

**T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Hypericum retusum* Aucher BİTKİSİNİN
FARKLI ÇÖZÜCÜLERDE HAZIRLANAN
EKSTRAKTLARININ ANTIOKSİDAN
ETKİLERİ**

Yasemin AKGÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN: Yrd. Doç. Dr. Zuhale TOKER

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DİYARBAKIR
TEMMUZ 2009**

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	i
ÖZ	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ.....	vi
ÇİZELGELER, ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1.GİRİŞ.....	1
1.1. <i>Hypericum</i> BİTKİSİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ.....	2
1.2.KAYNAKLAR.....	4
2.KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	5
2.1.SERBEST RADİKALLER.....	5
2.2.ANTİOKSİDANLAR.....	6
2.2.1.Doğal Antioksidanlar.....	6
2.2.2.Sentetik Antioksidanlar.....	9
2.3. <i>Hypericum</i> TÜRLERİNİN KULLANIM ALANLARI.....	11
2.4. <i>Hypericum</i> 'un KİMYASAL İÇERİĞİ.....	12
2.5.ANTİOKSİDANLARIN ÇALIŞMA MEKANİZMASI.....	15
2.6.ÇİZELGE VE ŞEKİLLER.....	16
2.7.KAYNAKLAR.....	17

3.MATERYAL ve METOT.....	22
3.1.MATERYAL.....	22
3.1.1. <i>Hypericum retusum</i> Aucher.....	22
3.1.2.Kullanılan Kimyasal Madde ve Çözücüler.....	23
3.1.3.Yararlanılan Aletler.....	23
3.1.4.Kullanılan Cihazlar.....	23
3.2.METOD.....	24
3.2.1.Bitki Ekstraktların Hazırlanışı.....	24
3.2.2.Toplam Fenolik Bileşik Miktarı Tayini.....	24
3.2.3.Toplam Flavonoid Miktarı Tayini.....	25
3.2.4.İndirgeme Gücü Tayini.....	26
3.2.5.DPPH Giderme Aktivitesi Tayini.....	26
3.2.6.Metal Şelatlama Aktivitesi Tayini.....	27
3.2.7.OH Radikalini Söndürme Aktivitesi Tayini.....	28
3.2.8.İstatiksel Analiz.....	29
3.3.KAYNAKLAR.....	30
4.BULGULAR ve TARTIŞMA.....	31
4.1.BULGULAR.....	31
4.1.1.Total Fenolik Bileşik Miktarı Bulguları.....	31
4.1.2.Total Flavonoid Miktarı Bulguları.....	31
4.1.3.İndirgeme Gücü Bulguları.....	32
4.1.4.DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi Bulguları.....	33
4.1.5.Metal İyonları Şelatlama Aktivitesi Bulguları.....	33
4.1.6.OH Radikalini Söndürme Aktivitesi Bulguları.....	34

4.2.TARTIŞMA.....	35
4.3.ÇİZELGE VE ŞEKİLLER.....	38
4.4.KAYNAKLAR.....	44
5.SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	46
6.ÖZGEÇMİŞ.....	47

ÖZ

Hypericum retusum Aucher, *Hypericaceae* ailesine mensup otsu bir bitki türüdür. *Hypericum*'ların dünyada 400'ü aşkın, Türkiye' de ise 70 farklı türü vardır. Bitkinin kanıtlanmış etkilerinden bazıları yara iyileştirici, antidepresif ve antiseptik olmasıdır. Bitkinin farklı türleriyle ilgili çok sayıda araştırma vardır, ancak *H. retusum* türünün antioksidan etkisi daha önce hiç çalışılmamıştır.

Bu çalışmada; *H. retusum* bitkisinin toprak üstü kısımları petrol eter, hegzan, etilasetat ve metanol özütlerinin antioksidan etkileri araştırıldı. Antioksidan aktivite; toplam fenolik bileşen miktarı (Folin & Ciocalteu reaktifi yöntemi), toplam flavonoid miktarı, DPPH (1,1-difenil-2-pikril hidrazil) radikalini, hidroksi radikalini söndürme, indirgeme gücü ve metal şelatlama aktiviteleri ölçülerek belirlendi. *H. retusum*'un özütleri DPPH radikal sisteminde antioksidan aktivite sergiledi. Diğer bir antioksidan test olarak metal şelatlama aktivitesi incelendi ve bitki özütlerinin değerinin EDTA'dan düşük olduğu bulundu. İndirgeme gücü değerlerinin yüksek olduğu, OH radikali deneyinde sonuçların dikkat çekici olduğu görüldü.

Bu sonuçlar, bize *H. retusum*'un yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir.

Sonraki çalışmalar petrol eter, hegzan, etilasetat ve metanol özütlerinin karakterizasyonuna yönelik olmalıdır.

Anahtar Kelimeler : *Hypericum retusum* Aucher, Antioksidan aktivite

ABSTRACT

Hypericum retusum Aucher Guttiferae family member is a bush type. 400 more than the world *Hypericums*, in Turkey there are only 70 different types. Some of the proven effects of plant is wound healing, wolf-down, antidepressif and antiseptic. Many different types of plant research are related to, but antioxidant effects of *H. retusum* type has not been previously ever work.

In this work, the antioxidants activity of *H. retusum* aerial parts were determined on methanol, etylacetate, petroleum ether, hegsane extracts. Total phenolic contents of extracts were quantified (with the Folin & Ciocalteu reagent), total flovonoid, DPPH (1,1-diphenyl-2-picryllhydrazyl), hydroxyl radical scavenging, reducing power and iron chelation. *H.retusum* extracts showed antioxidants activity in the DPPH radical system.

Total antioxidant activity methods as phenolic components, to resolve the activity of radicals, Metals chelate activity, has been looking into the demotion of the power. Another antioxidant activity tests of *H.retusum* extracts on iron chelation were found lower then EDTA. Reducing power values were higher and hydroxyl radicals in the experimental results have been remarkable.

These results shows, *H.retusum*'s has the highest antioxidant activity. Further studies should be aimed characterize of the petroleum ether, hegsane, etylacetate and methanol extracts.

Key words: *H. retusum* Aucher, Antioxidant activity

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezimi için konu seçimi, materyalin temini ile çalışmalarımın yönlendirilip sonuçlanmasına kadar geçen süreçte her türlü yardımıyla yanımda olan, ilgisini ve bilgisini esirgemeyen değerli hocam Sayın Yrd.Doç.Dr.Zuhal TOKER'e, çalışmalarımıza düşünceleriyle katkıda bulunan Sayın Prof.Dr.Hasan Çetin ÖZEN'e, bu çalışmanın oluşmasında öncü olan Sayın Doç.Dr.Göksel KIZIL'a ve Sayın Doç.Dr.Murat KIZIL'a teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Araştırma ve laboratuvar çalışmaları sırasında her konuda yardımcı olan desteklerini esirgemeyen öğretim elemanı Sayın Cumali KESKİN'e , Sayın Arş.Gör. Murat YAVUZ'a, Sayın Arş.Gör.Hilal SURMUŞ'a ve Sayın Besi SERİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca benden yardımlarını, ilgi ve desteklerini esirgemeyen başta Sayın müdürüm Paşa AYDINALP olmak üzere isimlerini yazamadığım tüm değerli iş arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Gösterdikleri sabır, anlayış ve destekten dolayı sevgili aileme minnetlerimi sunarım.

Bu çalışma (proje no: 2008-80-95) DÜBAP tarafından desteklenmiştir.

Yasemin AKGÖZ

Temmuz, 2009

ÇİZELGELER, RESİMLER, ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Fenol

Şekil 2.2: Kumarin

Şekil 2.3: α – tokoferol

Şekil 2.4: Flavonol

Şekil 2.5: TBHQ (Terbütilhidrokinon)

Şekil 2.6: BHA (Bütillenmiş hidroksianisol)

Şekil 2.7: BHT (Bütillenmiş hidroksitoluen)

Şekil 2.8: Dodesil Gallat

Şekil 2.9: Hiperisin

Şekil 2.10: Hiperforin

Şekil 2.11: Kuersetin

Şekil 4.3.1: Gallik asidin artan derişimlerine karşılık ölçülen absorbans değerleri.

Şekil 4.3.2: Kuersetinin artan derişimlerine karşı ölçülen absorbans değerleri.

Şekil 4.3.3: *H. retusum* bitkisinin petroleter, hegzan, etilasetat, metanol ekstraktlarının farklı konsantrasyonlardaki Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeme gücünün spektrofotometrik analiz verileri.

Şekil 4.3.4: *H. retusum* bitkisinin petroleter, hegzan, etilasetat, metanol ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının DPPH radikali üzerindeki söndürücü aktivitesinin spektrofotometrik analiz verileri.

Şekil 4.3.5: *H. retusum* bitkisinin petroleter, hegzan, etilasetat, metanol ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının metal şelatlama aktivitesinin spektrofotometrik analiz verileri.

Şekil 4.3.6:*H. retusum* bitkisinin petroleter, hegzan, etilasetat, metanol ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının OH Radikalini söndürme gücünün spektrofotometrik analiz verileri.

Çizelge 4.3.1:*H. retusum* bitkisinin petroleter, hegzan, etilasetat, metanol ekstraktlarının içindeki gallik asite eşdeğer total fenolik bileşen miktarları.

Çizelge 4.3.2:*H. retusum* bitkisinin hegzan, etilasetat, petrol eter ve metanol ekstraktlarının içindeki kuersetine eşdeğer toplam flavonoid bileşen miktarları.

Çizelge 4.3.3:*H. retusum* bitkisinin hegzan, etilasetat, petrol eter ve metanol ekstraktlarının farklı konsantrasyonlardaki Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeme gücünün değerleri.

Çizelge 4.3.4:*H. retusum* bitkisinin petroleter, hegzan, etilasetat, metanol ekstraktlarının BHT ve BHA'nın DPPH radikalini söndürme aktivitelerinin % inhibisyon değerleri.

Çizelge 4.3.5:*H. retusum* bitkisinin petroleter, hegzan, etilasetat, metanol ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının metal şelatlama aktivitesinin % inhibisyon değerleri .

Çizelge 4.3.6:*H. retusum* bitkisinin petroleter, hegzan, etilasetat, metanol ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının OH Radikalini söndürme gücünün % inhibisyon değerleri .

Resim 3.1: *H. retusum* (Fotoğraf : Prof. Dr. Selçuk Ertekin)

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BHA : Bütillenmiş hidroksianisol

BHT : Bütillenmiş hidroksitoluen

TCA : Triklorasetik asit

TBA : Tiyobarbitürik asit

DPPH : 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil

GAE : Gallik asit ekivalent

QE : Kuersetin ekivalent

FCR : Folin & Ciocalteu Reaktifi

EDTA : Etilendiamintetraasetik asit

DMSO : Dimetilsülfoksit

FeCl₂ : Demir-2-klorür

K₃Fe(CN)₆ : Potasyum ferrisiyanat

NaOH : Sodyum hidroksit

NaCO₃ : Sodyum karbonat

GİRİŞ

Tüm dünyada son zamanlarda kullanımları belirgin bir şekilde artan herbal (fitomedikal) tıbbi ürünler, doğal oldukları için güvenli kabul edilmektedir. WHO'nun son zamanlardaki raporlarında Avrupa, Avustralya ve Kuzey Amerika'da yaşayan insanların % 50'sinin alternatif-destekleyici tedavi yöntemlerinden birini kullandığını ve bu yöntemler içinde de en çok kullanılanların bitkisel ilaçlar olduğunu açıklamıştır. İnsanların % 80'inin doğal tedaviye inandığını açıklaması bu popülaritenin iyi bir göstergesidir ¹⁻².

Yine WHO'nun 91 ülkede tıbbi bitkiler üzerine yapılan yayınlara dayanarak hazırladığı araştırmasına göre, toplam 20.000 civarında tedavi amaçlı kullanılan tıbbi bitki olduğu bildirilmiştir ³.

Zengin flora yapısına sahip olan Türkiye'de, 9000'e yakın bitki türü doğal olarak yetişmesine rağmen bunların tümünden tam olarak yararlanılmamaktadır ⁴. Ancak yaygın kullanıma rağmen, pek çok bitkisel ilacın etkisi henüz kanıtlanmamıştır. Bu konuda bilimsel veri eksikliği de mevcuttur. Türkiye'de yaklaşık 1000 kadar bitkinin geleneksel tedavide kullanıldığı tahmin edilmektedir ⁵.

Tıbbi bitkilerdeki farklı bileşikler onları oldukça etkili kılmaktadır. Selüloz, nişasta, pektin, protein, şeker vs. gibi etkisiz maddelerin yanında, çok az miktarları bile farmakolojik etkilere sahip bileşiklerde bulunmaktadır. Bunlar; glikozitler, organik asitler, tanenler, alkaloidler, sabit yağlar, uçucu yağlar (esanslar), reçineli bileşikler, vitaminler gibi gruplara ayrılmaktadır ⁶.

1.1. *Hypericum* BİTKİSİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Hypericum 'lar Türkiye'de yöresel olarak Binbirdelik otu, Sarı kantaron, Kan otu, Kılıç otu, Mayasılotu, Yaraotu, Koyunkıran, Batof olarak bilinen Hypericaceae familyasına dahil çok yıllık otsu bitkiler grubundandır. Geleneksel tıpta mide rahatsızlıklarında, sarılıkta, iltihap kurutucu, balgam söktürücü, kan yapıcı ve antidepresan gibi amaçlar için kullanılmaktadır ⁷⁻⁸.

Bitki gövdesinin üst kısmı dallanmış olup 25-60 cm boyunda olabilir ve sapsarı ayrı olduğu halde bir şemsiye biçimindeki çiçekler 5 tane ve tomurcukta üst üste binmiştir. Korolla genelde altın sarısı renkli bazen kenarları siyah renkli guddeli tüyler ile çevrilidir. Petaller ayrı 5 tane, tomurcukta bükülü haldedir ve boyu 8-15 mm'dir. Sepaller 5 tane, tomurcukta üst üste binmiştir. Parietal etene ya da axile ile ovaryum üsttedir. Tohumlar endospermasızdır. Erkek organları stamenler küçük demetler halinde veya bazen belirsizce bir araya toplanmıştır. Yapraklar basit, karşılıklı veya genellikle helezoniktir. Çiçeklenme zamanı Haziran-Ağustos aylarıdır. Yakından incelenip ışığa karşı tutulduğunda yapraklardaki yağ guddeleri, parlak noktacıklar halinde kolaylıkla görülür. Bitkiye binbirdelik otu denmesi bu özellikten ileri gelmektedir. Yapraklarındaki bu siyah küçük noktalar cilde sürtüldüğünde kırmızı lekeler oluşur. Bu kırmızı renk bir pigment olan hiperisin etken maddesi yüzündendir ⁹⁻¹⁰.

Sarı kantaronun sakinleştirici etkisi yanında haricen yara iyileştirici olarak da kullanılmaktadır. *Hypericum* 'un Türkiye'de 70 kadar türü bilinmektedir. Sarı kantaron genellikle doğal olarak yetişmektedir ¹¹.

Modern eczacılık biliminin gelişmesi, diğer bazı bitkiler gibi *Hypericum* 'un da tıbbi olarak kullanılabilen bir bitki olduğunu neredeyse unutturmuştur. Fakat

sentetik ilaçların tehlikeli yan etkilerinin bulunması ve bitkilerin çok y6nl6 etkiye sahip olmaları, bu bitkilerin 6nemini yeniden g6ndeme taşımıştır. 6zellikle *Hypericum* t6rlerinin çağımızın yaygın hastalığı olan depresyona karşı etkili olması bu bitkiler ve onlardan elde edilen bileşikler 6zerinde çalışmaların artmasına neden olmuştur ¹⁰.

Araştırmamıza konu olan *H. retusum* t6r6 *Guttiferae* = *Hyperiaceae* familyasına aittir. *H. retusum*'un antioksidan etkileriyle ilgili daha 6nce yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada; yukarıda genel 6zellikleri belirtilen *H. retusum* t6r6n6n toprak6st6 kısımlarının petrol eter, hegzan, etilasetat ve metanol gibi farklı 6z6c6lerle elde edilen 6z6tlerinin antioksidan etkileri araştırılmıştır. Antioksidan ve serbest radikal s6p6r6c6 potansiyeldeki 6z6tlerinin fenolik içerikleri, spektroskopik y6ntemle tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar *H. retusum* ve sentetik antioksidan BHA ve BHT, Gallik asit, DPPH, EDTA, Kuersetin, DMSO sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır.

Bu sonuçlarda canlı organizmaların oksidatif zarara karşı koyabilmek için dışardan alabilecekleri yeni antioksidan kaynaklar bulunabileceği d6ř6n6lmektedir.

1.3. KAYNAKLAR

- 1.Sarışen, Ö.; Çalışkan, D., *Fitoterapi: Bitkilerle tedaviye dikkat.* **2005**, 14: 182-187
- 2.Gürün , MS., *Bitkisel tıp. ANKEM Dergisi*, **2004**, 18: 133-136
- 3.Kalaycıoğlu, A.; Öner, C., *Bazı Bitki Özütlerinin Antimutajenik Etkilerinin Ames-Salmonella Test sistemi ile araştırılması. Tr. J. Botany*, **1994**, 18, 117-122
- 4.İlçim, A.; Dığrak M.; Bağcı E., *Bazı Bitki Ekstrelerinin Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması. Tr. J. of Biology*, **2008**, 22, 119-125
- 5.Başer, K.H.C., *Uçucu Yağların Dünya Ticareti*, Anadolu Üniversitesi Tıbbi Bitkiler Araştırma Merkezi, Tıbbi Aromatik Bitkiler Bülteni, Eskişehir, **2008**, Sayı:9
- 6.Baytop, T., *Türkiye’de bitkilerle tedavi*, **1999**, s:87
- 7.Merck Index, 2003. 13th Edition. Merck & Co., Inc. Whitehouse Station, N. J, **2009**, 516-517
- 8.Türkiye Çevre Vakfı, GAP Yöresindeki Endemik ve Tıbbi Bitkiler, ISBN 975-7250-55-4, **2001**, TÇV yayın:143
- 9.Robson N.K.B., *Hypericum* In: Davis, P.H.(editör), *Flora of Turkey and The East Aegean Islands, II(p.355)*, Edinburg Universty Pres, **1988**, X (P.473)
- 10.Aşçı, A.; Baydar, T., *Evaluation Of Usage Of Herbal Preparatiion And Drug Interactions In Elderly People From Toxicological Aspect*, Turkish Journal of Geriatrics, 10 (4): **2007**, 203-214
- 11.FAO-Anonim-2001.www.fao.org/docrep/X5336e/x5336e0f.2008-htm web

2.KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. SERBEST RADİKALLER

Serbest radikal, atomik ya da moleküler yapılarda çiftlenmemiş bir veya daha fazla tek elektron taşıyan moleküllere verilen isimdir. Çok kolay bir şekilde başka moleküller ile elektron alışverişine giren bu moleküllere “Oksidan Moleküller” veya “Reaktif Oksijen Türleri (ROS)” de denilmektedir ¹.

20.yy’ın ikinci yarısının büyük bir kısmında reaktif oksijen türevlerine, doku hasarı ve hastalığına yol açan bir tür biyokimyasal “Oksitleyici Ajan” gözüyle bakılmıştır. Günümüzde neredeyse tüm hastalıkların bir dereceye kadar oksidatif strese bağlı olduğu kabul edilmektedir. Serbest radikallerin zararlı etkileri, DNA hasarı, lipit peroksidasyonu sürecinin başlatılması, kollajen ve hiyalüronik asit gibi yapısal elementlerin parçalanması şeklindedir ².

Son yıllarda yapılan çalışmalar oksidatif stresten dolayı katarakt, kanser, AIDS, alzheimer, parkinson, kalp-damar rahatsızlıkları, nörolojik rahatsızlıklar, yaşlanma, ateroskleroz, hipertansiyon gibi daha birçok dejeneratif hastalığın meydana gelmesinde önemli roller oynadığını ortaya çıkarmıştır ³.

Normal hücrelerin aerobik solunumu sırasında meydana gelen reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı vücudun savunma sisteminde antioksidanların önemli bir rolü olduğuna inanılır. Günlük beslenmede fazla miktarda antioksidanların alınımı ROS’lara karşı yeterli olup canlı sistemlerde normal fizyolojik fonksiyonların yerine getirilmesi sağlanır. Bir gıdanın besin değeri; total kalori, total lipit ve karbohidratın belirlenmesi ile değerlendirilmektedir. Oysa antioksidanlar sağlık açısından önemli bitkisel bileşikler olmalarına rağmen, bir besinin değerinin belirlenmesinde antioksidan kapasitesi geçmez. Diğer besinlerden farklı olarak antioksidanlar çok

fazla çeşitlilikte kimyasal bileşikler içermektedir. Sebzeleerde en çok bulunan antioksidan bileşikler vitamin C, vitamin E, karotenoitler, flavonoidler ve kükürtlü (tiyol) bileşiklerdir. Antioksidanlar çok çeşitli kimyasal yapıya sahip olduklarından, sebze ve meyvelerden tek tek saflaştırıp tayin edilmesi güç olmaktadır ⁴.

Ancak besin maddelerinden antioksidan aktivite ve bu aktiviteye sahip sekonder metabolitlerin saflaştırılması, karakterizasyonu ve aktivitelerinin belirlenmesi önemlidir ⁵.

2.2. ANTIOKSİDANLAR

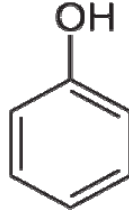
Radikallerin zararlı etkilerine karşı hücrelerde çeşitli savunma sistemleri bulunmaktadır. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve peroksidaz gibi enzimler; askorbik asit, α -tokoferol (vitamin E), sistein, indirgenmiş glutatyon gibi maddelerin radikal temizleme yeteneği olduğu bilinmektedir ⁶⁻⁷.

Gıdalara eklenen antioksidanlar lipidlerin oksidatif bozulmasını önleyerek veya gecikmesini sağlayarak besin kalitesini koruyup lipid oksidasyonu boyunca besin maddelerinin bozulmasını, küflenmesini, renklerinin solmasını önleyici maddelerdir ⁸.

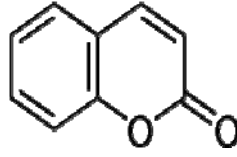
2.2.1. Doğal Antioksidanlar

Yiyeceklerdeki doğal antioksidanlar, polifenolik yapılu ve bitkilerin bütün kısımlarında bulunabilen bileşiklerdir. Genelde bitkisel fenolik antioksidanlara örnek olarak flavonoid bileşikler, fenolik asit türevleri, noftokinonlar, askorbik asit, tokoferoller ve kumarinler verilmektedir ⁹.

Bitkilerde 4000'den fazla fenolik ve polifenolik (*fenolik asit, tanninler, kumarinler, antrakinonlar, flavonoidler*) bileşik tanımlanmıştır ¹⁰.

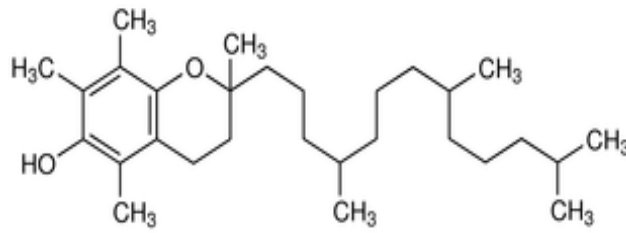


Şekil 2.1 : Fenol



Şekil 2.2: Kumarin

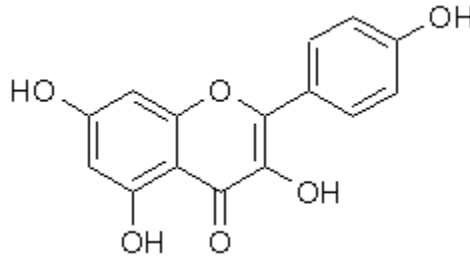
Bitkilerde oldukça yaygın olarak bulunan fenolik asitler, genellikle suda çözünmeyen fenolik bileşiklerdir. Bunların antioksidan aktivitesi moleküldeki hidroksil gruplarının sayısı ile doğru orantılıdır. Bu asitlerin lipid peroksidasyonunu önlediği de saptanmıştır ¹¹⁻¹².



Şekil 2.3: α – tokoferol

Bitkilerde yaygın olarak bulunan fenolik maddelerden biri de flavonoidlerdir. Çoğunlukla meyve, sebze, fındık, tohumlar ve çiçeklerde bulunmaktadır¹³.

Bitkilerde flavonoidler; kateşinler, rutin, oligomerik proantosiyanidinler, silimarin, kuersetin gibi çok değişik yapılar da bulunmaktadır. Etkili antioksidan olan flavonoidler, vücuttaki enzimlerin üretim ve salınımlarını serbest radikalleri temizleyerek düzenlemektedirler. Bunun yanında, bağ dokusunun ana proteini olup bağ dokusunu koruyup, bağ dokusunun bütünlüğünü ve esnekliğini koruyan kollajeni dokuya bağlayıp, stabilize etmektedirler. Flavonoidler sağlık uygulamalarında, yaşlanmayı geciktirici, alerjik reaksiyonlardan korunma, derinin elastikiyetini koruma, kırışık oluşumunu engelleme ve yara iyileşmesini hızlandırma gibi özelliklere sahip oldukları için önemli olmaktadır¹⁴.

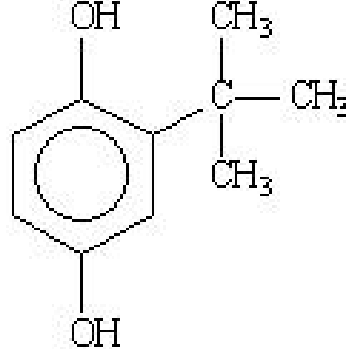


Şekil 2.4: Flavonol

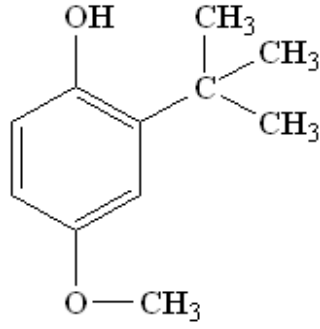
Flavonoidler; antoksaninler ve antosiyanidinler olarak iki kısma ayrılırlar. Antosiyanidinler; antosiyanidin glikozitleri olup meyve ve çiçeklerin kırmızı, mavi ve mor rengini veren suda çözünen pigmentlerdir. Antoksaninler ise renksiz ya da sarımsı-beyaz renktedirler ve flavon, flavonol, flavan, flavanol (Kateşin) ve izoflavonlar olarak ayrılmaktadır¹⁵.

2.2.2.Sentetik Antioksidanlar

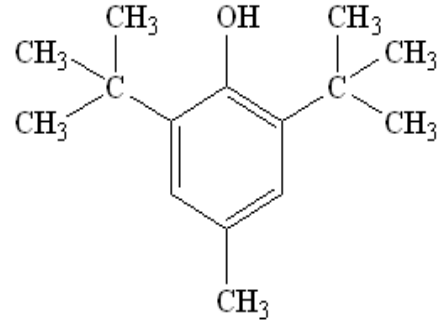
Besinlerin bozulmasını önlemede doğal olanların yanında uzun yıllardan beri sentetik antioksidanlar da kullanılmaktadır. Gıdalara uygun ideal bir antioksidan; renksiz, kokusuz olmalı ayrıca düşük konsantrasyonlarda etkili olabilmelidir. Bunun yanı sıra gıda ürünlerine eklenmesi kolay olmalı, işlemler esnasında bozulmadan kalabilmeli ve ucuz olmalıdır. Gıda ürünlerinde kullanılmasında sakınca görülmeyen ve yaygın olarak kullanılan sentetik antioksidanlardan bazıları BHA (Bütillenmiş hidroksianisol), BHT (Bütillenmiş hidroksitoluen), propil gallat (PG), terbütülhidrokinon (TBHQ) ve dodesil gallattır (DG) ¹⁶.



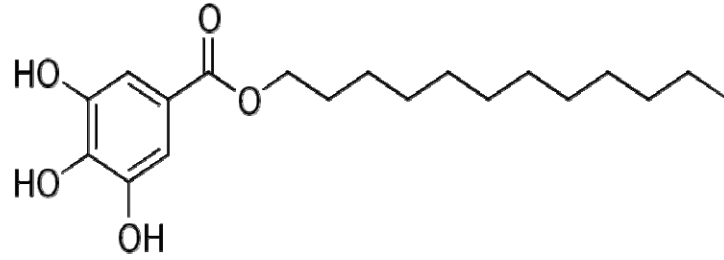
Şekil 2.5: TBHQ (Terbütülhidrokinon)



Şekil 2.6: BHA



Şekil 2.7: BHT



Şekil 2.8: Dodesil Gallat (E312)

Doğal kaynaklı antioksidanların yüksek maliyeti nedeniyle sentetik antioksidanlar 21. yüzyılın başından beri kullanılmaktadır. Ancak bu sentetik antioksidanların kanserojen ve toksik etkileri olabileceğini vurgulayan çalışmalar sonucunda bazı ülkeler bunların kullanımı için ciddi sınırlama veya tümden yasaklama yoluna gitmiştir. Besinleri oksidasyon için kontrol edip tadının bozulmasını engelleyen bu sentetik antioksidanların yiyeceklerde günümüzde oldukça yaygın kullanıldığı bilinmektedir. Ancak buna rağmen en güçlü sentetik antioksidanlardan TBHQ'nın Kanada, Japonya ve Avrupa'da besinlerde kullanımı henüz kabul edilmemiştir. Yine BHA, son yıllarda "Her zaman Güvenli Sayılan Bileşikler" (GRAS) listesinden çıkarılmıştır¹⁷.

2.3. *Hypericum* TÜRLERİNİN KULLANIM ALANLARI

Hypericum perforatum bitkisi hafif ve orta şiddete depresyonlarda alternatif bir antidepresan ilaç olarak önerilmektedir. Bu konudaki birçok otorite bu bitkiyi özellikle menapozun oluşturduğu ruhsal bozuklukları önlemek için uygun bir bitki olarak görmektedir. Antidepresan özelliği hayvan deneylerinde ve çeşitli klinik deneylerde de kanıtlanmıştır. Depresyon için etkili olan *Hypericum* özütü canlıların beynindeki cortico-limbic bölgesinde düzenleyici bir etkiye sahiptir ¹⁸.

H. perforatum'un antienflamatuvar etkisi de vardır. Birçok antienflamatuvar ilaçtan farklı olarak mide üzerinde olumsuz etkilerinin bulunmadığı, hatta ülser tedavisinde de etkili olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca derinin melanin kaybı ile birlikte kısmi renk bozuklukları şeklinde karakterize olan vitiligonun tedavisinde yardımcı olduğu gözlenmiştir ¹⁹.

H. perforatum'un enfeksiyonlara karşı, antimikrobiyal etkisinin olduğu ortaya konulmuştur ²⁰.

H. perforatum'daki hiperisin etken maddesinin HIV virüsleri üzerine antiviral etkisi olduğunu gözlenmiştir ²¹. Yine bu bitkinin özütleri ve içeriğinde yoğun olarak bulunan hiperisin, geniş anti-tümöral etkinlik göstermiştir ²².

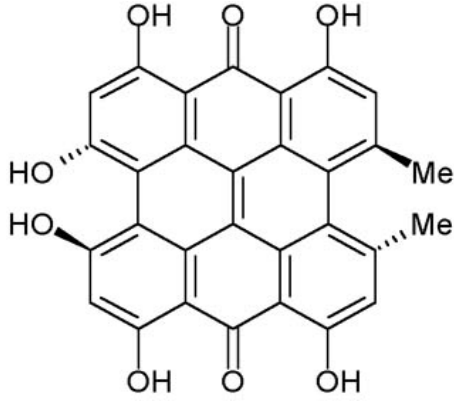
Hypericum brasiliense'den γ -pirone ve monoaminoksidaz inhibitörü olan antifungal etkili ksantonlar elde edilmiştir ²³.

Doku kültürü yöntemiyle çoğaltılıp yetiştirilen *Hypericum capitatum*'un MgOH özütünün düşük oranda HIV-1'e karşı antiretroviral aktivite gösterdiği saptanmıştır ²⁴.

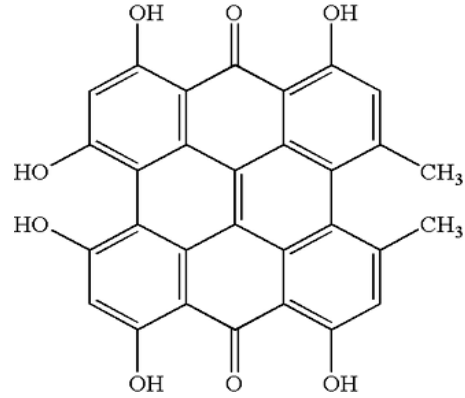
2.4. *Hypericum* ' un KİMYASAL İÇERİĞİ

Hypericum özütlerinin antidepresan ve antiviral aktivitelerinin görülmesinden sonra etken maddelerinden hiperisin ve pseudohiperisinin mümkün olduğu kadar saf halde elde edilmesi için bu farmasötik potansiyelin araştırılması yapılmıştır²⁵.

H. perforatum' un yapısında çok sayıda biyolojik olarak aktif kimyasal gruplar tespit edilmiştir. Bunlardan en önemlileri naftodiantronlar (*hiperisin, pseudohiperisin, protohiperisin*); flavonoidler (*kamferol, kuersetin, luteolin, hiperin, hiperosid*); floroglusinoller (*hiperforin, furohiperforin*) ve esansiyel yağlardır. *H. perforatum*' un gösterdiği klinik etkilerin çoğundan sorumlu tutulan hiperisin ve hiperforin, üzerinde en çok durulan bileşenleridir. Bu yüzden total hiperisin miktarı *H. perforatum* (% 0,3) preparatlarının standardize edilmesinde kullanılır. Etkin maddeler ısı, ışık ve neme karşı dayanıksız olduğundan saklama koşulları özütlerin ve ticari preparatların aktivitesinde önemlidir²⁶⁻²⁷.



Şekil 2.9: Hiperisin



Şekil 2.10: Hiperforin

Hypericum hyssopifolium var. *microcalycinum* ve *Hypericum lysimachioides* var. *lysimachioides*' in esansiyel yağlarının 60-80 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda 9 mikroorganizmaya karşı etkili olduğu görülmüştür²⁸.

H. perforatum ve *Hypericum retusum* Aucher'in gaz kromatografisiyle yapılan analizlerinde *H. perforatum*'da C16:0 (24,87 %), C18:3 n-3 (21,94 %), 3-OH-C18:0 (18,46 %) ve 3-OH-C14:0 (14,22 %), *H. retusum*'da 3-OH-C14:0 (28,29 %), C18:0 (16,47 %) ve C16:0 (14,17 %) bulunmuştur. Bunun yanı sıra fazla miktarda 3-hydroxytetradecanoic acid (3-OH-C14:0) ve 3-hydroxyoctadecanoic acid (3-OH-C18:0) belirlenmiştir ²⁹.

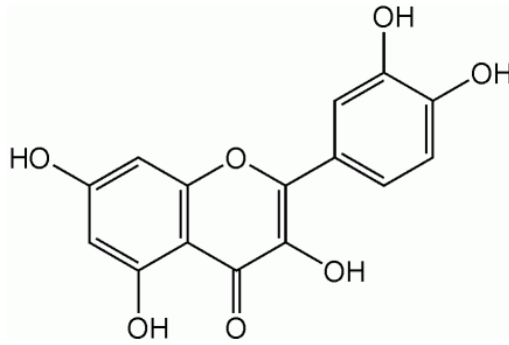
H. lysimachioides var. *lysimachioides*'in çiçeklerinden gaz kromatografisiyle diğer yağ asitlerinin yanında 3-OH yağ asidi [3-hydroxy- tetradecanoic acid (3-OH-C14:0) ve 3-hydroxy-octadecanoic acid (3-OH-C18:0)] de elde edilmiştir ³⁰.

Hypericum triquetrifolium ve *Hypericum scabroides*'in DPPH, metal şelatlama, indirgeme gücü, OH radikali, lipid peroksidasyon testlerinde antioksidan etkisi olduğu bulunmuştur ³¹.

H. triquetrifolium'un yapraklarında sağlık açısından güçlü potansiyele sahip oldukça fazla α -linoleik asit, oleik asit ve palmitik asit bulunmuştur. Bu türdeki iyi kalitede yağın nedeni içeriğindeki yüksek miktardaki doymamış yağdan dolayıdır. α -linoleik asit yağı insanların günlük besinlerinde ve gıda endüstrisinde alternatif olarak görülmektedir ³².

I3,II8-biapigenin, kuersetin-3-*O*-galactoside, kaempferol-3-*O*-glycoside, (-) epikateşin ve hiperisin gibi flavinoidlerin, diğer çalışmalardakilerle tutarlı bir oranda (0,062 ve 1mg/ml arasında) güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca ilk kez *H. triquetrifolium*'un topraküstü kısımlarının metanolik özütlerinin önemli miktarda antioksidan aktiviteye sahip olduğu bunun da içindeki flavinoidler ve özellikle de I3,II8-biapigenin ile ilgili olduğu anlaşılmıştır ³³.

H. triquetrifolium'un topraküstü kısımlarının etilasetatlı ekstresinden 1 biflavinoid, 1 flavonol-glikozid, 1 flavonol ve 1 fenolik asit yani; 3-8^{##}-biapigenin, kuersetin, rutin ve klorojenik asit elde edilmiştir³³.



Şekil 2.11 : Kuersetin

Türkiye'deki yetişen bazı *Hypericum* türlerinin (*Hypericum aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* (endemik), *H. perforatum* ve *Hypericum pruinatum*) total hiperisin içeriği diurnal varyasyon, morfojenetik ve ortogenetik olarak belirlenmiştir. Bunun yanında genelde *H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* tüm yapraklarındaki hiperisin içeriği miktarının diğer iki türden çok daha fazla olduğu görülmüştür³⁴.

2.5. ANTİOKSİDANLARIN ÇALIŞMA MEKANİZMASI

Antioksidan maddeler altı mekanizma ile çalışmaktadırlar. Bunlar :

- 1.) Oluşan serbest radikalleri toplayıcı ve giderici etkileri ile bağlayarak ya da kararlı hale getirerek,³⁵
- 2.) Zincir kırıcı etki ile serbest radikal üreten kimyasal reaksiyonları durdurarak,³⁶
- 3.) Baskılayıcı etki ile reaksiyon hızını azaltarak,³⁷
- 4.) Onarıcı etki ile lipid, protein ve DNA gibi yapılarda oluşmakta olan biyolojik moleküler hasarı rejenere ederek,³⁸
- 5.) Hücrel kinaz enzimi kayıplarını önleyip oksidasyon reaksiyonlarını durdurarak,³⁸
- 6.) Organizmadaki SOD gibi antioksidan enzimler ile enzimatik olmayan antioksidanların sentezini arttırarak etkilerini gösterirler .³⁸

2.6. ÇİZELGE VE ŞEKİLLER

Şekil 2.1: Fenol

Şekil 2.2: Kumarin

Şekil 2.3: α – tokoferol

Şekil 2.4: Flavonol

Şekil 2.5: TBHQ (Terbütilhidrokinon)

Şekil 2.6: BHA (Bütillenmiş hidroksianisol)

Şekil 2.7: BHT (Bütillenmiş hidroksitoluen)

Şekil 2.8: Dodesil Galat (E312)

Şekil 2.9: Hiperisin

Şekil 2.10: Hiperforin

Şekil 2.11: Kuersetin

2.7.KAYNAKLAR

- 1.Çavdar, C.; Sifil, A.; Çamsarı, T., *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, 3-4 , **1997**, s:92
2. Saraçoğlu İ., *Tıbbi Bitkiler Rehberi* , **2008**, s:50
- 3.Çakatay, U.; Kayalı R., *Serbest Radikal Biyokimyasının Tarihsel Süreçteki gelişimi*, Cerrahpaşa Tıp Dergisi, 37: **2006**, p:162 – 167
- 4.Deemer, E.K.; Huang A.; Hampsch, D.; Flanagan, M., *Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study*, J. Agric. Food Chem. 50, **2002**, pg:3122-3128
- 5.Halliwell, B., *Antioxidants in human health and disease*, Ann. Rev. Nutr. 16, **1996**, pg: 33-50
- 6.McCord, J.M.; Fridovich, I, *The biology and pathology of oxygen radicals*. Ann intern Med 89: **1978**, pg:122-127
- 7.Simpson, P.J.; Mickelson, J.K.; Lucchesi, B.R.: *Free radical scavengers in myocardial ischemia*. Fed Proc 46: **1987**, pg:2413- 2421
- 8.Sanchez, M. C. *Free Radical Scavenging Capacity of Selected Red, Rose and White Wines*, J. Sci. FoodAgric., 79, **1999**, 1301-1304
- 9.Triantaphyllou, K., *Antioxidative Propertiesof Water Extracts Obtained from Herbs of the Species Lamiaceae*, Intern. J. Food Sci. Nutr. **2001**, 52, 313-317
- 10.Middleton, E., *The impact of plantflavonoids on mammalian biology:implacations for immunity,inflammation and cancer*, InJ.B.HarbonThe flavonoids:advances in research since, **1994**, p.619-620

11. Balasundram, N.; Sundram, K.; Saman, S., *Phenolic Compounds in Plant and Agri-Industrial By-Products: Antioxidant Activity, Occurrence, and Potential Uses*, Food Chem., 99, **2006**, 191-203

12. Halliwell, B., *Food-Derived Antioxidants: How to Evaluate Their Importance in Food and In Vivo*, Handbook of Antioxidants, **2002**, 45-46

13. Frankel, E., N., *Natural Phenolic Antioxidants and Their Impact on Health, Antioxidant Food Supplements in Human Health*, Ed. by Packer, L., *Hypericum perforatum*, **1999**, Academic Press, USA

14. Ren, W.; Qiao, Z.; Wang, H.; *Flavonoids: Promising Anticancer Agents*, Medicinal Research Reviews, Vol. 23, No. 4, 519-534, **2003**, Wiley Periodicals, Inc.

15. Fuhrman, B., *Polyphenols and Flavonoids Protect LDL Against Atherogenic Modification*, Handbook of Antioxidants, 2nd Ed., E. and Packer, L., University of Southern California School of Pharmacy, **2002**, USA

16. Antolovich, M.; Prenzler, P. D.; Patsalides, E.; McDonald, S., *Methods for testing antioxidant activity*, Analyst, **2002**, 127, 183 - 198

17. Shahidi, F., *Natural Antioxidant: Chemistry, Health Effects and Applications*, Champaign, III (AOCS Press, **1997**, p,V

18. Müller, W.E., *St. John's Wort and Its Active Principles in Depression and Anxiety*, **2005**, p.53

19. Ernst, E., *Hypericum: The Genus Hypericum*, Taylor & Francis, **2003**, London, p:213-220

20. Meral, G., *In Vitro Antibacterial Activities of three Hypericum species from west Anatolia*. Turkish Electronic Journal of Biotechnology, **2002**, 6-10

21.Gulick, R.M.; Modde, M.P.H.; McAuliffe, MD; Wiltse, J.; C. Crumpacker, *AIDS Research and Human Retroviruses*. November **1992**, 8(11): p:1929-1936

22.Hışıl, Y., *Kantaronun (Hypericum perforatum L.) Bileşimi ve Tıbbi Önemi*, International Journal of Hematology and Oncology, N:4 Cilt, **2005**, Vol:15-6

23.Rocha L.; Marston, A; Phytochemistry, K- *An antifungalgamma-pyrone and xanthenes with MAO inhibitory activity from Hypericum brasiliense*, Phytochemistry, 36(6) **1994**, 1381-1385

24.Sökmen A.; Jones B.M.; Ertürk, M., *Antimicrobial activity of extracts from the celi cultures of some turkish medicinal plants*, Phytotherapy Research, **1999**, 13 (4) : 355-7

25.Hudson JB.; Lopez-Bazzocchi I.; Towers GH., *Antiviral activities of hiperisin*. Antiviral Res-15(2): **1991**, 101-12

26.Aşçı A.; Baydar T.; şahin G., *Yaşlılarda Herbal Preparat Kullanımının ve İlaç Etkileşmelerinin Toksikolojik Açıdan Değerlendirilmesi*, Turkish Journal Of Geriatrics, 10 (4), **2007**, 203-214

27.Choudhuri, S.; Valerio, L.G., *Usefulness of studies on the molecularmechnism of action of herbal/botanicals: The case of St.John's wort*. J Biochem Mol Toxicol; 19: **2005**, pag: 1-11

28.Toker, Z.; Kızıl, G.; Özen, H. Ç.; Kızıl M., *Compositions and antimicrobial activities of the essential oils of two Hypericum species from Turkey* - S. Fitoterapia-Vol: 77, Issue 1, January, **2004**, P:57-60

29.Özen, H. Ç.; Başhan, M.; Keskin, C.; Toker, Z., *Fatty acid and 3-hydroxy fatty acid composition of two Hypericum species from Turkey*, European Journal of Lipid Science and Technology, Vol: 106 Issue 1, **2006**, P,68-70

30.Özen, H. Ç.; Başhan, M.; Keskin, C.; Toker, Z., *3-Hydroxy Fatty Acids from the Flowers of Hypericum lysimachioides var. lysimachioides*, Turk J Chem-28, **2004**, p:223-226

31.Kızıllı, G.; Kızıllı, M.; Yavuz, M.; Emen, S.; Hakimoğlu, F., *Antioxidant Activities of Ethanol Extracts of Hypericum triquetrifolium. and Hypericum scabroides*. Pharmaceutical Biology, Vol. 46, No. 4, **2008**, P-231-242

32.Hosni ,K.; Msaada, K.; Marzauk, B., *Comparative study on H.triquetrefolium Turra fatty asids.*, Asian Journal of Plant Sciences 6(2): **2007**, 384-388

33.Conforti, M.; Statti, G.; Loizzo, M.R.; Bonesi, M., *Natural antioxidants: current status and future prospects Organized by the Italian society of herbal science*, Fitoterapia-Vol:73, Issue 6, **2002**, P: 479-483

34.Çırak, C.; Sağlam, B.; Ayan, A.K., *Morphogenetic and diurnal variation of hiperisin in some Hypericum species from Turkey during the course of ontogenesis*, Biochemical Systematics and Ecology Vol: 34, Issue 1, January, **2006**, P:1-13

35.Zintzen, H., *Fat-souble vitamins in nutrition of ruminant*, **1997**, Basel.La Roche

36.Van-MeulenJ.H.,*Concantraction-induced injury to the extensor digitorum longus muscles of rats the role of vitamin E*.J.Appl.Physiol, **1997**, 83:817-23

37.Packer, L., *Protective role of vit E in biological systems*, Amr. J .Clin. Nutr: 53, **1991**, p: 1050-5

38.Evelson P., *Oxidative stres and in vivo cheluminescence in Mouse skin exposed to UVA radiation*, J Photochem Photobiol, **1997**, B; 38; 215

3.MATERYAL ve METOD

3.1.MATERYAL

3.1.1. *Hypericum retusum* Aucher

Bu çalışmanın materyalini oluşturan *H. retusum* bitki örnekleri, Diyarbakır ili Çermik ilçesi (700 m) civarından 2008 Mayıs-Haziran aylarında toplanmıştır. Bitkiler Dicle Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Selçuk Ertekin tarafından teşhis edilmiştir. Hazırlanan bitki örnekleri D.Ü.Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü herbaryumunda (DUF) saklanmaktadır.



Resim 3.1: *H. retusum* (Fotoğraf : Prof. Dr. Selçuk Ertekin)

3.1.2. Kimyasal Madde ve Çözücüler

BHT, BHA, Deoksiriboz, DMSO (Dimetilsülfoksit), Gallik asit, Linoleik asit, DPPH, Ferrozin, potasyumferrisiyanür [$K_3Fe(CN)_6$], EDTA, Folin&Ciocalteu reaktifi, Potasyum asetat, TBA (tiyobarbitürik asit), Metanol, Hegzan, Petrol eter, Etilasetat, TCA(trikloroasetik asit), Demir-2-klorür, Sodyum hidroksit, $NaCO_3$ maddeleri Merck, Fluka, Sigma-Aldrich GmbH'den alınmıştır.

3.1.3.Yararlanılan Aletler

Cam tüpler, cam beher, cam balon (10mL, 50mL, 100mL, 250mL), pipet pompası, puar, taksimatlı cam pipet (2-10 mL), plastik tüpler (15mL, 50mL) Steril pipet ucu (5-100 μ L, 200-1000 μ L), Spektrofotometre küveti 1 mL, Otomatik Pipetör (100 μ L, 1000 μ L,5000 μ L, Steril otomatik mikropipet ucu (100 μ L, 1000 μ L), balon joje (10-25 mL)

3.1.4. Kullanılan Cihazlar

Su banyosu (Mettler), Etüv (Heraeus), Hassas Terazî (GEC/AVERY), Ph metre (GEC/AVERY), Spektrometre (UV/VIS Spectrometer PGInstruments), Evaporator (BÜCHI), vortex (Stuart), mikropipet (Gilson), santrifüj (Centruin 8000) derin dondurucu (Uğur), elektrikli öğütücü, buzdolabı (Arçelik)

3.2.METOD

3.2.1. Bitki Özütlelerinin Hazırlanışı

Toplanan *H. retusum* bitki örnekleri ışık görmeyecek, nem çekmeyecek şekilde oda sıcaklığında kurutuldu. Bir blender yardımıyla iyice öğütülüp toz haline getirildi. Öğütülen 196 gr kuru bitki materyali sırasıyla petrol eter, hegzan, etilasetat ve metanol çözücülerıyla (200 mL) üçer gün aralıklarla çözücü değiştirilerek özütlendi. *H. retusum*'un petrol eterde bekletilmesi sonucunda 2.385 gr sarımsı renkte petrol eter, hegzanda bekletilmesi sonucunda 1.336 gr yeşilimsi-sarı renkli hegzan, etilasetat da bekletilmesi sonucunda 2.119 gr koyu yeşil renkli etilasetat, metanolde bekletilmesi sonucunda 18.482 gr koyu kahve renkli metanol özütü elde edildi. Özütleler testte kullanılıncaya kadar derin dondurucuda -20 °C' de muhafaza edildi.

3.2.2. Toplam Fenolik Bileşik Miktarı Tayini

H. retusum bitkisinin topraküstü kısımlarının özütlerinde bulunan toplam fenolik bileşik miktarı FCR (Folin & Ciocalteu Reaktif) ile belirlendi. Standart fenolik bileşik olarak gallik asit kullanıldı. Bunun için önce bir standart grafik çizildi. Bu amaçla gallik asidin 0.05 gramı alınıp 10 mL etilalkole stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltiden 50- 500 µL gallik asit içeren çözelti tüplere aktarıldı ve hacim 1000 mL' ye etilalkolle tamamlandı. Öbür yandan 4 tüpte bitkiler için hazırlanıp 1 mg/mL'lik farklı çözücülü özütlerden 40 µL eklendi. Tüm tüplere sırasıyla 1160 µL saf su ve 200 µL FCR eklenip tüpler karıştırıldı ve 5 dakika sonra da % 20'lik Na₂CO₃ çözeltisinden 600 µL ilave edildi. Karışım 2 saat boyunca oda sıcaklığında 25°C sıcaklıkta çalkalayıcıda karıştırıldıktan sonra numunelerin absorbansı 765 nm'de distile sudan oluşan köre karşı kaydedildi. Kontrol için numune yerine distile

su kullanıldı. Bu işlemler üçer defa tekrarlandı. *H. retusum* bitkisinin özütünde bulunan toplam fenolik bileşik miktarı ile ilgili verilerde grafikte gösterildi.

($R^2:0.9826$)

$$\text{Absorbans}_{(A)} = 0.0027 \times \text{gallik asit}(\mu\text{g})$$

3.2.3. Toplam Flavonoid Miktarı Tayini

Toplam flavonoid miktarı tayini flavonoid-alüminyum kompleks oluşumuna dayanarak ¹, *Moreno, Isla, Sampietro ve Vattvone (2000)* ² tarafından geliştirilen metodla tespit edildi. Standart flavonoid bileşik olarak kuersetin kullanıldı. Bu metodtaki amaç; kuersetinin artan konsantrasyonlarına karşı absorbans değerlerini grafiğe geçirip R^2 'yi bulup bitkide bulunan toplam flavonoid bileşen miktarını hesaplamaktır.

Bunun için önce standart grafik çizildi. Bu amaçla kuersetinin metanol içindeki 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik stok çözeltisinden 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik çözeltiler hazırlandı. Fraksiyonlandırılmış *H. retusum* bitkisinin petrol eter, hegzan, etilasetat ve metanol ekstraktlarının 2mg/ mL'lik çözeltileri etanolde hazırlandı. Deney ortamına sırasıyla; 0.1 mL %10 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, 0.1 M CH_3COOK ve 3.8 mL etanol bırakıldı. Ardından 1mL kuersetin veya bitki çözeltisi eklendikten sonra karışım iyice karıştırıldıktan sonra 25 $^{\circ}\text{C}$ su banyosunda 40 dakika inkübasyona bırakıldı. Artan kuersetin konsantrasyonuna bağlı olarak artan sarı renk şiddeti gözlemlendi. UV-VIS spektrofotometresinde 415 nm dalga boyunda absorbansları köre karşı kaydedildi. Kör olarak saf su ve etanol kullanıldı.

Standart olarak kullanılan kuersetinin 15- 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyon aralığına denk gelen absorbans değerleri grafiğe geçirildi ve aşağıda verilen denklem hesaplandı. ($R^2: 0.9992$)

$$\text{Absorbans}_{(A)} = 0.0151x [\text{QE}]$$

Bu denklem kullanılarak numunelerdeki toplam flavonoid bileşen miktarı kuersetin eşdeğeri olarak hesaplandı.

3.2.4. İndirgeme Gücü Tayini

H. retusum bitkisinin topraküstü kısımlarının indirgeme gücü tayini *Oyaizu metoduna*(1986) göre yapıldı ³. Bu amaçla petrol eter, hegzan, etilaesetat, metanol özütlerinin ve pozitif kontrollerin 1 mg/mL'lik stok çözeltileri hazırlandı. Bunlardan seri çözeltiler 25-350 µg/ml olacak şekilde alındı ve deney tüplerine aktarıldı. Daha sonra her bir tüpe sırayla 1 mL bitki veya pozitif kontrol çözeltileri, 2.5 mL 0,2 M fosfat tamponu (pH: 6.6) ve 2.5 mL % 1'lik potasyum ferrisiyanür $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ilave edildikten sonra karıştırılıp bu karışım 50 °C'de 20 dakika inkübe edildi. Bu işlemlerden sonra reaksiyon karışımına 2.5 mL % 10'luk trikloroasetik asit (TCA) ilave edildi. 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Ardından çözeltinin üst tabakasından 2,5 mL alındı ve bunun üzerine de 2.5 mL distile su ve % 0.1'lik 0.5 mL FeCl_3 çözeltisi ilave edildikten sonra tüpler karıştırılıp 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Artan konsantrasyonla beraber sarıdan yeşile dönüşen renk şiddetinde artma görüldü. Absorbans 700 nm'de köre karşı okundu. Negatif kontrol için ise numune bitki yerine etanol kullanıldı. Artan konsantrasyona karşı absorbans değerleri grafiğe çevrildi ³. Bu testte absorbansın yüksek olması indirgeme gücü artışını gösterir.

3.2.5. DPPH Giderme Aktivitesi Tayini

Antioksidan aktiviteyi belirlemek için *Blois metodu* kullanılmıştır ⁴. Bu testte düşük absorbans yüksek aktivite anlamına gelmektedir. Fraksiyonlandırılmış *H. retusum* bitkisinin topraküstü kısımlarının serbest radikal giderme aktiviteleri için

serbest radikal olarak DPPH'nin 1 mM'lık çözeltisi kullanıldı. Deney tüplerine sırasıyla 25-350 µg/mL konsantrasyonlarında çözelti oluşturacak şekilde stok çözeltiler aktarıldı ve toplam hacimleri 3 mL olacak şekilde etanol ile tamamlandı. Daha sonra her bir numune tüpüne stok DPPH çözeltisinden 1 mL ilave edilip tüpler karıştırıldı. 30 dakika oda sıcaklığında 25°C sıcaklıkta çalkalama banyosunda inkübe edildikten sonra etanolden oluşan köre karşı 517 nm'de absorbansları kaydedildi. Kontrol olarak, 3 mL etanol ve 1 mL DPPH çözeltisi kullanıldı. Azalan absorbans geriye kalan DPPH çözeltisi miktarını yani serbest radikal giderme aktivitesini verdi.

2. aşamada BHA ve BHT'lerin hazırlanan 5- 350 µg/ mL'lik tüplerine 3000 µL BHA ve BHT'ler eklendi. Daha sonra bunların üzerine 1000 µL DPPH eklendi. Tüpler karıştırıldıktan sonra 27 °C sıcaklıkta çalkalama banyosunda inkübe edilip etanolden oluşan köre karşı 517 nm'de absorbansları kaydedildi. Deney ortamında mordan sarıya dönüşen renk şiddeti izlendi.

Sonuç olarak; artan özüt derişimine karşı % inhibisyon değerleri grafiğe geçirildi. % inhibisyon değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\% I = [(A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}}) / A_{\text{Kontrol}}] \times 100$$

3.2.6. Metal Şelatlama Aktivitesi Tayini

Fraksiyonlandırılmış *H. retusum* bitkisinin özütlerinin, metal şelatlama aktivitesi *Dinis, Madeira, Almedia (1994)* metodu ile ölçüldü³. Güçlü şelatlama aktivitesine sahip olan EDTA pozitif kontrol olarak kullanıldı. Bitkinin petroleter, hegzan, etilasetat ile metanol özütlerinin ve EDTA'nın 1 mg/mL'lik stok çözeltileri

hazırlandı. Bunların seri çözeltileri için 25-350 µg/mL'lik tüpler hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler 0.45 µL çapa sahip filtreden geçirildi. Deney ortamına sırasıyla 50 µL 1.25 mM FeCl₂ ve 200 µL 5mM ferrozine eklendi. Karışım iyice çalkalandıktan sonra oda sıcaklığında karanlıkta 10 dakika bekletildi. Artan konsantrasyona bağlı olarak azalan mor renk şiddeti izlendi. UV-VIS spektrometre cihazında 562 nm dalga boyunda absorban ölçüldü.

Aşağıdaki denklem kullanılarak elde edilen sonuçlardan Fe⁺²-ferrozine kompleksinin inhibisyon yüzdesi verileri elde edildi. Bu veriler kullanılarak artan madde derişimlerine karşı % inhibisyon grafiği çizildi ⁵.

EDTA pozitif kontroldür. Veriler üç deney (n=3) sonucu ortalamasıdır ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanmıştır.

$$\text{Metal Şelatlama Aktivitesi (\%)} = [(A_0 - A_1 / A_0) \times 100]$$

A₁ = Bitki çözeltilisinin absorbanı

A₀ = Negatif kontrol numunesinin absorbanı

3.2.7. OH Radikalini Söndürme Aktivitesi

Farklı çözücülerdeki bitki özütlerinin deoksiriboz metodu ile OH radikalini söndürme aktivitesi incelendi. Bu yöntemde OH radikali deoksiriboza saldırıp bir dizi reaksiyon sonucu malonaldehit (MDA) oluşumuna neden olur. Oluşan MDA, TBA ile reaksiyona girip pembe renk oluşumunu sağlar ⁶.

Bitki özütlerinin 1mg/mL'lik stok çözeltileri hazırlandı. Stok çözeltilerden 10-100 µg/mL konsantrasyonlarda seyreltmeler yapıldı. Reaksiyon karışımı sırasıyla 100 µL 1mM EDTA, 10 µL 10 mM FeCl₃, 100 µg/mL 50 mM H₂O₂, 360 µL 10 mM deoksiriboz, 1 mM özüt (10-100 µg/mL), 330 µL 50 mM Ph 7.4 fosfat tamponu ve 100 µL 1mM askorbik asit içermektedir. Karışım 37°C'de 1saat inkübasyona bırakıldı. İnkübe edilen karışımdan 1 mL %10'luk TCA ve 1 mL % 0.5'luk TBA ilave edildi. Ardından 100°C'de 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Karışım buzda soğutulduktan sonra 532 nm'de UV spektroskopide absorbansı ölçüldü. Pozitif kontrol olarak radikal söndürücü özelliği bilinen DMSO, negatif kontrol olarak ise sadece özüt içermeyen örnek kullanıldı.

Artan konsantrasyona karşı % inhibisyon değerleri grafiğe geçirildi. % inhibisyon değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı ⁷.

$$\% I = [(A_0 - A_1 / A_0) \times 100]$$

A₁ = Bitki çözeltilisinin absorbansı

A₀ = Negatif kontrol numunesinin absorbansı

3.2.8. İstatiksel Analiz

İstatiksel analizler SPSS-16.0 paket programı ile bilgisayarda yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar için parametrik varsayımların gerçekleştiği verilerde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandıktan sonra gruplar arası farklılıklar Tukey testi ile belirlendi. Sonuçlar ortalama ± standart sapma (SD) olarak belirlendi.

3.3. KAYNAKLAR

1.Topçu, G.; Ay, M.; Bilici, A.; Sarıkürkçü, C.; Öztürk, M.; Ulubelen, A., *A new flavone from antioxidant extracts of Pistacia terebinthus*, Food Chemistry, 103, **2007**, 816-822

2.Moreno, M.; Isla, M.; Sampietro, A.; Vattuone, M., *Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina*, Journal of ethnopharmacology, Journal of Ethnopharmacology ,Vol: 71, Issues 1-2, July **2000**, P: 109-114

3.Der Duh, P.; Yen, G., *Antioxidative activity of three herbal water extracts-* Food Chemistry ,Vol;60, Issue 4, **1997**, P: 639-645

4.Blois, M.S., *Antioxidant determinations by the use of a stable free radical.* Nature 181, **1958**, 198–1200

5.Singh, R.; Singh, S.; Kumar, S.; Arora, S., *Free radical-scavenging activity of acetone extract/fractions of A. auriculiformis A. Cunn.*, Food chemistry-,103, **2007**, p:1403-1410

6.Yen, G.C.; Hsieh, C.L., *Antioxidant activity of grape seed extracts on peroxidation models in vitro*, Food Chemistry,Vol. 73, Issue 3, May **2001**, P, 285-290

7.Kumar, R.; Sivakumar, R.; Sunderam, R.S.; Gupta M.; Mazumdar U.K.; Gomath P.; Rajeshwar Y.; Saravanan S., *Antioxidant and antimicrobial activities of B. racemosa L. stem bark.* Brazilian Journal of Medical Research, **2005**, 38, 1051-1024

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. BULGULAR

4.1.1. Toplam Fenolik Bileşik Miktarı Tayini Bulguları

Bitkinin petrol eter, hegzan, etilasetat ve metanol özütlerinin içerdiği toplam fenolik bileşen miktarı, gallik aside eşdeğer olarak hesaplandı. Standart olarak kullanılan gallik asidin 50-500 µg/mL konsantrasyon aralığına karşılık gelen absorbans değerleri grafiğe geçirilip aşağıdaki eşitlik elde edildi. (Şekil 4.3.1.)

$$\text{Absorbans (A)} = 0.0027 \times \text{Gallik asit } (\mu\text{g})$$

Bu eşitlik kullanılarak bitki özütlerinin 1 mg'larının içerdiği toplam fenolik bileşen miktarı gallik aside eşdeğer olarak hesaplandı.

H. retusum'un petroleter özütünün 1 mg'nın içerdiği toplam fenolik bileşen miktarı 57.53 ± 3.23 µg gallik aside, hegzan özütünün 1 mg'nın içerdiği toplam fenolik bileşen miktarı 62.35 ± 1.83 µg gallik aside, etilasetat özütünün 1mg'nın içerdiği toplam fenolik bileşen miktarı 91.851 ± 3.87 µg gallik aside ve metanol özütünün 1mg'nın içerdiği toplam fenolik bileşen miktarı 198.52 ± 4.64 gallik aside eşdeğer olduğu bulundu. En fazla toplam fenolik bileşen miktarı metanol özütünden elde edildi. (Çizelge 4.3.1)

4.1.2. Toplam Flavonoid Miktarı Tayini Bulguları

Bitki özütlerinin total flavonoid miktarı tayininde amaç; kuersetinin artan konsantrasyonlarına karşı absorbans değerlerini grafiğe geçirip R^2 'yi bulmaktır. Böylece bitkide bulunan toplam flavonoid bileşen miktarı kuersetine eşdeğer hesaplanır. Bu deneyde standart flavonoid bileşen olarak kuersetin kullanıldı.

(Şekil 4.3.2)

Bunun için önce standart olarak kullanılan kuersetinin 15-75 µg/ mL konsantrasyon aralığına denk gelen absorbans değerleri grafiğe geçirildi. Aşağıda verilen standart grafik denkleminde mikrogram kuersetin ekivalent (QE) ve mikrogram olarak hesaplandı. (R^2 : 0.9992)

$$\text{Absorbans (A)} = 0.0151 \times [\text{Kuersetin } \mu\text{g}]$$

Bu denklem kullanılarak *H. retusum* bitkisinin numunelerindeki toplam flavonoid bileşen miktarı petrol eter özütü için; 4.06 ± 0.75 QUE/ 2mg özüt, hegzan özütü için; 4.79 ± 0.90 QUE/ 2mg özüt, etilasetat özütü için; 110.91 ± 1.87 QUE/ 2mg özüt ve metanol özütü için; 168.83 ± 1.60 QUE/ 2mg özüt ile en fazla toplam flavonoid bileşen miktarı metanol özütünde gözlemlendi. (Çizelge 4.3.2.)

4.1.3. İndirgeme Gücü Tayini Bulguları

Bitki ekstraktlarının Fe^{+3} ve Fe^{+2} ye indirgeme gücüne bakıldı. İndirgeme gücü konsantrasyona karşı absorbans olarak verildi. Yüksek absorbans yüksek indirgeme gücünü göstermektedir. (Şekil 4.3.3)

Bitki özütlerinin indirgeme gücüne bakılırken 250-350 µg/mL konsantrasyon aralığında çalışıldı. Bu konsantrasyon aralığında çalışılan pozitif kontroller BHA 0.29 ± 0.08 – 0.77 ± 0.17 arasında ve BHT 0.22 ± 0.06 – 0.71 ± 0.12 arasında indirgeme gücü gösterdi. *H. retusum*'un petroleter özütü 0.03 ± 0.01 – 0.06 ± 0.01 arasında, hegzan özütü 0.04 ± 0.01 – 0.10 ± 0.01 arasında, etilasetat özütü 0.04 ± 0.01 – 0.13 ± 0.02 arasında ve metanol özütü 0.05 ± 0.01 – 0.36 ± 0.03 arasında indirgeme gücü gösterdi. (Çizelge 4.3.3.)

Bu sonuçlara göre en yüksek indirgeme gücü metanol özütünden elde edildi.

4.1.4. DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi Bulguları

H. retusum bitkisinin topraküstü kısımlarından elde edilen özütlerinin DPPH radikal giderme aktivitelerinin yüzde (%) olarak hesaplamaları ise aşağıdaki denkleme göre yapıldı.

$$\text{DPPH Söndürme Aktivitesi (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100]$$

A_1 = Bitki çözeltilisinin absorbanası

A_0 = Negatif kontrol numunesinin absorbanası

DPPH radikalini söndürme aktivitesi incelenirken 25-350 µg/mL konsantrasyon aralığında çalışıldı. Bu konsantrasyon aralığında çalışılan pozitif kontroller BHT 71.96±2.97–94.50±0.86 arasında ve BHA 75.68±5.81–97.56±1.60 arasında % inhibisyon gösterdi. (Şekil 4.3.4.)

H. retusum'un petroleter özütünün DPPH radikalini söndürme aktivitesi % 41.04±2.29–82.35±7.56 arasında, hegzan özütünün 22.46±1.70–79.44±3.12 arasında, etilasetat özütünün 25.57±5.88–79.77±6.98 arasında, metanol özütünün 78.48±2.52–91.83±2.10 arasında % inhibisyon gösterdi. (Çizelge 4.3.4.)

4.1.5. Metal İyonları Şelatlama Aktivitesi Bulguları

Bitki özütlerinin metal iyonları şelatlama aktivitesi konsantrasyona karşı % inhibisyon olarak hesaplandı. (Şekil 4.3.5.) Metal şelatlama aktivitesinde azalan absorbanas ferrozün bağlanmadan önce metal iyonlarının şelatlandığını gösterir. Şelatlanan metal iyonu miktarı aşağıda verilen denklemden yüzde olarak hesaplandı.

$$\text{Ferröz iyonları (Fe}^{2+}\text{) şelatlama aktivitesi (\%)} = [(A_0 - A_1/A_0) \times 100]$$

Formülde verilen A_0 = Kontrol değeri ortamda sadece kompleks oluşturan maddeler olan ferrozin ve Fe^{+2} iyonlarının varlığındaki kontrol numunesinin absorbans değeridir.

Metal şelatlama aktivitesi incelenirken 25-250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında çalışıldı. Bu konsantrasyon aralığında pozitif kontrol olan EDTA'nın metal şelatlama aktivitesi % 97.713 \pm 0.79–99.85 \pm 0.08 arasında, petroleter özütünün % 18.18 \pm 0.54–92.74 \pm 0.15 arasında, hegzan özütünün % 10.46 \pm 1.87–95.04 \pm 1.25 arasında, etilasetat özütünün % 23.56 \pm 2.17–84.44 \pm 2.60 arasında, metanol özütünün % 26.70 \pm 1.05–48.84 \pm 2.85 arasında olduğu görüldü. (Çizelge: 4.3.5)

4.1.6.OH Radikalini Söndürme Aktivitesi Bulguları

Bitki özütlerinin OH radikalini söndürme aktivitesi konsantrasyona karşı % inhibisyon olarak hesaplandı. (Şekil 4.3.6.)

Bitkinin özütlerinin OH radikalini söndürme aktivitesi için 5-100 $\mu\text{g/ mL}$ konsantrasyon aralığında çalışıldı. Pozitif kontrol olan DMSO % 90.07 \pm 0.97–97.20 \pm 0.86 arası, *H. retusum*'un petroleter özütünün % 61.12 \pm 1.81–96.22 \pm 1.60 arası, *H. retusum*'un hegzan özütünün % 66.85 \pm 0.29–94.13 \pm 0.56 arasında, *H. retusum*'un etilasetat özütünün % 69.23 \pm 0.70–91.14 \pm 0.12 arasında, *H. retusum*'un metanol özütünün % 83.36 \pm 0.88–89.37 \pm 0.98 arasında bulundu. (Çizelge:4.3.6)

4.2.TARTIŞMA

Bitkiler, yüksek oranda içerdikleri çok çeşitli kimyasal maddeler nedeniyle günümüzde hala ilaç, parfümeri, gıda ve kozmetik endüstrileri için güçlü bir kaynaktır. Canlı organizmalarda çeşitli oksidatif süreçlerin şeker hastalığı, kalp ve damar hastalıkları, immün sistem hastalıkları, multipl skleroz, artrit, katarkt, yaşlanma, kanser, nörolojik hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların meydana gelmesinde etkili olduğu anlaşılmıştır. Bununla beraber antioksidan maddelere özellikle de doğal olanlara karşı ilgi artmıştır ¹.

Bitkisel fenolik maddeler antioksidan veya serbest radikal süpürücü gibi davranan önemli bileşenlerdendir. En önemli fenolik bileşenler ise flavonoidlerdir. Flavonoidler ciddi kimyasal ve biyolojik aktivitelere sahiptirler. Bu yüzden fenolik bileşenler ile antioksidan kapasite arasındaki ilişkiyi iyi incelemek gereklidir ².

Yukarıda belirttiğimiz nedenlerden ötürü, antioksidan etkili bitkiler son yıllarda yoğun biçimde araştırılmaktadır. Araştırılan çok sayıda bitki arasında özellikle *H. perforatum* oldukça dikkat çekicidir ³.

Ülkemizde yetişmekte olan diğer *Hypericum* türlerinin hem antioksidan hem de diğer biyolojik etkileri açısından çok az sayıda araştırma yapılmıştır. Çalışma konumuz olan *Hypericum retusum* bitkisinin antioksidan özelliklerine ise daha önce hiç bakılmamıştır.

Ivanova ve ark. 2005'te *H. perforatum* 'un TEAC metoduna göre deneylerinde kuersetin ekivalentini 3.75 ± 0.14 mM /QE ve 881.3 ± 6.68 µM bulmuşlardır ⁴.

Fritz ve ark. 2007'te yaptıkları çalışmayla *Hypericum polyanthemum* ve *Hypericum myrianthum* 'da Folin-Ciocalteu reaktifi ve kolorimetrik test uygulayarak kuersetin equivalent (QE): 120.6 ± 1.1 ve 121.4 ± 4.7 olduğunu belirtmiştir ⁵.

Kulenova ve ark. 2000'de *H. perforatum*'da en yüksek değeri % 70 etanolle hazırlanmış ekstrelerde 1.32 mg/ mL, total kuersetin oranını ise 0.68 mg/mL olarak bulmuştur ⁶.

Tawaha ve ark. 2007'de *H. triquetrifolium*, *Arbutus andrachne* ve *Rosmarinus officinalis*'deki toplam fenol içeriğinin 2.8–70.3 mg ve 2.6-59.6 mg GAE/g kuru ağırlık olarak tesbit etmiştir ⁷.

Hakimoğlu ve ark. 2007'de *H. lysimachioides*'in etanol özütünün in vitro antioksidan çalışmasında 1 mg HL' nin 307 µg gallik asite ekivalent olduğunu görmüştür ⁸.

Çalışmalarımız esnasında en çok fenolik madde miktarı *H. retusum*'un metanol özütünde tesbit edilmiştir. Toplam fenolik bileşiğe paralel olarak en yüksek flavonoid miktarı da yine *H. retusum*'un metanol özütünde olduğu gözlenmiştir.

Zou ve ark. 2004'deki çalışmalarında *H. perforatum*'un etanolde hazırladığı özütlerinde $R^2 = 0.9991$ kuersetine eşdeğer olduğunu rapor etmiştir ⁹.

İndirgeme gücü antioksidan aktiviteyle ilgili önemli bir test yöntemidir. Bir bileşiğin indirgeme kapasitesi potansiyel antioksidan aktivitesinin anlamlı bir indikatörü gibi görülebilir.

Kızıl ve ark. 2008'de *H. triquetrifolium* ve *Hypericum scabroides*. Robson & Poulter'de DPPH'i $IC_{50} = 39.0-33.8$ µ g/mL, metal şelatlama kabiliyetini EDTA'dan düşük bulmuştur. Ayrıca toplam fenoliğini 1 mg HT ve HS'nin 267–333 µg gallikasite eşdeğer olduğunu ve bunların yüksek indirgeme gücüne sahip olduklarını bildirmiştir ¹⁰.

Gözlemlerimizde indirgeme gücü için en yüksek absorbansı *H.retusum*'un petrol eter özütü göstermiştir.

DPPH (1,1-Difenil 2-pikril hidrazil) deneyi, bileşenlerin H atomlarını radikale transfer etme gücünü ölçebilen en yaygın kullanılan antioksidan testtir. Bu deneyde DPPH indirgenmesiyle mor renk sarıya dönüşür.

Çakır ve ark. 2003'te yaptığı çalışmada *Hypericum hyssopifolium*'un DPPH testinde en yüksek % inhibisyonu 65-92 arasında etilasetat fraksiyonunda bulmuştur. Ayrıca total fenolik içeriğini de yine etilasetatta 0.14 abs olarak tesbit edilmiştir¹¹.

Silva ve ark. 2008'de yaptığı araştırmada *H. perforatum*'un etanol ekstraktında DPPH inhibisyonunu 49.3 ± 1.05 , indirgeme gücünü 1.60, metal şelatlamada 1.99 olduğunu gözlemiştir¹².

Yaptığımız bu çalışma; *Hypericum retusum*'un DPPH radikalini söndürme aktiviteside metanol özütünün, en az BHT ve BHA kadar oldukça yüksek aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.

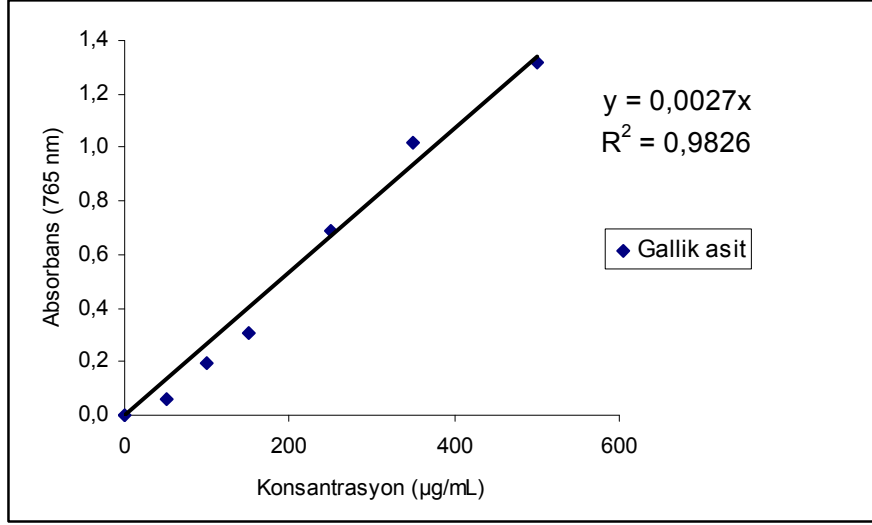
Spiteller ve ark. 2008'de *Hypericum venustum*'un çiçekleri için indirgeme gücü ($\mu\text{g/ml}$) etanolde; 1.620 ± 0.007 , suda; 1.279 ± 0.003 , BHA: 1.864 ± 0.007 , BHT: 1.726 ± 0.011 , metal şelatlama değerini etanolde; 0.158 ± 0.009 , suda; 0.226 ± 0.011 , BHA: 0.125 ± 0.005 , BHT: 0.197 ± 0.007 bulmuştur¹³.

Sagratini ve ark. 2008'de *Hypericum tetrapterum*'da 4.80 ± 0.09 mg GAE/g özüt, % indirgeme 1.09 ± 0.02 , DPPH : 25.05 ± 0.52 olarak gözlemiştir¹⁴.

Deneylelerimiz sırasında OH Radikali aktivitesi için en yüksek aktiviteyi *H. retusum*'un petrol eter özütü göstermiştir.

4.3.ÇİZELGELER , ŞEKİLLER

4.3.1.Toplam Fenolik Bileşen Miktarı Tayini Bulguları

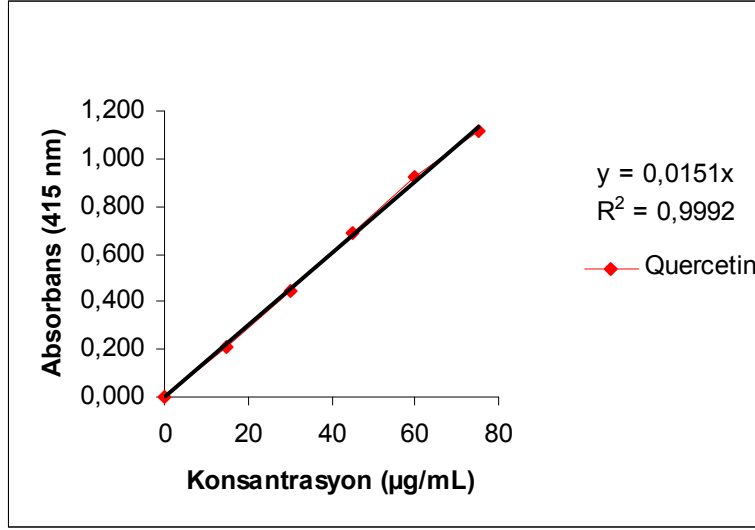


Şekil 4.3.1: Gallik asidin artan derişimlerine karşılık ölçülen absorbans değerleri.

Çizelge 4.3.1: *H. retusum* bitkisinin farklı çözücülerdeki özütlerinin içindeki gallik asite eşdeğer total fenolik bileşen miktarları. Her değer üç deney sonucunun ortalaması alınarak ve \pm standart sapmalar hesaplanıp verilmiştir.

Özütler	Gallik Asit Eşdeğerleri (µg GAE / mg özüt)
Petroleter	57.53 \pm 2.83
Hegzan	62.35 \pm 1.83
Etilasetat	91.85 \pm 3.87
Metanol	198.52 \pm 4.64

4.3.2. Toplam Flavonoid Miktarı Tayini Bulguları

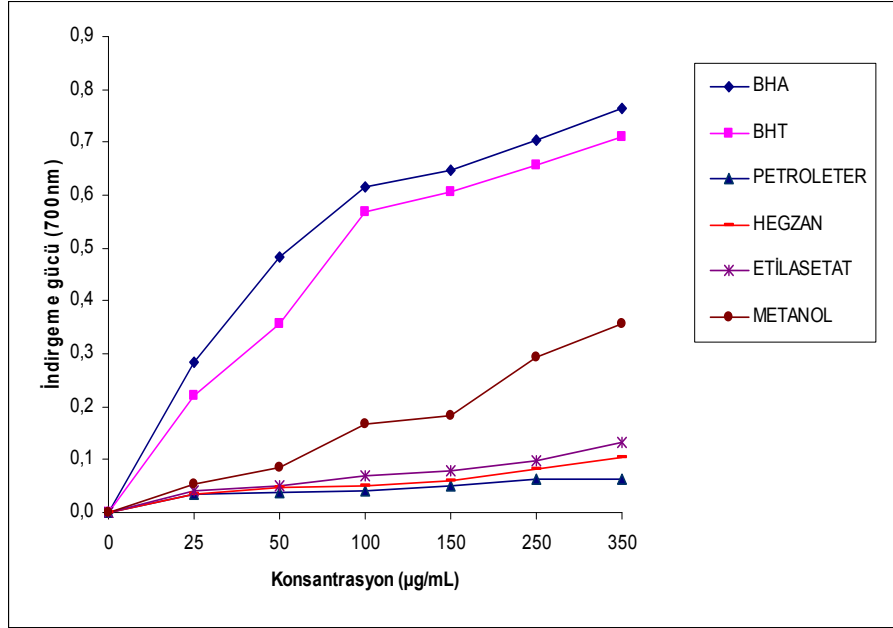


Şekil 4.3.2: Kuersetinin artan derişimlerine karşı ölçülen absorbans değerleri

Çizelge 4.3.2: *H. retusum* bitkisinin hegzan, etilasetat, petrol eter ve metanol ekstraktlarının içindeki kuersetine eşdeğer toplam flavonoid bileşen miktarları. Her değer üç deney sonucunun ortalaması alınarak ve \pm sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir. (n=3)

Özütler	Kuersetin Eşdeğerleri (µg QUE / 2mg özüt)
Petroleter	4.06 \pm 0.75
Hegzan	4.79 \pm 0.90
Etilasetat	110.91 \pm 1.87
Metanol	168.83 \pm 1.06

4.3.3.İndirgeme Gücü Tayini Bulguları

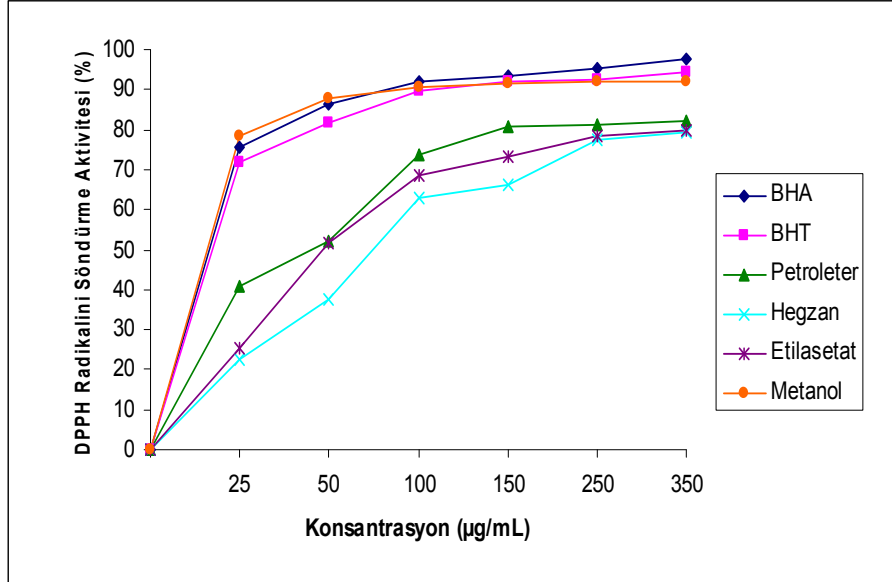


Şekil 4.3.3: *H. retusum* bitkisinin çeşitli çözücüler kullanılarak hazırlanan özütlerinin farklı konsantrasyonlardaki Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeme gücünün spektrofotometrik analiz verileri.

Çizelge 4.3.3: *H. retusum* bitkisinin çeşitli çözücüler kullanılarak hazırlanan özütlerinin farklı konsantrasyonlardaki Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeme gücünün değerleri. BHA ve BHT pozitif kontrol olarak kullanıldı. Veriler üç deney (n=3) sonucunun ortalamasıdır ve \pm standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir.

KONSANTRASYON ARALIĞI (µg / mL)						
	25	50	100	150	250	350
BHT	0.22±0.06	0.36±0.15	0.57±0.14	0.61±0.13	0.66±0.12	0.71±0.12
BHA	0.29±0.08	0.48±0.11	0.61±0.16	0.65±0.16	0.70±0.15	0.77±0.17
Petroleter	0.03±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01	0.05±0.01	0.06±0.02	0.06±0.01
Hegzan	0.04±0.01	0.05±0.01	0.05±0.01	0.06±0.01	0.08±0.02	0.10±0.01
Etilasetat	0.04±0.01	0.05±0.01	0.07±0.01	0.08±0.01	0.10±0.02	0.13±0.02
Metanol	0.05±0.01	0.09±0.02	0.17±0.08	0.18±0.03	0.29±0.07	0.36±0.03

4.3.4. DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi Bulguları

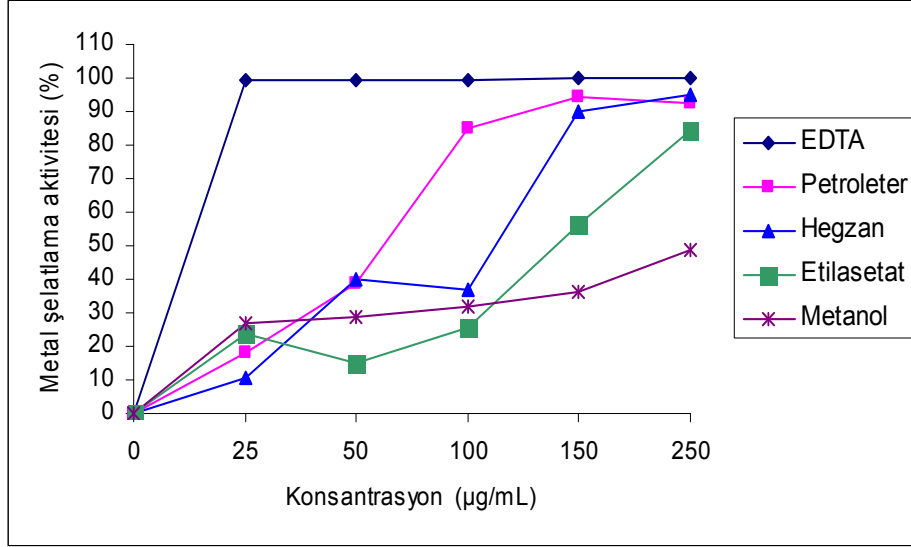


Şekil 4.3.4: *H. retusum* bitkisinin petroleter, hegzan, etilasetat, metanol özütlerinin farklı konsantrasyonlarının DPPH radikali üzerindeki söndürücü aktivitesinin spektrofotometrik analiz verileri.

Çizelge 4.3.4: *H. retusum* bitkisinin çeşitli çözücüler kullanılarak elde edilen özütlerinin BHT ve BHA'nın DPPH radikali üzerindeki söndürme aktivitelerinin % inhibisyon değerleri. Her değer üç deney sonucunun ortalaması alınarak ve \pm sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir. (n=3)

KONSANTRASYON ARALIĞI (µg / mL)						
	25	50	100	150	250	350
BHT	71.96±2.97	81.80±4.76	89.71±1.14	91.86±0.41	92.64±0.87	94.50±0.86
BHA	75.68±5.81	86.45±3.51	92.18±2.07	93.23±3.97	95.21±3.75	97.56±1.60
Petroleter	41.04±2.29	52.15±5.25	73.55±4.58	80.58±1.07	81.14±5.54	82.35±7.56
Hegzan	22.46±1.70	37.39±1.79	62.73±2.41	65.97±1.95	77.51±1.12	79.44±3.12
Etilasetat	25.57±5.88	51.87±1.07	68.69±1.09	73.20±1.90	78.42±0.52	79.77±6.98
Metanol	78.48±2.52	87.95±1.23	90.70±1.43	91.45±7.18	92.11±3.86	91.83±2.10

4.3.5. Metal İyonları Şelatlama Aktivitesi Bulguları

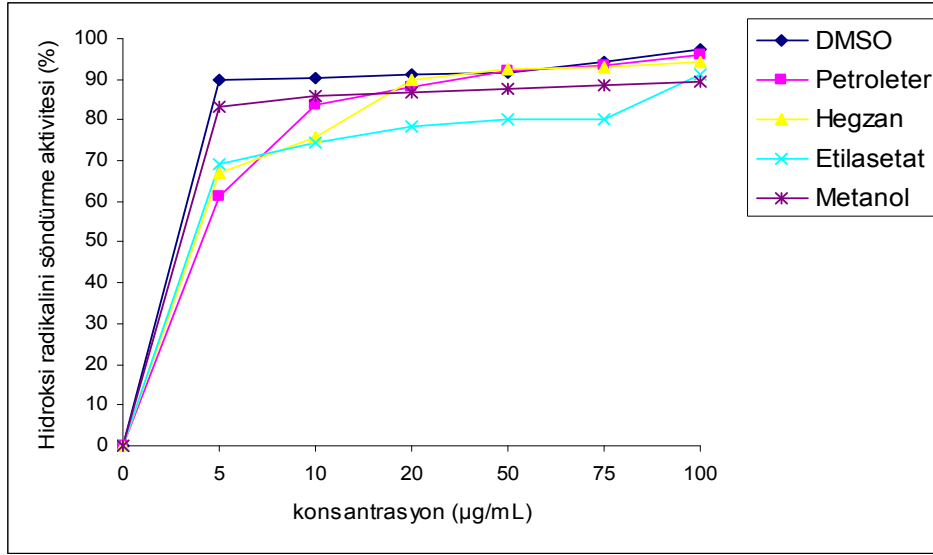


Şekil 4.3.5: *H. retusum* bitkisinin petroleter, hegzan, etilasetat, metanol özütlerinin farklı konsantrasyonlarının metal şelatlama aktivitesinin spektrofotometrik analiz verileri.

Çizelge 4.3.5: *H. retusum* bitkisinin petroleter, hegzan, etilasetat, metanol özütlerinin farklı konsantrasyonlarının metal şelatlama aktivitesinin % inhibisyon değerleri. EDTA pozitif kontrol olarak kullanıldı. Her değer üç deney (n=3) sonucunun ortalaması alınarak ve \pm sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir.

KONSANTRASYON ARALIĞI (µg/mL)					
	25	50	100	150	250
EDTA	99.713±0.79	99.46±0.46	99.64±0.42	99.72±0.35	99.85±0.08
Petroleter	18.18±0.54	38.96±4.54	84.81±1.16	94.27±2.71	92.74±0.15
Hegzan	10.46±1.87	40.03±3.11	37.15±3.38	90.26±0.74	95.04±1.25
Etilasetat	23.56±2.17	15.25±1.93	25.62±3.91	56.05±2.63	84.44±2.60
Metanol	26.70±1.05	28.62±1.17	31.61±3.65	36.37±3.92	48.84±2.85

4.3.6.OH Radikalini Söndürme Aktivitesi Bulguları



Şekil 4.3.6: *H. retusum* bitkisinin petroleter, hegzan, etilasetat, metanol özütlerinin farklı konsantrasyonlarının OH Radikalini söndürme gücünün spektrofotometrik analiz verileri.

Çizelge 4.3.6: *H. retusum* bitkisinin petroleter, hegzan, etilasetat, metanol özütlerinin farklı konsantrasyonlarının OH Radikalini söndürme gücünün % inhibisyon değerleri. DMSO pozitif kontrol olarak kullanıldı. Her değer üç deney (n=3) sonucunun ortalaması alınarak ve \pm sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir.

KONSANTRASYON ARALIĞI (µg / mL)						
	5	10	20	50	75	100
DMSO	90.07±0.97	90.49±0.76	91.19±0.14	91.75±0.41	94.13±0.87	97.20±0.86
Petroleter	61.12±1.81	83.64±1.51	88.25±1.07	91.89±0.97	93.43±0.75	96.22±1.60
Hegzan	66.85±0.29	75.94±0.25	89.65±1.58	92.73±1.07	93.15±1.54	94.13±0.56
Etilasetat	69.23±0.70	74.55±0.79	78.46±0.41	80.00±0.95	80.14±0.12	91.14±0.12
Metanol	83.36±0.88	86.01±1.07	86.71±1.09	87.83±1.90	88.67±0.52	89.37±0.98

4.4.KAYNAKLAR

- 1.Tsao, R.; Deng, Z., *Seperation procedures for naturally occuring antioxidant phytochemicals*, J.Chromatogr.B.812, **2004**, 85-99
- 2.Ardestani, A; Yazdanparast, B., *Antioxidant and free radical scavenging potential of Achillea santolina extracts* , R.food chem, 104, **2007**, 21-29
- 3.Zheng, W.; Wang, S.Y., *Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs*, J.Agric Food Chem, vol.49, **2001**, 5165-5170
- 4.Ivanova, D.; Gerova, D.; Chervenkov, T.; Yankova, T., *Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants*, Journal of Ethnopharmacology- Vol 96, Issues 1-2, 4 January, **2005**, P, 145-150
- 5.João, J.; Bernardi, A.; HaaS, J.S.; Ascol, B. M.; Bordignon, S., *Germination and growth inhibitory effects of Hypericum myrianthum and H. polyanthemum extracts on Lactuca sativa L.* Rev. bras. farmacogn. **2007**, vol.17 no.1
- 6.Jordán,M. J.; Martínez, M. C. Martínez,; Moñino,I.,*Polyphenolic extract and essential oil quality shrubs cultivated under different watering levels* , Industrial Crops and Products,Vol 29, Issue 1, January- **2009**, Pg: 145-153
- 7.Tawaha, K.; Ali, F. Q.; Gharaibe, M., *Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species-* Food Chemistry, Vol 104, **2007**, Issue 4, P-1372-137
8. Kızıl, G.; Kanay, Z.; Kızıl, M., *The effect of ethanol extract of Hypericum lysimachioides on lipid profile in hypercholesterolemic rabbits and its in vitro*

antioxidant activity Atherosclerosis, Informa Pharmaceutical Science, Vol 192, Issue 1, **2007**, P- 113-122

9. Yanping, Z.; Yanhua, W., *Antioxidant Activity of a Flavonoid-Rich Extract of Hypericum perforatum L. in Vitro*, *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52 (16), pp 5032–5039

10. Kızıl, G.; Kızıl, M.; Yavuz, M.; Emen, S.; Hakimoğlu, F., *Antioxidant Activities of Ethanol Extracts of Hypericum triquetrifolium. and Hypericum scabroides*, *Pharmaceutical Biology*, Vol. 46, **2008**, No. 4, P-231-242

11. Mavi, A.; Yıldırım, A.; Duru, M.; Harmandar, M.; Kazaz, C., *Isolation and characterization of antioxidant phenolic compounds from the aerial parts of Hypericum hyssopifolium L. by activity-guided fractionation*, *Journal of Ethnopharmacology*, **2003**, 8773–83

12. Silva, B. A.; Malva, J.O.; Dias, A., *St. John's Wort (Hypericum perforatum) extracts and isolated phenolic compounds are effective antioxidants in several in vitro models of oxidative stress*, *Food Chemistry*, **2008**, 110 611–619

13. Spiteller, M.; Özen, T.; Zuehlke, S.A. ; Mimica, N. - *Phenolic constituents and the in vitro antioxidant activity of the flowers of Hypericum venustum*, *Fitoterapia*, **2008**, 79 ,191–193

14. Sagratini, G.; Ricciutelli, M.; Vittori, S.; Öztürk, N.; Öztürk, Y.; Maggi, F., *Phytochemical and antioxidant analysis of eight Hypericum taxa from Central Italy*, *Fitoterapia* 79, **2008**, 210–213

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Mevcut çalışmada *H. retusum* bitkisinin topraküstü kısımlarından elde edilen petroleter, hegzan, etilasetat ve metanol özütlerinin antioksidan ve radikal giderme ile ilgili yapılan çalışmalarda toplam fenolik bileşen miktarı tayini, Fe^{3+} - Fe^{2+} transformasyonu metoduna göre indirgeme kapasitesi, metal şelatlama aktivitesi, toplam flavonoid miktarı, DPPH serbest radikal giderme aktivitesi, OH radikalini giderme gücü gibi farklı biyoanalitik metotlar kullanılarak farklı konsantrasyonlarda ayrı ayrı belirlendi.

Kullanılan antioksidan yöntemlerde bulunan aktiviteler kozmetik ve gıda sanayinde yaygın olarak kullanılan BHT, BHA ile kıyaslamaları yapıldı.

H. retusum bitkisinin topraküstü kısımlarından elde edilen hegzan, etilasetat, petroleter ve metanol ekstralarının çalışılan konsantrasyonlarda (5-350 μ g/ml), artan konsantrasyon ile beraber toplam antioksidan aktivitede, indirgeme kapasitelerinde, metal şelatlamada, DPPH aktivitelerinde de artış görüldü. Ayrıca OH radikalini söndürücü gücünün varlığı da saptandı.

Antioksidan etkisini gözlemlediğimiz bu çalışma ışığında; daha ileri fraksiyonlandırma, bileşen saflaştırma ve biyolojik aktif etkilerin gözlenmesi gibi yeni çalışmalara öncü olacaktır.

6. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Yasemin AKGÖZ

Doğum Yeri : Diyarbakır

Doğum Tarihi : 17.06.1975

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Fatih Lisesi-1992

Lisans : Dicle Üniversitesi Eğitim Fakültesi-1997

Yüksek Lisans : Dicle Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi-2007

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: Koşuyolu İlköğretim Okulu-2009

Yayımları (SCI ve diğer):