

Işık, M., *Salvia officinalis* L. Etanol Ekstresinin Antikolinergik ve Antioksidan Aktivitesi ve LC-MS/MS Analizi. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2020. 3(1): p. 51-61. DOI: 10.38001/ijlsb.690835

***Salvia officinalis* L. Etanol Ekstresinin Antikolinergik ve Antioksidan Aktivitesi ve LC-MS/MS Analizi**

Mesut Işık^{1*} 

ÖZET

Tıbbi bitkiler, yeni ilaç gelişiminde kullanılacak önemli fenolik ve flavonoid bileşikler içerdiklerinden dolayı birçok biyolojik aktiviteye sahiptir. Bu yüzden bitkilerin fenolik içeriğinin biyoaktivitelere katkısının bilinmesi önem arz etmektedir. Bu çalışmada, *Salvia officinalis* L. etanol (SOLE) ekstresinin fenolik içeriği LC-MS/MS ile belirlendi. Bu ekstre *in vitro* olarak, antikolinergik ve antioksidan (metal indirgeme, radikal ve lipid peroksidasyon giderme) aktiviteleri materyal metotta belirtilen yöntemlerle belirlendi. The SOLE ekstresi AChE enzimi üzerine (IC₅₀: 0.136 mg / ml) inhibisyon etkisi göstermiştir. Dahası, bu bitki ekstresi % 17 oranında DPPH radikal giderme aktivitesi gösterirken, % 22 oranında ABTS radikal giderme aktivitesi göstermiştir. The SOLE (10 µg/mL) ekstresi linoleik asit oksidasyonunu % 24 inhibe etmiştir. Bu çıktılar oksidatif strese karşı bu bitkinin antioksidan savunma sistemlerine katkıda bulunduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, asetilkolinesteraz inhibitör etkisi ve antioksidan aktiviteleri nedeniyle önemli biyoaktiviteye sahip olan bu tıbbi bitki ateroskleroz, Alzheimer gibi birçok hastalıkların tedavisinde kullanılabilir.

MAKALE GEÇMİŞİ

Geliş

10 Şubat 2020

Kabul

22 Mart 2020

ANAHTAR KELİMELER

Adaçayı

fitokimyasal analiz

antioksidanlar

asetilkolinesteraz

lipit peroksidasyonu

Anticholinergic, Antioxidant Activity and LC-MS/MS Analysis of Ethanol Extract from *Salvia officinalis* L.

ABSTRACT

Medicinal plants have many biological activities because they contain important phenolic and flavonoid compounds that can be used in new drug development. Therefore, it is important to know the contribution of phenolic content of plants to bioactivities. In this study, the phenolic content of *Salvia officinalis* L. ethanol (SOLE) extract was determined with LC-MS/MS. The anticholinergic and antioxidant (metal reduction, radical and lipid peroxidation removal) activities of the extract *in vitro* were determined by methods specified in the material method. The SOLE extract showed an inhibition effect on AChE enzyme (IC₅₀: 0.136 mg / ml). Moreover, the plant extract showed 17 % DPPH radical removal activity, while 22 % ABTS showed radical removal activity. The SOLE extract (10 µg / mL) inhibited linoleic acid oxidation by 24 %. The results showed that this plant contributes to antioxidant defense systems against oxidative stress. As a result, the medicinal plant, which has significant bioactivity due to its acetylcholinesterase inhibitory effect and antioxidant activities, can be used in the treatment of many diseases such as atherosclerosis, Alzheimer's.

ARTICLE HISTORY

Received

10 February 2020

Accepted

22 March 2020

KEY WORDS

Sage,

phytochemical

analysis

antioxidants,

acetylcholinesterase,

lipid peroxidation

¹ Department of Pharmacy Services, Vocational School of Health Services, Harran University, Şanlıurfa, Turkey

*Corresponding Author: Mesut Işık, e-mail: misik@harran.edu.tr

Giriş

Tıbbi bitkilerin birçoğu, farmakolojik olarak biyoaktif maddeler içermektedir. Son yıllarda, bitkilerde bulunan doğal biyoaktif bileşiklerin insan sağlığına olan faydalarından dolayı geleneksel olarak kullanılan tıbbi bitkilere ilgi artmıştır [1]. Buna ek olarak, bitki içeriğinde bulunan fenolik bileşikler, lipit peroksidasyonunu azalttıkları için gıdaların raf ömrünün uzatılmasında rol oynamaktadır [2, 3]. Gıda endüstrisinde kullanımı ile olası toksisiteleri ve kanserojen etkileri nedeniyle kısıtlanan sentetik antioksidanların yerine doğal antioksidan kaynaklı bitki kullanımına ilgi her geçen gün artmaktadır [4]. Bu nedenle, biyoaktif içeriğe sahip tıbbi bitkilerin araştırılması önem arz etmektedir.

Lamiaceae familyası dünya çapında yaklaşık 230 cins ve 7100 türden oluşmaktadır. Bu familyadan birçok türün tıp, gıda ve kozmetik gibi birçok alanda kullanıldığı ve uçucu yağ içeriği nedeniyle yüksek önem taşıdığı düşünülmektedir. *Salvia*, *Menthe* ve *Siderites* Lamiaceae familyasına ait bazı büyük cinsler arasındadır [5]. *Salvia* (adaçayı), geleneksel tıp ve gıda alanında kullanım amaçlı yetiştirilmektedir [6]. Adaçayı içeriğinde bulunan bileşikler antioksidan, antimikrobiyal, sitotoksik, antimutagenik, antikanser antiinflamatuvar, antifungal ve lipit peroksidasyonunun önlenmesi/azaltılması gibi etkilere sahip olduğu için çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır [7, 8]. *S. officinalis*'in tedavi amaçlı kullanılma nedeninin içeriğindeki polifenoller olabileceği bildirilmiştir [9]. Bu yüzden aromatik bitkilerin hangi fitokimyasal içeriklerinin ne tür biyoaktivitelere sahip olabileceği araştırma konusu olmuştur [10].

Nörodejeneratif bir hastalık olan Alzheimer hastalarında 4 aylık bir süre boyunca sabit bir dozda (60 damla/gün) *Salvia officinalis* L. (SOL) ekstresinin etkisine bakılmıştır. Bu çalışma sonucunda hafif ve orta derecede Alzheimer hastalığı tedavisinde SOL ekstresinin etkili olabileceği bildirilmiştir [11].

Bu çalışmada, Akdeniz bölgesinde yetişen SOL etanolik ekstresinin radikal giderme ve metal indirgeme aktivitesinin yanı sıra asetilkolinesteraz aktivitesi üzerine etkisi araştırıldı. Ayrıca bu ekstrenin fenolik içerik analizi LC-MS/MS yöntemi ile belirlendi. Fenolik içerik enzimatik inhibitör etkiler (asetilkolinesteraz) ve antioksidan aktivite ile ilişkilendirildi.

Materyal ve Metot

Ektraksiyonun hazırlanması

Gölgede kurutulduktan sonra değirmen içinde toz haline getirilen 1 g *S. officinalis* L. (SOL) 20 mL etanol içerisine eklendi, oda koşullarında 6 saat boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Elde edilen ekstratlar, Whatman No.1 kâğıdı ile süzüldü. Etanolik ekstratlar falkon tüplerine konuldu ve kullanılabildiği kadar -20 °C'de saklandı.

LC-MS/MS yöntemi ile *S. officinalis* L. etanol ekstresinin içerik analizi

25 fenolik bileşiğin LC-MS/MS analizleri, bir tandem MS cihazına bağlanmış bir Nexera modeli Shimadzu UHPLC kullanılarak gerçekleştirildi. Kromatografik işlemlerin yürütülmesinde LC-30AD ikili pompalar, DGU-20A3R degazör, CTO-10ASVP kolon fırını ve SIL-30AC otomatik örnekleyici bulunur. Kromatografik ayırma işlemi, bir C18 intersil ODS-4 (3.0mm x 100mm, 2µm) analitik kolon üzerinde gerçekleştirildi. Kolon sıcaklığı 40 °C'ye sabitlemiştir. Elüsyon gradyanı mobil faz A (Su, % 0,1 Formik asit) ve mobil faz B (Metanol, % 0,1 Formik asit)'den oluşturuldu. Çözücü akış hızı 0.3 mL / dakikada tutuldu ve enjeksiyon hacmi 2 µL olarak ayarlandı.

Antioksidan aktivite yöntemleri

FRAP demir iyonlarını (Fe³⁺) indirgeme analizi

SOL ekstresinin indirgeme gücü Oyaizu yönteminin modifiye edilmiş şekliyle gerçekleştirildi [12, 13]. Farklı konsantrasyonlardaki SOL ekstresine (10, 20, 40 ug / mL) 2.5 mL fosfat tamponu (0.2 M, pH 6.6) ve 2.5 mL %1'lik potasyum ferrisiyanit [K₃Fe(CN)₆] ile karıştırıldı. Karışımlar 50°C'de 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra her karışıma trikloroasetik asit (2.5 mL, %10) ve FeCl₃ (0.25 mL, %0.1) ilave edildikten sonra santrifüj edildi (10 dakika boyunca 3.000 rpm'de). 700 nm'de karışımın absorbans değerleri kaydedildi.

Cu⁺⁺ iyonu indirgeme kapasitesi (CUPRAC)

Cu(II)-Nc'nin Cu(I)-Nc şelatına indirgenmesine dayanan Cuprac metodu uygulandı [14]. Test tüpüne, 1 mL neocuprin'e (2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline), 1 mL CuCl₂ (0.01 M) çözeltisi ve 1 mL amonyum asetat (NH₄Ac) tampon çözeltisi ilave edildi ve vortekslendi. Daha sonra farklı konsantrasyonlarda (10, 20, 40 µL) ekstratlar ilave edildi ve toplam hacim su ile 4 mL'ye tamamlandı. 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyondan sonra, absorbans değişimi 450 nm'de kaydedildi. Karışım içerisinde gerçekleşen reaksiyonla artan absorbans Cu⁺⁺ iyonu indirgeme kapasitesinin arttığını göstermektedir.

DPPH[•] giderme aktivitesi

SOL ekstresi ve standart antioksidanların DPPH[•] serbest radikal giderme aktivitesi Blois metodu ile gerçekleştirildi [15]. Etanol içerisinde 0.1 mM DPPH[•] çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltinin 1 mL'si ile stok çözeltilerden (10, 20, 40 µL) alınan örnek karıştırıldı ve etanol ile 3 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiler vortekslenildi ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. Absorbans değişimi 517 nm'de spektrofotometre ile ölçüldü. Reaksiyon karışımının düşük absorbans vermesi, daha yüksek radikal giderme aktivitesinin göstergesidir.

ABTS^{•+} giderme aktivitesi

Bu metot, renkli ABTS^{•+} katyon radikalini ektre ile muamele edilmesi sonucunda renk değiştirmesi esasına dayanır [16]. ABTS^{•+} katyon radikali, ABTS (2 mmol L⁻¹) çözeltisi ile 2.45 mmol L⁻¹ potasyum persülfat (K₂S₂O₈) çözeltisinin karıştırılarak karanlıkta ve oda sıcaklığında 14 saat inkübasyonu ile hazırlandı. ABTS^{•+} katyon radikalini kullanmadan önce, radikal çözeltisi 734 nm'de 0.750 ± 0.025'lik bir absorbans elde edene kadar sodyum fosfat tamponu (0.1 mol L⁻¹, pH 7.4) ile seyreltildi. Daha sonra ekstresi hazırlanan stok çözeltilerinden 10, 20, 40 µL alınarak üzerine hacmi 3mL oluncaya kadar fosfat tamponu eklendi. Üzerlerine hazırlanan 1 mL ABTS^{•+} çözeltisi eklenerek vortekslenildi. 734 nm'de radikal giderme aktivitesi ölçüldü.

Linoleik asit peroksidasyonu giderme aktivitesi

Linoleik asit peroksidasyon giderme aktivite tayini ferrik tiyosiyanat metoduna göre belirlendi [17]. Bu metodun esası, linoleik asit oksidasyonu sonucu oluşan hidroperoksidin spektrofotometrik olarak 500 nm'de ölçülmesine dayanır. Yüksek absorbans, peroksidasyon sonucu oluşan peroksit miktarının fazlalığını gösterir. Oluşan hidroperoksit ise Fe²⁺'yi Fe³⁺'e yükseltir. Daha sonra Fe³⁺, ilave edilen tiyosiyanat ile kompleks oluşturarak 500 nm'de maksimum absorbans verir. İstenilen miktarlara karşılık gelen konsantrasyonlarda stok çözeltilerden (1 mg/ml) vezin kaplarına otomatik pipetlerle pipetlendi ve hacim tampon çözeltiyle 2,5 mL'ye tamamlandı. Daha sonra her bir vezin kabına 2,5 mL linoleik asit emülsiyonu ilave edildi. Kontrol olarak 2,5 mL tampon çözelti ve 2,5 mL linoleik asit emülsiyonu kullanıldı. İnkübasyon 37 °C'de gerçekleştirildi. Her altı saatte bir vezin kaplarından 100'er µL alındı ve 4,7 mL etanol bulunan deney tüplerine konuldu. 100 µL Fe²⁺ çözeltisi daha sonra da 100 µL SCN⁻ çözeltisi ilave edildi.

Kör 4,8 mL etanol bulunan deney tüpüne 100 µL Fe²⁺ ve 100 µL SCN⁻ çözeltilerinin ilavesiyle hazırlandı. Numunelerin 500 nm'deki absorbansları köre karşı okundu.

Antikolinergik aktivitesinin belirlenmesi

Çalışmada, SOL etanol ekstresinin asetilkolinesteraz (AChE) enzimi üzerindeki inhibe edici etkisi Ellman spektrofotometrik metodu ile test edilmiştir [18]. Kısaca, 50 µl 5,5'-dithio-bis(2-nitro-benzoic)acid (DTNB), 100 µl Tris-HCl tampon (1 M, pH 8.0) ve 50 µl AChE (5.32x10⁻³ U) içeren reaksiyon çözeltisi 15 dakika boyunca 30 °C'de karıştırılarak inkübe edildi. Son olarak reaksiyon, substrat olarak kullanılan 50 µl acetylthiocholine iodide (AChI) ilave edilerek başlatıldı. Substratın enzimatik hidrolizi, 412 nm'de spektrofotometrik olarak kaydedildi ve sonuç IC₅₀ değeri olarak verildi [19, 20].

Sonuçlar ve Tartışma

Birçok çalışma, polifenol ve flavonoidlerin antioksidan, antimikrobiyal, antitümör gibi biyolojik aktivitelerdeki rolünü ortaya koymuştur. Bu biyoaktiviteler, aslında bileşiklerde bulunan fonksiyonel gruplara bağlıdır. Yapılan biyo-güdümlü araştırmalar, yan etkisi olan sentetik bileşiklerden ziyade onlara alternatif doğal fenolik içerikli gıdalara yöneltilmiştir [10]. Yapılan bir çalışmada fenolik ve flavonoidlerin antioksidan aktivitesinin genellikle bileşiklerin kimyasal yapılarına ve hidroksil gruplarının dağılımına bağlı olabileceği bildirilmiştir [21]. Diğer bir çalışmada, süperoksit radikalının üretiminde önemli rol oynayan ksantin oksidazın flavonoidler tarafından inhibe edilebileceği gösterilmiştir [22, 23]. Flavonoidlerin protein kinaz, aldoz redüktaz, miyeloperoksidaz, NADPH oksidaz, fosfolipaz, lipooksijenaz gibi enzimlerin aktivitesini etkilediği de bilinmektedir. Fenol ve flavonoidlerin enzimler üzerine etkisi ve antioksidan özellikleri bunların birçok farmakolojik özelliklerini açıklamaktadır [10]. Fenolik hidroksil gruplarının sayısı serbest radikal giderme aktivitesinde önemli rol oynamaktadır [24, 25]. Kuersetin gibi aromatik orto pozisyonda hidroksillenmiş bileşiklerin reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı anti-oksidan aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir [26]. ROS oluşumunda önemli rol oynayan H₂O₂, orto-kinol gibi fenolik bileşikler tarafından indirgenerek orto-kinon ve suya dönüştürülür [27]. Dolayısıyla, fenolik bileşikler hücrel biyomolekülleri oksidatif hasara karşı koruyabilir ve bu nedenle oksidatif strese bağlı dejeneratif hastalık riskini azaltabilir [28]. Adaçayı içeriğindeki rosmarinik asitin lipid peroksidasyonunun önlenmesinde etkili olduğu bildirilmiştir. Adaçayı ayrıca toplam

antioksidan aktiviteye katkıda bulunabilecek flavonoid ve diğler fenolikleri de içermektedir [4, 6].

LC-MS/MS yöntemi ile analiz edilen SOL'un fenolik bileşik kompozisyonu standart olarak tanıtilan fenolik bileşiklerle değlerlendirildi. Tablo 1 'de görüldüğü gibi vanilik asit, silymarin, kafeik asit, resveratrol ve luteolin miktarı diğlerlerine (fumarik asit, gallik acid, bütein...) nispeten yüksek çıktığı tespit edilmiştir.

Tablo 1 Adaçayının (*Salvia officinalis* L.) fitokimyasal fenolik bileşik içeriğinin LC-MS/MS yöntemi ile kantitatif olarak belirlenmesi

Standart bileşikler	ESI İYON MOD	MRM	LOD/LOQ (µg L ⁻¹)	RT	R ²	Regresyon denklemi	Konsantrasyon (µg L ⁻¹)
Kuersetin	neg	301,1>151	22.5/25.7	6,091	0,999	Y=(13,7831)X+(-146,951)	ND
Asetohidroksamik asit	pos	76,10>43,10	2.8/8.2	1,986	0,999	Y = (150,982)X + (23,1833)	ND
Kateşin hidrat	neg	291,10>139,00	8.2/11.4	4,958	0,999	Y = (79,2933)X + (-2406,22)	ND
Vanilik asit	pos	168,80>93,00	125.5/142.2	6,026	0,998	Y = (48,0522)X + (-876,904)	10818,231
Resveratrol	pos	229,10>135,00	9.0/13.6	5,713	0,998	Y = (46,4361)X + (-1314,61)	589,313
Fumarik asit	neg	115,20>71,00	25.2/31.3	3,674	0,999	Y = (20,2986)X + (-762,592)	482,415
Gallik asit	neg	169,20>125,00	0.90/1.6	4,134	0,999	Y = (65,3835)X + (-2699,84)	427,359
Kafeik asit	neg	179,20>135,00	6.3/10.7	5,283	0,996	Y = (124,785)X + (-487,132)	702,146
Phloridzin dihidrat	neg	435,00>273,10	61.0/207.0	5,646	0,999	Y = (33,4069)X + (-1396,90)	ND
Oleuropein	neg	539,10>377,20	0.05/1.0	5,643	0,999	Y = (25,9240)X + (-558,916)	ND
Hidroksisinnamik asit	neg	163,20>119,00	8.7/16.1	5,738	0,995	Y = (13,1516)X + (717,421)	ND
Ellagik asit	neg	300,90>145,10	0.101/0.333	5,895	1,000	Y = (5,25903)X + (-1167,31)	ND
Mirisetin	neg	317,10>150,90	55.4/59.6	5,858	0,999	Y = (37,0934)X + (2684,23)	ND
Protokatekuik asit	neg	181,20>108,00	30.3/35.4	5,875	0,994	Y = (526,954)X + (23026,1)	ND
Silymarin	neg	481,00>301,00	0.5/1.2	5,978	0,995	Y = (31,9969)X + (-1823,79)	3146,396
2-hidroksi-1,4 naftakinon	neg	173,20>144,90	0.5/1.5	6,058	0,997	Y = (203,469)X + (29033,1)	ND
Bütein	neg	271,10>135,00	22.7/28.6	6,084	0,999	Y = (49,3543)X + (367,917)	26,438
Naringenin	neg	271,10>150,90	5.4/6.4	6,104	0,996	Y = (317,241)X + (33733,3)	
Luteolin	neg	285,20>132,90	0.5/2.5	6,190	0,998	Y = (34,6668)X + (3721,79)	6397,142
Kaempferol	neg	285,10>116,90	206.6/214.3	6,288	0,999	Y = (2,63905)X + (-206,494)	ND
Kurkumin	neg	367,00>149,00	0.1/0.75	6,516	0,997	Y = (227,706)X + (-10111,1)	ND
Thymoquinone	neg	164,20>149,00	1.5/4.5	6,632	0,999	Y = (60,4553)X + (2285,92)	ND
Alizarin	neg	239,20>210,90	65.2/77.5	6,800	0,998	Y = (3,97487)X + (1614,23)	ND
Hidroksibenzoik asit	neg	137,20>93,00	30.5/40.25	6,130	0,999	Y = (735,804)X + (-498,102)	ND
Salisilik asit	neg	137,20>93,00	4.2/7.6	6,104	0,999	Y = (746,369)X + (6072,41)	ND

Çoklu reaksiyon izleme (MRM), Alıkonma zamanı (RT), R²: determinasyon katsayısı, LOD/LOQ (µg/L): Belirleme sınırı/Tayin sınırı, N.D: not detected

Yapılan bir çalışmada, HPLC ile belirlenen kafeik asit, karnosol ve toplam tanımlanmış fenolikler, uygulanan üç antioksidan test ile anlamlı ($p < 0.05$) korelasyon göstermiştir. Luteolin ve ABTS testi arasında pozitif anlamlı korelasyon saptandı ($r = 0.50$). Ferulik asit ($r = 0.60$), karnosik asit ($r = 0.83$), metil karnosat ($r = 0.62$) ve hispidulin ($r = 0.49$) FRAP testi ile anlamlı korelasyon göstermiştir. Korelasyonlardaki bu farklılıkların, çok çeşitli fenolik bileşiklerin yapısındaki farklılıklardan kaynaklanabileceği öne sürülmektedir [29]. Araştırmacılara göre, fenolikler ile antioksidan aktivite arasındaki önemli korelasyonlar, bitki ekstralarında bulunan fenolik bileşiklerin toplam antioksidan kapasitesine katkı sağlayabileceği hipotezini destekleyebilir. Çeşitli çalışmalar, bitki ekstralarında bulunan rosmarinik asidin toplam antioksidan kapasitesine önemli katkı sağlayabileceğini göstermiştir [7, 30].

Bu çalışmada, SOL ekstresinin metal indirgeme gücü FRAP ve CUPRAC yöntemi ile araştırılmıştır. Tablo 2'de görüldüğü gibi, Demir ve bakır indirgeme aktivitesinin (FRAP and CUPRAC) troloksa yakın çıkması antioksidan kapasitesinin yüksek olduğunu göstermektedir. Bu SOL ekstresi 0.2 mg/ml konsantrasyonda yaklaşık % 22 ABTS radikal giderme aktivitesi gösterirken, % 17 DPPH radikal giderme aktivitesi göstermiştir. Tablo 2'de gösterildiği gibi, bu bitki ekstresi orta derece radikalleri giderme kapasitesine sahiptir. Bu çalışmada, SOL'un içeriğinde bulunan vanilik asit, silymarin, kafeik asit, resveratrol ve luteolin gibi fenolik bileşiklerin radikal giderme ve metal indirgeme kapasitesine önemli katkı sağlayabileceği söylenebilir.

Asetilkolinesteraz (AChE) enziminin aşırı aktivitesi ile kolinerjik sistemde nörotransmitter asetilkolin hidrolizi artar. Bu durum Alzheimer hastalığı gelişimine sebep olmaktadır. Alzheimer hastalığının semptomatik tedavisinde kullanılan AChE inhibitörlerinin hücreleri oksidatif hasardan koruduğu bilinmektedir. Bu hastalık için kullanılan bazı AChE inhibitörlerinin kardiyovasküler hastalarda anjiyogenezin artmasında rol oynadığı da vurgulanmıştır [31-33].

Tablo 2 de gösterildiği gibi SOLE ekstresi AChE üzerine inhibisyon etkisi göstermiştir (IC_{50} : 0,136 mg/ml, R^2 : 0,965). Yapılan birçok çalışmada flavonoid ve fenolik bileşiklerin anti-asetilkolinesteraz aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Örneğin, yapılan bir çalışmada, ellagic asidin tirozinaz ve asetilkolinesteraz üzerine güçlü inhibitör etkisinin olduğu bildirilmiştir [34]. Fenolik bileşiklerin nörokoruyucu etkilerinden dolayı Alzheimer hastalığının tedavisinde önemli bir rol oynayabilirler [35, 36]. Günümüzde

yaygın kullanılan donepezilin, ellagic asitten yaklaşık 10000 kat daha güçlü AChE inhibitör etkisine sahip olduğu bilinmiştir [37]. Bu çalışmada, LS-MS/MS içerik analizine bakıldığında ellagic asit tespit edilmemiştir. SOL'un içeriğinde bulunan vanilik asit, silymarin, kafeik asit, resveratrol, luteolin ve diğer fenolik asitlerin AChE üzerine inhibisyon etkisinin olabileceği sonucuna varılabilir.

Tablo 2 *Salvia officinalis* L. ekstresinin radikal giderme, metal indirgeme aktivitesi ve AChE üzerine inhibisyon etkisi

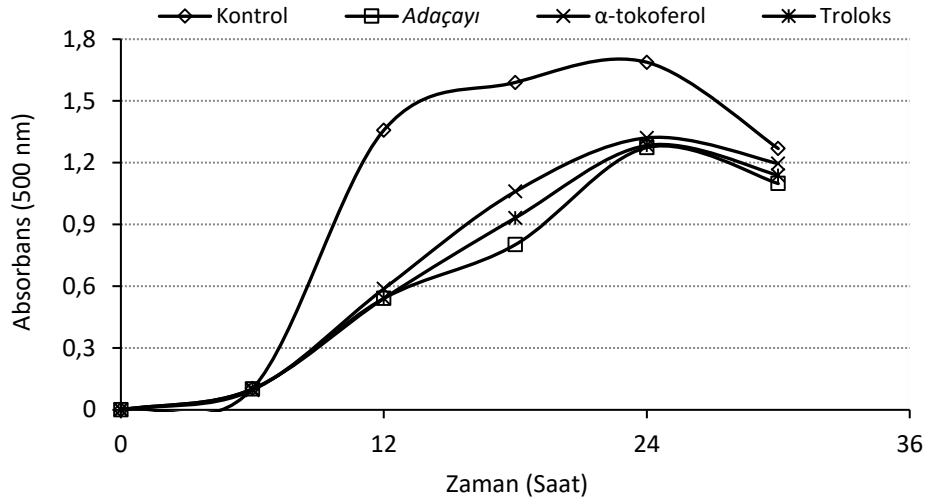
Antioksidanlar	DPPH ^a (0,2 mg/ml)	ABTS ^a (0,2 mg/ml)	FRAP Testi ^b (0,2 mg/mL)	CUPRAC Testi ^b (0,2 mg / mL)	AChE inhibisyonu	
					IC ₅₀ (mg/ml)	R ²
<i>S. officinalis</i> L.	17,601±1,674	22,153±1,945	0,183±0,015	0,438±0,029	0,136±0,014	0,965
BHA	71,819±5,462	83,668±7,674	0,454±0,032	-		
BHT	46,329±3,647	48,353±3,648	0,624±0,041	-		
Troloks	81,188±7,423	80,063±7,064	0,252±0,018	0,516±0,037		

Standart antioksidanlar (BHA, bütillenmiş hidroksianisol; BHT, bütillenmiş hidroksitoluen, troloks)

^aDeğerler yüzde radikal giderme aktivitesi olarak ifade edildi

^bDeğerler absorbans olarak ifade edildi. Yüksek absorbans, yüksek metal indirgeme kapasitesini gösterir

Ferrik tiyosiyanat metodu ile lineloik asit peroksidasyon giderme kapasitesi en çok kullanılan antioksidan parameterlerden biridir. Ferrik tiyosiyonat metodu, lipit peroksidasyonu boyunca meydana gelen peroksin miktarını ölçer. Bu analizde, hava oksijeni tarafından oksitlenen ve emülsiyonda linoleik asitin peroksidasyonu sonucu oluşan hidroperoksitler dolaylı olarak ölçülür [17, 33]. Çalışmamızda, SOL ekstresinin (10 µg/mL) zamanla lipit peroksidasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Şekil 1). SOL, troloks ve a-tokoferolün lineloik asit oksidasyonu üzerine inhibisyon etkisi 24. saatte sırasıyla yaklaşık %24, %24 ve %22 olarak bulunmuştur. Sonuçlarımız, bitki içeriğinde bulunan fenolik bileşiklerin lipit peroksidasyonunu önleyebileceğini göstermektedir. Yapılan bir çalışmada, BHT (10-400 µg/mL aralığında) doza bağımlı olarak lineloik asit oksidasyonunu % 34-49 aralığında inhibe ederken, *Ocimum basilicum* etanolik ekstresi ise aynı dozda % 12-29 aralığında inhibe etmiştir [38]. Yukarıdaki çalışmada 10 µg/mL'de *Ocimum basilicum* etanolik ekstresi lineloik asit oksidasyonunu % 12 inhibe ederken, çalışmamızda ise SOLE ekstresi % 24 inhibe etmiştir.



Şekil 1 Standart antioksidanlar (α -tokoferol ve troloks) ve *Salvia officinalis* L. etanol ekstresinin ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) lineloik asit peroksidasyonu giderme aktivitesi

Sonuç olarak, SOL'un birçok fenolik bileşik içerdiği ve bu içeriğinden dolayı önemli düzeyde antikolinerjik ve antioksidan özellik (metal indirgeme, radikal ve lipid peroksidasyon giderme) sergilediği gösterilmiştir. Bu araştırma, doğal olarak zengin antioksidan kaynağa sahip bu bitkinin oksidatif strese bağlı gelişen birçok hastalığın önlenmesin/ tedavisinde kullanılabileceğini gösterebilir.

Kaynaklar

1. Giorgi, A., et al., Effect of nitrogen starvation on the phenolic metabolism and antioxidant properties of yarrow (*Achillea collina* Becker ex Rchb.). *Food Chemistry*, 2009. 114(1): p. 204-211.
2. Landry, L.G., C.C.S. Chapple, and R.L. Last, Arabidopsis mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant physiology*, 1995. 109(4): p. 1159-1166.
3. Rice-Evans, C.A., N.J. Miller, and G. Paganga, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, 1996. 20(7): p. 933-956.
4. Bettaieb, I., et al., Drought effects on polyphenol composition and antioxidant activities in aerial parts of *Salvia officinalis* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2011. 33(4): p. 1103-1111.
5. Abdelkader, M., et al., Phytochemical study and biological activity of sage (*Salvia officinalis* L.). *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 2014. 8(11): p. 1231-1235.
6. Lu, Y. and L.Y. Foo, Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*, 2000. 55(3): p. 263-267.
7. Tepe, B., Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia virgata* (Jacq), *Salvia staminea* (Montbret & Aucher ex Benth) and *Salvia verbenaca* (L.) from Turkey. *Bioresource Technology*, 2008. 99(6): p. 1584-1588.

8. Jaberian, H., K. Piri, and J. Nazari, Phytochemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants. *Food chemistry*, 2013. 136(1): p. 237-244.
9. Schwarz, K. and W. Ternes, Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. I. Determination of phenolic diterpenes with antioxidative activity amongst tocochromanols using HPLC. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 1992. 195(2): p. 95-98.
10. Et-Touys, A., et al., Screening of antioxidant, antibacterial and antileishmanial activities of *Salvia officinalis* L. extracts from Morocco. *Microbiology Research Journal International*, 2016: p. 1-10.
11. Akhondzadeh, S., et al., *Salvia officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and placebo-controlled trial. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 2003. 28(1): p. 53-59.
12. Oyaizu, M., Studies on products of browning reaction. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*, 1986. 44(6): p. 307-315.
13. Elmastaş, M., et al., A study on the in vitro antioxidant activity of juniper (*Juniperus communis* L.) fruit extracts. *Analytical letters*, 2006. 39(1): p. 47-65.
14. Apak, R., et al., Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2004. 52(26): p. 7970-7981.
15. Blois, M.S., Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 1958. 181(4617): p. 1199-1200.
16. Re, R., et al., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 1999. 26(9-10): p. 1231-1237.
17. Mitsuda, H., Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Eiyo to shokuryo*, 1966. 19: p. 210-221.
18. Ellman, G.L., et al., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 1961. 7(2): p. 88-95.
19. Demir, Y., et al., Phenolic compounds inhibit the aldose reductase enzyme from the sheep kidney. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 2017. 31(9): p. e21936.
20. Necip, A. and M. Işık, Bioactivities of *Hypericum Perforatum* L and *Equisetum Arvense* L fractions obtained with different solvents. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 2019. 2(3): p. 221-230.
21. Popovici, C., I. Saykova, and B. Tylkowski, Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. 2010.
22. Hanasaki, Y., S. Ogawa, and S. Fukui, The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 1994. 16(6): p. 845-850.
23. Cos, P., et al., Structure– activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of natural products*, 1998. 61(1): p. 71-76.
24. Van Acker, S.A.B.E., L.M.H. Koymans, and A. Bast, Molecular pharmacology of vitamin E: structural aspects of antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 1993. 15(3): p. 311-328.
25. Justino, G.C., et al., Plasma quercetin metabolites: structure–antioxidant activity relationships. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2004. 432(1): p. 109-121.
26. Soobrattee, M.A., et al., Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2005. 579(1-2): p. 200-213.
27. Dewick, P.M., *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. 2002: John Wiley & Sons.
28. Luqman, S. and S.I. Rizvi, Protection of lipid peroxidation and carbonyl formation in proteins by capsaicin in human erythrocytes subjected to oxidative stress. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 2006. 20(4): p. 303-306.

29. Farhat, M.B., et al., Antioxidant potential of *Salvia officinalis* L. residues as affected by the harvesting time. *Industrial Crops and Products*, 2014. 54: p. 78-85.
30. Dorman, H.J.D., et al., Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food chemistry*, 2003. 83(2): p. 255-262.
31. Kakinuma, Y., et al., Donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor against Alzheimer's dementia, promotes angiogenesis in an ischemic hindlimb model. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2010. 48(4): p. 680-693.
32. Işık, M., The binding mechanisms and inhibitory effect of intravenous anesthetics on AChE in vitro and in vivo: kinetic analysis and molecular docking. *Neurochemical research*, 2019. 44(9): p. 2147-2155.
33. Işık, M., et al., Oxidative stress and mRNA expression of acetylcholinesterase in the leukocytes of ischemic patients. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 2017. 87: p. 561-567.
34. Fan, P., et al., Acetylcholinesterase-inhibitory activity of linarin from *Buddleja davidii*, structure-activity relationships of related flavonoids, and chemical investigation of *Buddleja nitida*. *Pharmaceutical biology*, 2008. 46(9): p. 596-601.
35. Feng, Y., et al., Ellagic acid promotes A β 42 fibrillization and inhibits A β 42-induced neurotoxicity. *Biochemical and biophysical research communications*, 2009. 390(4): p. 1250-1254.
36. Neagu, E., et al., Assessment of acetylcholinesterase and tyrosinase inhibitory and antioxidant activity of *Alchemilla vulgaris* and *Filipendula ulmaria* extracts. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2015. 52: p. 1-6.
37. Jha, A.B., S.S. Panchal, and A. Shah, Ellagic acid: Insights into its neuroprotective and cognitive enhancement effects in sporadic Alzheimer's disease. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2018. 175: p. 33-46.
38. Khatib, S., et al., Phenolic Extract of Basil Prevents Lipid Oxidation in Sunflower Oil, Beef and Turkey Meat: A Comparison with Synthetic Antioxidant BHA. *American Journal of Food Science and Nutrition*, 2018. 5(3): p. 66-75.