



Gıda Takviyesine Giden Yolda *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino Bitkisi Üzerinde Ön Çalışmalar: Antidiyabetik Aktivite ve Fitokimyasal Analizler

Preliminary Studies on Gynostemma pentaphyllum (Thunb.) Makino toward Dietary Supplement Development: Antidiabetic Activity and Phytochemical Analysis

Methiye Mancak^{1*} , Fatma Zeynep Uzuner² , Ufuk Koca Çalışkan^{1,3} 

¹Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

²Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Ankara, Türkiye

³Düzce Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, Düzce, Türkiye

Öz

Gynostemma pentaphyllum (Thunb.) Makino, jiaogulan olarak adlandırılan Cucurbitaceae familyasına ait bir bitkidir. Bitkinin toprak üstü kısımları uzun yıllardır diyabet tedavisi için kullanılmaktadır. Literatürde, *G. pentaphyllum*'un antidiyabetik etkisi in vivo ve klinik çalışmalar ile belirlenmiştir. Diğer taraftan bitkinin etki mekanizmasını aydınlatmaya yönelik in vitro aktivite çalışmalarının kısıtlı olduğu tespit edilmiştir. Amerika, Avrupa, Çin ve Asya ülkelerinde bitkiyi içeren ticari preparatları bulunsa da Türkiye'de herhangi bir ürünü bulunmadığı belirlenmiştir. Bu eksiklerden yola çıkarak bu çalışmada *G. pentaphyllum*'un antidiyabetik aktivitesinin belirlenmesi, etki mekanizmasının aydınlatılması ve ileride standardize ekstrelerinin hazırlanabilmesi için ön fitokimyasal analizlerinin yapılması amaçlanmıştır. Araştırmalar sonucunda bitkinin hem metanollü hem de sulu ekstresinin in vitro koşullarda α -amilaz ve α -glukozidaz enzimlerini inhibe ederek antidiyabetik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Fenolik madde ve flavonoid içeriği bakımından metanollü ekstrenin sulu ekstreten çok daha zengin olduğu belirlenmiştir. Araştırmalarımız *G. pentaphyllum*'dan standart ekstre ve gıda takviyesi hazırlanması için ön verileri sağlamakta olup ileri çalışmalar için öncü bir çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: Diyabet, fitokimyasal analiz, *Gynostemma pentaphyllum*, saponin, YPSK.

Abstract

Gynostemma pentaphyllum (Thunb.) Makino is a plant belonging to the Cucurbitaceae family called jiaogulan. The herb of the plant is used for the treatment of diabetes for many years. In the literature, the antidiabetic effect of *G. pentaphyllum* was determined by in vivo and clinical studies. On the other hand, it was determined that in vitro activity studies aimed at elucidating the mechanism of action of the plant are limited. Although there are commercial preparations containing the plant in America, Europe, China and Asian countries, it was determined that there is no product in Turkey. Based on these deficiencies, the aim of this study was to determine the antidiabetic activity of *G. pentaphyllum*, to elucidate its mechanism of action and to perform preliminary phytochemical analyses to prepare standardized extracts in the future. As a result of the studies, it was determined that both methanol and aqueous extracts of the plant showed antidiabetic activity by inhibiting α -amylase and α -glucosidase enzymes under in vitro conditions. The methanol extract was much richer than the aqueous extract in terms of phenolic and flavonoid content. Our research provides preliminary data for the preparation of standardized extracts and food supplements from *G. pentaphyllum* and is a pioneering work for further studies.

Keywords: Diabetes, *Gynostemma pentaphyllum*, HPLC, phytochemical analysis, saponin.

*Sorumlu yazarın e-posta adresi: mancakmethiye@gmail.com

Methiye Mancak  orcid.org/0000-0002-0085-7552

Fatma Zeynep Uzuner  orcid.org/0009-0007-4763-3728

Ufuk Koca Çalışkan  orcid.org/0000-0002-5216-7588



1. Giriş

Gynostemma pentaphyllum (Thunb.) Makino (GP), Cucurbitaceae familyasından *Gynostemma* Blume cinsinin 19 türünden biridir (Nguyen vd. 2021). 'Jiaogulan' olarak adlandırılan bu bitki Vietnam, Çin ve diğer bazı Asya ülkelerinde yabancı olarak yetişen, çok yıllık sürünen bir bitkidir. *G. pentaphyllum* bitkisi pürüzsüz veya tüylü olan ince dallarla karakterizedir. Yapraklar tüylü, zarımsı ve 4 ila 7 foliatlıdır. Yapraklar oval-eliptik ve dikdörtgen, oval veya keskindir ve nadiren yukarı dönüktür. Üst kısmı koyu yeşil ve alt kısmı soluk yeşildir. İki evcikli çiçekli bir bitkidir. Erkek çiçekler konik ve çiçek açmış olup çapı 15-20 cm'dir. Küçük, çok dallı tütün 4-5 (15'e kadar) cm uzunluğunda dalları vardır. Sap 2-3 mm uzunluğunda ve iplik benzeridir. Küçük kaliks, her biri 0,7 mm uzunluğunda 5 üçgen, apikulat loba sahiptir. Açık yeşil veya beyaz taç yaprağında beş yarık vardır. Sivri uçlu, tek damarlı çiçekler oval-mızrak şeklinde ve biraz çentiklidir (2,5-3,0 mm uzunluk, 1 mm genişlik). Stamenler, tepesinde anterler bulunan bir sütun oluşturan beş bitişik iplikten oluşur (Ahmed vd. 2023). Türkiye'de doğal olarak yetişmeyen bitkinin çeşitli şehirlerinde kültürü yapılmaktadır. Bitkiden hazırlanan çaylar uzun yıllardır geleneksel olarak kullanılmaktadır. Guizhou'da "ölümsüzlük otu" olarak da adlandırılan bitkinin yaşlı bireyler tarafından sıklıkla yutulduğu tespit edilmiştir (Bensky vd. 2004). Bitkinin toprak üstü kısımları geleneksel olarak astım, bronşit, diyabet, gastrit, hipertansiyon, kanser ve uykusuzluk gibi hastalıklar için kullanılmıştır (Blumert ve Liu 1999, Ahmed vd. 2023). Literatür taramaları sonucunda GP'nin çok çeşitli güçlü biyoaktiviteleri dolayısıyla büyük ilgi çeken ve umut veren bir bitki olduğu tespit edilmiştir. Türün antioksidan, anti-diyabetik, anti-aterojenik, antikanser, anti-obeze, nöroprotektif, anti-anksiyete, antihiperlipidemik, immunomodülatör ve hepatoprotektif etkileri bilimsel çalışmalarla araştırılmıştır (Cheng vd. 2011, Li vd. 2015, Liou vd. 2010, Megalli vd. 2006, Wang vd. 2020, Yang vd. 2008, Zhai vd. 2021). GP fitokimyasal açıdan değerlendirildiğinde gypenosid veya gynosaponin olarak isimlendirilen dammaran tipi saponinler açısından zengin olduğu bulunmuştur. Saponinlere ek olarak polisakkaritler, flavonoidler, fitosteroller, amino asitler ve inorganik elementler de bitki içeriğinde yer alan bileşenler olarak belirlenmiştir (Su vd. 2021).

Amerika, Avrupa, Çin ve Asya ülkelerinde jiaogulanın çay, meşrubat, spor içeceği, tablet, hazır toz, kapsül, oral sıvı ve hap formlarında hazırlanmış ticari ürünleri bulunmaktadır (Nguyen vd. 2021, Razmovski-Naumovski vd. 2005). Ülkemizde bitkinin kültürü yapılsa da standardize ekstresini

içeren takviyeler de dahil olmak üzere herhangi bir ürünü bulunmamaktadır. Bu eksikten yola çıkılarak bu çalışmada ülkemizde kültürü yapılan GP'nin standart ekstresini içeren gıda takviyesi hazırlanabilmesi için ön çalışmalar yapılmıştır. GP'nin geleneksel kullanımına ve literatür verilerine dayanarak farklı solvanlarla hazırlanan ekstrelerinin antidiyabetik aktivitelerinin tanımlanması amaçlanmıştır. Antidiyabetik aktivite sonuçlarından yola çıkarak etkili ekstrenin belirlenmesi ve bu aktiviteden sorumlu bileşiklerin tanımlanması hedeflenmiştir. Bu hedefler doğrultusunda in vitro antidiyabetik enzim inhibisyon analizleri ve fitokimyasal analizler gerçekleştirilmiştir.

2. Gereç ve Yöntemler

Bu çalışmada GP'nin Muğla'da kültürü yapılan örnekleri kullanılmıştır. Çalışma kapsamında öncelikle GP'nin toprak üstü kısımlarından metanollü ve sulu ekstreleri hazırlanmıştır. Antidiyabetik aktivitesinin belirlenmesi için in vitro α -amilaz ve α -glukozidaz inhibisyon analizleri yapılmıştır. Fitokimyasal analizler kapsamında toplam fenol miktar tayini, toplam flavonoid miktar tayini ve YPSK (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi) analizleri yapılmıştır. YPSK analizlerinde miktar tayinleri rutin üzerinden gerçekleştirilmiştir.

2.1. Bitkiden Ekstre Hazırlanması

GP bitkisinin toprak üstü kısımları kurutulmuş, toz edilerek metanollü ve sulu ekstreleri hazırlanmıştır. Metanollü ekstresi için maserasyon ve sulu ekstre için infüzyon tekniği kullanılmıştır.

Metanollü ekstre hazırlanırken toz edilmiş bitki örnekleri üzerine metanol ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 24 saat bekletilmiştir. Süre sonunda ekstre süzülüş düşük basınç altında ve 40-45 °C sıcaklıkta rotavaporda yoğunlaştırılmıştır. Sulu ekstre halk arasında kullanımına uygun olacak şekilde, kurutulmuş bitki örnekleri üzerine kaynar su ilave edilip 10 dakika bekletilerek, ve süre sonunda süzülerek hazırlanmıştır. Süzünü liofilizatörde yoğunlaştırılmıştır. Prosedürler her iki ekstre için de üçer kere tekrar edilmiştir. Ekstraksiyon işlemi sonucunda sulu ekstre %28.53 ve metanollü ekstre %22.48 verimle elde edilmiştir. Ekstreler çalışma esnasında buzdolabında muhafaza edilmiştir.

2.2. In vitro Antidiyabetik Aktivite Çalışmaları

α -Amilaz inhibisyon aktivite tayini, Eruygur vd. 2019 tarafından kullanılan in vitro yöntem modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. 250 μ g/ml, 125 μ g/ml, 62.5 μ g/ml, 31.25 μ g/ml, 15.625 μ g/ml konsantrasyonlarda bitki ekstreleri ve

amilaz enzimi (Sigma-Aldrich Type VI-B, ≥ 5 U/mg A3176-500KU) çözeltisi fosfat tamponu içinde hazırlanmıştır. Bitki ekstralarının olduğu ortama 50 μ L amilaz enzimi (0.8 U/mL) ilave edilmiş ve 37 °C de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında üzerine 50 μ L nişasta çözeltisi (%0.05) eklenerek 10 dakika daha inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda ortama 25 μ L HCl (1 M) ve 100 μ L lugol çözeltisi ilave edilmiş ve 540 nm de absorbansları okunmuştur. Kontrol grubu için ekstre yerine tampon çözeltisi ve referans madde olarak akarboz kullanılmıştır. α -amilaz enzimi üzerindeki inhibisyon etki düzeyleri absorbans değerleri sayesinde aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır (Denklem 1):

$$\text{İnhibisyon (\%)} = [1 - (\text{Absorbans (örnek)} / \text{Absorbans (kontrol)})] \times 100 \quad (1)$$

Absorbans (örnek): Örneklerin 540 nm'deki absorbans değeri

Absorbans (kontrol): Kontrolün 540 nm'deki absorbans değeri

α -Glukozidaz inhibisyon aktivite tayini, Eruygur vd. 2019 tarafından kullanılan in vitro yöntem modifiye edilerek yapılmıştır. Deneyin esası p-nitrofenil-D-glukopiranozid'in α -glukozidaz enzimi ile hidroliz reaksiyonu sonucu açığa çıkan p-nitrofenol'ün 405 nm'de absorpsiyonunun spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanmaktadır. 250 μ g/ml, 125 μ g/ml, 62.5 μ g/ml, 31.25 μ g/ml, 15.625 μ g/ml konsantrasyonlardaki bitki ekstraları ve α -glukozidaz enzimi (Sigma-Aldrich Type I, ≥ 10 U/mg G5003-1KU) çözeltisi fosfat tamponu ile hazırlanmış olup substrat olarak p-nitrofenil- α -D-glukopiranozid, referans madde olarak akarboz kullanılmıştır. Bitki ekstralarının olduğu ortama 50 μ L α -glukozidaz enzimi ilave edilerek 37 °C de 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 50 μ L p-nitrofenil- α -D-glukopiranozid (5 mM) eklenerek 37 °C de 30 dakika ikinci kez inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası absorbans 405 nm de okunmuştur. Spektrofotometrik olarak ölçülen absorbans değerleri sayesinde bitki ekstralarının α -glukozidaz üzerindeki inhibisyon etki düzeyleri aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır (Denklem 2):

$$\text{İnhibisyon (\%)} = [1 - (\text{Absorbans (örnek)} / \text{Absorbans (kontrol)})] \times 100 \quad (2)$$

Absorbans (örnek): Örneklerin 405 nm'deki absorbans değeri

Absorbans (kontrol): Kontrolün 405 nm'deki absorbans değeri

2.3. Fitokimyasal Analiz Çalışmaları

Fitokimyasal analiz çalışmaları kapsamında öncelikle toplam fenol ve toplam flavonoit miktarı tayinleri yapılmıştır. YPSK analizleri kapsamında GP'nin ana flavonoitlerinden biri olmasının yanı sıra nispeten kolay erişilebilir olması da göz önünde bulundurularak rutin kantitatif analizi yapılmıştır.

2.3.1. Toplam Fenol Miktar Tayini

Analiz, Singleton ve Rossi, 1965 tarafından kullanılan in vitro Folin-Ciocalteu yöntemi modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Deneyde referans madde olarak gallik asit kullanılmıştır. Ekstreler 5mg/mL konsantrasyonda hazırlanmıştır. Ekstre örneklerinden 10 μ L alınıp üzerine Folin-Ciocalteu reaktifi ve doymuş Na₂CO₃ eklenerek 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 765 nm de köre (distile su) karşı absorbanslar okunmuştur. Gallik asite ait kalibrasyon denklemi $y = 2.5565x + 0.0263$ ($r^2 = 0.99$) olarak belirlenmiştir. Toplam fenol konsantrasyonu gallik asit mg/g ekstre eşdeğeri olarak hesaplanmıştır.

2.3.2. Toplam Flavonoit Miktar Tayini

Toplam flavonid miktar tayini Woisky ve Salantino, 1998 tarafından kullanılan in vitro alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi ile hesaplanmıştır. 2mg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan ekstre örneklerinden 0.5 mL alınmıştır. Üzerine sırasıyla %75 etanol, 100 μ L AlCl₃ (% 10), 100 μ L sodyum asetat çözeltisi (1 M) ve distile su ilave edilmiş oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 415 nm'de köre karşı (etanol) absorbansları ölçülmüştür. Referans madde olarak kersetin kullanılmış ve kersetine ait kalibrasyon denklemi $y = 3.0537x - 0.0042$ ($r^2 = 0.99$) olarak belirlenmiştir. Toplam flavonoit miktarı kersetin mg/g ekstre eşdeğeri olarak hesaplanmıştır.

2.3.3. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (YPSK)

Analizleri

GP'nin metanollü ve sulu ekstralarının UV-VIS spektrumlarından ve literatürde daha önce yapılmış çalışmalardan yola çıkılarak YPSK analiz koşulları belirlenmiştir. Analiz C18 (150 $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) kolon ve %0.1 formik asit-su (A) ile %0.1 formik asit-asetonitril (B) mobil faz sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. YPSK analiz koşulları Çizelge 1'de sunulmuştur.

Rutine ait kalibrasyon denkleminin belirlenmesi için rutin metanol içerisinde çözülerek stok çözeltisi hazırlanmıştır. Stok çözelti metanol ile 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 10 ppm ve 5 ppm konsantrasyonlarına seyreltilerek açıklanan YPSK prosedüründe analizleri gerçekleştirilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

In vitro antidiyabetik aktivite tayini sonuçları GP bitkisinin α -amilaz ve α -glukozidaz enzimlerini doza bağlı olarak artıran bir şekilde inhibe ettiğini göstermiştir. Analiz sonuçları, bitkinin metanollü (IC50: 117.7 $\mu\text{g/ml}$) ve sulu ekstralarının (IC50: 106.2 $\mu\text{g/ml}$) α -amilazı benzer ölçüde inhibe ettiğini göstermiştir. Ekstrelerin α -amilaz inhibitör etkisinin referans madde akarbozdan (IC50: 34.43 $\mu\text{g/ml}$) daha düşük düzeyde olduğu bulunmuştur (Çizelge 2).

Çizelge 1. YPSK analiz koşulları.

Çizelge	Çizelge
Kolon	C18 (150 $\times$ 4.6 mm, 5 μm) kolon
Kolon sıcaklığı	30 $^{\circ}\text{C}$
Mobil faz	A: %0.1 formik asit -su B: %0.1 formik asit-asetonitril 0-10 dk, %0 $\rightarrow$ 10 B 10-15 dk, %10 B 15-30 dk, %10 $\rightarrow$ 15 B 30-40 dk, %15 B 40-60 dk, %15 $\rightarrow$ 25 B 60-70 dk, %25 $\rightarrow$ 35 B 70-80 dk, %35 $\rightarrow$ 40 B 80-90 dk, %40 $\rightarrow$ 50 B 90-110 dk, %50 $\rightarrow$ 70 B 110-115 dk, %70 $\rightarrow$ 90 B 115-120 dk, %90 $\rightarrow$ 10 B
Akış hızı	0.8 ml/dk
Enjeksiyon hacmi	5 μL
Dalga boyu	280 nm
Analiz süresi	120 dk

Literatür taramalarında GP'un α -amilaz üzerindeki etkinliğini araştıran çok az çalışma olduğu tespit edilmiştir. Vo vd. (2022) çalışmasında bizim çalışmamıza benzer şekilde GP bitkisinin etanollü ekstresinin α -amilaz inhibitör aktivitesi akarbozdan daha düşük seviyede bulunmuştur. Çalışma sonuçlarına göre, 100 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda etanollü ekstre %38.5 $\pm$ 3.8 inhibisyon sağlarken akarboz %59 $\pm$ 5.3 inhibisyon sağlamıştır (Vo vd. 2022).

α -Glukozidaz inhibisyon analizleri doğrultusunda, GP bitkisinin hem metanollü (IC50: 13.57 $\mu\text{g/ml}$) hem sulu ekstresinin (IC50: 11.40 $\mu\text{g/ml}$) α -glukozidaz enzimini akarboza (IC50: 9.25 $\mu\text{g/ml}$) benzer ve güçlü bir şekilde inhibe ettiği belirlenmiştir (Çizelge 3).

Literatürde bitkinin farklı çözücüler kullanılarak hazırlanmış ekstralarının α -glukozidaz enzimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Yang vd. (2013) çalışmasında bizim çalışmamıza benzer şekilde, GP metanol ekstresinin (%12.79) α -glukozidaz enzimi üzerinde akarboza (%13.26) yakın bir inhibe edici aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Phanjaroen vd. (2024) çalışmasında sıcak su kullanılarak hazırlanan sulu ekstre 2.5 mg/ml konsantrasyonda %25.75 inhibisyon göstermiştir. Çalışmada, GP'nin sıcak su kullanılarak hazırlanan sulu ekstresinin ve *Gymnema inodorum* (GI) bitkisinin sulu ekstresiyle kombine edilerek hazırlanan formülasyonlarının α -glukozidaz enzimi üzerindeki aktivitelerini karşılaştırmıştır. Çalışma verileri, 1.25 mg/ml konsantrasyonda α -glukozidaz enzimini, GP ekstresinin %18.60, GI ekstresinin %18.26, GP:GI (1:1,w/w) formülasyonunun %30.40 ve GP:GI (2:1,w/w) formülasyonunun %34.04 oranından inhibe ettiğini göstermiştir. Bahsi geçen çalışma GP ve GI'nin kombine formülasyonlarının α -glukozidaz enzimi üzerinde sinerjistik bir etkiye sahip olduğu tespit etmiş

Çizelge 2. GP ekstralarının α -amilaz enzim inhibisyonu sonuçları.

Ekstre	250 $\mu\text{g/ml}$	125 $\mu\text{g/ml}$	62.50 $\mu\text{g/ml}$	31.25 $\mu\text{g/ml}$	15.62 $\mu\text{g/ml}$	IC50 $\mu\text{g/ml}$
Metanollü ekstre	64.11 $\pm$ 1.37	49.44 $\pm$ 1.44	40.37 $\pm$ 0.41	28.51 $\pm$ 1.94	11.27 $\pm$ 0.71	117.7
Sulu ekstre	68.53 $\pm$ 1.02	50.76 $\pm$ 3.47	42.43 $\pm$ 1.84	24.18 $\pm$ 1.97	14.93 $\pm$ 1.65	106.2
Akarboz (Referans madde)	91.61 $\pm$ 0.46	83.85 $\pm$ 1.45	65.37 $\pm$ 0.02	51.54 $\pm$ 0.11	24.02 $\pm$ 0.74	34.43

Çizelge 3. GP ekstralarının α -glukozidaz enzim inhibisyonu sonuçları.

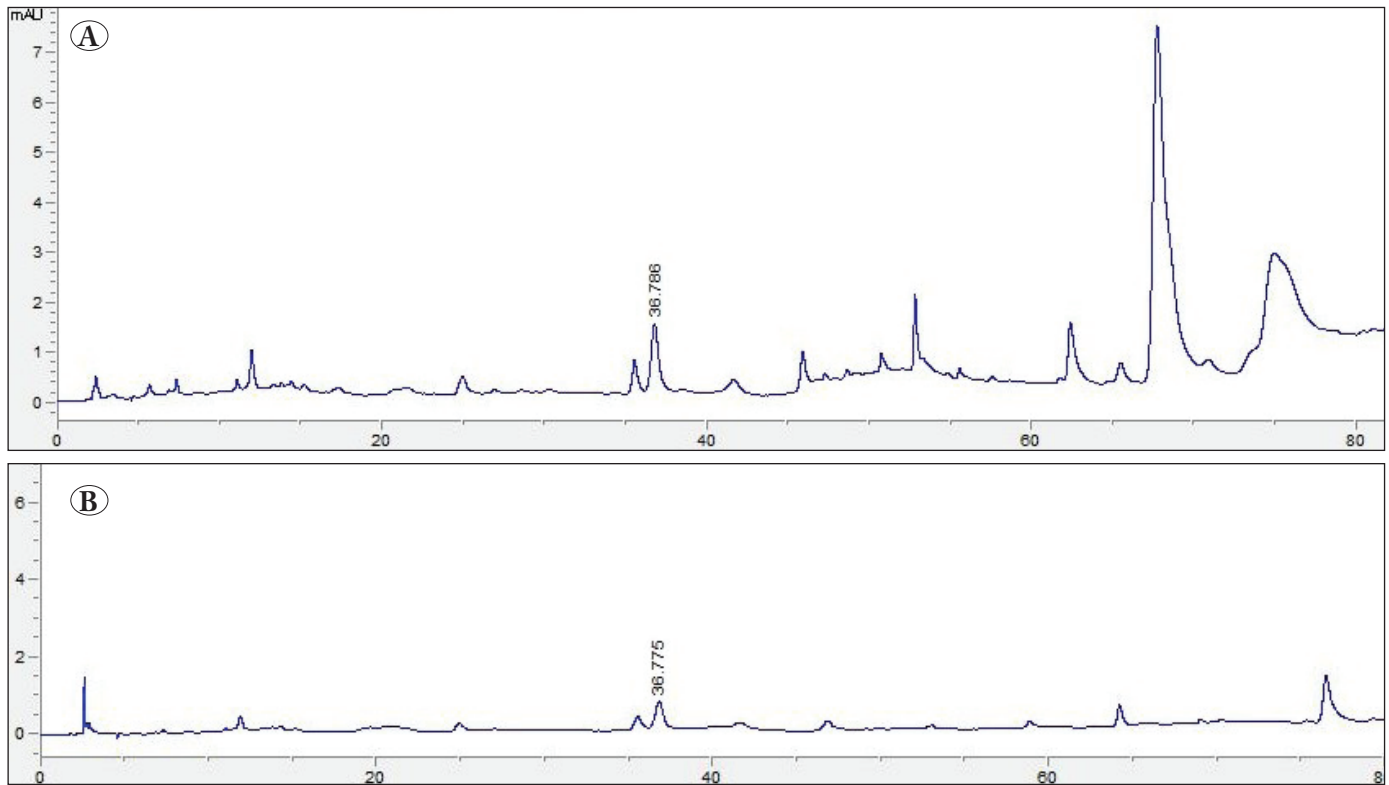
Ekstre	250 $\mu\text{g/ml}$	125 $\mu\text{g/ml}$	62.50 $\mu\text{g/ml}$	31.25 $\mu\text{g/ml}$	15.62 $\mu\text{g/ml}$	IC50 $\mu\text{g/ml}$
Metanollü ekstre	89.13 $\pm$ 1.58	75.92 $\pm$ 0.67	72.45 $\pm$ 1.69	62.97 $\pm$ 0.77	52.35 $\pm$ 2.53	13.57
Sulu ekstre	91.63 $\pm$ 0.51	84.73 $\pm$ 1.75	81.40 $\pm$ 0.73	69.49 $\pm$ 1.17	55.34 $\pm$ 2.98	11.40
Akarboz (Referans madde)	92.24 $\pm$ 0.91	85.65 $\pm$ 0.74	80.24 $\pm$ 2.64	73.86 $\pm$ 0.04	58.11 $\pm$ 0.36	9.25

olsa da çalışmada referans bir madde kullanılarak kıyaslama yapılmamıştır (Phanjaroen vd. 2024). Daha önceki yıllarda yapılan başka bir çalışmada bitkinin etanol ekstresinin akarbozdan daha güçlü bir α -glukozidaz inhibitörü olduğu bulunmuştur. Akarbozun 53.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonda % 50 lik bir inhibe edici etkiye sahipken, etanol ekstresinin 42.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonda aynı oranda inhibe edici etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Megalli vd. 2006).

Fitokimyasal analiz sonuçları, GP bitkisinin metanollü ekstresinin toplam fenolik ve flavonoid içeriği bakımından daha zengin olduğunu göstermiştir. Metanollü ekstrenin toplam fenol miktarı 18.77 mg/g gallik asit iken toplam flavonoid miktarı 34.53 mg/g kersetin olarak tespit edilmiştir. Sulu ekstrenin toplam fenolik içeriği 16.94 mg/g gallik asit ve toplam flavonoid miktarı 9.81 mg/g kersetin bulunmuştur. Bu çalışmaya benzer şekilde, farklı yerlerde üretilen jiaogulan çaylarının karşılaştırıldığı Şamec vd. (2016) çalışmasında, %80 metanol kullanılarak hazırlanan ekstraktların toplam fenol içeriğinin (10.42 ve 11.57 mg/g gallik asit), sulu ekstraktlarının fenolik içeriğinden (6.61 ve 8.11 mg/g gallik asit) daha fazla olduğu belirlenmiştir. Phanjaroen vd. (2024) çalışmasında GP sulu ekstresinin fenolik içeriği bu çalışmadan çok daha düşük (2.36 ± 0.04 mg/g gallik asit) bulunmuştur (Phanjaroen vd. 2024). Flavonoid içeriği açısından

değerlendirildiğinde de benzer şekilde metanollü ekstraktların (5.39 mg/g rutin ve 4.75 mg/g rutin), sulu ekstraktlardan (2.76 mg/g ve 1.89 mg/g rutin) daha fazla flavonoid içerdiği tespit edilmiştir (Şamec vd. 2016). GP farklı genotiplerinin (di- ve tetraploidler) ve farklı kısımlarının (yaprak ve tüm bitki) incelendiği başka bir çalışmada, bitkinin genotiplerine göre farklılık göstermekle birlikte yaprak kısımlarının toplam fenol miktarı 22.5-41.2 mg/g gallik asit aralığında iken tüm bitki için bu değerler 8.1-24.1 mg/g gallik asit eşdeğeri aralığında bulunmuştur (Xie vd. 2011). Zhao vd. (2012) çalışmasında on bir ticari jiaogulan örneğinin kimyasal bileşimlerini incelenmiştir. Örneklerin toplam fenolik içerikleri metanol ekstresi için 1.4-35.1 mg/g ve %50 aseton ekstresi için 6.3-52.3 mg/g iken toplam flavonoid içeriği metanollü ekstre için 1.7-25.5 mg/g ve %50 asetonlu ekstre için 3.8- 50.3 mg/g olarak belirlemiştir (Zhao vd. 2012). Bu çalışmada bulunan sonuçlar literatürdeki çalışmalarla uyumludur. Elde edilen veriler, ekstre içeriğinin bitkinin yetiştirme, toplama, kurutma gibi aşamaların yanı sıra ekstrenin hazırlandığı solvan ve ekstre etme koşullarına göre değiştiğini göstermiştir.

YPSK analizleri sonucunda, GP bitkisinin metanollü ve sulu ekstresinin elde edilen kromatogramları Şekil 1'de sunulmuştur.



Şekil 1. GP bitkisinin metanollü (A) ve sulu (B) ekstraktlarının YPSK kromatogramları.

YPSK koşullarında rutine ait pik 36.7 dakikada tespit edilmiş olup pik alanlarından yola çıkılarak kalibrasyon denklemi $y = 14468x - 11.19$ ($r^2 = 0.99$) olarak belirlenmiştir. Ekstrelerin rutin içeriği bu kalibrasyon denklemi üzerinden tespit edilmiştir. Kantitatif analiz verilerine göre, GP bitkisinin metanollü ekstresinin 18.85 mg/g ekstre ve sulu ekstresinin 2.76 mg/g ekstre rutin içerdiği bulunmuştur. Bu sonuçlar, ekstre hazırlanırken kullanılan çözücünün ekstrenin içerdiği rutin miktarını önemli ölçüde değiştirdiğini göstermiştir. Literatürdeki verilerle karşılaştırıldığında elde edilen sonuçların literatürü destekler nitelikte olduğu tespit edilmiştir. GP farklı genotipleri (di- ve tetraploitler) ve farklı kısımları (yaprak ve tüm bitki) ile gerçekleştirilen bir çalışmada rutin miktarının 1.92- 23.03 mg/g aralığında değiştiği tespit edilmiştir. (Xie vd. 2011). 11 ticari GP örneğinin değerlendirildiği farklı bir çalışmada ise rutin içeriği 0.01- 21.49 mg/g aralığında bulunmuştur (Zhao vd. 2012). Diğer bir çalışmada, GP yapraklarından hazırlanan ekstrenin 23.10 mg/g rutin taşıdığı belirlenmiştir (Jo vd. 2024).

4. Sonuç ve Öneriler

GP uzun yıllardır geleneksel olarak diyabet için kullanılan bir bitki olup antidiyabetik etkisi literatürde yer alan daha önceki birkaç çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmada bitkinin antidiyabetik etkisi bir kez daha kanıtlanmıştır. Literatürdeki çalışmalardan farklı olarak bu araştırma ile GP'nin antidiyabetik etkisini α -amilaz ve α -glukozidaz enzimlerini inhibe ederek gösterdiği tespit edilmiş olup bitkinin etki mekanizması aydınlatılmıştır. GP bitkisinin metanollü ve sulu ekstralarının her ikisinin de enzimleri inhibe edebildiği bulunmuştur. Ekstrelerin enzimler üzerinde aynı dozlarda benzer inhibisyon oranlarına sahip olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan rutin içeriği ve toplam flavonoid içeriği bakımından ekstralar arasında ciddi farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Literatür incelendiğinde GP bitkisi dammaran tipi saponinler açısından oldukça zengin olduğu tespit edilmiştir (Zhao vd. 2012). Bu bilgiler bitkinin antidiyabetik aktivitesinin flavonoid içeriğinden ziyade saponin içeriğinden kaynaklanabileceğini düşündürmüştür. Bitkinin dammaran tipi saponinlerinden biri olan Gylongiposid P'nin insülin salınımını uyardığını gösteren bir çalışma bu düşüncemizi desteklemektedir (Lundqvist vd. 2019). Diğer taraftan bu düşüncenin kanıtlanması için saponinlerin de dahil edildiği daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bu çalışma bildiğimiz kadarıyla GP bitkisinin metanollü ve sulu ekstralarının hem α -amilaz hem de α -glukozidaz enzimleri üzerindeki etkilerinin kıyaslandığı, ekstraların

fitokimyasal açıdan da karşılaştırıldığı ilk çalışma olarak literatüre ciddi katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bu çalışma verilerine göre GP'nin α -amilaz ve α -glukozidaz enzimlerini inhibe ederek antidiyabetik etki gösterdiğini, hem metanollü hem de sulu ekstralarının antidiyabetik aktivite için kullanılabileceğini öne sürüyoruz. Ön çalışma olarak tasarlanan bu çalışmanın devamında antidiyabetik aktivitenin saponinlerle ilişkisinin kanıtlanması için daha ileri fitokimyasal analizlerinin yapılmasını, standart ekstralarının hazırlanmasını ve toksisite çalışmalarının gerçekleştirilmesini amaçlıyoruz. Çalışmalar neticesinde değerli bir bitki olan GP'den ülkemizde üretilen yerli ve milli, kaliteli ürünlerinin elde edilmesini umuyoruz.

Teşekkür: Bu araştırma, 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı kapsamında gerçekleştirilmiştir. Destekleri için TÜBİTAK'a teşekkürlerimizi sunarız. (Proje no: 1919B012305993)

Bitki temini için Muhlis Partal'a teşekkür ederiz.

Yazar katkısı: Methiye Mancak: Çalışmayı planlamış ve tasarlamış, deneyleri gerçekleştirmiş, verileri toplamış ve analiz etmiş, makaleyi yazmıştır. Fatma Zeynep Uzuner: Deneyleri gerçekleştirmiş ve makaleyi yazmıştır. Ufuk Koca Çalışkan: Çalışmayı planlamış ve tasarlamış, verileri analiz etmiş, makaleyi yazmıştır.

5. Kaynaklar

- Ahmed, A., Saleem, MA., Saeed, F., Afzaal, M., Imran, A., Nadeem, M., Ambreen, S., Imran, M., Hussain, M., Aljbawi, E. 2023. *Gynostemma pentaphyllum* an immortal herb with promising therapeutic potential: A comprehensive review on its phytochemistry and pharmacological perspective. Int. J. Food Prop., 26(1):808-832. Doi: 10.1080/10942912.2023.2185566
- Bensky, D., Clavey, S., Stöger, E. 2004. *Materia medica. Chinese Herbal Medicine*. 3. Basım, 3-6.
- Blumert, M., Liu, JL. 1999. Jiaogulan China's "Immortality" Herb. In Torchlight Publishing Inc. (3rd ed). Badger: USA.
- Cheng, TC., Lu, JF., Wang, JS., Lin, LJ., Kuo, HI., Chen, BH. 2011. Antiproliferation effect and apoptosis mechanism of prostate cancer cell PC-3 by flavonoids and saponins prepared from *Gynostemma pentaphyllum*. J. Agric. Food Chem., 59(20):11319-11329. Doi: 10.1021/jf2018758
- Eruygur, N., Ucar, E., Akpulat, HA., Shahsavari, K., Safavi, SM., Kahrizi, D. 2019. In vitro antioxidant assessment, screening of enzyme inhibitory activities of methanol and water extracts and gene expression in *Hypericum lydiu*m. Mol. Biol. Rep., 46(2):2121-2129. Doi: 10.1007/s11033-019-04664-3

- Jo, HG., Baek, CY., Hwang, Y., Baek, E., Park, C., Song, HS., Lee, D. 2024. Investigating the anti-inflammatory, analgesic, and chondroprotective effects of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino in osteoarthritis: an in vitro and in vivo study. *Int. J. Mol. Sci.*, 25(17):9594. Doi: 10.3390/ijms25179594
- Li, B., Zhang, X., Wang, M., Jiao, L. 2015. Characterization and antioxidant activities of acidic polysaccharides from *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Markino. *Carbohydr. Polym.*, 127:209-214. Doi: 10.1016/j.carbpol.2015.03.069
- Liou, CJ., Huang, WC., Kuo, ML., Yang, RC., Shen, JJ. 2010. Long-term oral administration of *Gynostemma pentaphyllum* extract attenuates airway inflammation and Th2 cell activities in ovalbumin-sensitized mice. *Food Chem. Toxicol.*, 48(10):2592-2598. Doi: 10.1016/j.fct.2010.06.020
- Lundqvist, LC., Rattigan, D., Ehtesham, E., Demmou, C., Östenson, CG., Sandström, C. 2019. Profiling and activity screening of dammarane-type triterpen saponins from *Gynostemma pentaphyllum* with glucose-dependent insulin secretory activity. *Sci. Rep.*, 9(1):627. Doi: 10.1038/s41598-018-37517-3
- Megalli, S., Davies, NM., Roufogalis, BD. 2006. Anti-hyperlipidemic and hypoglycemic effects of *Gynostemma pentaphyllum* in the Zucker fatty rat. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 9(3):281-291.
- Nguyen, NH., Ha, TKQ., Yang, JL., Pham, HTT., Oh, WK. 2021. Triterpenoids from the genus *Gynostemma*: Chemistry and pharmacological activities. *J. Ethnopharmacol.*, 268:113574. Doi: 10.1016/j.jep.2020.113574
- Phanjaroen, T., Haideri, MH., Khiolaongam, W., Somsak, V., Boonyapranai, K., Ounjaijean, S. 2024. Phytochemical content, antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities of *Gynostemma pentaphyllum* and *Gymnema inodorum* extracts. *J. Curr. Sci.*, 14(3):54-54. Doi: 10.59796/jcst.V14N3.2024.54
- Razmovski-Naumovski, V., Huang, TH., Tran, VH., Li, GQ., Duke, CC., Roufogalis, BD. 2005. Chemistry and pharmacology of *Gynostemma pentaphyllum*. *Phytochem. Rev.*, 4:197-219. Doi: 10.1007/s11101-005-3754-4
- Šamec, D., Valek-Žulj, L., Martinez, S., Grúz, J., Piljac, A., Piljac-Žegarac, J. 2016. Phenolic acids significantly contribute to antioxidant potency of *Gynostemma pentaphyllum* aqueous and methanol extracts. *Ind. Crops Prod.*, 84:104-107. Doi: 10.1016/j.indcrop.2016.01.035
- Singleton, VL., Rossi, JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16(3):144-158. Doi: 10.5344/ajev.1965.16.3.144
- Su, C., Li, N., Ren, R., Wang, Y., Su, X., Lu, F., Zong, R., Yang, L., Ma, X. 2021. Progress in the medicinal value, bioactive compounds, and pharmacological activities of *Gynostemma pentaphyllum*. *Molecules*, 26(20):6249. Doi: 10.3390/molecules26206249
- Vo, TS., Le, PU., Ngo, DH. 2022. In vitro hypoglycemic and radical scavenging activities of certain medicinal plants. *Exp. Appl. Biomed. Res.*, 23(4):291-298. Doi: 10.2478/sjccr-2019-0083
- Wang, Z., Wang, Z., Huang, W., Suo, J., Chen, X., Ding, K., Sun, K., Zhang, H. 2020. Antioxidant and anti-inflammatory activities of an anti-diabetic polysaccharide extracted from *Gynostemma pentaphyllum* herb. *Int. J. Biol. Macromol.*, 145:484-491. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.213
- Woisky, RG., Salatino, A. 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apic. Res.*, 37(2):99-105. Doi: 10.1080/00218839.1998.11100961
- Xie, Z., Zhao, Y., Chen, P., Jing, P., Yue, J., Yu, L. 2011. Chromatographic fingerprint analysis and rutin and quercetin compositions in the leaf and whole-plant samples of di- and tetraploid *Gynostemma pentaphyllum*. *J. Agric. Food Chem.*, 59(7):3042-3049. Doi: 10.1021/jf104329v
- Yang, X., Zhao, Y., Yang, Y., Ruan, Y. 2008. Isolation and characterization of immunostimulatory polysaccharide from an herb tea, *Gynostemma pentaphyllum* Makino. *J. Agric. Food Chem.*, 56(16):6905-6909. Doi: 10.1021/jf801101u
- Yang, F., Shi, H., Zhang, X., Yang, H., Zhou, Q., Yu, LL. 2013. Two new saponins from tetraploid jiaogulan (*Gynostemma pentaphyllum*), and their anti-inflammatory and α -glucosidase inhibitory activities. *Food Chem.*, 141(4):3606-3613. Doi: 10.1016/j.foodchem.2013.06.015
- Zhai, XF., Zu, ML., Wang, YR., Cui, WY., Duan, Y., Yang, C., Piao, XL. 2021. Protective effects of four new saponins from *Gynostemma pentaphyllum* against hydrogen peroxide-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. *Bioorg. Chem.*, 106:104470. Doi: 10.1016/j.bioorg.2020.104470
- Zhao, Y., Xie, Z., Niu, Y., Shi, H., Chen, P., Yu, LL. 2012. Chemical compositions, HPLC/MS fingerprinting profiles and radical scavenging properties of commercial *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino samples. *Food Chem.*, 134(1):180-188. Doi: 10.1016/j.foodchem.2012.02.090