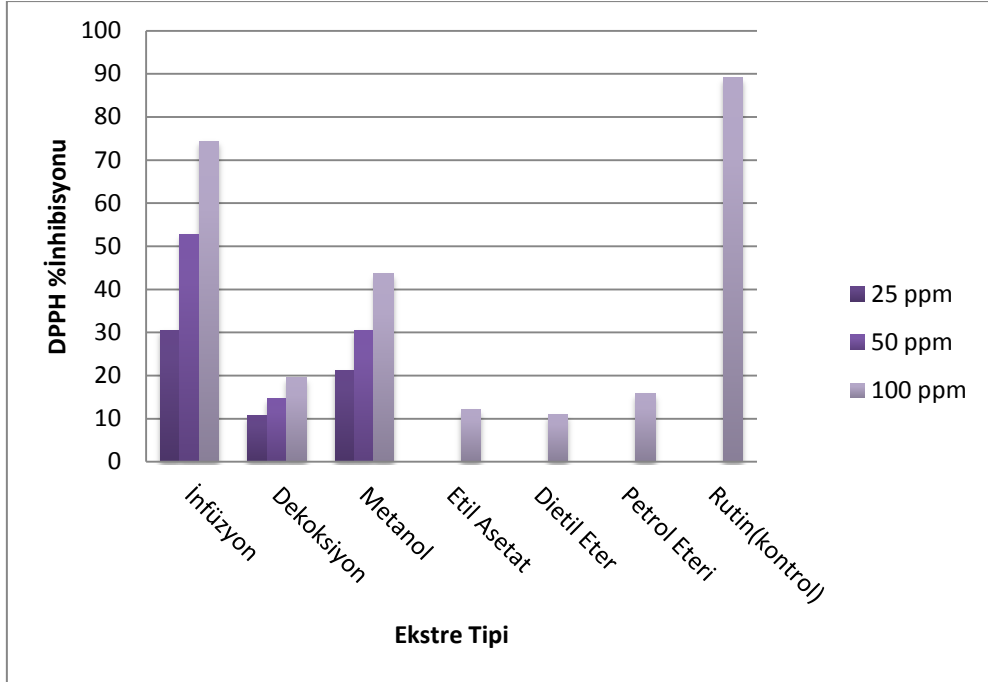
Ortamdaki DPPH radikalının % 50'sinin yok edilmesi için gereken etkili antioksidan konsantrasyonu EC₅₀ (veya IC₅₀) değeri olarak tanımlanır ve düşük EC₅₀ değeri yüksek radikal giderme aktivitesinin göstergesidir. Çalışmada kullanılan bütün ekstrelerin her biri için ayrı ayrı çizilen konsantrasyon - % inhibisyon grafiklerinden EC₅₀ (µg/mL) değerleri belirlenmiş ve elde edilen bu değerler Çizelge 6.4.'de verilmiştir.

Standart antioksidan bileşiği olarak kullanılan rutin flavonoidinin DPPH süpürme aktivitesi (%89,1) baz alındığında; DPPH radikalini süpürme aktivitesinin en yüksek olduğu ekstre, 50 ppm ve 100 ppm 'lik infüzyon ekstresinde olduğu gözlenmiştir (sırası ile; % 52.8 ve 74.4). İnfüzyon ekstresi dışındaki diğer ekstrelerde kayda değer bir DPPH radikalini süpürme aktivitesi gözlenememiştir (Çizelge 6.4. ve Şekil 6.3.). % 50 inhibitör konsantrasyon değeri (IC₅₀) sadece %50'nin üzerinde süpürme aktivitesi gösteren infüzyon ekstresi için hesaplanabilmiş, diğer ekstrelerde bu değere ulaşamadığından IC₅₀ değeri hesaplanamamıştır.

Çizelge 6.4. *H. hirsutissimum* örneklerinden elde edilen ekstrelerin ve standardın DPPH süpürme aktivitesi ve IC₅₀ değerleri

Eksre Tipi	Konsantrasyon	%DPPH süpürme Aktivitesi ± SD	IC ₅₀ (µg/mL)
Petrol Eteri	25 ppm	0.0 ±0.0025	-
	50 ppm	0.0 ±0.0025	
	100 ppm	15.8 ±0.0025	
Dietil Eter	25 ppm	0.0 ±0.1327	-
	50 ppm	0.0 ±0.0005	
	100 ppm	11.0 ±0.0030	
Etil Asetat	25 ppm	0.0 ±0.0076	-
	50 ppm	0.0 ±0.0023	
	100 ppm	12.1 ±0.0025	
Metanol	25 ppm	21.2 ±0.0021	-
	50 ppm	30.5 ±0.0005	
	100 ppm	43.6 ±0.000	
İnfüzyon	25 ppm	30.5 ±0.0190	49.98 ppm
	50 ppm	52.8 ±0.0005*	
	100 ppm	74.4 ±0.1646*	
Dekoksiyon	25 ppm	10.7 ±0.0076	-
	50 ppm	14.6 ±0.0010	
	100 ppm	19.6 ±0.0020	
Rutin Flavonoidi (kontrol)	100 ppm	89.1 ±0.0015*	

*p<0.05 seviyesinde önemlidir.



Şekil. 6.3. *H. hirsutissimum* örneklerinden elde edilen ekstrelerin ve standardın DPPH süpürme aktivitesi

6.5. *Heliotropium hirsutissimum*'dan Elde Edilen Farklı Ekstrelerin H₂O₂ Süpürme Aktivitesi

H. hirsutissimum'dan elde edilen farklı ekstrelerin hidrojen peroksit süpürme aktivitesi Ruch ve ark. yöntemine göre belirlenmiştir (Ruch vd., 1989). Bu yöntemde, reaksiyon ortamına eklenen belirli miktardaki hidrojen peroksit çözeltisinin bitki ekstresi tarafından yıkılması, 230 nm'deki absorbans değişimiyle izlenir. Süpürme aktivitesinin okuma absorbansı 230 nm'de gerçekleştirildiğinden ekstrelerin konsantrasyonları, DPPH süpürme aktivitesi yönteminde kullanılan konsantrasyon aralığının 5 kat seyreltilmesiyle gerçekleştirilmiştir (5, 10, 20 ppm). Bu konsantrasyonlar, 50 ppm ve 100 ppm'lik konsantrasyonların 230 nm'de absorbans okuma aralığının dışında kalan değerler vermesinden dolayı seçilmiştir. Ekstrelerin H₂O₂ süpürme aktivitesi aşağıdaki denklem kullanılarak belirlenmiştir.

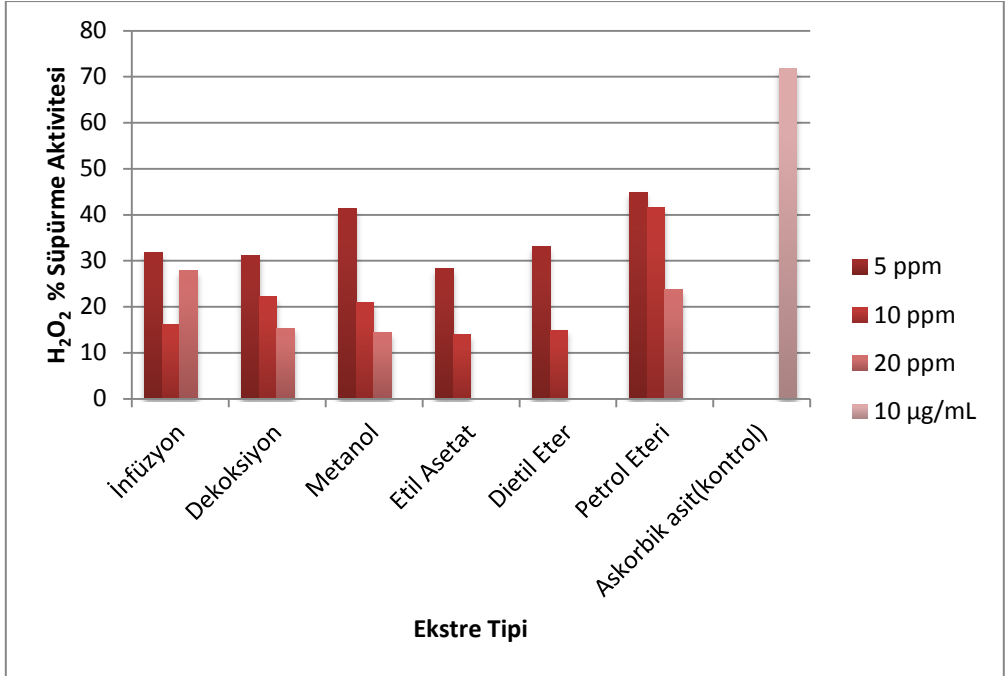
$$\% \text{H}_2\text{O}_2 \text{ Giderme Aktivitesi} = 1 - \frac{\text{230 nm'de \u00d6rnek Absorbans\u0131}}{\text{230 nm'de Kontrol Absorbans\u0131}} \times 100$$

H. hirsutissimum'dan elde edilen petrol eteri, dietil eter, etil asetat, metanol, su (inf\u00fczyon ve dekoksiyon) ekstrelerinin H₂O₂ s\u00fcp\u00fcrme aktiviteleri \u00c7izelge 6.5.'de yer almaktadır. Kontrol grubu olarak kullanılan askorbik asit ile elde edilen sonu\u00e7lar kar\u015f\u0131la\u015ft\u0131r\u0131ld\u0131\u011f\u0131nda H₂O₂ s\u00fcp\u00fcrme aktivitesi bakım\u0131ndan petrol eteri (% 44.9) ve metanol (% 41.3) ekstresi di\u011fer ekstrelelere g\u00f6re d\u00fc\u015fik de olsa H₂O₂ s\u00fcp\u00fcrme aktivitesi g\u00f6stermi\u015flerdir (\u015ekil 6.4). Ekstrelerin artan konsantrasyonlarda absorbanslarının artmas\u0131 nedeniyle, H₂O₂ s\u00fcp\u00fcrme aktivitesinin ancak 5 ppm'de ger\u00e7ekle\u015fti\u011fi g\u00f6zlenmi\u015ftir. Petrol eteri ve metanol ekstresi d\u0131\u015f\u0131nda kalan di\u011fer ekstrelerin H₂O₂ s\u00fcp\u00fcrme aktivitesi ise olduk\u00e7a zayıf bulunmu\u015ftur.

Çizelge 6.5. *H. hirsutissimum* 'dan elde edilen farklı ekstrelerin ve standardın H₂O₂ süpürme aktiviteleri

Ekstre Tipi	Konsantrasyon	%H ₂ O ₂ süpürme Aktivitesi ± SD	IC ₅₀ değeri
Petrol Eteri	5 ppm	44.9 ±0.0043	-
	10 ppm	41.5 ±0.0012	
	20 ppm	23.7 ±0.0043	
Dietyl Eter	5 ppm	33.1 ±0.0016	-
	10 ppm	14.9 ±0.0023	
	20 ppm	0.0 ±0.0008	
Etil Asetat	5 ppm	28.3 ±0.0014	-
	10 ppm	14.0 ±0.0019	
	20 ppm	0.0 ±0.0085	
Metanol	5 ppm	41.3±0.0071	-
	10 ppm	20.9 ±0.0081	
	20 ppm	14.3 ±0.0009	
İnfüzyon	5 ppm	31.7 ±0.0008	-
	10 ppm	16.1 ±0.0012	
	20 ppm	27.8 ±0.0019	
Dekoksiyon	5 ppm	31.2 ±0.0022	-
	10 ppm	22.2 ±0.0014	
	20 ppm	15.3 ±0.0015	
Askorbik Asit (kontrol)	10 µg/mL	71.8 ±0.0069*	

* p<0,05 seviyesinde önemlidir (One Way ANOVA).



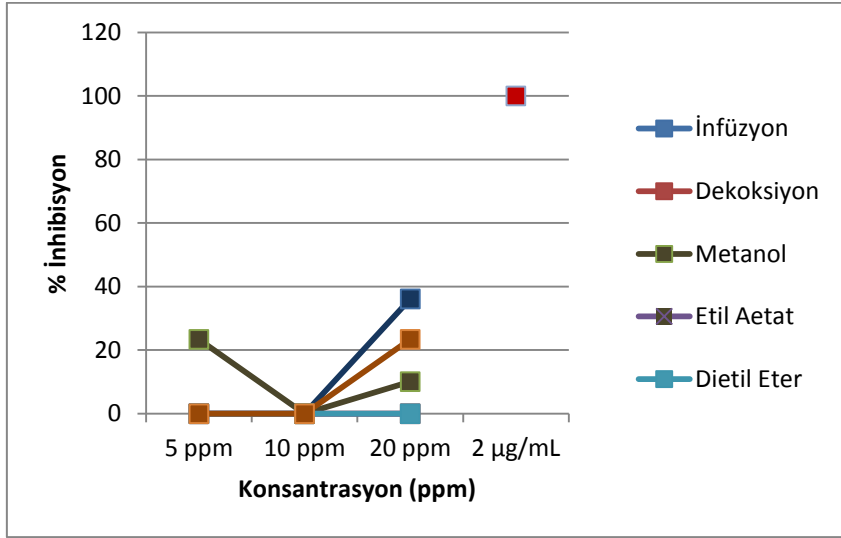
Şekil 6.4. *H. hirsutissimum*'dan elde edilen farklı ekstrelerin ve standardın H₂O₂ süpürme aktiviteleri

6.6. *Heliotropium hirsutissimum*'dan Elde Edilen Farklı Ekstrelerin Metal Şelatlama Aktivitesi

Farklı konsantrasyonlardaki (5, 10, 20 ppm) bitki ekstralarının Fe⁺² iyonlarını şelatlama aktivitesi, Dinis ve ark. metoduna göre belirlenmiştir (Dinis vd., 1994). Metod Fe⁺² iyonlarını bağlamak üzere, güçlü bir demir şelatlayıcı olan ferrozin reaktifi ile ortamda bulunan metal bağlayıcı bileşiklerin yarışmasına dayanır. Şelatlama gücü yüksekse kırmızı renkli Fe²⁺/ferrozin kompleksinin oluşumu engellenir. Ferrozin-Fe⁺² kompleksinin inhibisyon yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Metal Şelatlama Aktivitesi} = 1 - \frac{562 \text{ nm'deki Örnek Absorbansı}}{562 \text{ nm'deki Kontrol Absorbansı}} \times 100$$

Ekstrelerin metal iyonu şelatlama aktivitesini belirleyebilmek için kıyaslama maddesi olarak, iyi bir metal şelatlayıcı olan EDTA seçilmiştir. Çalışmada kullanılan ekstrere için, metal şelatlama aktivitesini gösteren konsantrasyon - % inhibisyon grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 6.5.).



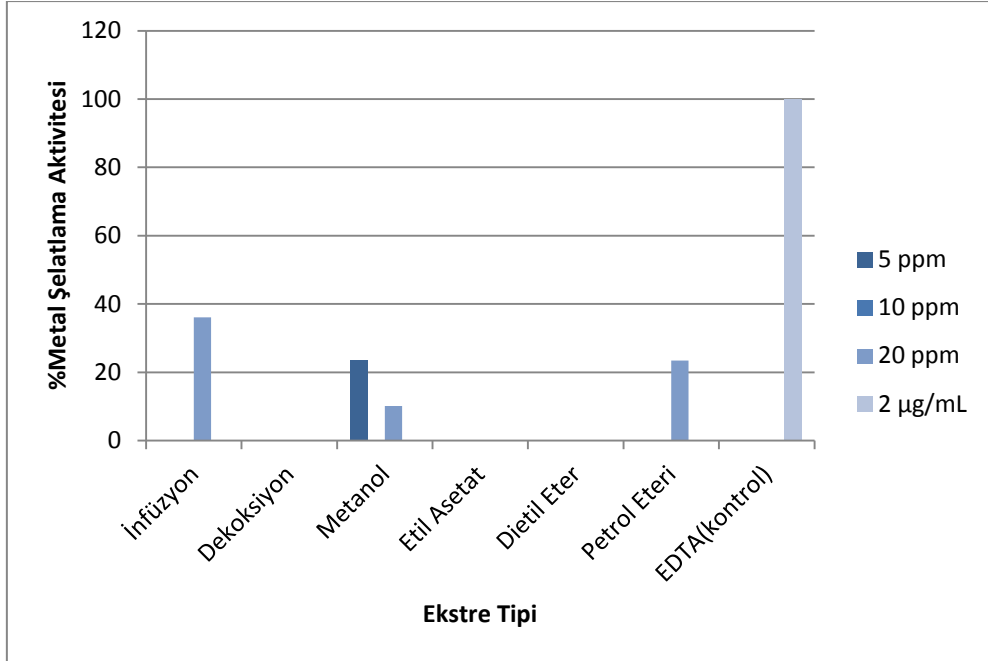
Şekil 6.5. *H. hirsutissimum*'dan elde edilen farklı ekstrere ve EDTA'nın konsantrasyon % inhibisyon grafiği

H. hirsutissimum petrol eteri, dietil eter, etil asetat, metanol, su (infüzyon ve dekoksiyon) ekstrere metal şelatlama kapasiteleri Çizelge 6.6.'de verilmiştir. Ekstrelerin metal şelatlama kapasiteleri değerlendirildiğinde; petrol eteri, metanol ve infüzyon ekstrere hariç, diğer ekstrere hiç biri şelatlama aktivitesi göstermemişlerdir. Ekstrelerin metal şelatlama aktiviteleri sırasıyla infüzyon ekstresinde % 36.1 (20 ppm), metanol ekstresinde % 23.4 (5 ppm) ve petrol eterin ekstresinde ise % 23.4 (20 ppm) 'tir. Metanol ekstresi maksimum metal şelatlama aktivitesini 5 ppm'de gösterirken, petrol eteri ve infüzyon ekstrere maksimum metal şelatlama aktivitelerini ancak konsantrasyon 20 ppm'e çıktığında göstermişlerdir. Elde edilen bu sonuçlar EDTA'nın aktivitesiyle karşılaştırıldığında, EDTA ile ekstrere arasında gözlenen metal şelatlama aktivitesi arasındaki fark, istatistiki olarak önemlidir ($p < 0,05$) (Çizelge 6.6).

Çizelge 6.6. *H. hirsutissimum*'dan elde edilen ekstrelerin ve EDTA'nın metal şelatlama aktivitesi

Ekstre Tipi	Konsantrasyon	%Metal Şelatlama Aktivitesi ±SD (Absorbans)	IC ₅₀ değeri
Petrol Eteri	5 ppm	0.0 ±0.0120	-
	10 ppm	0.0 ±0.0045	
	20 ppm	23.4 ±0.0020	
Dietil Eter	5 ppm	0.0 ±0.0215	-
	10 ppm	0.0 ±0.0015	
	20 ppm	0.0 ±0.0090	
Etil Asetat	5 ppm	0.0 ±0.0010	-
	10 ppm	0.0 ±0.0000	
	20 ppm	0.0 ±0.0010	
Metanol	5 ppm	23.4±0.0020	-
	10 ppm	0.0 ±0.0055	
	20 ppm	10.1 ±0.0005	
İnfüzyon	5 ppm	0.0 ±0.0090	-
	10 ppm	0.0 ±0.0000	
	20 ppm	36.1 ±0.0010	
Dekoksiyon	5 ppm	0.0 ±0.0050	-
	10 ppm	0.0 ±0.0040	
	20 ppm	0.0 ±0.0025	
EDTA (kontrol)	2 µg/mL	100.0 ±0.0000*	

*p<0,05 seviyesinde önemlidir (One Way ANOVA)



Şekil 6.6. *H. hirsutissimum*'dan elde edilen ekstrelerin ve EDTA'nın metal şelatlama kapasitesi

6.7. *Heliotropium hirsutissimum*'dan Elde Edilen Farklı Ekstrelerin Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality Assay (BSLA) ile Akut Toksisitesinin Belirlenmesi

H. hirsutissimum petrol eteri, diethyl eter, etil asetat, metanol, su (infüzyon ve dekoksiyon) ekstrlerinin Brine Shrimp (*Artemia salina*) larvaları üzerindeki akut toksisitesini belirleyebilmek için, toksisite verileri hesaplanmış ve LD₁₀ ve LD₅₀ değerleri ile birlikte üst ve alt % 95 güvenilirlik sınırları ortaya konulmuştur. Sonuçların toksisite derecelendirilmeleri ise Çizelge 6.7'deki referans değerlerine göre yapılmıştır (Brayn vd.,1997).

Çizelge 6.7. Toksikite derecesi değerlendirilmesinde kullanılan referans değerleri (Brayn vd., 1997).

Toksikite Derecesi	LD₅₀ Limitleri
Oldukça Toksik	< 10 µg/mL
Toksik	>10 µg/mL
Zararlı	> 100 µg/mL
Toksik Değil	> 1000 µg/mL

Petrol eteri, dietil eter, etil asetat, metanol, su (infüzyon ve dekoksasyon) ekstrilerine ait verilerin Probit analizi ile değerlendirilmesi sonucunda; denenen ekstrilerin belirlenen konsantrasyon aralıklarında (10, 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 ppm) LC₅₀ değerlerine ulaşamadığı görülmüştür. LC₁₀ değeri sonuçları ise; metanol (LC₁₀= 258.610 ppm) ve dietil eter (LC₁₀= 93.344 ppm) ekstrileri dışında diğer ekstrilerde anlamlı sonuçlar ortaya koymamıştır (p<0.05). Denenen ekstrilere ve pozitif kontrol olarak kullanılan umbelliferon'a ait toksisite sonuçları Çizelge 6.8 ve 6.9'de yer almaktadır.

Çizelge 6.8. *H. hirsutissimum*'dan elde edilen ekstrelerin ve umbelliferon'un Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality (BSLA) Assay ile Elde Edilen LD₁₀ ve LD₅₀ değerleri

Ekstre Tipi	LC₁₀ değeri (ppm)	LC₅₀ değeri (ppm)
Metanol	258.610	>1000
Dietil eter	93.344	>1000
Petrol eteri	>1000	>1000
Etil asetat	>1000	>1000
Su (infüzyon)	>1000	>1000
Su (dekoksiyon)	>1000	>1000
Umbelliferon (pozitif kontrol)	53.773	170.836

H. hirsutissimum petrol eteri, dietil eter, etil asetat, metanol, su (infüzyon ve dekoksiyon) ekstrelerinin denemede kullanılan konsantrasyonları hemen hemen kontrol ile aynı değerleri vermiş ve bu değerlerin de istatistiki olarak anlamlı sonuçlar ortaya koymadığı gözlemlenmiştir. Elde edilen veriler *H. hirsutissimum* petrol eteri, dietil eter, etil asetat, metanol, su (infüzyon ve dekoksiyon) ekstrelerinin uygulanan konsantrasyon aralıklarında 100µg/ml–1000µg/ml arasında bulunan LC₅₀ değerleri, alt ve üst güvenlik sınırları itibariyle toksisite sınırları içerisinde yer aldığını, bu konsantrasyon aralıkları içinde toksik olmadığını ortaya koymuştur (Çizelge 6.9).

Çizelge 6.9. *H. hirsutissimum*'dan elde edilen farklı ekstrelerin ve umbelliferon'un *Artemia salina* larvalarındaki % ortalama canlılık değerleri

Ekstraksiyon Tipi	Konsantrasyon (ppm)	Ortalama Canlılık \pm SD
Petrol Eteri	10	9.33 \pm 0.577
	25	8.67 \pm 1.528
	50	9.67 \pm 0.577
	100	9.00 \pm 1.000
	250	9.00 \pm 1.000
	500	9.33 \pm 0.577
	1000	8.67 \pm 1.528
Dietil Eter	10	9.67 \pm 0.577
	25	9.00 \pm 1.000
	50	9.33 \pm 0.577
	100	9.00 \pm 1.000
	250	8.33 \pm 0.577
	500	9.33 \pm 0.577
	1000	9.33 \pm 0.577
Etil Asetat	10	9.33 \pm 0.577
	25	9.67 \pm 0.577
	50	9.67 \pm 0.577
	100	8.67 \pm 1.528
	250	9.67 \pm 0.577
	500	9.33 \pm 1.155
	1000	7.67 \pm 0.577
Metanol	10	9.67 \pm 0.577
	25	9.67 \pm 0.577
	50	9.33 \pm 0.577
	100	9.67 \pm 0.577
	250	7.67 \pm 1.528
	500	8.67 \pm 1.155
	1000	8.67 \pm 0.577
Su (infüzyon)	10	1.00 \pm 0.000
	25	9.67 \pm 0.577
	50	9.33 \pm 0.577
	100	9.00 \pm 0.000
	250	9.00 \pm 1.000
	500	8.67 \pm 0.577
	1000	8.67 \pm 0.577
Su (dekoksiyon)	10	9.67 \pm 0.577
	25	9.67 \pm 0.577
	50	9.33 \pm 0.577
	100	9.33 \pm 0.577
	250	9.67 \pm 0.577
	500	9.33 \pm 0.577
	1000	9.67 \pm 0.577
Umbelliferon	10	9.33 \pm 0.5773
	25	9.33 \pm 1.1547
	50	9.33 \pm 0.5773
	100	6.33 \pm 2.0816
	250	2.33 \pm 0.5773
	500	2.00 \pm 0.0000
	1000	0.00 \pm 0.0000
Kontrol	0	9.33 \pm 0.577

7. TARTIŞMA

Bu çalışmada ülser, yara iyileşmesi, lokal inflamasyon, ürtiker, saçkıran, romatizma, ateşlenme, sedef hastalığı ve arı sokması gibi rahatsızlıklarda bu hastalıklarının tedavisi başta olmak üzere halk tıbbında çok çeşitli amaçlarla kullanılan *Heliotropium hirsutissimum* (Bambıl, Deve bambılı, Deli bambıl, Siğil otu, Aygün çiçeği) bitkisinden farklı polaritelere sahip olan çözücülerle elde edilen ekstrelerde (petrol eteri, dietil eter, etil asetat, metanol, su (infüzyon ve dekoksasyon)) bulunması muhtemel başlıca kimyasal grupları belirleyebilmek için, fitokimyasal madde taraması yapılmış ve ekstrelerin toplam fenolik madde miktarı, antioksidan aktivitesi, hidroksil radikalini ve hidrojen peroksit süpürme ve metal şelatlama aktiviteleri belirlenmiştir. Ayrıca bitkiden elde edilen ekstrelerin sitotoksik etkisinin olup olmadığı da Brine Shrimp (*Artemia salina*) Letality Assay (BSLA) ile araştırılmış, çalışmadan elde edilen sonuçlar diğer araştırmacıların sonuçlarıyla tartışılmıştır.

Bu çalışmada *H. hirsutissimum*'dan elde edilen ham ekstreler kullanılmıştır, çünkü tıbbi bitkilerin halk arasındaki kullanımı genellikle bu şekildedir. Bununla birlikte, ham ekstrelerle çalışmak, aynı zamanda biyoaktif bileşiklerin kompleks karışımları ile çalışmak demektir. Bu tür karışımlardaki bileşiklerin bazıları sitotoksik ve/veya genotoksik iken, diğerleri hücre koruyucu ve/veya antijenotoksik olabilir. Bitkilerden ekstrakt elde etmenin temel amacı bitkilerin gereksiz maddelerden arındırılması ve ana aktif maddelerinin (fitobiyotik) saf olarak elde edilmesidir. Bitkiden beklenen etkinin tam olarak alınabilmesi için bitkiye uygulanacak ekstraksiyon yöntemi ve varsa bu yöntemde kullanılacak uygun çözücünün seçimi çok önemlidir.

H. hirsutissimum'dan elde edilen ekstrelerde kuru bitki üzerinden hesaplanan en fazla ekstraksiyon verimi; metanol ekstresinden (% 16,4) elde edilmiş olup, metanolü takiben verim açısından en iyi ekstreler; dekoksasyon (% 8,36) ve infüzyon (% 6,04), etil asetat (% 2,79), dietil eter (% 1,94) ve petrol eteri (% 1,59) ekstresi olmuştur (Çizelge 6.1). Farklı ekstrelerden elde edilen ekstre verimindeki farklılıklar, bitkinin sahip olduğu kimyasal kompozisyonundan, bitki ekstraksiyonu yapılırken ekstraksiyonda kullanılan maddeden ve yöntemdeki farklılıklardan kaynaklanmış olabilir. Hayouni vd. (2007) ile Özcan vd. (2007) farklı yöntemler ve farklı polariteye sahip çözücüler kullanarak yaptıkları

araştırmalar sonucunda, % ekstrakt miktarları üzerine polar çözücülerin apolar çözücülerden daha etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Bitkilerin ikincil metabolik faaliyetleri sırasında ortaya çıkarak depolanan, sadece besin olarak tüketildikleri zaman insan sağlığı için yararlı etkilerde bulunan biyoaktif bileşiklere bitki kimyasalları (fitokimyasallar); karotenoidler, flavonoidler, polifenoller, fitosteroller, fitoestrogenler, indoller ve sülfidler olarak gruplandırılmaktadırlar. Fitokimyasallar sahip oldukları antioksidan aktiviteleri sayesinde birçok olumsuz duruma karşı koruyucu ve iyileştirici bir etkiye sahiptirler. Fitokimyasalların önemli bir grubunu oluşturan fenolik bileşiklerin serbest radikal temizleme ve antioksidan aktivitesi genellikle fenolik moleküllerin aromatik halkasında bulunan hidrojen verici -OH gruplarının sayısına ve pozisyonuna bağlıdır ve aglikonların glikolizasyonu ve diğer H verici gruplar (-NH , -SH) gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Bu özellik serbest radikallerin absorbe edilmesinde ve nötrale edilmesinde, tekil ve üçlü oksijenin yakalanmasında veya peroksitlerin ayrıştırılmasında önemli rol oynamaktadır (Panovska vd., 2005). Yine bu özellik sayesinde fenolik bileşikler indirgeyici ajan, hidrojen verici, tekil oksijen yakalayıcı ve metal şelatörü olarak görev yapmaktadırlar (Ivanova vd., 2005). Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesinin nedeni, redoks özelliği olup, bu özellik bileşiklerin kimyasal yapılarıyla yakından ilişkilidir (Rice-Evans vd.,1996; Morel vd.,1994).

Serbest radikallerin canlılarda fizyolojik seviyelerinin üzerinde bulunması durumunda doğrudan ya da dolaylı olarak kanser, diyabet, Alzheimer, Parkinson kardiyovasküler rahatsızlıklar gibi sağlık sorunlarına neden olabilmektedirler (Valko vd. 2007). Serbest radikallerin yol açtığı bu tip sorunlar göz önüne alındığında, standardize edilmiş test yöntemleriyle radikal süpürme ve antioksidan aktivite testlerinin ne derece önemli olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Bitkisel ekstrelerin 1,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürücü aktivitesini etkileyen en önemli faktörlerden biri, ekstre içerisinde DPPH radikali ile reaksiyona girerek bu radikale proton (hidrojen atomu) verme yeteneğine sahip olan bileşiklerin bulunmasıdır. Bitkisel ekstrelerin DPPH radikal süpürücü aktivitesini etkileyen en önemli faktörlerden ikincisi ise, kullanılan çözücünün polaritesidir. Dielektrik sabiti, çözücü polaritesini yaklaşık olarak veren bir niceliktir ve çözücünün zıt yükleri birbirinden ayırma yeteneğinin bir ölçüsüdür (Jensen, 2009). Tez çalışması kapsamında kullanılan bitkilerden ekstrelerin elde edilmesinde kullanılan çözücülerin dielektrik sabitlerine bakıldığında etil asetat

(6.0), metanol (32.6) ve suyun (80.0) polar çözücüler olduğu; buna karşın dietil eter (4.191) ve petrol eterinin (2.22) ise, apolar (polar olmayan) çözücüler olduğu görülmektedir. Etil asetat polar bir çözücü olmasına rağmen, etil asetatın polaritesi metanole, metanolün polaritesi de suya göre daha düşüktür. Bu çözücülerin normal koşullarda (25 °C'de ve 1 atmosfer basınçta) polarite indeksleri etil asetat için 4,4; metanol için 5.1 ve su için 10.2'dir. Dolayısıyla metanol orta derecedeki polar bileşikler çözebilirken, su yüksek seviyede polar bileşikler çözebilmektedir. Çözücü ve çözünenin birbiri içinde homojen olarak karışması ile çözünme olayı gerçekleşir. Çözünme, moleküller arasındaki çekim kuvvetine dayanır. Bir çözücünün bir maddeyi çözebilmesi için; çözücü ile çözünen moleküller arasındaki çekim kuvvetlerinin, çözücü ve çözünenin kendi moleküller arasındaki çekim kuvvetinden daha büyük olması gerekir. Genellikle çözünme olayı, çözücü ile çözünenin benzer yapıda olmaları ile gerçekleşir. Bu durum benzer benzeri çözer şeklinde ifade edilebilir. Dolayısıyla polar çözücüler polar maddeleri, polar olmayan çözücüler de polar olmayan maddeleri daha iyi çözer (Jensen, 2009). Bu bilgiden yola çıkarak, denenen bitkilerden elde edilen dietil eter ve petrol eteri ekstralarının apolar bileşikler; etil asetat, metanol ve sulu ekstraların ise polar bileşikler içerdiği düşünülmektedir. Su, yüksek kaynama noktasına, yüksek dielektrik sabitine ve polariteye sahip olması nedeni ile özel bir çözücüdür. Suyun normal koşullarda oldukça yüksek olan dielektrik sabiti ve polaritesi, yüksek sıcaklık ve basınçta oldukça düşmektedir ve ekstraksiyon işleminde etanol, aseton, metanol gibi davranabilmektedir. Bu sayede su oda sıcaklığında polaritesi yüksek olan bileşenler çözebilirken, sıcaklık ve basınç arttığında orta polar-düşük polar bileşenlerin ekstraksiyonu için organik çözücüler yerine kullanılabilir (Çam ve Hışıl, 2006).

Denemede kullanılan bitkilerden sulu ekstraların iki farklı şekilde elde edildiği göz önüne alınırsa, infüzyon (demleme) yöntemi ile elde edilen ekstraların orta polar-düşük polar bileşikler içerdiği; buna karşın dekoksasyon (kaynatma) yöntemi ile elde edilen ekstraların hem yüksek, hem de orta ve düşük polar bileşikler içerdiği söylenebilir. Bitkilerden farklı yöntemlerle elde edilen ekstraların çözücü özelliklerine göre farklı bileşikler içermesi, ekstraların DPPH üzerinden serbest radikali süpürücü aktivitelerinin birbirinden farklı olmasına ve polar çözücüler kullanılarak elde edilen ekstraların, polar olmayan çözücüler kullanılarak elde edilen ekstralardan çok daha yüksek DPPH radikal süpürücü aktivite göstermesine neden olabilmektedir (Miliauskas vd., 2004; Vundać vd., 2007, Aslantürk, 2010).

Brand-Williams vd. (1995) de antioksidan aktiviteyi belirlemek için 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl'i (DPPH) kullanmışlardır. Antiradikal aktivite tayini belirlemede antioksidan özelliği olduğu bilinen fenol, BHT, BHA, p-kumarik asit, vanilin, vanilik asit, izogenol, ferülik asit, eugenol, zingeron, guaiacol, protocatehuic asit, kafeik asit, gallik asit ve gentsik asit bileşiklerini kullanmışlardır. Antiradikal gücü tayin ederken bileşiklerin 3 tip kinetik aktivite gösterdiklerini saptamışlardır ve bunun zamana bağlı olarak çok hızlı (1 dakika), orta hızda (5-30 dakika) ve yavaş hızda (1-6 saat) kararlı duruma geçiş gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Bunun yanında aktivite hızı ile antiradikal güç arasında doğrudan bir korelasyon olmadığını, dolayısıyla zamana bağlı olarak etki gösteren (yavaş hızda) bazı bileşiklerin hızlı aktivite gösteren bileşiklere göre daha etkin olduğunu rapor etmişlerdir. Lemos vd. (2006), *Magonia glabrata* 'nın meyve kısımlarından etanol ekstresinden şikimik asit, skopoletin, 2-O-Metil-L-inositol içeriklerini elde etmiş ve 2-O-Metil-L-inositol bileşiğini ekstreden ayırarak değerlendirmişlerdir. Antioksidan aktiviteyi belirlemek amacıyla DPPH radikali süpürme aktivitesi testini kullanmışlardır. Bütillenmiş hidroksitoluenin kontrol olarak kullanıldığı testte, etanol ekstresinin kontrolle karşılaştırıldığında radikal süpürme aktivitesinin oldukça yüksek olduğu bulunmuştur ($p < 0.01$).

H. hirsutissimum'dan elde edilen ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanan petrol eteri, dietil eter, etil asetat, metanol, su (infüzyon ve dekoksiyon) ekstrelerinin DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü aktivitesi kendi aralarında ve standart bir antioksidan olan rutin (% 89.1) ile karşılaştırıldığında, sadece infüzyon ekstresi diğerlerine göre serbest radikali süpürücü aktivite bakımından 50 ppm ve 100 ppm'lik konsantrasyonlarda antioksidan aktiviteye sahip olmasına rağmen (sırası ile % 52.8 ve % 74.4), denenen diğer ekstrelerin hiçbirinin kayda değer bir serbest radikal süpürücü aktivite göstermediği tespit edilmiştir (Çizelge 6.4). Ancak denemede *H. hirsutissimum* bitkisinin ham ekstreleri kullanıldığı ve bitkiden elde edilen ekstrelerin içerik analizleri yapılamadığı için, bu bitkiden elde edilen ekstrelerin hiçbirinin kayda değer bir serbest radikal süpürücü aktivite göstermemesinin nedeni hakkında kesin bir yorumda bulunmak mümkün değildir.

Biyolojik olarak aktif bileşikler olan fitokimyasallar, güçlü antioksidan aktiviteleri ile insan ve hayvanlarda kronik hastalıkların oluşmasını önler veya ilerlemesini geciktirirler. Bu maddeler içinde fenolik bileşikler, bitkinin toplam antioksidan aktivitesine katkıda bulunan temel bileşenlerdir. Bitkilerde bulunan antioksidanlar, serbest radikaller ile reaksiyona girerek ve lipid peroksidasyonunu

katalizleme yeteneğinde olan demir ve bakır gibi metaller ile şelat oluşturarak, antioksidan aktivite göstermektedirler. Bitkilerden farklı çözücülerle elde edilen fraksiyonlar, toplam fenolik içeriklerine bağlı olarak antioksidan aktiviteleri bakımından farklılık göstermektedirler. Fenoller hidroksil grupları bulundurdıklarından, serbest radikalleri yok etme yetenekleri nedeniyle çok önemli bitki bileşenleridir (Hatano vd, 1989). Aynı zamanda fenolik bileşikler doğrudan doğruya antioksidan aktiviteye katkıda bulunabilirler (Duh vd, 1999). Polifenolik bileşikler, potansiyel bir antioksidan olduğu için antioksidan aktivite belirlemede, toplam fenolik madde miktarlarının bilinmesi önemlidir. *H. hirsutissimum*'dan elde edilen ekstrelerde toplam fenolik madde tayininde standart bileşik olarak, gallik asit kullanılmış ve standart grafikler hazırlamıştır. Bu standart grafikler kullanılarak örneklerin toplam fenolik madde miktarları mg gallik asit (gr GAE/g ekstrakt) eşdeğeri şeklinde hesaplanmıştır. Bitkinin farklı ekstrelerinin fenolik bileşik içeriği karşılaştırıldığında; denenen bütün ekstrelerdeki fenolik içeriğin oldukça düşük miktarda bulunduğu tespit edilmiştir. Gallik asit eşdeğer (GAE) alınarak sırasıyla fenolik içeriğin dietil eter ekstresinde 55.7 µg/g, etil asetat ekstresinde 52.3 µg/g, petrol eteri ekstresinde 42.3 µg/g, metanol ve infüzyon ekstresinde 34.3 µg/g ve dekoksasyon ekstresinde ise, 33.3 µg/g olduğu hesaplanmıştır (Çizelge 6.3). Fenolik maddece fakir olduğu gözlemlenen ekstrelerin serbest radikalleri süpürme aktivitesi hiç yok denecek kadar azdır. Buna karşın, infüzyon ekstresinin DPPH radikalini süpürme aktivitesinin diğer ekstrelerden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, çalışılan bitkinin kullanılan çözücülere göre fenolik madde içeriğindeki farklılıkların, gösterdikleri antioksidan özelliklerini etkilediği açıkça görülmüştür. Bunun yanında yüksek fenolik madde miktarına ve yüksek radikal yakalama aktivitesine sahip olmanın, birbirleri ile % 100 paralel olmadığı görülmüştür. Çalışmamızda da etanol ekstraktın fenolik madde miktarının en yüksek olduğu fakat DPPH serbest radikali giderim aktivitesinin infüzyon ekstresi hariç, diğer ekstrelerde düşük olduğu görülmüştür. Böylelikle tek bir yöntemle antioksidan aktivitesi hakkında karar vermenin doğru bir yaklaşım olmadığı anlaşılmakta ve buna göre antioksidan aktivitesi belirlenirken, farklı yöntemler kullanılması, farklı metotların uygulanması ve elde edilen aktivite sonuçlarının, her bir özelliğe göre verilmesinin daha doğru bir yaklaşım olacağı düşünülmektedir. Fenolik madde ve flavonoid miktarları ile antioksidan kapasitesi tayin yöntemleri arasında da bir ilişki mevcut olabilir. Özellikle radikal yakalama temeline dayalı DPPH gibi metotların toplam fenolik madde ve flavonoid

miktarları ile ilişkisi bazı bitkisel yapılarda önemli olabilir. Fenolik asitler ve flavonoidler polar çözücülerde çözümler ve polar sistemlerde güçlü aktivite gösterirler. DPPH radikal süpürücü etki testleri de polar ortamlarda yapılmaktadır. Bu nedenle de bu bileşiklerce zengin ekstraksiyonlar bu deney sistemlerinde etkili olarak bulunmuşlardır. DPPH radikali bununla birlikte antioksidan kapasiteleri ile fenolik bileşikler ve flavonoidler arasında da önemli farklılıklar söz konusu olabilir. Bitkisel kaynakların antioksidan kapasitelerini değerlendirirken bu ilişkilerin de irdelenmesi önerilmektedir (Arıduru ve Arabacı, 2013). Çalışmamızda kullanılan *Heliotropium hirsutissimum*'dan farklı polariteye sahip çözücülerle elde edilen ekstraktlarının fitokimyasal içeriklerine bakıldığında fenolik ve flavonoid gibi antioksidan aktivitede rol oynayan içeriklere eser miktarda sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle de infüzyon ekstresi hariç, ekstraktların antioksidan aktivitesinin de düşük olmasının nedeninin bu olabileceği düşünülmektedir.

Canlı organizmalarda hidrojen peroksit, süperoksit dismutaz gibi birçok enzim tarafından oluşturulabilir. Hidrojen peroksit çok reaktif değildir, fakat hücrede serbest radikallerin artmasına sebep olduğundan dolayı zamanla hücre için toksik olabilir. Hidrojen peroksit, hücre kültürüne ilave edildiğinde geçiş metal iyonları varlığında oksidatif DNA hasarlarına sebep olan hidroksi iyonlarının oluşmasına sebep olur. Hidrojen peroksit, birçok hücre tipinde 20- 50 mg'ın üzerinde olduğunda toksisiteye sebep olabilir. Bütün bunlardan dolayı farmasötik ve gıda sistemlerini oksidatif hasardan korumak için bu sistemlerden hidrojen peroksidi uzaklaştırmak oldukça önemlidir (Doğmuş ve Durucasu, 2013). Bir bileşiğin indirgeme kapasitesi onun elektron transfer edebilmesiyle ilişkilidir ve potansiyel antioksidan aktivitesinin önemli bir göstergesi olarak kabul edilir. Geçiş metalleri arasından Fe^{2+} , lipid oksidasyonunda prooksidan olarak bilinir. Fenton reaksiyonu ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^\bullet$) vasıtasıyla reaktif oksijen türlerini oluşturur ve lipid oksidasyonunu hızlandırır (Halliwell ve Gutteridge, 1990). Bitki ekstraktları geçiş metal iyonlarını bağlayarak ortamdaki konsantrasyonlarını azaltır ve Fe^{2+} katalizli lipid peroksidasyonunu geciktirirler.

Çalışmada metal iyonu şelatlama aktivitesi; bitki ekstraktlarının çözeltideki Fe^{2+} iyonlarını bağlayabilmek için ferrozin ile yarışmasına göre değerlendirilmiştir. Kıyaslama maddesi olarak iyi bir metal şelatlayıcı olan EDTA seçilmiştir. Bitki ekstraktlarının Fe^{2+} iyonlarını şelatlama aktivitesinin ölçümü 5-20 ppm aralığındaki konsantrasyonlarda çalışılmıştır. *H. hirsutissimum*'dan elde edilen ekstraktların

metal şelatlama aktiviteleri sırasıyla infüzyon ekstresinde % 36.1 (20 ppm'de), metanol ekstresinde % 23.4 (5 ppm'de) ve petrol eterin ekstresinde ise % 23.4 (20 ppm'de) 'tir. Metanol ekstresi maksimum metal şelatlama aktivitesini 5ppm'de gösterirken, petrol eteri ve infüzyon ekstreleri maksimum metal şelatlama aktivitelerini ancak konsantrasyon 20 ppm'e çıktığında gösterebilmişlerdir. Ancak bu sistemde ekstraktların hiçbiri standart olarak kullanılan EDTA'dan daha iyi şelatör olmamıştır (Çizelge 6.6).

Heliotropium hirsutissimum'dan elde edilen ekstrelerde alkaloidlerin, saponinlerin, tanenlerin, fenoller ve flavonoidlerin varlığını belirlemek için gereken fitokimyasal analizler sonucunda ekstrelerde en fazla bulunan fitokimyasal maddenin alkaloidler olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda bitki ekstrelerinde alkaloidlerden sonra gözlenen en yaygın içeriğin saponinler olduğu görülmüştür. Köpük oluşturma testiyle metanol ve su (infüzyon ve dekoksiyonda) ekstrelerinde tespit edilen saponinlerin benzer şekilde *H. indicum*'un metanol ekstresinde varlığı daha önceki çalışmalarda tespit edilmiştir (Sharma ve Alexander, 2011). Bizim elde ettiğimiz analiz sonuçları da literatür bilgilerine uygunluk göstermektedir. Metanol ekstresinde alkaloidlerin gözlenememesi, alkaloidlerin metanolde çözünemediği ya da içerikte bulunan herhangi bir maddenin antagonistik etkisine maruz kalabilmesinden kaynaklanmış olabilir. Tanin ve antrakinonların varlığının ise gerek ekstrelerdeki dağılımı gerekse belirginlik bakımından zayıf olduğu ve flavonoidlerin ise denenen hiç bir ekstrede bulunmadığı görülmüştür (Çizelge 6.2).

H. hirsutissimum dışında kalan diğer *Heliotropium* üyelerinde de alkaloidlerin varlığı tespit edilmiştir (Reina vd., 1998, Souza vd., 2005, Osungunna ve Adedeji, 2011). Yine daha önce yapılan çalışmalarda Boraginaceae familyasına ait türlerin hemen hepsinde bir tür alkaloit sınıfı olan pirolizidin alkaloidlerinin bulunduğu bildirilmiştir. Bu alkaloid sınıfı, ester alkaloidler olarak da bilinmektedir. Pirolizidin alkaloidinin sitotoksik etkilere sahip olduğu, insan ve çiftlik hayvanlarında zehirlenmelere neden olduğu (Sharma vd. 2009), çeşit ve maruz kalınan miktara bağlı olarak mutajenik, karsinojenik ve hepatotoksik etkiler meydana getirebildiği belirtilmiştir. Pirolizidin alkaloidlerinin özellikle DNA kırıklarına, DNA-DNA, DNA-protein çapraz bağlarına ve katılma tepkimelerine neden olabildiği de bildirilmiştir (Chen vd. 2010).

Özellikle bitkisel kökenli ilaç geliştirme aşamalarında söz konusu olan test bileşiğinin terapötik etkileri ve farmakolojik özelliklerinin yanı sıra bu bileşiğin toksikolojik özellikleri de göz önüne alınmak zorundadır. Toksikolojik özellikler, toksik etkinin akut, subakut, subkronik ve kronik düzeyde değerlendirilmesiyle belirlenmektedir. Bu özelliklerin belirlenmesinde akut etki önemli bir yer tutmaktadır. Brine shrimp (*Artemia salina*) Lethality Assay (BSLA) daha fazla zaman ve maliyet gerektiren hayvan denemeleriyle paralel sonuç veren hızlı bir yöntem olmasından dolayı, son zamanlarda en çok tercih edilen testlerden biri olmuştur. *H.hirsutissimum*'dan elde edilen farklı ekstrelerin akut sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla farklı konsantrasyonlarda hazırlanan (10, 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 ppm) ekstrelerin *Artemia salina* larvalarına uygulanması sonucunda, ekstrelerin hiç birinin LC₅₀ değeri üzerinden sitotoksik etki göstermediği belirlenmiştir. Denemelerde yalnızca metanol (258.610 ppm) ve petrol eteri ekstreleri için (93.344 ppm) LC₁₀ değeri (deneklerin % 10'unu öldüren konsantrasyon) hesaplanabilmiştir. Kontrol maddesi olarak kullanılan umbelliferon bileşiğinin ise LC₁₀ değerinin 53.773 ppm ve LC₅₀ değerinin ise 170.836 ppm olduğu belirlenmiştir (Çizelge 6.8).

Moshi ve arkadaşları da (2009), *Canarium schweinfurthii*, *Dissotis brazzae*, *Iboza urticifolia*, *Isoglosa lacteal*, *Strombosia scheffleri* ve *Whitfieldia elongata*' dan elde edilen diklorometan, etanol ve etil asetat ekstrelerinin antibakteriyel etkisini ve sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda diklorometan ekstrelerinin antibakteriyel aktivitesinin etanol ekstrelerine daha yüksek olduğunu, ekstrelerin (*Dissotis brazzae* ve *Strombosia scheffleri*'nin etanol ekstrelerinde LC₅₀>1000 toksik etki gözlenmemiştir) Brine shrimp larvalarına üzerinde çok düşük seviyede toksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Ullah vd. (2009), *Centella asiatica* bitkisinden metanol ekstraktının n-hekzan, karbon tetraklorid, kloroform ve su fraksiyonlarını elde etmişler ve Brine Shrimp Lethality Assay sonuçlarına göre, ekstrelerin yüksek sitotoksik aktivite gösterdiğini bulmuşlar ve LC₅₀ değerlerinin yukarıdaki fraksiyon sırasını takiben 1.254, 0.826, 3.866 ve 5.366 ug/ml olduğunu rapor etmişlerdir. Geleneksel kullanımlarını destekler şekilde gerçekten de *Centella asiatica* bitkisinin antioksidan, antimikrobiyal ve sitotoksik etki gösterdiğini ve önemli bir ilaç kaynağı olarak kullanılabileceği görüşünü ileri sürmüşlerdir. Lemos vd. (2006), *Magonia glabrata*' nın meyve kısımlarından etanol ekstresinden şikimik asit, skopoletin, 2-O-Metil-L-inositol içeriklerini elde etmiş ve 2-O-Metil-L-inositol bileşiğini ekstreden ayırarak değerlendirmişlerdir.

Bitkinin sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla BSLA yöntemini kullanmışlardır. Ekstre için her iki testte de *Artemia* larvalarında gözlenen en yüksek ölüm oranının 100 ppm konsantrasyonda gerçekleştiğini, buna karşın bitkinin etanol ekstresinden izole ettikleri 2-O-Metil-L-inositol bileşiğinin her iki testte de sitotoksik etki göstermediğini belirtmişlerdir.

Rahman ve arkadaşlarının (2011) *Heliotropium indicum* bitkisinin köklerinden elde ettikleri metanol ekstresinin antinosiseptik, sitotoksik ve diüretik etkisini araştırdıkları ve fitokimyasal analizlerini yaptıkları çalışmada, *H.indicum* metanol ekstresinin *Artemia salina* larvalarına karşı sitotoksik etkisinin bulunduğunu ve bu etkinin konsantrasyon artışı ile arttığını belirtmişlerdir. Shah vd (2012) de *Heliotropium*'un bir başka türü olan *Heliotropium strigosum* 'un bütün kısımlarından elde ettikleri ham ekstre, etil asetat, fraksiyonu, kloroform fraksiyonu ile hekzan fraksiyonunun (10, 100, 100 µg/ml) ve pozitif kontrol olarak da etoposide'nin *Artemia salina* larvaları üzerindeki sitotoksik ve fitotoksik etkilerini araştırmışlardır. Denenen ekstrelerin arasında en güçlü sitotoksik etkiyi etil asetat fraksiyonu, onu takiben de kloroform ve n-hekzan fraksiyonu göstermiş olduğunu ve konsantrasyon artışı ile bu etkinin daha da arttığını rapor etmişlerdir.

Bizim çalışmamızda *H.hirsutissimum* bitkisinin kök hariç, diğer bitki kısımları kullanılmıştır. Çalışmamızdan elde edilen sitotoksik verileri ile, sitotoksik etkisi denenen diğer *Heliotropium* türleri arasındaki farklılığının, kullanılan bitki kısımlarında yer alan fitokimyasal maddeler nedeni ile ortaya çıkmış olabileceğini düşünmekteyiz.

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması sonucunda deneysel veriler ışığında elde edilen sonuçlar, *H. hirsutissimum*'dan elde edilen farklı ekstrelerin antioksidan aktivitelerinin, fenolik içeriklerinin, metal şelatlama aktivitelerinin, H₂O₂ süpürme kapasitelerinin, fitokimyasal içeriklerinin ve sitotoksik aktivitelerinin ekstre tipine göre farklılıklar gösterdiklerini ortaya koymuştur. Antioksidan aktiviteyi belirleyebilmek amacı ile kullanılan analiz yöntemleri antioksidan aktivite hakkında özgül, fakat sınırlı bilgi vermektedirler. Bu nedenle antioksidan aktivite tayinlerinde uygun referans maddesinin seçimi, oksitlenebilen maddenin ve oksidasyon koşullarının seçimi, ölçülen parametrenin ne olduğu, analizin hızı, duyarlılığı, uygulanabilirliği ve gereken aygıtların temin edilebilirliği de dikkate alınması gereken parametrelerdir. Bu çalışmada *H. hirsutissimum*'dan elde edilen ekstrelerin antioksidan aktivitesinde kullanılan DPPH yönteminin yanı sıra, farklı tayin yöntemleri ile ölçülen antioksidan aktivitenin desteklenmesi gerekmektedir. Bu çalışmada bitkinin toprak üstü kısımlarından elde edilen ham ekstreler kullanıldığı için, ekstrelerin içeriğinde bulunan etken madde ve bileşiklerin ayrıntılı analizleri yapılarak, bu bileşiklerin etki mekanizmalarının belirlenebilmesi için farklı testler ve sistemler kullanılarak daha ayrıntılı çalışmalar yapılmasına ihtiyaç vardır.

Brine Shrimp Letality Assay (BSLA) her ne kadar akut toksisiteyi belirlemede etkin bir test olsa da, uzun süreli kronik etkinin gözlenmesini mümkün kılmamaktadır. Yapılan bu çalışmadan elde edilen sonuçlar *H. hirsutissimum*'dan elde edilen farklı ekstrelerin *Artemia salina* larvaları üzerinde sitotoksik etki göstermediğini ortaya koymuştur. *Heliotropium hirsutissimum*'dan elde edilen ekstrelerin sitotoksik aktivite sonuçlarının olumsuz çıkmaması, halk arasında ülser, yara iyileşmesi, lokal inflamasyon, ürtiker, saçkıran, romatizma, ateşlenme, sedef hastalığı ve arı sokması gibi rahatsızlıklarda bu hastalıklarının tedavisi başta olmak üzere ve genellikle infüzyon şeklinde çok çeşitli amaçlarla kullanıldığı için, önemli bir olgudur. Ancak *H. hirsutissimum* dışındaki diğer *Heliotropium* türlerinin sitotoksik veya antineoplastik etki gösterdikleri de bilinmektedir. Bu nedenle, bitkiden elde edilen etkili ekstrelerin kromatografik yöntemlerle kantitatif fitokimyasal analizi ile içerik saflaştırması yapılarak farklı test sistemlerinde, farklı canlılar kullanılarak in vivo araştırmaların yapılarak, bu konuda elde ettiğimiz verilerin desteklenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdille, M. H., Singh, R. P., Jayaprakasa, G. K., Jens, B. S. 2005. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. **Food Chemistry**, 90: 891-896.
- Aboaba, O. O., Simith, S.I., Olude, F. O. 2006. Antibacterial Effect of Edible Plant Extract on *Escherichia coli* 0157:H7. **Pakistan Journal of Nutrition**, 5: 325-327.
- Ahmad, I., Beg, A. Z. 2001. Antimicrobial and phytochemical studies on Indian medicinal plants against multi B drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**,74(2): 113-123.
- Albayrak, S., Sağdıç, O., Aksoy, A. 2010. Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler. **Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi**, 26(4): 401-409.
- Ames, B. N. 1986. Food constituents as a source of mutagens, carcinogens and anticarcinogens. **Progress in Clinical Biological Research**, 206: 3-32.
- Anonim, 2008. Artemia Kültürü. MEGEP (Meslekî Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi). T.C. Millî Eğitim Bakanlığı, Ankara.
- Arıdurdu, R., Arabacı, G., 2013. Ciğertaze otu (*Salvia officinalis*) bitkisinin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi. **SAÜ. Fen Bilimleri Dergisi**, 17(2): 241-246.
- Aruoma, O.I. 1998. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. **Journal of the American Oil Chemists' Soceity**, 75(2): 199-212.
- Asjad, H. M. M., Akhtar, M. S., Asad, M., Din, B., Gulzar, F., Hassnain, F. 2012. In vitro antioxidant activity of Habbe Sara [unani medicine] prescribed for febrile convulsions. **Journal of Pharmacy and Alternative Medicine**, 2: 30-35.
- Aslantürk, Ö. S. 2010. Aydın Yöresinde Kullanılan Bazı Tıbbi Bitkilerin Antioksidant ve Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Aydın.
- Aswal, B.S., Bhakuni, D.S., Goel, A.K., Kar, K., Mehrotra, B.N., Mukherjee, K.C. 1984. Screening of Indian plants for biological activity. Part X. **Indian Journal of Experimental Biology**, 22: 312- 332.

- Aşkın Çelik, T., Aslantürk, Ö. S. 2007. Cytotoxic and genotoxic effects of *Lavandula stoechas* aqueous extracts. **Biologia**, 62(3): 292–296.
- Aşkın Çelik, T., Aslantürk, Ö. S. 2009. Investigation of cytotoxic and genotoxic effects of *Ecballium elaterium* juice based on *Allium* Test. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, 31(9): 591-596.
- Aşkın Çelik, T., Aslantürk, Ö.S. 2010. Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of *Inula viscosa* leaf extracts with *Allium* Test. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, (doi: 10.1155/2010/189252).
- Avcı, G., Küpeli, E., Eryavuz, A., Yeşilada, E., Küçükkurt, I. 2006. Antihypercholesterolaemic and antioxidant activity assessment of some plants used as remedy in Turkish folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, 107: 418-423.
- Balch, J. F, Balch, P.A. 1997. Prescription for Nutritional Healing. 2nd edition, Avery Publication, pp.5-9, USA.
- Barahona, M.V., Sacher-fortun, S.1999. Toxicity of carbamates to the Brine Shrimp *Artemia salina* and the effect of atropine, BW284c51, iso-OMPA and 2-PAM on carbaryl toxicity. **Environmental Pollution**, 104: 469-476.
- Başaran, A. A., Yu, T.-W., Plewa, M. J., Anderson, D. 1996. An investigation of some Turkish herbal medicines in *Salmonella typhimurium* and in the COMET assay in human lymphocytes. **Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis**, 16(2): 125–138.
- Baytop, T. 1999. Türkiye’de Bitkilerle Tedavi. Nobel Tıp Kitabevleri Yayınları, 480s, İstanbul, Türkiye.
- Bolivar, P., Cruz-Paredes, C., Hernández, L. R., Juárezc, Z. N., Sánchez-Arreola, E., Av-Gaya, Y., Bacha, H. 2011. Antimicrobial, anti-inflammatory, antiparasitic, and cytotoxic activities of *Galium mexicanum*. **Journal of Ethnopharmacology**, 137: 141– 147.
- Brand-Williams,W.,Cuvelier, M. E., Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, 28: 25-30.
- Brito, M. T., Martinez, A., Cadavid, N. F. C. 1990. Mutagenic activity in regional foods and beverages from the Venezuelan Andean region. **Mutation Research**, 243(2): 115– 120.
- Calleja, M. C., Persoone, G. 1992. Cyst-based toxicity tests IV. the potential of ecotoxicological tests for the prediction of acute toxicity in man as

- evaluated on the first ten chemicals of the MEIC programme, **ATLA**, 20: 396-405.
- Chen, T., Mei, N., Fu, P. P. 2010. Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids, **Journal of Applied Toxicology**, 30: 183-196.
- Choudhary, I. M., Thomsen, W.J. 2001. Bioassay Techniques For Drug Development, Harwood Academic Publishers, 8-10.
- Constantinidis, T., Harvala, C., Skaltsounis, A. L. 1993. Pyrrolizidine N-oxide alkaloids of *Heliotropium hirsutissimum*. **The International Journal of Plant Biochemistry**, 32(5): 1335–1337
- Çakatay, U., Kayalı, R. 2006. Serbest radikal biyokimyasının tarihsel süreçteki önemi. **Cerrahpaşa Tıp Dergisi**, 37: 162 – 167.
- Çam, M., Hışıl, Y. 2006. Basınçlı solvent ekstraksiyonu ve uygulamaları. **Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi**, 3: 79-86.
- Çelik, A. T. 2012. Potential genotoxic and cytotoxic effects of plant extracts. In: A Compendium of Essays on Alternative Therapy (Bhattacharya, A. Ed.), ISBN 978-953-307-863-2.
- Das, K., Tiwari, R. K. S, Shrivastava, D. K. 2010. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. **Journal of Medicinal Plants Research**, 4(2): 104-111.
- Das, P. K. 2011. Antibacterial activity of leaf extracts of *Heliotropium indicum* Linn. **Life sciences Leaflets**, 20: 904-907.
- Dash, G. K., Murthy, P. N., 2011. Studies on wound healing activity of *Heliotropium indicum* Linn. leaves on rats, International Scholarly Research Network ISRN Pharmacolog. Article ID 847980, 8 pp doi:10.5402/2011/847980
- Davis, P.H. 1965-1985. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 1-9. Edinburgh: Edinburgh University Press.
- Davis, P.H., Mill, R.R., Tan, K. 1988. Flora of Turkey and The East Aegean Islands. Vol. 10, Edinburgh University Press. Edinburgh.
- Diken, M. E., 2009. Bazı Şifalı Bitkilerin Antioksidan İçerikleri. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir.
- Dinis, T. C. P., Madeira, V. M. C., Almeida, M. L. M. 1994. Action of phenolic derivatives (acetoaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of

- membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 315: 161-169.
- Doğmuş, D., Durucasu, İ. 2013. Keten tohumu çeşitlerinin N-Bütanol fraksiyonlarının fenolik bileşenlerinin antioksidan aktivitesi. **C.B.Ü. Fen Bilimleri Dergisi**, 9(1): 47 – 56.
- Domínguez, X.A. 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica Bolívarca. Limusa, México D. F., México, pp.39–43.
- Dorman, H. J. D., Peltoketo, A., Hiltunen, R., Tikkonen, M. J. 2003. Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae Herbs. **Food Chemistry**, 83: 255-262.
- Doughari, J. H. 2012. Phytochemicals: Extraction methods, basic structures and mode of action as potential chemotherapeutic agents, phytochemicals. **A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health**, ISBN: 978-953-51-0296-0.
- Dökmeçi, I. 1994. Toksikoloji – Akut Zehirlenmelerde Tanı ve Tedavi, Nobel Tıp Kitabevleri, 1-50.
- Duh, P. D., Tu, Y. Y., Yen, G. C. 1999. Antioxidant activity of water extract of Harnng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). **Lebnesmittel Wissenschaft und Technologie**, 32: 269–277.
- Dündar, Y. 2001. Fitokimyasallar ve sağlıklı yaşam. **Kocatepe Tıp Dergisi**. 2: 131-138
- Ekim, T., Koyuncu, M., Erik, S. İlarıslan, R. 1989. Türkiye'nin Tehlike Altındaki Nadir ve Endemik Bitkileri. Türkiye Tabiatını Koruma Derneği Yayınları, Ankara.
- Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z., Adıgüzel, N. 2000. Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı. Ankara (Eğrelti ve Tohumlu Bitkiler), Red Data Book Of Turkish Plants (Pteridophyta And Spermatophyta), pp. 246.
- Eloff J. N. 1998. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants. **Journal of Ethnopharmacology**, 60: 1–8.
- Erik, S., Tarıkahya, B. 2004. Türkiye Florası Üzerine. **Kebikeç İnsan Bilimleri için Kaynak Araştırmaları Dergisi**, 17: 139-163.
- Erdoğan, T.F., 2009. Brine shrimp lethality bioassay of *Fumaria Densiflora* DC. and *Fumaria officinalis* L. extracts, **Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy**, 28(2): 125-132.

- Facey, P. C., Pascoe, K. O., Porter, R. B., Jones, A. D. 1999. Investigation of plants used in Jamaican folk medicine for antibacterial activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 51(12): 1455-1460.
- Farnsworth, N. R., Akerele, O., Bingel, A. S., Soejarto D. D. 1985. Medicinal plants in therapy. **The Bulletin of WHO**, 63(6): 965-981.
- Faydaoğlu, E., Sürücüoğlu, M. S. 2011. Geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. **Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi**, 11: 52-67.
- Fernandes De S´a Ferreira, I. C., Ferrˆao Vargas, V. M. 1999. Mutagenicity of medicinal plant extracts in Salmonella/Microsome assay. **Phytotherapy Research**, 13(5): 397-400.
- Firn, R. 2010. Nature’s Chemicals, Oxford University Press, Oxford, pp.74-75.
- Frankel, E. N., Meyer, A. S. 2000. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 80: 1925-1941.
- Goffin, E., Cunha, A. P., Ziemons, E., Tits, M., Angenot, L., Frederich, M. 2003. Quantification of Tagitinin C in *Tithonia diversifolia* by reversed-phase high performance Liquid Chromatography. **Phytochem. Anal.**, 14: 378-380
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., Baser, K.H.C. 2000. Flora of Turkey. Volume 11, Edinburgh University Press. Edinburgh.
- Güney, O., Canbilen, A., Konak, A., Acar, O. 2003. The effects of folic acid in the prevention of neural tube development defects caused by phenytoin in early chick embryos. **Spine**, 28(5): 442-445.
- Gürkan, E., Tüzün, O.T., Hırlak, F. ve Sarıyar, G. 2000. Bazı Papaver alkaloidlerinin Brine Shrimp yöntemiyle sitotoksisite tayinleri. **XIII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildiri Kitabı**, 670(17): 66, İstanbul.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. In: **Methods in Enzymology**, 186: 1-85.
- Handa, S. S., Khanuja, S. P. S., Longo, G., Rakesh, D. D. 2008. An overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plants. In: Extraction Technologies For Medicinal And Aromatic Plants (Handa, S. S., Khanuja, S. P. S., Longo, G., Rakesh, D. D. Eds.), International Centre for Science and High Technology, pp.21-25.

- Harborne, J. B. 1998. Phytochemical methods A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. Chapter One, pp.1-9.
- Harwig, J., Scott, P. M. 1971a. Brine Shrimp (*Artemia salina* L) larva as a screening system for fungal toxins, research laboratories. Food and Drug Directorate, Department of National Health and Welfare, Tunney's Pasture, Ottawa, Canada, pp.1011-1016.
- Harwig, J., Scott, P. 1971b. Brine shrimp (*Artemia salina* L) larvae as a screening fungal toxins. **Appl. Microbial.**, 21: 1011-1016.
- Hatano, T., Edamatsu, R., Mori, A., Fujita, Y., Yasuhara, E. 1989. Effect of interaction of tannins with coexisting substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and on DPPH radical. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 37: 2016–2021.
- Hayouni, E. A., Abedrabb, A. M., Bouix, M., Hamdi, M. 2007. The effects of solvent and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. **Food Chemistry** 105(3): 1126-1134.
- Heliotropes, http://www.ehow.com/about_4623603_heliotrope.html, [Erişim Tarihi: 05.08.2012].
- Higashimoto, M., Purintrapiban, J., Kataoka, K. 1993. Mutagenicity and antimutagenicity of extracts of three spices and a medicinal plant in Thailand, **Mutation Research**, 303(3): 135–142.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. 2005. The Chemistry behind antioxidant capacity assays. **J. Agric. Food Chem.**, 53: 1841-1856.
- Ivanova, D., Gerova, D., Chervenkov, T., Yankova, T. 2005. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, 96: 145-150.
- Jain, S. C., Purohit, M. 1986. Antitumor active pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium marifolium* Retz. **Chem. Pharm. Bull.**, 34: 5154–5156.
- Jain, S. C., Singh, B. 1998. Bioefficacy of *Heliotropium ellipticum* Ledeb. I. Antimicrobial screening. **Indian J. Pharm. Sci.**, 60: 394–396.
- Jain, S. K., Defilipps, R. A. 1991. Medicinal Plants of India, Michigan, Reference Publishing Co. pp. 198.
- Jaki, B., Orjala, J., Bürji, H.R., Sticher, O. 1999. Biological screening of cyanobacteria for antimicrobial and molluscicidal activity, Brine Shrimp lethality and cytotoxicity, **Pharm. Biol.**, 37: 138-143.

- Jensen, W. B. J. 2009. The origin of the “Delta” symbol for fractional charges. **Chem. Educ.**, 86(5): 545.
- Kar, A. 2007. Pharmacognosy and Pharmaco Biotechnology (Revised-Expanded Second Edition), New Age International Limited Publishres New Delhi. pp. 332-600.
- Kara, A. A. 2002. Bazı Şifalı Bitkilerin *Helicobacter pylori*'nin In Vitro Üremesi Üzerine Etkileri ve Antioksidan Özellikleri. Atatürk Üniversitesi FenBilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Erzurum.
- Kassie F., Parzefall, W., Musk, S. 1996. Genotoxic effects of crude juices from Brassica vegetables and juices and extracts from phytopharmaceutical preparations and spices of cruciferous plants origin in bacterial and mammalian cells. **Chemico-Biological Interactions**, 102(1): 1–16.
- Kılınç, A., Kılınç, K. 2002. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. **Hacettepe Tıp Dergisi**, 33(2): 110 – 118.
- Kırıçoğlu S, Velioglu S. 2001. Hiper besleyici gıdalar. **Bilim Teknik Dergisi**, 4: 56-57.
- Kıvçak, B., Akay S. 2002. *Pistacia terebinthus*, *Pistacia lentiscus*, *Pistacia lentiscus* var. *chia* bitkilerinin sitotoksik aktivitesi **14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı**, pp. 309-311, 29-31 Mayıs 2002, Eskişehir.
- Koçyiğit, M. 2005. Yalova İlinde Etnobotanik Bir Araştırma. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- Kumar, S. A. 2009. Plants-based Medicines in India. <http://pib.nic.in/feature/feyr2000/fmay2000/f240520006.html>, [Erişim Tarihi: 10.08.2012].
- Lagarto, P. A., Silva, Y. R., Guerra, S. I., Iglesias, B. L. 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. Drug Research and Development Center (CIDEM), Biologic Research Department, Ciudad de La Habana, Cuba, pp.395-400.
- Lavelli, V., Peri, C., Rizzola, A. 2000. Antioxidant activity of tomato products as studied by model reactions using Xanthine oxidase, Myeloperoxidase, and copper-induced lipid peroxidation. **J. Agric. Food Chem.**, 48 (5): 1442-1448.

- Lee, J.Y., Hwang, W. I., Lim, S. T. 2004. Antioxidant and anticancer activities of organic extracts from *Platycodon grandiflorum* A. De Candolle roots. **Journal of Ethnopharmacology**, 93: 409–415.
- Lemos, T. L. G., Machado, L. L., Souza, J. S. N., Fonseca, A. M., Maia, J. L., Pessoa, O. D. L. 2006. Antioxidant, ichthyotoxicity and Brine Shrimp Lethality tests of *Magonia glabrata*, **Fitoterapia** 77: 443-445.
- Lewan, L., Andersson, M., Morales-gomez, P. 1992. The use of *Artemia salina* in toxicity testing. **ATLA**, 20: 297-301.
- Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., Cheng, S. 2006. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. **Food Chem.**, 96: 254-260.
- Lichtenthaler, R., Marx, F., Kind, O. M. 2003. Determination of antioxidative capacities using an enhanced total oxidant scavenging capacity (TOSC) assay. **Eur. Food Res. Technol.**, 216: 166–173.
- Lindsay, R. C. 1996. Food Additives. In: Food Chemistry (Fennema, O.R. Ed.), Marcel Dekker, pp.767-823, New York.
- Ljubuncic, P., Azaizeh, H., Portnaya, I., Cogan, U., Said, O., Khalid, A.S., Bomzon, A. 2005. Antioxidant activity and cytotoxicity of eight plants used in traditional Arab medicine in Israel. **Journal of Ethnopharmacology**, 99: 43–47
- MacDonald-Wicks, L. K., Wood L. G., Garg, M. L. 2006. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. **J. Sci. Food Agric.**, 86: 2046–2056.
- Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., Lima, J. L. F. C. 2008. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Anal. Chim. Acta**, 613: 1–19.
- Malik, A., Rehman, K . 1988. Stereostructure of subulacine-Noxide: A new pyrrolizidine alkaloid from *Heliotropium subulatum* Hochst. **Heterocycles**, 27: 707–710.
- Marquina, G., Laguna, A., Franco, P., Fernandez, L., Perez, R., Valicute, O. 1989. Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium burseriferum*. **Grisenbach Pharmazie**, 44: 871–874.
- Martinez, M., Del Ramo, J., Torreblanca, A., Diaz-Mayans, J. 1998. Effect of cadmium exposure on zinc levels in the Brine Shrimp *Artemia partenogenetica*. **Aquaculture**, 172: 315-325.

- Mc Laughlin, J. L., Chang, C. J. ve Smith, D. L. 1991. Bench top bioassay for the discovery of bioactive natural products. In: *Studies In Natural Products Chemistry* (Rahman, A. U. Ed.). Elsevier, 9: 383-409.
- Mc Laughlin, J. L., Roger, L. L., Anderson, J. E. 1998. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal**, 32: 513-524.
- Migliore, L., Civitareale, C., Brambilla, G., Didelupis, G. D. 1997. Toxicity of several important agricultural antibiotics to *Artemia*, **Wat. Res.**, 31: 1801-1806.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., Van Beek, T. A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, 85: 231-237.
- Miller, D. D. 1996. Minerals. In: *Food Chemistry*, (Fennema, O. R. Ed), Marcel Dekker, pp.617-649, New York.
- Modak, B., Galeno, H., Torres, R. 2004, Antiviral activity on hantavirus and apoptosis of vero cells of natural and semi-synthetic compounds from *Heliotropium filifolium* Resin. **J. Chil. Chem. Soc.**, 49(2): 143-145.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarın J. Sci. Technol.**, 26(2): 211- 219.
- Morel, I., Lescoat, G., Cillard, P., Cillard, J. 1994. Role of flavonoids and iron chelation in antioxidant action. **Methods Enzymol.**, 234: 437-443.
- Moshi, M. J., Innocent, E., Masimba, P. J., Otieno, D. F., Weisheit, A., Mbabazi, P., Lynes, M., Meachem, K., Hamilton, A., Urassa, I. 2009. Antimicrobial and Brine Shrimp toxicity of some plants used in traditional. **Tanzania Journal of Health Research**, 11(1): 23-28.
- Mourin, N. A., Sharmin, T., Chowdhury, S. R., Islam, F., Rahman, M. S., Rashid, M. A. 2013. Evaluation of bioactivities of *Heliotropium indicum*, a medicinal plant of Bangladesh. **The Pharma Innovation – Journal**, 2(5): 217-221.
- Nagao, M., Wakabayashi, K., Fujita, Y., Tahira T., Ochiaia, T., Sugimura, T. 1986. Mutagenic compounds in soy sauce, Chinese cabbage, coffee and herbal teas. In: *Genetic Toxicology of the Diet*, (Knudsen, I. Ed.) Alan R. Liss, pp.55-62, New York, USA.
- Ncube, N. S., Afolayan, A. J., Okoh, A. I. 2008. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: Current

- Methods and Future Trends. **African Journal of Biotechnology**, 7(12): 1797-1806.
- Nguyen, T., Fluss L., Hodej, R., Ginther, G., Leighton, T. 1989. The distribution of mutagenic activity in red rose and white wines. **Mutation Research**, 223: 205–212.
- Osungunna, M. O., Adedeji, K. A. 2011. Phytochemical and antimicrobial screening of methanol extract of *Heliotropium indicum* leaf. **Journal of Microbiology and Antimicrobials**, 3(8): 213-216.
- Özbek, H., 2005. Cinsel ve jinekolojik sorunların tedavisinde bitkilerin kullanımı. **Van Tıp Dergisi**, 12(2): 170-174.
- Özcan, M. M., Baydar, H., Sağdıç, O., Özkan, G. 2007. Türkiye’de Ticari Açıdan Önemli *Lamiaceae* Familyasına Ait Baharat veya Çeşni Olarak Kullanılan Bitkilerin Fenolik Bileşenleri ile Antioksidan ve Antimikrobiyal Etkilerinin Belirlenmesi. TÜBİTAK Projesi, No: TOGTAG-3319, Konya.
- Pandey, V. B., Singh, J. P., Mattocks, A. R., Bailey, A. 1983. Antitumor activity of pyrrolizidine alkaloids. **Planta Med**, 49: 254–257.
- Panovska, T. K., Kulevanova, S., Stefova, M. 2005. In vitro activity of some *Teucrium* species (*Lamiaceae*). **Acta Pharm.**, 55: 207-214.
- Parekh, J., Karathia, N., Chanda, S. 2006. Evaluation of antibacterial activity and phytochemical analysis of *Bauhinia variegata* L. bark. **African Journal of Biomedical Research**, 9: 53-56.
- Pelka, M., Danzl, C., Distler, W., Petschelt, A. 2000. A new screening test toxicity testing of dental materials. **Jr. Dent**, 28: 341-345.
- Persoon, G., Van De Vell, A., Van Steergem, M., Nayer, B. 1989. Predictive value for laboratory test with aquatic invertebrates. Influence of experimental condition. **Aquat. Toxicol.**, 14: 149-166.
- Peschel, W., Sanchez-Rabaneda, F., Dn, W. Plescher, A., Gartzia, I., Jimenez, D., Lamuela- Raventos, R., Buxaderas, S., Condina, C. 2006. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. **Food Chem.**, 97: 137-150.
- Pisutthanan, S., Plianbangchang, P., Pisutthanan, N., Ruanruay, S., Muanrit, O. 2004. Brine shrimp lethality activity of Thai medicinal plants. **Naresuan University Journal**, 12(2): 13-18.

- Pooja, Sharma, P., Samanta, K. C., Garg, V. 2010. Evaluation of nitric oxide and hydrogen peroxide scavenging activity *Dalbergia sissoo* Roots. **Pharmacophore**, 1(2): 77-81.
- Pour, B. M., Sasidharan, S. 2011. In vitro toxicity study of *Lantana camara*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine** [Electronic Journal], pp.230-232, Erişim [www.elsevier.com/locate/apjtb], doi: 10.1016/S2221-1691(11)60033-6.
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J., Shahabimajid, N. 2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, 5 (11): 1142-1145.
- Price, J. A., Sanny, C. G., Shevlin, D. 2006. Application of manual assessment of oxygen radical absorbent capacity (ORAC) for use in high throughput assay of “total” antioxidant, activity of drugs and natural products. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, 54: 56 – 61.
- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **J. Agric. Food Chem.**, 53: 4290- 4302.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Hanna-Leena, A. 2008. The action of berry phenolics against human intestinal pathogens. **BioFactors**, 23 (4): 243–251.
- Rahman, M. A., Mia, M. A. Shahid, I. Z. 2011. Pharmacological and phytochemical screening of roots of *Heliotropium indicum* Linn. **Pharmacologyonline**, 1: 185-192.
- Ravishankara, M. N., Neeta, S., Harish, P., Rajani, M. 2002. Evaluation of antioxidant properties of root bark of *Hemidesmus indicus* R. Br. (Anantmul). **Phytomedicine**, 9: 153-160.
- Reddy, J. S., Rao, P. R., Reddy, M. S. 2002. Wound healing effects of *Heliotropium indicum*, *Plumbago zeylanicum* and *Acalypha indica* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 79: 249–251.
- Rehman, Z. U. 2006. Citrus peel extract- A natural source of antioxidant. **Food Chem.**, 99: 450-454.
- Reina, M., Merich, A.H., Cabrera, R., Gonzalez-Coloma, A. 1995. Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium bovei*. **Phytochemistry**, 38: 355–358.
- Reina, M., Gonzalez-Coloma, A., Gutierrez, C., Cabrera, R., Henriquez, J., Villarroel, L. 1998. Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium megalanthum*. **Journal of Natural Products**, 61(11): 1418-1420

- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic. Biol. Med.**, 20(7): 933-956.
- Ruch, R. J., Cheng, S. J., Klaunig, J. E. 1989. Prevention of cyto-toxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. **Carcinogenesis**, 10(6): 1003-1008.
- Sanchez-fortun, S., Sanz, F., Barahona, M. W. 1996. Acute toxicity of several organophosphorous insecticides and protection by cholinergic antagonists and 2-PAM on *Artemia salina* larvae. **Arch Environ Contam Toxicol**, 31 (3): 391-398.
- Sarah, B. 2001. Fruits of the Earth. **Resurgence**, 205: 14-15.
- Scalzo, R. L. 2008. Organic acids influence on DPPH scavenging by ascorbic acid. **Food Chem.**, 107: 40-43.
- Schimmer, O., Kruger, A., Paulini, H., Haefele, F. 1994. An evaluation of 55 commercial plant extracts in the Ames mutagenicity test. **Pharmazie**, 49 (6): 448-451.
- Schoneich, C. 1999. Reactive oxygen species and biological aging: a mechanistic approach. **Experimental Gerontology**, 34(1): 19-34.
- Shah, S. M., Hussain, S., Khan, A., Shah, A. H. A., Khan, A., Ullah, F., Ullah, B. 2012. Cytotoxic and phytotoxic actions of *Heliotropium strigosum*. **Toxicology and Industrial Health** (Electronic Journal), pp. 1 – 4, DOI: 10.1177/0748233712471706, Erişim Tarihi: 26.11.2013.
- Sharififar, F., Moshafi, M. H., Dehghan-Nudehe, G., Ameri, A., Alishahi, F., Pourhemati, A. 2009. Bioassay screening of the essential oil and various extracts from 4 spices medicinal plants. **Pak. J. Pharm. Sci.**, 22(3): 317-322.
- Sharma, M.K., Alexander, A. 2011. Pharmacognostical and phytochemical investigations of root of *Heliotropium indicum* Linn. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, 2(6): 1569-1571.
- Sharma, R. A., Singh, B., Singh, D., Chandrawat, P. 2009, Ethnomedicinal, pharmacological properties and chemistry of some medicinal plants of *Boraginaceae* in India. **Journal of Medicinal Plants Research**, 3(13): 1153-1175.

- Singh, B., Sahu, P.M., Jain, S.C., Singh, S. 2002, Antineoplastic and antiviral screening of pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium subulatum*. **Pharmaceutical Biology**, 40(8): 581–586.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, 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.
- Sleet, R. B., Brendel, K. 1983. Improved methods for harvesting and counting synchronous populations of *Artemia nauplii* for use in developmental toxicology. **Ecotoxicol, Env. Safety**, 7: 435-446.
- Solis, P. N., Wright, C. W., Anderson, M., Gupta, M. P., Phillipson, J. D. 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine shrimp). **Planta Medica**, 26: 250-252.
- Souza, J. S. N., Machado, L. L., Pessoa, O. D. L., Braz-Filho, R., Overk, C. R., Yao, P., Cordell, G. A., Lemos, T. L. G. 2005. Pyrrolizidine Alkaloids from *Heliotropium indicum*. **J. Braz. Chem. Soc.**, 16(6B): 1410-1414.
- Tandon S., Rane S. 2008. Decoction and hot continuous extraction techniques. In: Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. International Centre for Science and High Technology (Handa, S. S., Khanuja, S. P. S., Longo, G., Rakesh, D. D. Eds.), pp.93-106.
- Tosun, F., Tamer, U. 2004. *Heliotropium europaeum* tohumlarında GC-MS ile pirolizidin alkaloitlerinin tayini. **Ankara Ecz. Fak. Derg.**, 33(1): 7-9.
- Tübives http://turkherb.ibu.edu.tr/index.php?sayfa=1&tax_id=6428 Erişim Tarihi: 11.06.2013.
- Uğur, M. S., Sarioğlu, İ., Sarıboyacı, Ü., Gürkan, E., Tuzlacı, E. 2000. İstanbul çevresinde yetişen bazı bitkilerin fibrinolitik etkileri. **XIII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiri Kitabı**, 670(17): 68, İstanbul.
- Ullah, M. O., Sultana, S., Haque, A., Tasmin, S. 2009. Antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activity of *Centella asiatica*. **European Journal of Scientific Research**, 30(2): 260-264.
- Ulusoylu, M., Soyogul, U., Gürkan, E., Tuzlacı, E. 2001. *Centaurea iberica* bitkisinin biyolojik aktivite tayinleri. **XIII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiri Kitabı**, 670(17): 287-290, İstanbul.
- Üren, S., 2011. Artemia Yumurtasının Balık Larvası Beslenmesinde Kullanımı. Çanakkale 18 Mart Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Lisans Tezi. Çanakkale.

- Wells, P. G. 1999. Biomonitoring the health of coastal marine ecosystems – The role and challenges of microscale toxicity tests. **Mar. Pollut. Bull.**, 39: 39-47.
- Wynder, E. L., Hall, N. E. L., Polansky, M. 1983. Epidemiology of coffee and pancreatic cancer. **Cancer Research**. 43 (8): 3900–3906
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 39: 44-84.
- Van Overwalle, G. 2006. IP Protection for medicinal and aromatic plants. In: Medicinal and Aromatic Plants. Agricultural, Commercial, Ecological, Legal, Pharmacological and Social Aspects, Chapter 9 (Bogers, R., Craker, L., Lange, D. Eds.), Wageningen, Springer, pp.121-128.
- Visioli, F., Borsani, L., Gali, C. 2000. Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. **Cardiovasc. Res.**, 47: 149-425.
- Vundać, V. B., Brantner, A. H., Plazibat, M. 2007. Content of polyphenolic constituents and antioxidant activity of some *Stachys* taxa. **Food Chemistry**, 104: 1277–1281.
- Vural, N. 2005. Toksikoloji. Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Yayınları, No:73. Ankara
- Yeo D., Coulibaly A. F., N’guessan J. D., Djaman A. J. 2011. In vitro comparison of wound healing effect of three extracts from *Heliotropium indicum*. **Asian J Pharm Biol Res Apr-Jun**, 1(2): 182-185.
- Zink, T., Chaffin, J. 1998. Herbal health products: What family physicians need to know. **American Family Physician**, 58(5): 1133–1140.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Semih UZUNHAN
Doğum Yeri ve Tarihi : BAKIRKÖY/İSTANBUL / 1989

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümü
(İ.Ö.)
Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

- a) Makaleler
-SCI
-Diğer

- b) Bildiriler
-Uluslararası
-Ulusal

1. Aşkın Çelik,T., Aslantürk, Ö.S., Telli, M., **Uzunhan, S.** Bitkisel İçerikli Doğal Bir Anti-akne Formülasyonu. II. Ulusal Kozmetik Kimyası, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi. Bildiriler Özet Kitabı, 18-20 Şubat, Antalya, 2012
2. **Uzunhan, S.** Aşkın Çelik,T., miRNA'lar ve Kanser. Ege Üniversitesi. 5. Geleneksel Bilim ve Teknoloji Sempozyumu, Kanser Genetiği. 31 Mart 2013(Poster bildiri).

- c) Katıldığı Projeler:

1. *Heliotropium hirsutissimum'* dan Elde Edilen Farklı Ekstrelerin Fitokimyasal Analizi ve Biyolojik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi (BAP FEF- 13017 No'lu proje-Araştırmacı).

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl :

İLETİŞİM

E-posta Adresi : semihzeon@hotmail.com

Tarih :