

**T.C.**  
**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BAZI ŞİFALI BİTKİLERİN EKONOMİYE KAZANDIRILMASI:  
ŞERBETÇİ OTU (*HUMULUS LUPULUS L.*) BİTKİSİNİN  
ANTIOKSİDAN, SİTOTOKSİK, ENZİM AKTİF ÖZÜT VE  
BİLEŞENLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Ferah CÖMERT**  
**Kimya Anabilim Dalı**

Tezin Sunulduğu Tarih: **16/07/2012**

**Tez Danışmanı:**  
**Prof. Dr. Mehmet AY**

**ÇANAKKALE**

## YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

**FERAH CÖMERT** tarafından **PROF. DR. MEHMET AY** yönetiminde hazırlanan **“BAZI ŞIFALI BİTKİLERİN EKONOMİYE KAZANDIRILMASI: ŞERBETÇİ OTU (*HUMULUS LUPULUS L.*) BİTKİSİNİN ANTIOKSİDAN, SİTOTOKSİK, ENZİM AKTİF ÖZÜT VE BİLEŞENLERİNİN BELİRLENMESİ** başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet AY

Danışman

Prof. Dr. Feray KÖÇKAR

Jüri Üyesi

Doç.Dr. Ayhan ÇELİK

Jüri Üyesi

Sıra No:

Tez Savunma Tarihi: 16/07/2012

Prof. Dr. İsmet KAYA

Müdür

Fen bilimler Enstitüsü

Hazırlanan bu Yüksek Lisans tezi ÇOMÜ BAP tarafından **2010/224** no'lu projeden desteklenmiştir.

## İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

**Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.**

Ferah CÖMERT

## TEŞEKKÜR

Lisans ve Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet AY'a,

İngiltere'de ki çalışmalarım süresince bana her konuda yardımcı olan Sayın Prof. Satyajit D. SARKER'a,

Şerbetçi otu bitkisini bulma ve toplama aşamasında yardımcı olan Balıkesir ÜNİVERSİTESİ Biyoloji Bölümü A.B.D. Başkanı Sayın Prof. Dr. Gülendem TÜMEN'e ve Belma AYAN'a; Bitkinin Herbaryum tanımlamasını yapan Uludağ ÜNİVERSİTESİ F.E.F. Biyoloji Bölümü Sayın Prof. Dr. Hulusi MALYER'e, ayrıca Farmakognosi konusunda bilgi ve desteğini esirgemeyen Ankara Gazi ÜNİVERSİTESİ Farmakognosi A.B.D. Sayın Prof. Dr. Bilge ŞENER'e,

Sitotoksiste çalışmalarım süresince her konuda yardımcı olan Balıkesir ÜNİVERSİTESİ Moleküler Biyoloji A.B.D. Başkanı Sayın Prof. Dr. Feray KÖÇKAR ve Araş. Gör. Dr. Sümeyye AYDOĞAN'a,

Enzim-Aktivite/İnhibisyon çalışmalarım süresince desteğini esirgemeyen Gebze Yüksek Teknoloji ENSTİTÜSÜ Kimya Bölümü, Biyokimya A.B.D. Sayın Doç. Dr. Ayhan ÇELİK ve doktora öğrencisi Gülden Aşçı YETİŞ'e,

Dostluklarıyla ve yardımlarıyla bana her zaman destek olan ve yanımda bulunan Arş. Gör. Melek T. YAVAŞOĞLU, Arş. Gör. Tuğba GÜNGÖR, Zahide ÖZTAŞ, Deniz DİLEK, Arş. Gör. Arif Sercan ŞAHUTOĞLU ve Memduh BİLMEZ'e,

Anlayışı ve desteğiyle her zaman yanımda olan nişanlım Alper ÖNDER'e,

Ve en önemlisi hayatımın her evresinde yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen BABAM'a, ANNEM'e ve AĞABEYİM'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca bu araştırma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri 2010-224 no'lu proje ile desteklenmiştir. Bu nedenle adı geçen kuruma teşekkür ederim.

Ferah CÖMERT

## SİMGELER VE KISALTMALAR

ROS	Reaktif Oksijen Türler
RNT	Reaktif Nitrojen Türler
CVD	Kardiyovasküler hastalıklar
CNS	Merkezi Sinir Sistemi
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
L-DOPA	Dihidroksifenilalanin
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
Hep3B	İnsan karaciğer karsinomu
HT-29	İnsan kolon karsinom
TPTZ	2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazin
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
HAA	Hidrojen Atomu Aktarımı
EA	Tek Elektron Aktarımı
ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzothiazolin-6-sulfonik asit) diamonyum tuzu
CUPRAC	Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
FCR	Folin & Ciocalteu's Fenol Reaktifi
FRAP	Ferrik İyonu İndirgeme Antioksidan Gücü
TEAC	Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite
TR	Troloks
QR	Kersetin
QERFC	Kersetin Eşdeğeri Flavonoid Derişimi
EtOAc	Etilasetat
DCM	Diklormetan

MeOH	Metanol
HPLC	Yüksek Ayırmalı Sıvı Kromatografisi
<sup>1</sup> H-NMR	Hidrojen Çekirdek Magnetik Rezonans Spektroskopisi
UV-VIS	Mor Ötesi ve Görünür Bölge Soğurma Spektroskopisi
VLC	Düşük Basınç Sıvı Kromatografisi
SPE	Katı Faz Özütlemesi
XN	Ksantohumol
IXN	İsoksantohumol
6-PN	6-Prenilnarinjenin
8-PN	8-Prenilnarinjenin
SD	Hata değeri
M	Molarite
mM	Milimolar
mg	Miligram
μL	Mikrolitre
mL	Mililitre
nm	Nanometre
mmol	Milimol

## ÖZET

### **BAZI ŞIFALI BİTKİLERİN EKONOMİYE KAZANDIRILMASI: ŞERBETÇİ OTU (*HUMULUS LUPULUS L.*) BİTKİSİNİN ANTIOKSİDAN, SİTOTOKSİK, ENZİM AKTİF ÖZÜT VE BİLEŞENLERİNİN BELİRLENMESİ**

Ferah CÖMERT

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Mehmet AY

16/07/2012, 162

Bu araştırmada, **Şerbetçi otu (*Humulus lupulus L.*)** bitkisinden elde edilen 6 farklı etken özütün antioksidan aktiviteleri DPPH, TEAC, FRAP ve CUPRAC yöntemleri ile karşılaştırılmış olup, hekzan, aseton sonrası metanol, metanol (kademeli), metanol (doğrudan) özütlerinin sırasıyla bu yöntemlerle en etkili özütler olduğu belirlenmiştir. F-C reaktifi ile tayin edilen toplam fenolik bileşen miktarı % 75 etanol+% 25 su özütü için en yüksek değeri vermiştir. *Humulus lupulus L.* bitkisi etken özütleri için *Proteaz*, *Tirozinaz*, *β-Laktamaz* enzimleri ile enzim aktivite/inhibisyon çalışmaları yapılmıştır. Özütlerin % inhibisyonları, Vmaks değerleri hesaplanarak belirlenmiştir. Etken bitki özütlerinin 9 farklı derişiminin sitotoksik etkilerinin HT29 ve Hep3B hücreleri üzerinde belirlenmesinde MTT testi uygulanmıştır ve 570 nm’de okunan soğurma değerleri grafiksel olarak gösterilmiştir.

Hekzan özütüne VLC uygulanmıştır ve % 20 etilasetat ayrımı, en aktif ayırım olarak belirlenmiştir. Preparatif HPLC-UV ile elde edilen % 100 metanol SPE ayrımlarındaki bileşenlerin yapıları spektroskopik yöntemlerle belirlenmiştir. GC-MS ve LC-MS analizleri ile özütlerin bileşim analizleri yapılmış, diğer etken bileşenlerin saflaştırma ve yapısal analiz çalışmaları devam etmektedir.

**Anahtar sözcükler:** Şerbetçi otu, özütler, DPPH, CUPRAC, TEAC, FRAP, Sitotoksisite, Enzim aktivite/inhibisyon, VLC, HPLC-UV, GC-MS/LC-MS, Biyoaktif bileşenler.

## ABSTRACT

### IDENTIFICATION OF ANTIOXIDANT, CYTOTOXIC, ENZYME ACTIVE COMPONENTS FROM *HUMULUS LUPULUS* L. EXTRACTS

Ferah CÖMERT

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Chair For Chemistry Thesis of Master of Science

Advisor: Prof. Dr. Mehmet AY

16/07/2012, 162

In this research, antioxidant activities of six different active extracts obtained from *Humulus lupulus* L. plant were compared by DPPH, TEAC, FRAP and CUPRAC methods. Hexane, acetone, methanol, and methanol (gradually) and methanol (directly) extracts were found as the most efficient. The amount of total phenolic components determined by F-C reagent, were found with the highest value for the mixture of ethanol 75% and water 25% extract. The enzyme activity/inhibition assays were performed by protease, tyrosinase and lactamase and % inhibition values of extracts were determined by calculating Vmax values. The cytotoxicity effects of nine different concentration of active extracts were determined among Hep3B and HT29 cell lines by MTT assay. The number of living cells were determined by measuring absorbance at 570 nm. VLC was applied for the analysis of the n-hexane extract by varying mixtures of EtOAc and n-hexane. 20% EtOAc fraction were observed as the most active fraction by TLC and DPPH investigation of the fractions in MeOH. The structures of components obtained from methanol 100% fraction of SPE applied methanol extract were determined by spectroscopic methods. The components of crude extracts were determined by GC-MS/LC-MS. The purification and structural analysis studies of other active components are still continuing.

**Key words:** *Humulus lupulus* L., Extracts, DPPH, CUPRAC, TEAC, FRAP, Cytotoxicity, Enzyme activity/inhibition, VLC, HPLC-UV, GC-MS/LC-MS, Bioactive components.



<b>İÇERİK</b>	<b>Sayfa</b>
<b>TEZ SINAVI SONUÇ FORMU.....</b>	<b>ii</b>
<b>İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI .....</b>	<b>iii</b>
<b>TEŞEKKÜR .....</b>	<b>iv</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR .....</b>	<b>v</b>
<b>ÖZET .....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>vii</b>
<b>BÖLÜM 1 – GİRİŞ .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1. Antioksidanlar (Yükseltgen önleyiciler) .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2. Doğal Antioksidan Bileşikler.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3. Bitkisel Biyoaktif Bileşikler .....</b>	<b>5</b>
<b>1.4. Bitkisel Biyoaktif Bileşikleri Elde Etme Yöntemleri .....</b>	<b>5</b>
<b>1.4.1. Kaynar alkol yöntemi .....</b>	<b>6</b>
<b>1.4.2. Alkol buharı yöntemi .....</b>	<b>6</b>
<b>1.4.3. Çeşitli organik çözücülerle özütleme.....</b>	<b>6</b>
<b>1.4.4. Sokhelet özütleme yöntemi .....</b>	<b>6</b>
<b>1.4.5. Süper kritik akışkan özütlemesi .....</b>	<b>6</b>
<b>1.5. Polifenolik Bileşikler .....</b>	<b>7</b>
<b>1.5.1. Flavonoidlerin yapı-etkinlik bağlantıları .....</b>	<b>12</b>
<b>1.5.2. Flavonoidlerin öncü-yükseltgen etkinliği .....</b>	<b>15</b>
<b>1.5.2. Flavonoidleri belirlemede kullanılan çözücü sistemleri .....</b>	<b>16</b>
<b>1.6. Antioksidan Yapı Etkinlik Tayinleri .....</b>	<b>17</b>
<b>1.6.1. DPPH radikal süpürücü antioksidan kapasite yöntemi.....</b>	<b>19</b>
<b>1.6.2. Folin-Ciocalteu yöntemi ile toplam fenolik bileşen tayini.....</b>	<b>20</b>
<b>1.6.3. Troloks eşiti antioksidan kapasite (TEAC) yöntemi.....</b>	<b>21</b>
<b>1.6.4. Demir iyon indirgeyici antioksidan güç (FRAP) yöntemi.....</b>	<b>22</b>

1.6.5. (CUPRAC) bakır(II) indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi.....	23
1.7. Enzim-Aktivite/İnhibisyon Çalışmaları .....	24
1.7.1. DMSO uyumu.....	24
1.7.2. Enzim çalışmaları.....	24
1.7.2.1. Proteaz inhibisyon çalışmaları .....	26
1.7.2.2. Tirozinaz inhibisyonu çalışması.....	28
1.7.2.3. $\beta$ -laktamaz inhibisyonu çalışması .....	29
1.6. Sitotoksisite Denemesi .....	29
1.7. <i>Humulus lupulus</i> L.....	30
1.8. Cannabinaceae Familyası .....	32
<b>BÖLÜM 2 – ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....</b>	<b>34</b>
2.1. Botanik Bilgi .....	34
2.2. <i>Humulus lupulus</i> L. Fitokimyasal Analizleri ve Biyoaktif Bileşenleri .....	34
2.3. <i>Humulus lupulus</i> L. Bitki Özütləri .....	39
2.4. <i>Humulus Lupulus</i> L. Bileşenlerinin Östrojenik Özelliği.....	39
2.5. <i>Humulus Lupulus</i> L. Bileşenlerinin Antikanser Özelliği.....	40
2.6. <i>Humulus Lupulus</i> L. Bileşenlerinin Antioksidan, Antibakteriyel, Antifungal ve Antiviral Özelliği .....	40
2.7. <i>Humulus Lupulus</i> L. Bileşenlerinin Toksikolojik Analizleri .....	41
2.8. <i>Humulus Lupulus</i> L. Bileşenlerinin Kromatografik Analizleri .....	42
2.9. <i>Humulus Lupulus</i> L. Bileşenlerinin Hastalıklardaki Rolü .....	43
<b>BÖLÜM 3 – MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>45</b>
3.1. Materyaller .....	45
3.1.1. Kullanılan kimyasallar.....	45
3.1.2. Kullanılan cihazlar .....	45
3.2. Deneysel Yöntemler .....	45

3.2.1. Bitkinin toplanması ve tanımlanması.....	46
3.2.2. Bitkinin kurutulması, öğütülmesi ve depolanması.....	46
3.2.3. Bitki örneklerine özütleme işleminin uygulanması.....	47
3.2.4. Bitki özütlerinin aktifliğinin DPPH (1,1-difenil-2-pikril hidrazil) ile nitel olarak belirlenmesi .....	49
3.2.5. DPPH (1,1-Difenil 2-Pikril Hidrazil) serbest radikal süpürücü aktivite tayini .....	50
3.2.6. Toplam fenolik bileşik miktarı tayini .....	52
3.2.7. (CUPRAC) Bakır(II) indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi .....	52
3.2.8. TEAC (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi) yöntemi .....	53
3.2.9. FRAP (Demir İyon İndirgeyici Antioksidan Güç) yöntemi.....	54
3.2.10. Düşük basınç sıvı kromatografisi (VLC).....	54
3.2.11. Katı faz özütlemesi (SPE) ve HPLC-UV.....	55
3.2.12. Kolon kromatografisi .....	56
3.2.12.1. Düşük basınç sıvı kromatografisi F3 ayrımı için uygulanan kolon kromatografisi .....	56
3.2.12.2. D-MeOH özütü kolon kromatografisi .....	56
3.2.13. Enzim-aktivite/inhibisyon çalışmaları.....	57
3.2.13.1. Proteaz inhibisyon çalışmaları .....	57
3.2.13.2. Tirozinaz inhibisyon çalışmaları .....	59
3.2.13.3. $\beta$ -laktamaz inhibisyon çalışmaları .....	60
3.2.14. Şerbetçi otu bitki özütlerine uygulanan sitotoksisite çalışmaları .....	62
3.2.14.1. Hücre kültürü medyumunun hazırlanması .....	62
3.2.14.2. FCS hazırlanması .....	62
3.2.14.3. PBS tampon çözeltisinin hazırlanması .....	62
3.2.14.4. Çalışmada kullanılan hücre soyları .....	62
3.2.14.5. Hücre soyunun başlatılması .....	64

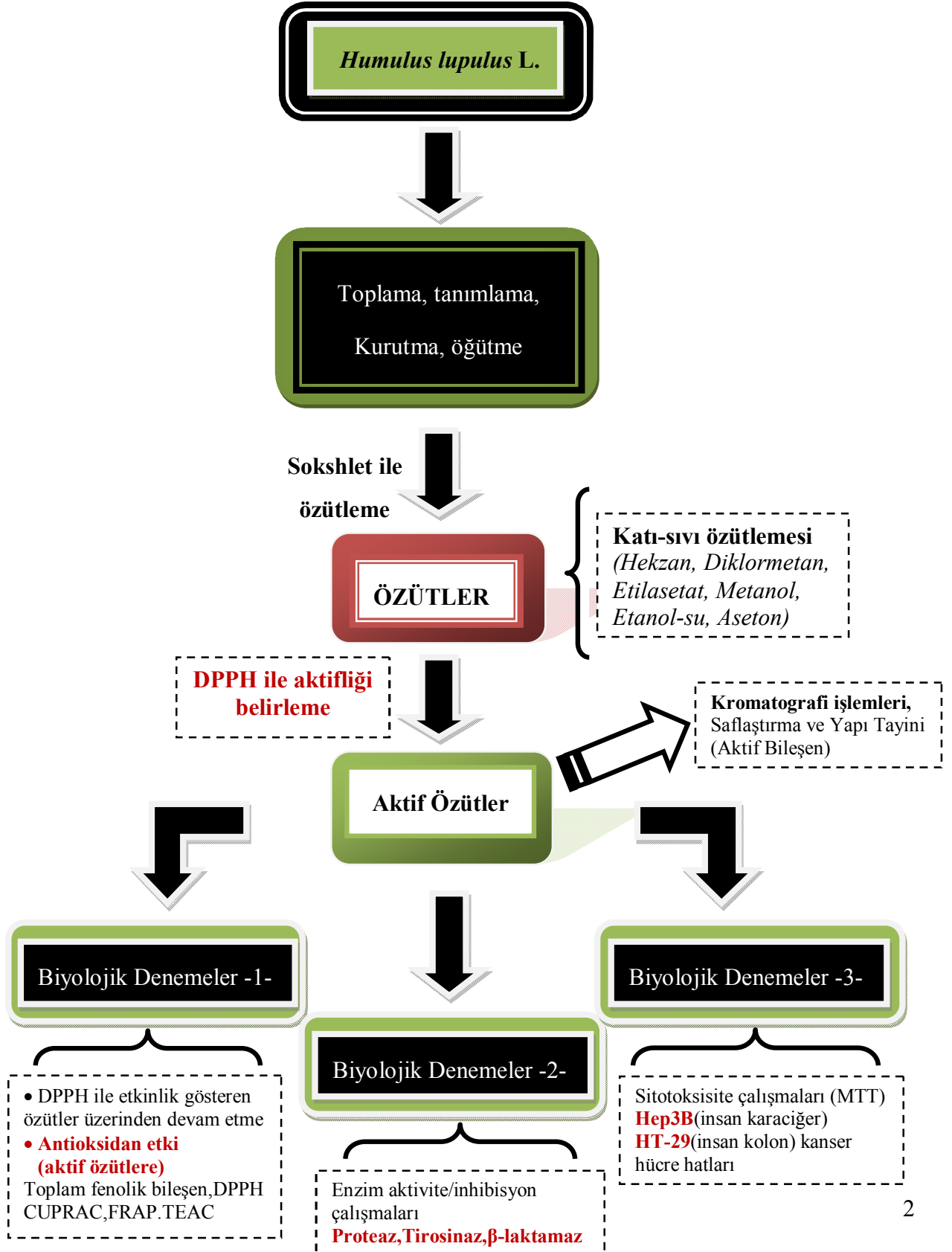
3.2.14.6. Hücrelerin büyütülmesi .....	64
3.2.14.7. Hücrelerin pasajlanması .....	64
3.2.14.8. Canlı hücrelerin belirlenmesi (Trypan Blue Exclusion) ve hücre sayımı .....	64
3.2.14.9. Maddelerin uygulanması .....	65
3.2.14.10. MTT denemesi.....	68
<b>BÖLÜM 4 – ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....</b>	<b>69</b>
4.1. DPPH (Serbest Radikal Süpürücü Kapasite) Sonuçları.....	69
4.2. Toplam Fenolik Bileşen Miktar Tayini Sonuçları .....	79
4.3. CUPRAC (Cu(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi) Sonuçları .....	82
4.4. TEAC (ABTS <sup>+</sup> Radikal Giderme Aktivitesi) Sonuçları .....	95
4.5. FRAP (Demir İyon İndirgeyici Antioksidan Güç) Sonuçları .....	106
4.6. HPLC-UV ve <sup>1</sup> H-NMR Sonuçları.....	107
4.7. Kolon Kromatografisi Sonuçları.....	112
4.8. GC-MS Sonuçları.....	113
4.9. LC-MS Sonuçları .....	118
4.10. Enzim-Aktivite/İnhibisyon Sonuçları.....	120
4.10.1. Proteaz inhibisyon sonuçları.....	120
4.10.2. Tirozinaz inhibisyon sonuçları.....	126
4.10.3. β-laktamaz inhibisyon sonuçları .....	128
4.11. Şerbetçi Otu Özütlerinin Sitotoksikite Çalışmasının Sonuçları .....	129
<b>BÖLÜM 5 – SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....</b>	<b>139</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>148</b>
<b>Ekler.....</b>	<b>I</b>
<b>Çizelgeler .....</b>	<b>XXX</b>
<b>Şekiller .....</b>	<b>XXXII</b>

**Özgeçmiş..... XXXVIII**

## BÖLÜM 1

## GİRİŞ

Tez kapsamında *Humulus lupulus* L. (Şerbetçi otu) bitkisi için yapılması planlanan çalışmalar şematik olarak aşağıda gösterilmiştir.



Metabolizmanın işleyişi sırasında doğal bir işlem olan yükseltgenme sonucunda, organizmada çeşitli hasarlar yaratan ve kanser, kalp v.b. hayati öneme sahip bazı kronik hastalıkların başlatıcısı olan serbest radikallerin oluşumu, bunlarla mücadele eden antioksidan bileşiklere olan ilgiyi artırmış, bu konudaki çalışmalar daha çok gıdaların ve farmasötik preparatların antioksidan aktivitelerinin belirlenmesine yönelmiştir. Bu ilgi esas olarak yaşlanma sürecinde ve pek çok hastalığın patojenitesinde Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT; İng: ROS) yarattığı hasarlara yönelmiştir.

İnsanlarda yaşlanma ve kronik hastalıklar karmaşık biyolojik süreçler sonucu oluşur. Bu karmaşık süreçleri anlamak için çeşitli denenceler öne sürülmüş ve bunlar deneysel olarak sınanmıştır. Yaşlanma ile ilgili olarak ileri sürülen teoriler son yıllarda moleküler genetik ve deneysel tekniklerde sağlanan ilerlemeler ile açıklanmaya başlanmıştır. ROT'nin hücrede giderek artan bir şekilde oluşturduğu zararlar esas olarak, yaşlı (senescent) hücrelerde telomer erozyonu, genom kararsızlığı, DNA mutasyonları ve gen profillerindeki değişimleri kapsar (Wei ve Pang, 2005). Yaşlanma ile ilgili öne sürülen teorilerden en çok dikkat çeken “serbest radikaller” teorisidir. Bu teori ilk olarak Harman (1956) tarafından ileri sürülmüştür. Serbest radikal molekülleri eşlenmemiş elektron içeren, çok kararsız, diğer moleküllerle çok hızlı reaksiyona giren ve kimyasal olarak kararlı hale gelebilmek için elektron almaya gereksinim duyan moleküllerdir. Bir moleküle saldırdığında onun elektronunu alarak yükseltger ve bu yeni molekülün kendisi bir serbest radikal haline dönüşür. Bu şekilde başlayan bir zincir reaksiyonlar dizisi canlı hücrenin zarar görmesi ile sonuçlanır. Serbest radikallerin yarattığı en büyük zarar hücre zarları üzerinedir. Bunlar hücre zarlarından elektron çalarak eşlenir, hücre zarı ve sonuç olarak hücre yapısını bozar (Gökpınar ve ark., 2006).

Serbest radikallerin oluşumu organizmada oksijen kullanımı sırasında ortaya çıkar. Eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküller hücrelerin zarar gördüğü reaksiyonlar dizisini başlatır. Vücutta serbest radikallerin oluşumu katabolik parçalanmaların yanı sıra sağlıksız beslenme, sigara, ilaç tedavileri, alkol tüketimi, radyasyon, böcek ilaçları ve çevre kirliliği gibi nedenlerle başlamakta ve artmaktadır. Serbest radikaller bağışıklık sistemini zayıflatarak çeşitli hastalıklara ve erken yaşlanmaya neden olurlar. Bu dengelenmemiş serbest radikal saldırısı ve hücre zarının tahribatı “oksidatif stres” veya “yükseltgeyici gerginlik” olarak adlandırılır. Oksidatif stres, oksidatif lezyonlara, doku hasarına, mutasyonlara ve hücre ölümlerine yol açabilen reaktif oksijen ve reaktif azot türlerinin (çoğunlukla serbest radikallerin) aşırı üretimiyle tetiklenir. Oksidatif stres tüm canlılarda

gözlenebilir. İnsanlarda çeşitli kalp damar patolojileri (arterioskleroz ve hipertansiyon), diyabet, nörodejeneratif süreçler (özellikle Alzheimer ve Parkinson hastalıkları), hücre yıpranması ve yaşlanma, kıkırdak iltihabından gelen patoloji, solunum yolu hastalıkları (sistik fibroz ve astım), Down sendromu ve kanser gibi hastalıkların oluşumunda oksidatif stresin katkı yaptığı bilinmektedir (Valko ve ark., 2006,2007). Bu bakımdan antioksidanlar (yükseltgen önleyiciler), hücre koruyucu tedavi ve bozucu hastalıklardan korunmada önemlidir.

### **1.1. Antioksidanlar (Yükseltgen Önleyiciler)**

Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek veya mevcut radikalleri süpürerek hücrenin zarar görmesini engelleyen ve yapısında genellikle fenolik işlevsel gruplar taşıyan moleküllerdir (Kahkönen ve ark., 1999; Nagai ve ark., 2005). Vücutta kalkan görevi yapan bu kimyasal bileşiklerin özelliği, kendi elektronlarını vererek serbest radikalleri etkisizleştirmeleri ve bu sırada serbest radikal haline gelmemeleridir (Prior ve Cao, 1999). Antioksidanların insan sağlığındaki yerini belirleyen en önemli etmenler, onların kimyasal yapıları, çözünürlükleri, yapı/aktivite ilişkileri ve doğal kaynaklardan elde edilebilmeleridir (Kaur ve Kapoor, 2001). Canlı sistemlerde gerçekleşen bütün fizyolojik süreçler; enzim, hormon ve iz elementler gibi farklı etkenler tarafından yönetilen yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarının iç içe geçmiş hallerini içerir. Canlılarda yükseltgenme ve indirgenme dengesinde meydana gelebilecek herhangi bir değişiklik, hücrelerin ve doku işlevlerinin bozulmasına sebep olabilir. Antioksidan maddeler dokularda doğal olarak bulunur ve farklı yükseltgenme reaksiyonlarını düzenler. Ayrıca, antioksidan maddeler veya antioksidan savunma sistemlerinde bulunan bazı bileşenlerin kendi ürettiği maddenin (iç kaynaklı) sentezinde meydana gelebilecek bir yetersizlik, farklı hastalık türlerini meydana getirebilir (Cuttler ve Pryor, 1984).



Antioksidan savunma çeşitli mekanizmalarla etkisini göstermektedir. Bu mekanizmalar:

- ✓ Radikal metabolit üretiminin önlenmesi,
- ✓ Üretilmiş radikallerin temizlenmesi (radikallerin detoksifikasyonu),
- ✓ Hücre yapısı bozulmasının onarılması,
- ✓ İkincil radikal üreten zincir reaksiyonlarının durdurulması,
- ✓ İç kaynaklı yükseltgen kapasitesinin artırılması.

### **1.2. Doğal Antioksidan Bileşikler**

Reaktif oksijen türler, kardiyovasküler hastalıklar (CVD) ve kanser hastalıklarına sebep olabilirler. Kronik hastalıkların tedavisinde ve korunmalarında can alıcı besinler meyve ve sebzelerde bulunan biyoaktif antioksidan bileşiklerin varlığında sağlanır. Meyve ve sebzelerdeki doğal antioksidanlar farklı kimyasal yapılarına ve insan vücudundaki farklı etkilerine göre sınıflandırılırlar. Fitokimyasallar polifenoller, terpenoidler, N- bileşikleri, siyanojenik glikozitler, fitosteroller gibi biyoaktif bileşik sınıflarını içerirler. Herbir grup çok az farklı özellikleri ile benzer bileşenleri içerirler. Normal fizyolojik işlemlerde doğal antioksidanlar sinyal genetik bilgi aktarımı ve çoğalma/hücre ölümü dengesinin düzenlenmesinde etkilidir (Balsano ve Alisi, 2009).

### **1.3. Bitkisel Biyoaktif Bileşikler**

Doğal bileşiklere verilen önem her geçen gün artmaktadır. Bu bileşiklerin bir kısmı ise bitkiler tarafından ikincil metabolizma ürünleri olarak sentezlenen moleküller olup, sinyal (haberci) olarak ve mikroorganizma, insektisit, herbisit ve serbest radikallere karşı koruyucu olarak rol oynarlar. Bu nedenle (karbohidratlar, proteinler ve yağların sentezinden sonra) bunlar *ikincil bitki ürünleri* veya *fitokimyasallar* diye adlandırılırlar. Bitkiler sınırsız aromatik ve alifatik madde sentezleyebilme kabiliyetine sahip olup bunların çoğu fenolik bileşikler veya bunların oksijen ile bağlanmış halleridir.

### **1.4. Bitkisel Biyoaktif Bileşikleri Elde Etme Yöntemleri (Özütleme Teknikleri)**

Bitkisel materyal toplanıp kurutulduktan sonra içerdiği etken maddeleri elde etmek için özütleme ve kararlı kılma işlemine tabii tutulur (Baytop, 1986). İlgilenilen türe göre özel yöntemler bulunmakla birlikte yaygın olan yöntemler şu şekilde özetlenebilir.

**1.4.1. Kaynar alkol yöntemi**

Materyalin % 80'lik etanol veya metanolde 1 saat kaynatılmasından ibarettir. Bir kısım materyal için beş kısım alkol kullanılır. Bu şekilde hem kararlı kılma hemde özütleme yapılmaktadır.

**1.4.2. Alkol buharı yöntemi**

Taze ve kuru materyalin belli bir süre boyunca metanol buharı ile özütlenmesi işlemidir. Özellikle çabuk bozunan türlerin özütlenmesi için uygulanabilir. Çoğunlukla Sokshelet düzeneğinde birkaç saat içinde gerçekleştirilebilir.

**1.4.3. Çeşitli organik çözücülerle özütleme**

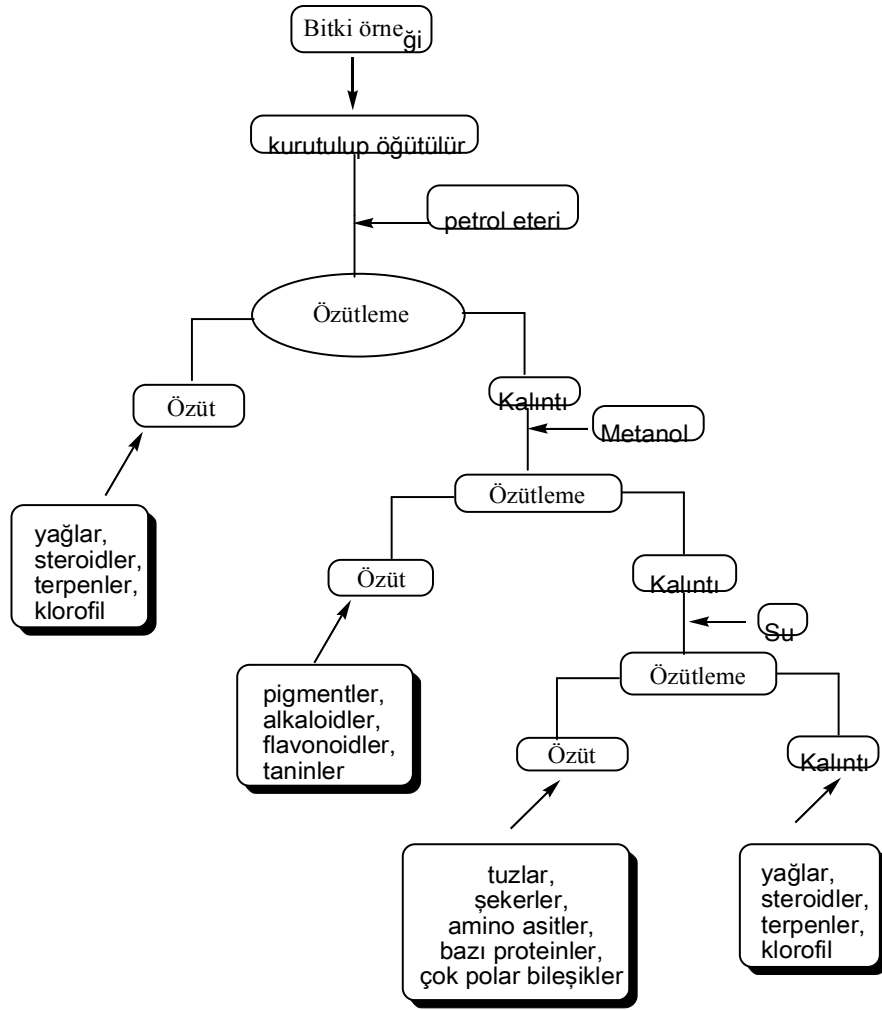
Aseton, hekzan, diklorometan, kloroform gibi çeşitli çözücüler ve çözücü karışımları kullanılarak soğuk veya sıcak şartlarda çalkalama yoluyla çoğu kimyasal özütlenebilir (Şekil 2).

**1.4.4. Sokshelet özütleme yöntemi**

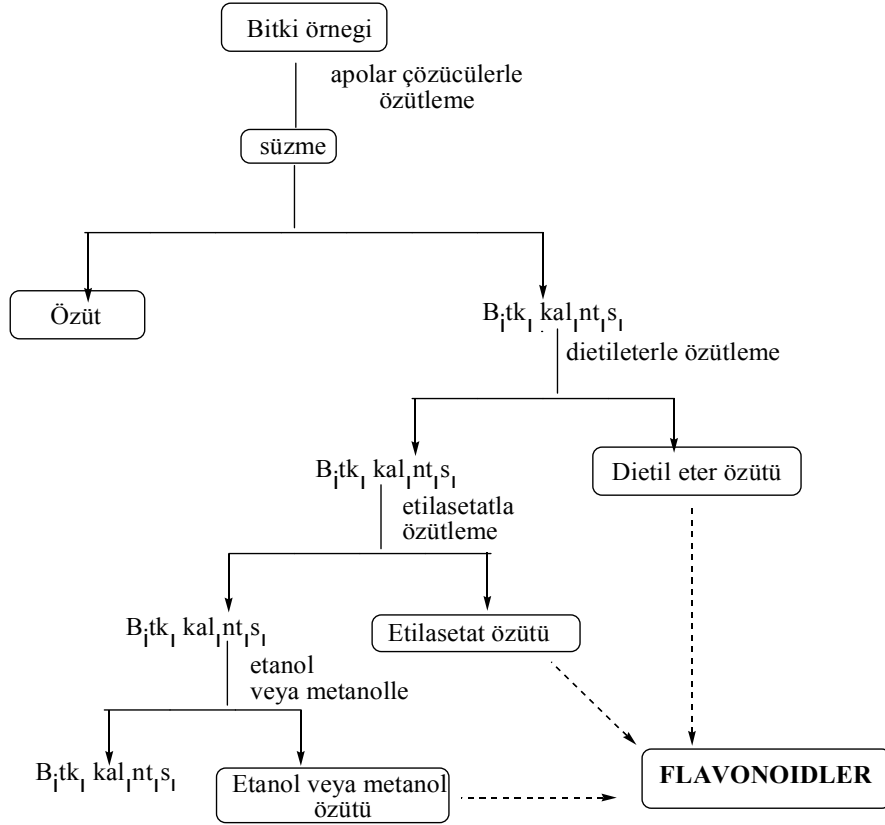
Katı materyal kurutulur, küçük parçalara ayrılır ve bu katı parçacıklar selülozdan yapılmış olan özütleme kartuşuna doldurulur. Bu kartuş da özütleme kolunun içine yerleştirilir. Cam balona çözücü olarak kullanılacak kimyasal madde konulur ve ısıtıcı yardımıyla bu maddenin buharlaşması sağlanır. Buharlaşan çözücü özütleme kolundan geçerek geri soğutucuya ulaşır. Geri soğutucuda yoğunlaşan çözücü tekrar özütleme koluna gelerek kartuş içerisinde bulunan maddeyi çözer ve cam balona geri döner. İşte bu işlem sürekli tekrarlanarak özütleme tamamlanmış olur. Sokshlet ile katı-sıvı özütleme yöntemi sonucunda elde edilen özütler ve bu özütlere geçen biyoaktif bileşenler Şekil 1'de gösterilmiştir.

**1.4.5. Süper kritik akışkan özütlemesi**

CO<sub>2</sub> çözücü olarak kullanılır. Özel çelik kaplara doldurulan bitkisel materyal içinden süper kritik CO<sub>2</sub> geçirilerek etken maddeler hem çok kısa sürede hem de sıcaklık olmaksızın özütlendiğinden bozunmadan ayrılabilir.



Şekil 1. Bitki örneğine uygulanan katı-sıvı özütleme işleminin şematik gösterimi (Erdik, 2007).



Şekil 2. Bitkilerde bol miktarda bulunan flavonoidlerin seçici özütleme yöntemiyle ayrılması.

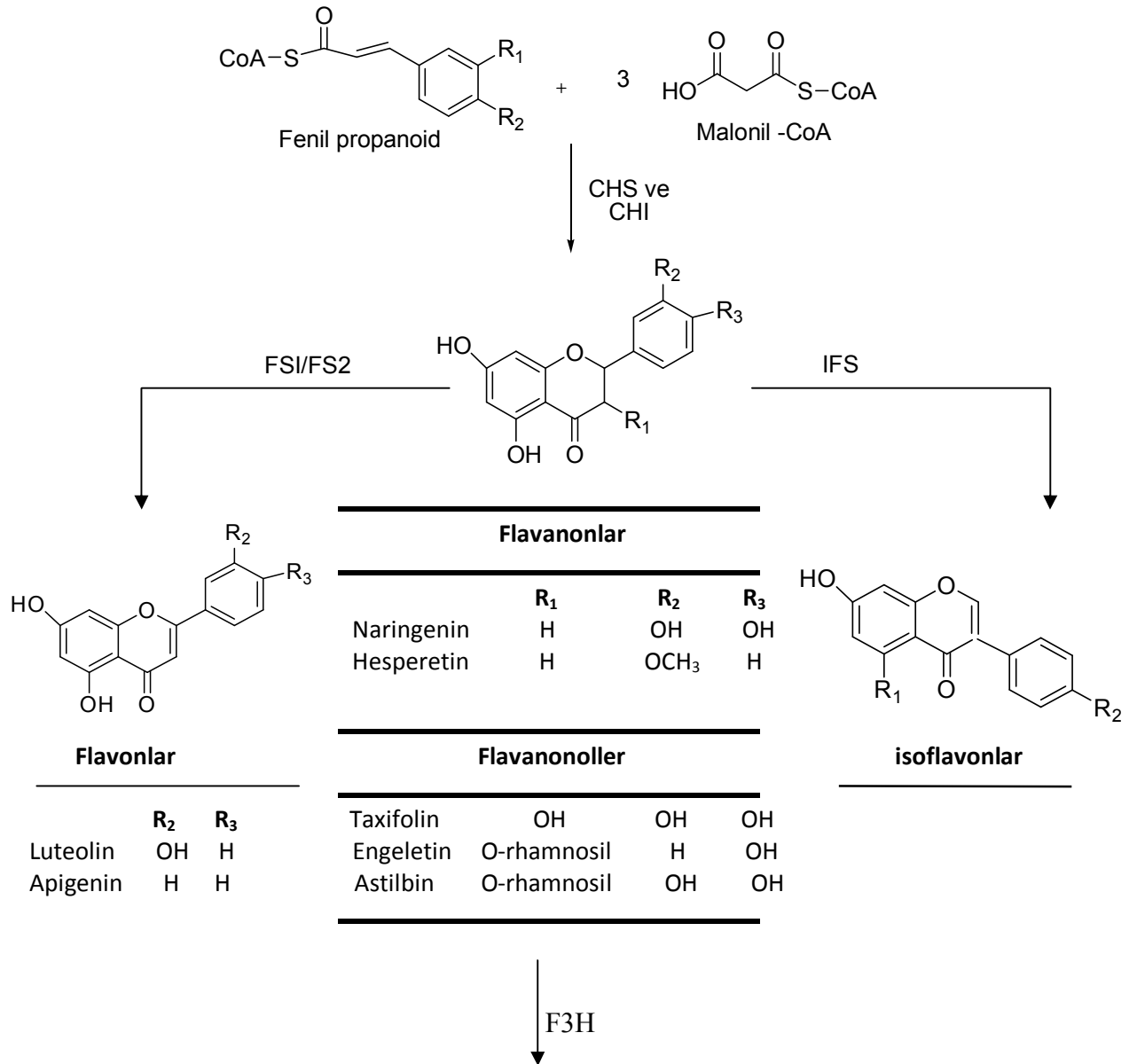
### 1.5. Polifenolik Bileşikler

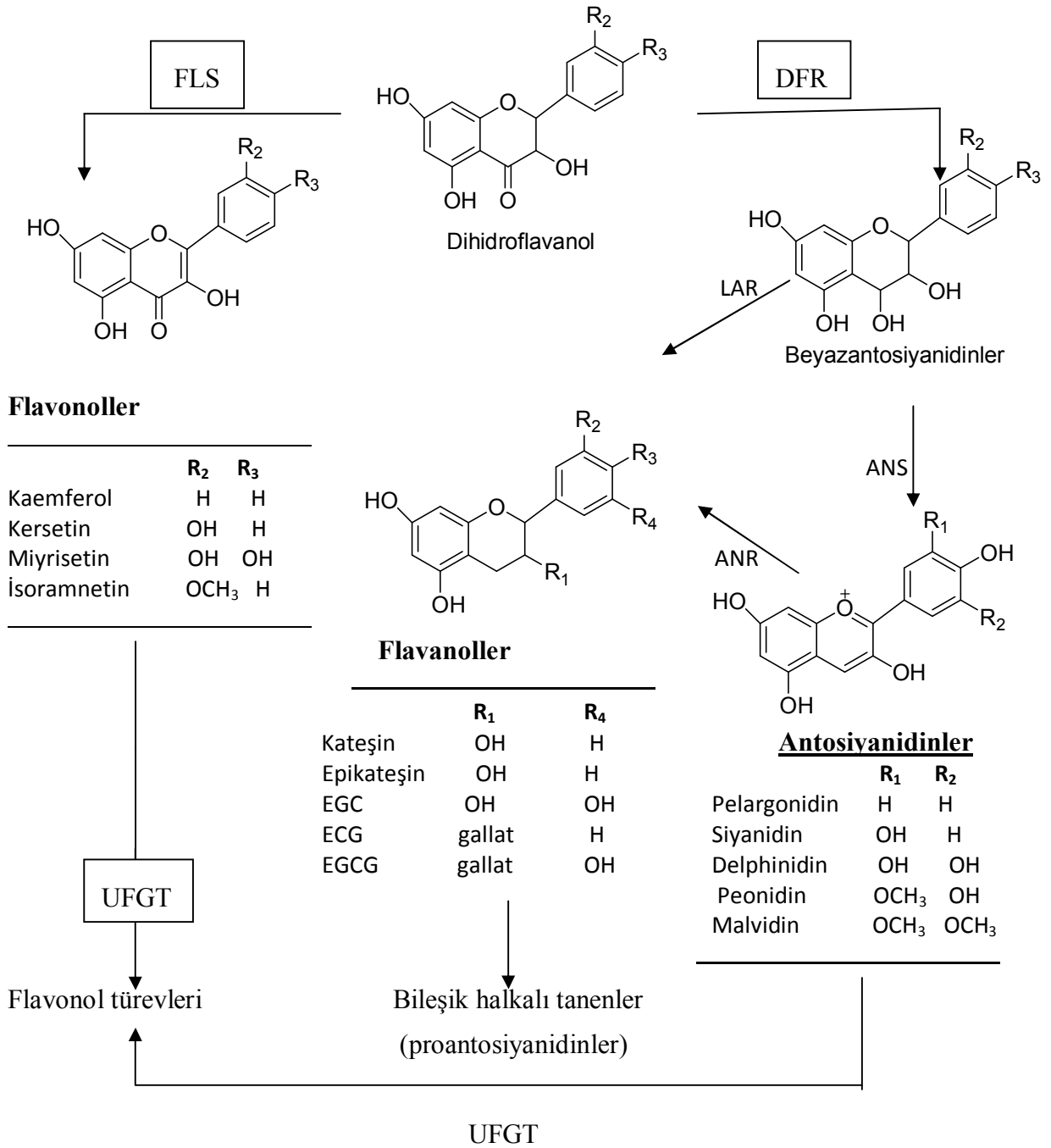
Fenolik bileşikler bir veya daha fazla hidroksil grubu içeren aromatik yapılardır. Polifenollerin serbest radikal süpürücü kapasitesi için ideal kimyasal yapıya sahip oldukları ve derişim düzeyinde *in vitro* olarak  $\alpha$ -tokoferol ve vitamin C'den daha etkin antioksidan özellik gösterdikleri ispatlanmıştır (Rice-Evans ve ark., 1997). Polifenollerin hidroksil (OH•), azid (N<sub>3</sub>•), süperoksit (O<sub>2</sub>•-), lipid peroksil (LOO•) ve model t-bütül alkoksil (t-BuO•) radikalleri ile ilişkileri, reaksiyonların hız sabitleri ve antioksidan radikalın kararlılığı konusunda pek çok çalışma yapılmıştır (Rice-Evans ve ark., 1997).

Üye sayısı itibariyle polifenoliklerin en büyük grubunu oluşturan flavonoidlerin ilk olarak belirlenen biyolojik özelliği kılcar damar duvarlarına etkileridir. Bu bileşiklerin kılcal damar sistemine olumlu etkisi, genellikle kan sızdırmanın önlenmesinde, kırılgnalık ve geçirgenliğin ortadan kalkmasında kendini göstermiştir. Flavonoidlerden flavon ve

flavonoller, kateşinler ve flavanonlar kılcal damarların tedavisinde etkili oldukları tespit edilmiştir. Flavonoidlerin kanın bileşenleri üzerine etkisi de açıklanmıştır. Örneğin; *Hedusarum* L. türünün toplam flavonoidlerin eritrosit oluşumunu teşvik ettiği ve kanda lökositlerin miktarını arttırdığı açıklanmıştır (Ruş ve Kulikov, 1971). Başka bir araştırma sonuçlarına göre kersetin, rutin ve bazı flavonoller zayıf hipodinamik, nabızı normalleştirme özelliğine sahiptirler (Jeney ve Uri, 1954). Bazı flavonoidler barsakların kuvvetini yükselterek, hazım kolaylaştırıcı etki gösterirler (Borkowski ve Krug, 1960). Flavonoidlerin temel sınıfları ve biyosentezleri Şekil 3’de ayrıntılı şekilde gösterilmiştir (Spencer, 2010).

Vücutta hücre içi ve dışındaki oksidasyon işlemlerini azaltan antioksidan maddeler cilt sağlığı açısından da önemlidir. Bu maddeler cilde elastikiyet kazandırıp, parlak, renkli ve sağlıklı bir görünüm vermekte, *Herpes simplex* virüsünün yol açtığı deri yaralarını da bir ölçüde önlemektedir. Böylece deri kanserine karşı da koruyucu etki göstermektedir (Wetherilt, 1996).





Tüm flavonoidler 3-malonil CoA ve fenilpropanoid'ten türemiş kalkon öncüllerinden dönüşerek CHS (kalkon sentaz) aracılığıyla biyosentezlenmiştir. Bazı flavonoid sınıflarının oluşumunu çeşitli enzimler meydana getirir. (kalkon izomeraz) CHI, kalkon isomeraz (CHI), flavon sentaz (FSI/FS2), isoflavon sentaz (IFS), flavanon 3-hidroksilaz (F3H), dihidroflavanol reduktaz (DFR), antosiyandin sentaz (ANS), beyaz antosiyandin redüktaz (LAR), anthosiyandin redüktaz (ANR), UDP glukoz-flavonoid 3-O-glukozil transferaz

(UFGT), flavonol sentaz (FLS). EGC, epigallokateşin; ECG, epikateşin gallat; EGCG, epigallokateşin gallat (Spencer, 2010).

Şekil 3. Flavonoidlerin temel sınıfları ve biyosentezleri (Spencer, 2010).

### **1.5.1. Flavonoidlerin yapı-etkinlik bağıntıları**

Canlı organizmanın serbest radikallerin etkisinden korunması için, antioksidatif koruma sistemine sahip olduğu bilinmektedir. Bazı durumlarda antioksidatif koruyucu sistemin yetersiz kalmasından dolayı, serbest radikal oluşumunda belli bir artma meydana gelir. Bu durum serbest radikal mekanizmalı hasarın meydana çıkmasına neden olur. Bu ‘oksidatif baskı’ terimi ile belirtilir. Eğer düşük seviyede bir yükseltgeyici baskı oluşursa, dokular bunu karşılayacak şekilde ilave antioksidan savunma sistemi oluştururlar. Ancak meydana çıkan şiddetli bir antioksidatif baskı hücrelerin hasarına, hatta ölümüne neden olur. Serbest radikallerin sebep olduğu hücre ölümü, doku ölümüne ve beyin damarlarının tahribatına kadar ilerleyebilir. Yükseltgeyici baskıyı arttıran etkenlerden biri, serbest radikallerin oluşmasına ve antioksidanların azalmasına neden olan bazı toksinlerdir.

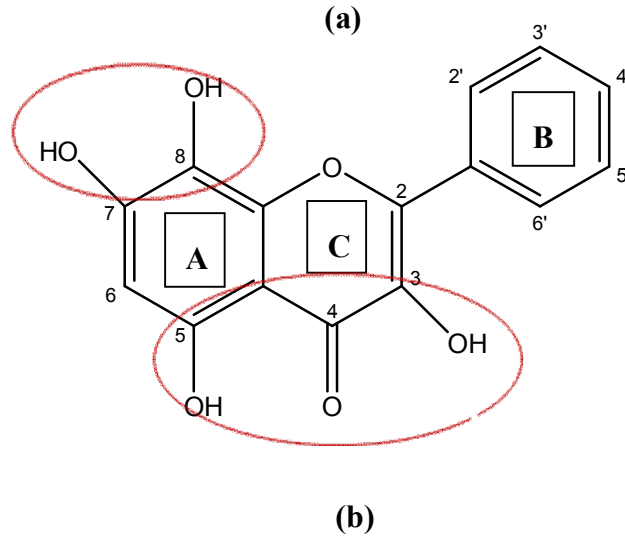
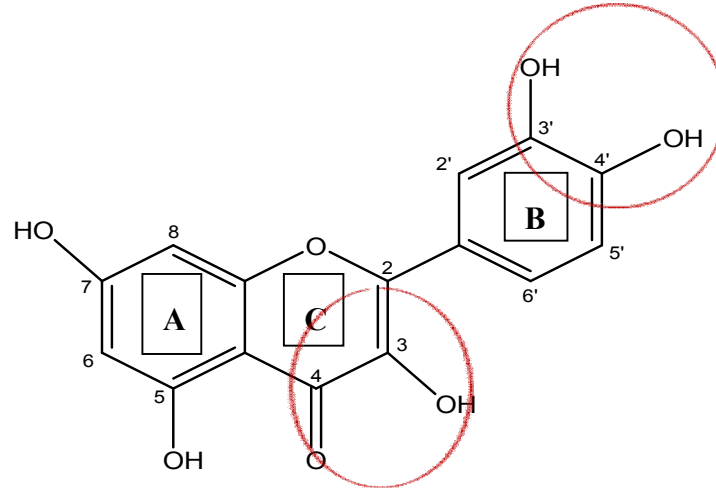
Oksijenin etken türlerinin etkilerine ilk önce maruz kalan doku bileşenlerinden başlıcaları, lipidlerin doymamış yağ asitleri ve hücre membranlarının temel kısımlarını oluşturan fosfolipidlerdir. Doğal flavonoidler içinde antioksidan özellikli bileşiklerin belirlenmesi ve bunların antioksidatif etkilerinin açıklanması flavonoidlere karşı ilginin daha da artmasına neden olmuştur.

Kateşinler ve kersetin ile yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar bu bileşiklerin sulu ortamda oksijen radikallerinin etkisiyle başlatılan membran lipidlerinin peroksidasyonunu  $\alpha$ -tokoferole göre daha aktif olarak önleyen lipofilik antioksidanlar olduklarını göstermiştir.

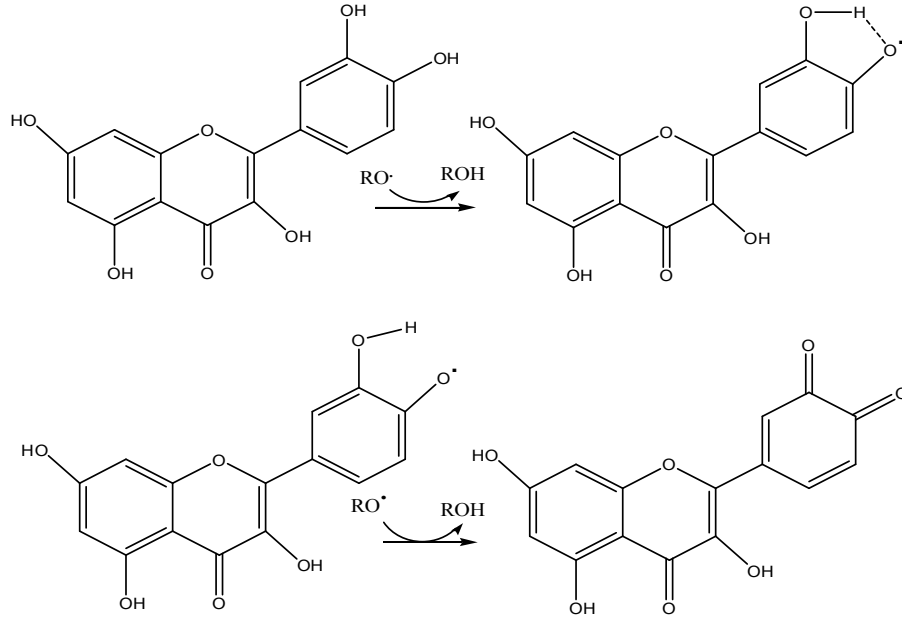
Flavonoidlerin yapı özellikleri ile antioksidan etkinlikleri arasındaki bağıntı ise; 3-OH, C-2 ve C-3 atomları arasında doymamış bağ ve C-4 konumunda (piron halkasında) karbonil grubu bulunmasının antioksidan özelliğe olumlu etki yaptığı gösterilmiştir. C halkasındaki 2,3-çift bağın 4-okso grubuyla konjugasyonu B-halkasının elektron kaymasına katkıda bulunur. A ve C halkalarında bulunan C-3 ve C-5 –OH grupları ise 4-okso grubuyla birlikte en yüksek radikal uzaklaştırma etkisi sağlar. B-halkasında bulunan



o-dihidroksi grubu elektron kaymasına etki ederek yüksek kararlılıkta flavonoid radikalinin oluşmasına neden olur (Cao ve ark., 1997) (Şekil 4).



Şekil 4. Yüksek antioksidan etkinliği ile flavonoidlerin yapısal özellikleri (a) Molekülde 3',4'-konumlarında –OH grubunun bulunması elektron delokalizasyonuna etki ederek yüksek kararlılıkta flavonoid radikalini oluşturur (Şekil 5). Konjugasyon B halkasının elektron delokalizasyonuna katkı sağlar, (b) Maksimum radikal uzaklaştırma etkisi sağlar (Amić ve ark., 2007; Cao ve ark., 1997).



Şekil 5. 3',4'-diOH flavonoidlerin antioksidan etkiye mekanizması (Amić ve ark., 2007).

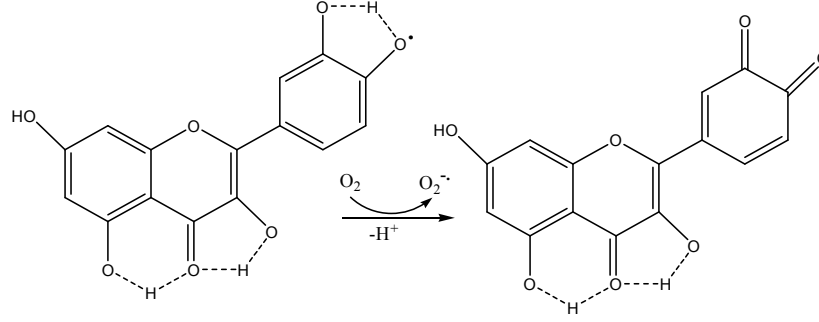
İzoflavonlar, yapılarında bulunan 4-karbonil ve 5-hidroksi grubunun, oluşan izoflavon radikaline sağladıkları kararlılık nedeniyle, flavonlara göre daha etkilidirler (Babu ve Liu, 2008). Flavonollerin (kersetin, flavanollerden (kateşin) daha etkili antioksidan olduğu ileri sürülmüştür (Cao ve ark., 1997). Kersetin ve başka flavonoller yukarıdaki özelliklere sahip oldukları halde, kateşin sahip değildir. Flavonol yapısında metoksi gruplarının bulunması da antioksidatif aktiviteye katkıda bulunur.

Kateşinler doğrudan yükseltgeyici hasardan ve reaktif oksijen türlerin kararlılığından korurlar. Kateşinlerin serbest radikal süpürücü mekanizmaları elektronların kaymasını, molekül içi ve molekül dışı hidrojen bağının oluşumunu, moleküllerin düzenlenmesini ve yükseltgemeye ilişkili metallerin bağlanmasını içerir. Etkisi fenolik gruplarının düzenlenmesine ve sayısına bağlıdır. Kateşinler çok güçlü elektron vericidirler ve süperoksit anyonlar, singlet oksijen, nitrik oksit ve peroksinitrit gibi serbest radikalleri etkili bir şekilde süpürürler. Kateşin bileşiklerinin süpürücü kapasitesi orto-dihidroksil ve orto-hidroksiketol gruplarının sayısına, C2-C3 çift bağına, derişimine, çözünürlüğüne ve reaksiyon ürününün kararlılığına bağlıdır. Antioksidan kapasitesi B halkasındaki hidroksil gruplarının sayılarının azalması ile azalır. Bu hidroksil gruplarının sayısı kateşinlerin önemli derecede hidroksil süpürücü aktivitesine katkıda bulunur. Heterosiklik doymamış halkaya sahip olan kateşinlerde, ROT, B halkasındaki orto-dihidroksi konumuna saldırır. 3

farklı halkadaki hidroksil grupları (A'nın C5 ve C7, B'nin C3' ve C4' ve C'nin C3) lipid peroksidasyonunun önlenmesini kolaylaştırır. Ayrıca B halkasındaki orto-hidroksil grupları süperoksit anyonunun süpürülmesinde etkilidirler. A ve B halkaları arasındaki konjugasyon fenoksil radikallerine kararlılık sağlar. EGCG en etkili çay antioksidanıdır, orto-trihidroksi grupları ve 3-gallat esterleri antioksidan aktiviteye katkı sağlar. Çay kateşinleri geçiş metal katalizli serbest radikal oluşumuna karşı hücreleri korur ve B halkasındaki 3', 4' hidroksil grupları metallerin bağlandığı öncelikli konumlar olarak raporlanmıştır. Buna ilaveten çay kateşinlerinin öncü-yükseltgen olarak davranış sergilediğini sayısız çalışma raporlamıştır ve ROT oluşumu boyunca oksidatif hasara sebep olur. Kateşinler hücre kültür koşulları altında kararsızdır ve hidrojen peroksit ile oksidatif polimerizasyona maruz kalır. EC ve EGCG süperoksit anyonu ve hidroksil radikallerini meydana getirebilir. Öncü-yükseltgen etkisinin moleküllerindeki orto-dihidroksi gruplarının hidroksil üzerine bağlı olduğunu göstermiştir. Bu öncü-yükseltgen özellikleri sadece laboratuvar koşulları altında yapılan çalışmalarda görülmüştür (Babu ve Liu, 2008).

### **1.5.2. Flavonoidlerin öncü-yükseltgen etkinliği**

Flavonoidlerin B halkasındaki –OH gruplarının varlığı antioksidan aktiviteye katkı sağlamasına rağmen, kanser gelişiminde önemli işlemler olan immün endotel hücre kohalenti ve damar gelişimi gibi biyolojik olaylarda önemli rol oynarlar. Bors ve ark., (1995) tarafından kararlı flavonoid fenoksil radikalinin bazen şüphe uyandırdığını ve öncü-yükseltgen etki gösterdiğini rapor edilmiştir. Öncü-yükseltgen aktivite tamamen –OH gruplarının toplam sayısı ile orantılıdır. Flavonoid fenoksil radikali kinonları ve süperoksit anyonu oluşturan oksijen ile etkileşebilir, ardından zincir reaksiyonu sonlanır. Bu reaksiyon geçiş metal iyonlarının yüksek düzeylerinin varlığında gerçekleşir ve flavonoidlerin istenmeyen öncü-yükseltgen etkilerine cevap verir. Aynı flavonoid bileşiği yükseltgen ve öncü-yükseltgen olarak davranabilir. Van Acker ve ark., (1996) çok etkin antioksidanların öncü-yükseltgenlar olabileceğini olası görmüştür. Yoshino ve ark., (1999) A veya B halkasındaki katekol yapısına sahip bileşiklerin öncü-yükseltgen etki gösterdiğini belirtmiştir. DNA'ya bağlı Cu(II) tarafından katekolun yükseltgenmesi konum seçici DNA hasarından sorumlu reaktif oksijen türleri oluşturabilir. Cu(II) ile tepkimeye giren kersetin geniş DNA hasarını uyarırken, kamferol ve luteolin daha az DNA hasarını uyarmıştır (Amić ve ark., 2007).



Şekil 6. Flavonoidlerin Öncü-yükseltgen Özelliği (Amić ve ark., 2007).

### 1.5.3. Flavonoidleri belirlemede kullanılan çözücü sistemleri

Az miktarda ve karışım halinde bulunan flavonoidler, silikajel, poliamid ve selüloz gibi soğurucularla preparatif ince tabaka kromatografisi uygulanarak birbirlerinden ayrılabilirler. Kullanılan çözücü sistemleri, flavonoidlerin tipine göre değişir. Çözücü sistemlerine örnekler Çizelge 1’de görülmektedir (Harborne ve Mabry, 1982). Elde edilen özütler ayırmsallaştırılmak isteniyorsa kolon kromatografisi kullanılır. Çizelge 2’de sol sütun ilk olarak kullanılacak çözücüyü, sağ sütun belirli oranlarda eklenecek polar çözücüyü gösterirken, orta sütun artan oranları göstermektedir. Örneğin kloroform ve etilasetat’ın % 50’lik karışımlarının ayırma gücü, dietil eter ve metanol’ün 80:20’lik bir karışımın gücü ile aynıdır (Markham ve ark., 1982).

Çizelge 1. Flavonoidlerin kolon kromatografisinde kullanılan çözücüleri ve oranları

<i>Temel çözücü</i>	<i>Ayrırma gücünün yükselmesi</i> →	<i>Eklenen çözücü</i>
Kloroform	50:50	Dietil eter
	50:50	Etil asetat
	50:50	Aseton
	40:60	Metanol
	20:80	

Dietil eter	50:50	Etil asetat
	50:50	Aseton
	80:20	Metanol
Etil asetat	50:50	Aseton
	80:10	Metanol
Aseton	90:10	Metanol

Çizelge 2. Preparatif ince tabaka kromatografisinde kullanılan çözücü sistemleri

Flavonoid	Çözücü Sistemi
Flavonlar	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> /C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> N/HCOOH (36/9/5); EtOAc/C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> (45:55)
Flavon- <i>O</i> -glikozitleri	PrOH/EtOAc/H <sub>2</sub> O (3/2/1); MeOH/AcOH/H <sub>2</sub> O
Flavonoller	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> /C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> N/HCOOH (36/9/5); CHCL <sub>3</sub> /Me <sub>2</sub> CO/HCOOH (9/2/1)
Flavonol- <i>O</i> -glikozitleri	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> /C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> N/HCOOH (36/9/5); EtOAc/MeOH /H <sub>2</sub> O (100/16,5/13,5)
Flavonlar	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> /MeCOEt/MeOH (90/5/5)
Flavon- <i>O</i> -glikozitleri	CHCL <sub>3</sub> /MeOH/2-bütanol (5/3/1); MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)

### 1.6. Antioksidan Etkinlik Tayin Yöntemleri

Antioksidanlarla ilgili bilimsel makaleler incelendiğinde farklı araştırmacılar tarafından antioksidan kapasiteyi tanımlamak için farklı terimlerin kullanıldığı görülür. Karşılaşılabilecek terimler toplam antioksidan “kapasite” veya “etkinlik”, “güç”, “parametre”, “potansiyel”, “potens” ve “aktivite” dir. Bir kimyasalın “aktivitesi” basınç, sıcaklık, reaksiyon ortamı, diğer reaktifler gibi özel reaksiyon koşulları belirtilmedikçe anlamsızdır. Tek bir analiz yöntemi ile ölçülen “antioksidan aktivite” o yöntemde uygulanan özel koşullardaki kimyasal reaktiviteyi yansıttığından verileri “toplam antioksidan aktivitenin” göstergesi olarak genellemek uygun olmayabilir ve yanıltıcıdır. Bu

nedenle “aktivite” terimi yerine farklı deneylerde elde edilen sonuçları “kapasite” olarak sunmak önerilmektedir. Ya da “peroksil radikal süpürücü kapasite”, “süperoksit süpürücü kapasite”, “demir iyonu indirgeme kapasitesi” gibi ölçüm yöntemini daha özel olarak belirten terimlerin kullanılması da önerilmektedir (Koleva ve ark., 2002).

Antioksidan kapasite tayin yöntemleri, kullanılan kimyasal reaksiyon açısından temel olarak iki sınıfta toplanabilir:

*i) Hidrojen Atomu Aktarımı reaksiyonuna dayananlar (HAA; İng. HAT)*

*ii) Tek Elektron Aktarımı reaksiyonlarına dayananlar (TEA; İng. SET)*

HAA ve TEA esaslı yöntemler bir örneğin koruyucu antioksidan kapasitesi yerine radikal (veya oksidan) süpürücü kapasitesini ölçmeye dönüktür (Lopez-Alarcon ve Lissi, 2005). HAT temelli yöntemlerin birçoğu azobisiklerin bozulması ile oluşan peroksil radikalleri için antioksidan ve substratın rekabetine dayanan yarışmacı reaksiyonları kullanmaktadır (Albayrak ve ark., 2010).

- ❖ İndüklenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein otooksidasyonu,
- ❖ Oksijen radikal soğurma kapasitesi (ORAC)
- ❖ Toplam radikal yakalama antioksidan kapasitesi (TRAP)
- ❖ Krosin ağartma deneyleri olarak sıralanabilir.

ET temelli yöntemler antioksidanın oksidantı indirgeme yeteneğini renk değişimi ile ölçer. Renk değişiminin derecesi örneklerin antioksidan derişimi ile alakalıdır. TEA esaslı analiz yöntemleri (Albayrak ve ark., 2010),

- ❖ Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile toplam fenolik madde analizi
- ❖ Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) ölçümü
- ❖ Ferrik iyonu indirgeme antioksidan gücü (FRAP) ölçümü
- ❖ Cu (II) kompleksini yükseltgen olarak kullanılan “toplam antioksidan kapasite” ölçüm yöntemi
- ❖ DPPH kullanarak “toplam antioksidan kapasite” ölçüm yöntemi
- ❖ CUPRAC (Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi olarak sıralanabilir.

Bu yöntemlerden FCR’in antioksidanın indirgeme kapasitesinin belirlenmesinde ve ORAC’ın ise antioksidan radikal süpürücü kapasitesinin belirlenmesinde kullanılması önerilmektedir (Lopez-Alarcon ve Lissi, 2005).

Yukarıda bahsedilen tüm yöntemlerin bir bitkinin antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde kullanılması mümkün olmakla birlikte, örnekteki antioksidan maddelerin moleküler çeşitliliği bu yöntemler arasında her zaman doğrusal ilişki oluşmasını engelleyebilir. Bu nedenle tek bir yöntem kullanarak bitkinin antioksidan kapasitesi hakkında karar vermek uygun olmayabilir.

Antioksidan kapasiteyi ölçmek için bu güne kadar çok sayıda yöntem geliştirilmiştir (Cao ve Prior, 1999; Somogyi ve ark., 2007; Pellegrini ve ark., 2003; Huang ve ark., 2005; Decker ve ark., 2005). Bitkilerin antioksidan kapasitelerinin tayini söz konusu olduğunda literatürdeki sonuçlar açıkça göstermektedir ki antioksidan aktivite seçilen tayin yöntemine son derece bağlıdır ve gözlenen antioksidan aktivite (veya kapasite) ile bitki özütlerinin toplam fenolik içeriği arasında tam bir doğrusal ilişki gözlenmeyebilir (Dorman ve ark., 2003; Trouillas ve ark., 2003; Miliauskas ve ark., 2004).

Tez kapsamında kullanılan antioksidan aktivite tayin yöntemlerinin ilkeleri aşağıda açıklanmıştır.

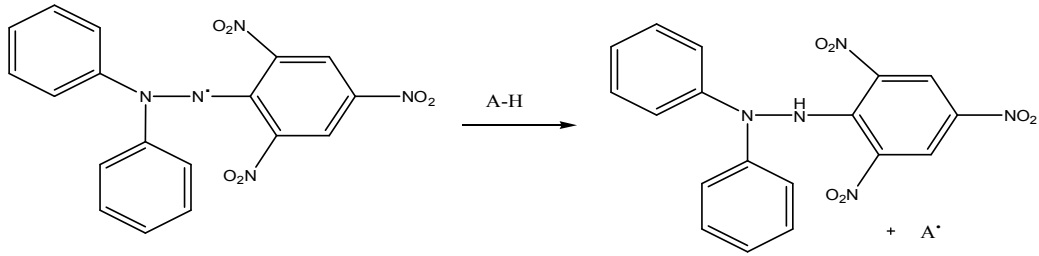
#### **1.6.1. DPPH radikal süpürücü antioksidan kapasite yöntemi**

Bu yöntem ilk kez Blois (1958) tarafından 1,1-difenil-2-pikril hidrazil (DPPH) radikallerinin antioksidan moleküllerin tayininde kullanılabileceğinin önerilmesi ile ortaya çıkmıştır. Antioksidan aktivite ölçümlerinin yoğunlaştığı yıllarda Brand-Williams ve arkadaşları (Brand-Williams ve ark., 1995) yöntemi geliştirmiş ve bu yöntem pek çok araştırmacı tarafından kaynak olarak kullanılmıştır.

Yöntemin esası DPPH içeren çözelti ile hidrojen atomu verme eğilimi olan bir molekülün (antioksidan) çözeltisinin karıştırılması sonucu DPPH radikalının indirgenmesine ve çözeltinin başlangıçta mor olan renginin kaybolmasına dayanır. Mor renkli çözeltinin 520 nm civarındaki soğurmanın azalması ölçülerek reaksiyon takip edilir.

Antioksidan etki başlangıçtaki DPPH derişiminin % 50'sinin azalması için harcanan antioksidan miktarını ifade eden IC<sub>50</sub> (etkin derişim) değeri ile verilir (Brand-Williams ve ark., 1995). DPPH yöntemi teknik olarak basit olmasına karşın bazı olumsuzlukları bulunmaktadır. Birçok antioksidan bileşik lipid peroksidasyonunda rol oynayan peroksil radikalleri ile çok hızlı tepkime vermektedir, ancak DPPH ile yavaş tepkime vermektedir. Örneğin askorbik asit ile 1,15 dakika ve rutin bileşiği ile 103 dakikada tepkime vermektedir. Sonuç olarak antioksidan kapasitenin doğru bir şekilde ifade edilemediği

düşünülebilir. Ayrıca, DPPH ile antioksidan bileşik arasındaki reaksiyon kinetiğinin DPPH derişimi ile her zaman doğrusallık göstermediği de bilinmektedir (Huang ve Prior, 2005; Molyneux, 2004). Teknik olarak basit ve hızlı bir yöntemdir. Fakat uygulamasını sınırlandıran bazı olumsuzluklara sahiptir. Uzun ömürlü azot radikali olan DPPH, lipid peroksidasyonu ile ilişkili olan hayli reaktif ve kısa ömürlü peroksil radikallerine benzerlik göstermez. Peroksil radikalleri ile hızla reaksiyona giren birçok antioksidan DPPH ile yavaş reaksiyona girebilir, hatta hiç reaksiyona girmeyebilir (Huang ve Prior, 2005; Prior ve ark., 2005; Magalhães ve ark., 2008).



Şekil 7. DPPH radikalının antioksidan ile etkileşim reaksiyonu (Albayrak ve ark., 2010).

### 1.6.2. Folin-Ciocalteu yöntemi ile toplam fenolik bileşen tayini

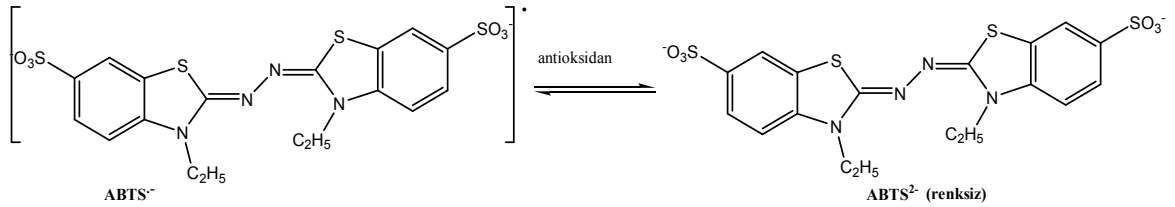
Bu yöntem Singleton ve Rossi (1965) tarafından önerilmiş ve daha sonra farklı uygulayıcılar tarafından geliştirilmiştir. Folin-Ciocalteu reaktifi (Folin Fenol Reaktifi veya Folin-Denis reaktifi) fosfomolibdat ve fosfotungstat karışımı bir reaktif olup fenolik ve polifenolik antioksidanların kolorimetrik tayininde kullanılır (Singleton ve ark., 1965). Yöntem denenen materyalin reaktifin yükseltgenmesini önlemesi için gerekli miktarını ölçer (Vinson ve ark., 2005). Ancak bu reaktifin sadece toplam fenolik bileşik miktarını ölçmediği ve örnek içinde mevcut tüm indirgen maddelerle de reaksiyon vereceği bilinmektedir. Bu nedenle reaktifin sadece örnekteki fenolik bileşen düzeyini değil örneğin toplam indirgeme kapasitesini de ölçtüğü konusunda tartışma vardır (Ikawa ve ark., 2003). Buna rağmen Folin-Ciocalteu reaktifi ile toplam fenolik bileşen miktarı tayini hemen hemen tüm antioksidan çalışmalarında örnekteki fenolik içeriğinin tayininde kullanılan standart bir yöntemdir. Ayrıca bu reaktifin ilaç analizinde (Rao ve ark., 1978), gıda



ürünlerinde (Mogalhaes ve ark., 2006) fenolik bileşen düzeyi veya indirgeme kapasitesi ölçümleri için genişletilmiş veya düzenlenmiş uygulamaları vardır.

### 1.6.3. Troloks eşiti antioksidan kapasite (TEAC)yöntemi

Troloks [(±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit], E vitamininin suda çözünür eşdeğeridir (Re ve ark., 1999). Troloks canlı sistemlerde doğal olarak bulunan bir bileşik olmamakla birlikte pek çok antioksidan kapasite tayin yönteminde standart olarak kullanılır. Genellikle belli bir derişim aralığında Troloks antioksidan olarak kullanılarak bir çalışma grafiği hazırlanır ve bilinmeyen antioksidanın etkisi bu grafikten Troloks eşdeğeri olarak okunur. TEAC yöntemi ilk olarak Miller ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (Miller ve ark., 1993). Kromojenik bir redoks radikali olan ABTS [2,2'-azinobis(3- etilbenzotiyazolin 6-sülfonat)] aynı zamanda kararlı bir radikaldir. Hem suda hem organik çözücülerde çözüdüğünden hem hidrofilik hem de hidrofobik antioksidan aktivite tayininde kullanılabilir. TEAC yöntemi, antioksidan varlığında çözültideki ABTS radikalinin soğurmasındaki azalmanın ölçülmesine dayanmaktadır (Rice-Evans ve Miller, 1984; Pellegrini ve ark., 1999).



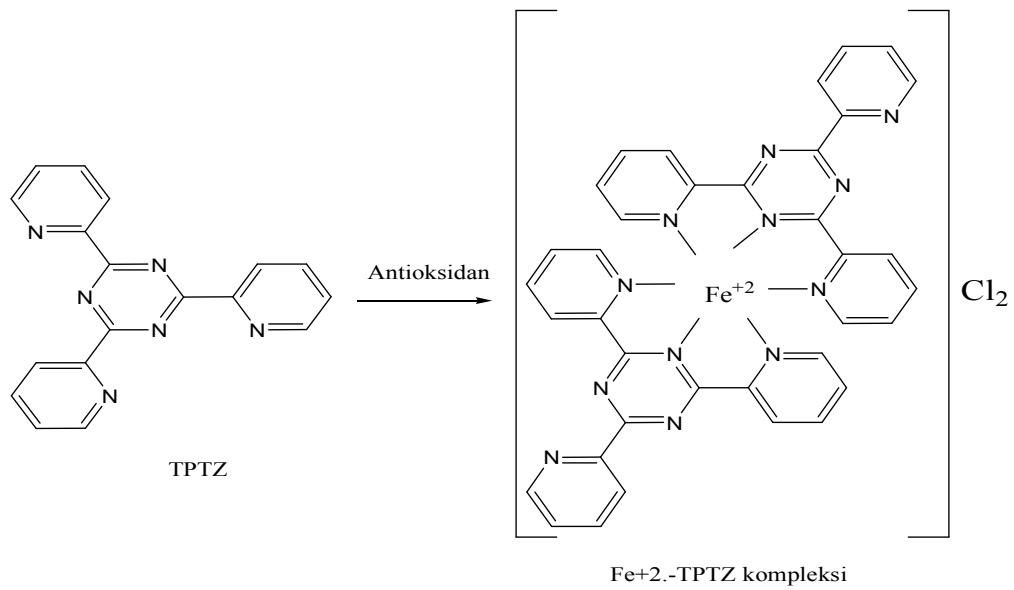
Şekil 8. ABTS<sup>•-</sup> radikalinin antioksidan ile reaksiyonu (Huang ve ark., 2005).

TEAC yönteminde analiz edilen maddenin (antioksidanın) ABTS radikalini indirgeme yeteneği ölçülmektedir (Şekil 8). Ancak bu madde ferrilmiyoglobini de indirgeyebilir. Re ve ark., (1999) tarafından düzenlenen TEAC yönteminde, ABTS'nin potasyum persülfat ile yükseltgenmesi sonucu ABTS<sup>•+</sup> radikal katyonu oluşmaktadır. Yani sisteme antioksidan ilave edilmeden önce radikal katyonu oluşturulmaktadır. Asıl metotta

ise antioksidan varlığında radikal meydana gelmektedir. Oluşan radikal katyonu oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 2 gün dayanıklıdır (Van den Berg ve ark., 1999).

#### 1.6.4 Demir iyon indirgeyici antioksidan güç (FRAP) yöntemi

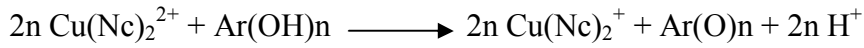
Düşük pH'ta  $Fe^{+3}$ 'ün  $Fe^{+2}$ 'ye indirgenmesi renkli ferröz-tripiridiltriiazin [ $Fe(III)$  (TPTZ) $_2Cl_3$  (TPTZ = 2,4,6-tripiridil-s-triazin) = Herein] kompleksinin oluşmasına neden olur. Oluşan bu demir tuzu oksidan olarak kullanılır (Benzie ve ark., 1996).  $Fe^{+3}$  tuzunun (yaklaşık 0,70 V) redoks potansiyeli  $ABTS^{\cdot-}$ 'nin ki ile (0,68 V) birbirine yakındır. Bu nedenle FRAP ve TEAC yöntemleri arasında çok fazla fark yoktur. Yalnız TEAC nötr pH'ta FRAP ise asidik koşullarda (pH = 3,6) gerçekleştirilir (MacDonald-Wicks ve ark., 2006; Price ve ark., 2006; Ames ve ark., 1993; Somogyi ve ark., 2007; Pellegrini ve ark., 2003; Huang ve ark., 2005). Asidik ortamda, antioksidanların varlığında ferritripiridiltriiazin kompleksi  $Fe^{+2}$ 'ye indirgenir ve oluşan renkli çözelti 595 nm'de soğurmada artışa neden olur (Şekil 9).



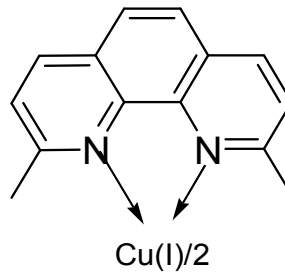
Şekil 9. Antioksidanın TPTZ ile reaksiyonu (Benzie ve ark., 1996).

### 1.6.5 (CUPRAC) bakır(II) indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi

Tütem ve Apak (1991) tarafından ilımlı bir oksidan olarak çeşitli indirgen araçların tayini için kullanılabileceği önerilen bis(neokuprein)bakır (II) klorür reaktifi sistein (Tütem ve Apak, 1991), E vitamini (Tütem ve ark., 1997) ve askorbik asit (Güçlü ve ark., 2005)'in tayininde başarı ile kullanılmıştır. Bu yöntem daha sonra kuprik iyonu indirgeme potansiyeli ölçülmek suretiyle bitki özütlerinde ve insan serumunda (Apak ve ark., 2004; 2005) toplam antioksidan kapasite tayini için geliştirilmiş ve bakır iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity: CUPRAC) olarak isimlendirilmiştir. Bu yöntemle hem hidrofilik hem lipofilik toplam antioksidan kapasitesi kolaylıkla tayin edilebilmektedir. Yeni geliştirilen CUPRAC yönteminde kullanılan renkli yükseltgeme aracı olan bis(neokuproin)-Cu(II) klorür ile antioksidan polifenol arasındaki reaksiyon aşağıdaki gibi gerçekleşmektedir:



Bu reaksiyonda, Ar(OH)<sub>n</sub> hidroksi grubu içeren antioksidan polifenolden oluşan kinonu ifade etmektedir. Tepkime sonunda iki proton açığa çıkmakta ve Ar(OH)<sub>n</sub> yapısında bulunan hidroksil grubu kinon şekline dönüşmektedir. Cu(II)-Nc ise 450 nm'de en yüksek soğurma veren şiddetli renk oluşumuyla birlikte Cu(I)-Nc kelatına dönüşmektedir (Şekil 10). Bu reaksiyonda, n-OH grubu içeren antioksidan karakterli bileşikler, 2n-e vericisi olarak hareket etmektedir (Apak ve ark., 2004).



Şekil 10. CUPRAC yönteminin kromoforunu oluşturan Bis(2,9-dimetil-1,10-fenantrolin)bakır(I) kelatı'nın 'Cu(I)-Nc' kimyasal yapısı (Apak ve ark., 2004).

### **1.7. Enzim-aktivite/inhibisyon çalışmaları**

Doğal ürün kaynaklarından elde edilen özütler, birçok ilaç geliştirme programlarında moleküler çeşitliliğin faydalı bir kaynağıdır ve birçok tedavi edici önemli ilaçlar doğal ürünlerden elde edilirler. Bununla birlikte, bu gibi maddelerin taraması, ikincil metabolitlerin kompleks karışımlarını içerdiklerinden dolayı anlaşılması zor olabilir. *in vitro* reseptör ve enzim denemeleri kullanılarak yeni terapötiklerin tanımlanmasındaki başarı, büyük ölçüde uygun tasarım ve tarama denemelerinin geçerliliğine bağlıdır. Çok sayıda özüt çabukça araştırılabilir. Birleştirilen kimya yöntemlerinin gelişi de biyoaktivite denemesi için yüksek verimli görüntüleme yöntemleri ile önemini arttırmıştır. Kimyasal tepkime ürünlerinin tanınması için geliştirilen yüksek yayılma hızlı enzim çalışmaları ile önemli olan değişkenler aşağıda listelenmiştir (Atta-ur-Rahman ve ark., 2005).

- Enzim kaynağı - pH denemesi
- Enzimin son deneme derişimi - Sıcaklık denemei
- Substratın ve son deneme derişiminin seçimi - İnhibitör biçimleri
- Kofaktör ihtiyacı ve son deneme derişimleri - DMSO uygunluğu
- Deneme bitiminin seçimi - Özüt uygunluğu

#### **1.7.1. DMSO uyumu**

Genellikle, doğal ürün özütleri temel denemelerde araştırma içinde DMSO içinde tutulur. En uygun bir araştırma denemesi, deneme inkübasyon boyunca özüt içindeki muhtemel ikincil metabolitlerin çözünür durumda kalmasını sağlamak için DMSO'nun yüksek derişimlerini yapılabilmelidir. Çoğu enzim denemeleri DMSO'nun yüksek miktarda kullanımını bir dereceye kadar kaldırabilir. Hücre- esaslı denemeler genellikle % 0,5 DMSO'dan fazla deneme derişimlerinde iyi sonuç vermez (Atta-ur-Rahman ve ark., 2005).

#### **1.7.2. Enzim çalışmaları**

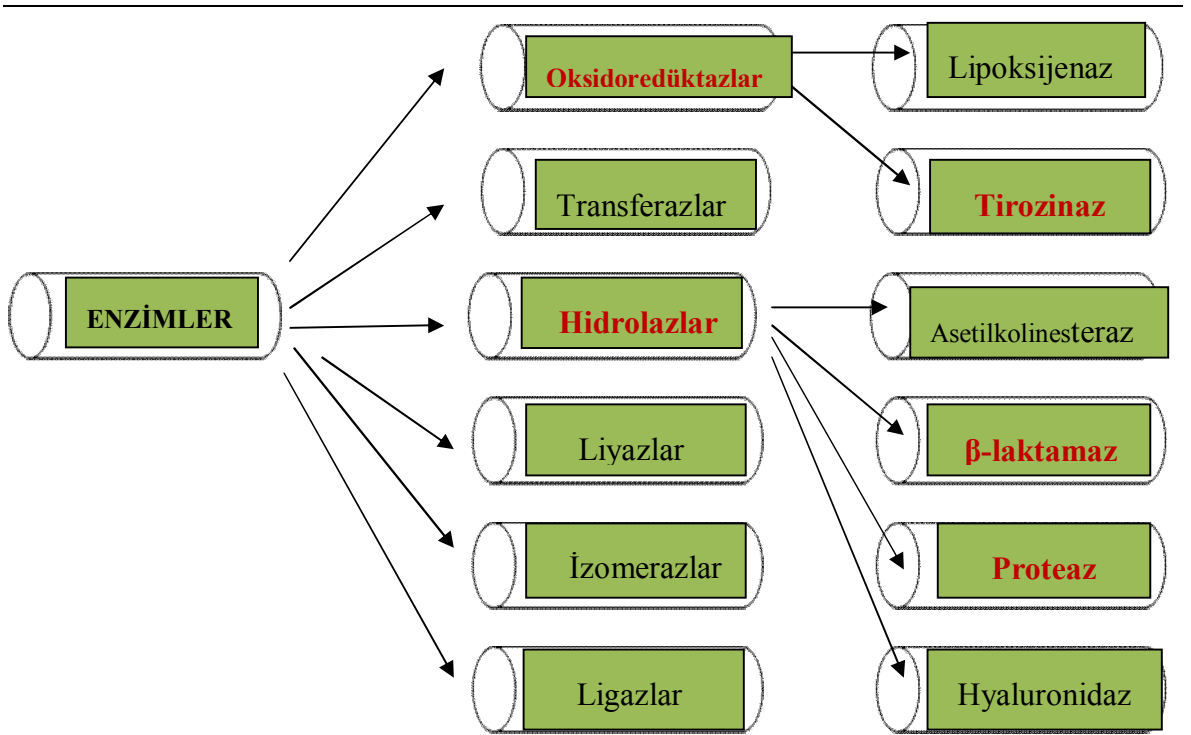
Substrat enzimin aktif bölgesine bağlanır ve enzim-substrat kompleksi oluşur, substrat bir veya daha fazla ürüne dönüşür ve enzimin boş kalan aktif bölgesine bir diğer substrat bağlanır. İnhibitörler ise substrat yerine enzime bağlanır ve enzimin bir tepkimeyi katalizlemesini engelleyerek aktivitesini azaltır. Enzim inhibitörü olarak kullanılan

ilaçların çoğu bu şekilde bir patojeni öldürür veya metabolik bir dengesizliği düzelterek tedavi eder. İnhibitörler tersinir veya tersinmez (enzimin yapısı kimyasal olarak değişir) olarak bağlanabilir. İlaç olarak kullanılan enzim inhibitörleri seçiciliklerine (diğer proteinlere bağlanmama) ve etkinliklerine (enzimi etkisizleştirmek için gerekli miktar) göre değerlendirilir. İnhibitörün seçiciliği ve etkinliği ne kadar yüksek ise yan etkileri ve toksisitesi o kadar düşüktür.

Hayvanlar ve insanlar ikincil metabolitler olarak adlandırılan zehirli olabilecek maddeler sentezlerler. Bu metabolitler küçük organik moleküllerdir ve bu sayede vücuda dağılarak birçok metabolik süreci engelleyebilirler. Örneğin, pasifik porsuğu (*Taxus brevifolia*)'ndan elde edilen taksol (paclitaxel) organik molekülü tübülün dimerlerine bağlanarak hücre iskeletindeki mikrotübüllere (hücrenin esnekliğini ve hareketini sağlayan ağ topluluğu) bağlanmasını engeller ve kanser tedavisinde kullanılır.

Enzim aktivitesinin bazı maddeler veya etmenler tarafından azaltılması /durdurulmasına *enzim inhibisyonu* denir.

Temel enzim sınıfları ve bu sınıflardan seçilen bazı enzimler Şekil 11'de gösterilmiştir.



Şekil 11. Temel Enzim Sınıfları (Anonim).

Bazı enzimler ilaç geliştirme için önemli moleküler hedeflerdir ve birçok ilaç keşif programları, birincil ölçüm denemeleri içinde enzim hedeflerini içerir. Genellikle, bu denemeler kısmi olarak saflaştırılan veya saflaştırılmış insan enzimlerini kullanırlar ve radyometrik, kalorimetrik ve florometrik denemeleri içeren deneme yöntemlerinin bir çeşidi tarafından ürün oluşumunun ölçümünü içerirler (Atta-ur-Rahman ve ark., 2005).

Tez çalışması kapsamında etken özütlere uygulanan enzim-aktivite/inhibisyonu çalışmalarının ilkeleri aşağıda açıklanmıştır.

### 1.7.2.1. Proteaz inhibisyonu çalışmaları

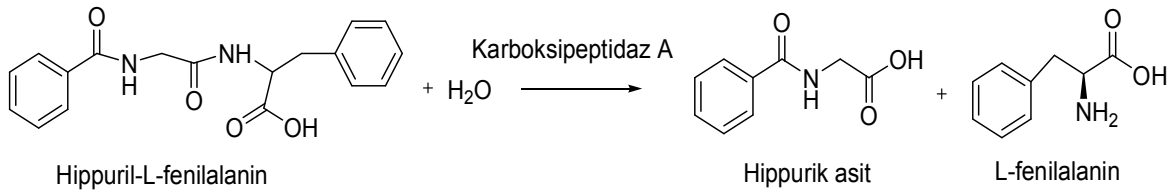
Proteazlar veya proteinazlar, protein olgunlaşması, sindirim, kan koagülasyonu, kan basıncı kontrolü gibi hücrelerin normal fizyolojik işlevlerinde temel rol oynayan proteolitik enzimlerdir. Kanser, akciğer doku ve organları arasında hava kalması, beslenme yetersizliğine bağlı olarak kasların gelişmemesi, kireçlenme, pankreasın çalışmasını durdurabilecek derecede tahriş olması gibi hastalıkların bir çeşidi proteazların aşırı aktivitesi ile ilişkilendirilir. *Proteaz veya proteinazların* bahsi geçen hastalıklardaki rolü nedeniyle, *bu enzimlere karşı doğal kaynaklardan inhibitörler gibi terapötik ajanların bulunması büyük önem taşımaktadır.*

Çizelge 3. Proteazlar ve özel kromojenik substratları

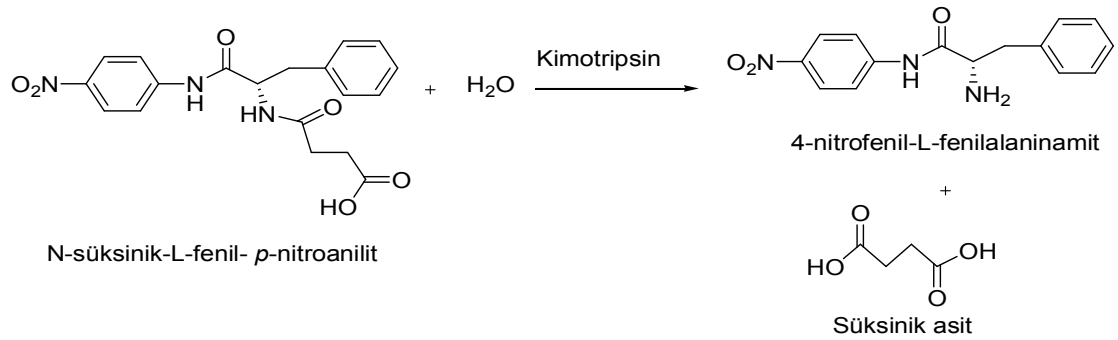
	Proteaz	Substrat
(i)	$\alpha$ - Kimotripsin	N-Süksinil-fenil-p-nitroanilit
(ii)	Tripsin	Bz-DL-Arjinin-p-nitroanilit
(iii)	Elastaz	Süksinil-(Ala)3-p-nitroanilit
(iv)	Karboksipeptidaz A	Hippuril-L-fenilalanin
(v)	Papain	Bz-DL-Arjinin-p-nitroanilit

Proteazlar ve özel kromojenik substratları Çizelge 3’de, Karboksipeptidaz A,  $\alpha$ -kimotripsin, tripsin ve substratları arasındaki reaksiyon ise sırasıyla Şekil 12, Şekil 13, Şekil 14’de gösterilmiştir. Proteazların kromojenik substratları *p*-nitroanilin gibi bir

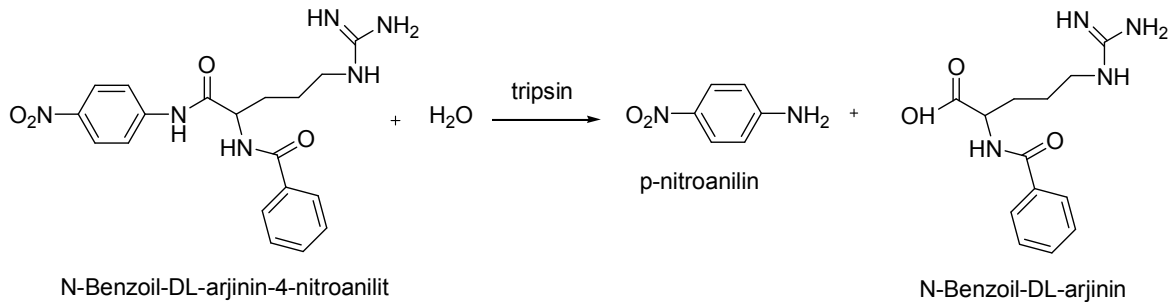
kromofor'a ardı ardına bağlı özel bir amino asite sahiptir. Substratı üzerindeki özel bir proteazın etkisi, spektrofotometrede soğurmada artış olarak ölçülen kromoforu serbest bırakmasına neden olur. Böylece kromofor miktarı, enzimin aktivitesine orantılı olarak serbest kalır (Atta-ur-Rahman ve ark., 2005).



Şekil 12. Karboksipeptidaz A ve substratı Hippuril-L-fenilalanin arasındaki tepkime.



Şekil 13. Kimotripsin ve substratı N-süksinik-fenil-*p*-nitroanilit arasındaki tepkime.



Şekil 14. Tripsin ve substratı N-benzoil-D-L-arjinin-4-nitroanilit arasındaki tepkime.

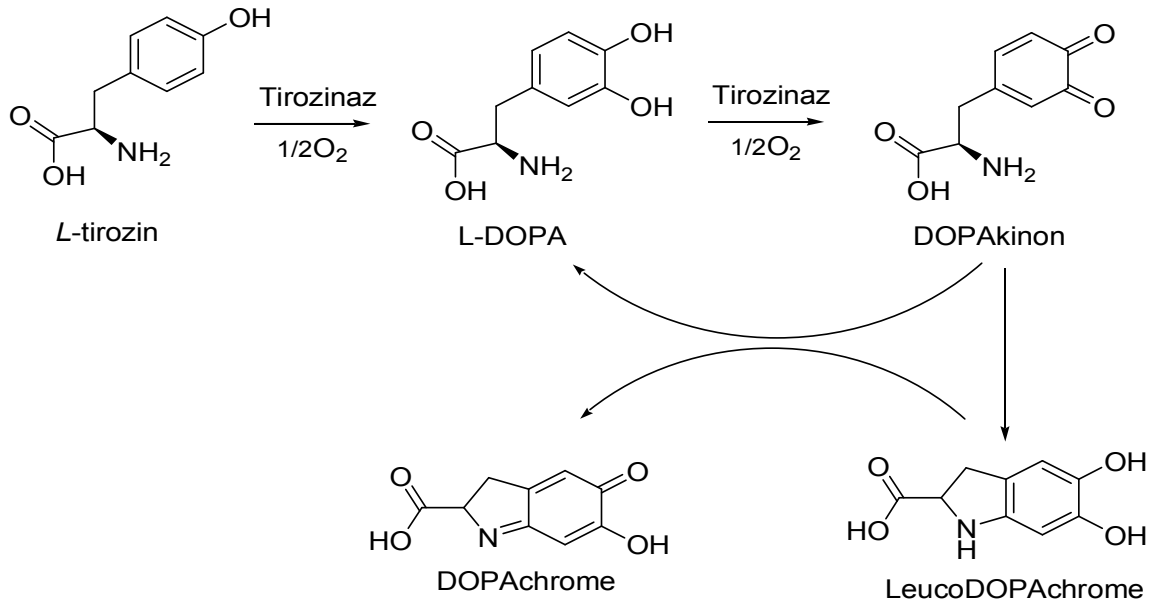
Enzim aktivitesinde oluşacak inhibisyonun yüzdelik ifadesi eşitlik (1.1)'de ki formülle hesaplanabilir:

$$(\%) \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{Soğurma(kontrol)} - \text{Soğurma (deneme)} \times 100}{\text{Soğurma (kontrol)}} \quad (1.1)$$

### 1.7.2.2. Tirozinaz inhibisyonu çalışması

Tirozinaz enzimi, melanosomlardaki melanositlerde gerçekleşen *L*-tirozin ve *L*-DOPA (dihidroksifenilalanin)'dan deri melanin pigmenti sentezinden sorumludur. Bu enzimin, tirozinin hidroksilasyonu, *L*-DOPA'nın dopakinon'a yükseltgenmesi ve devamında melanin otopolimerizasyonu dahil olmak üzere birçok işlevi vardır. Aşırı melanin üretimi derideki hiperpigmentasyon durumu ile ilişkilidir (melazma ve efelid gibi). Dolayısıyla *tirozinaz enziminin inhibisyonu doğrudan hiperpigmentasyonun kontrolüyle* ilgilidir.

*L*-tirozinin, Tirozinaz enzimi ile *L*-DOPA'ya ve *L*-DOPA'nın dopakinon'a yükseltgenme reaksiyonu Şekil 15'de gösterilmiştir.

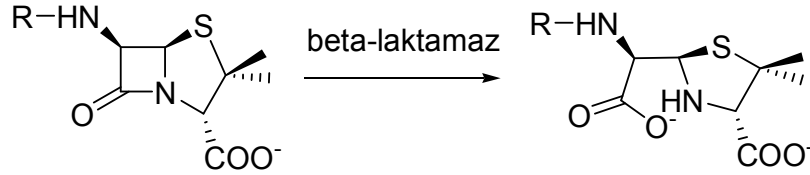


Şekil 15. *L*-tirozinin *L*-DOPA'ya dönüşüm mekanizması. (Satooka ve Kubo, 2011).



### 1.7.2.3. $\beta$ -Laktamaz inhibisyonu çalışması

$\beta$ -Laktamaz enzimi bakteriler tarafından  $\beta$ -laktam antibiyotiklerine karşı direnç mekanizmasının bir parçası olarak üretilir. Bu aileye ait çok sayıda laktamaz enzimi (EC 3.5.2.6) tanımlanmıştır. Enzim  $\beta$ -laktam yapısında bulunan amid bağının hidrolizini verimli şekilde gerçekleştirir (Şekil 16).  $\beta$ -Laktamaz inhibitörleri klinik açıdan önemlidir. Bu önem bakterilere karşı  $\beta$ -laktam antibiyotiklerinin yaygın şekilde kullanımında yansıtılmıştır. Güvenli profilleri ve kanıtlanmış klinik etkinlik sayesinde bu antibiyotikler çok sayıda bulaşıcı hastalıkların tedavisinde yoğun kullanılmaktadır. Dolayısıyla *yeni laktamaz inhibitörlerinin araştırılması hem klinik açıdan hem de ticari potansiyeli nedeniyle oldukça önemlidir* (Atta-ur-Rahman ve ark., 2005).



Şekil 16.  $\beta$ -laktamaz enziminin amid bağını hidroliz tepkimesi (Atta-ur-Rahman ve ark., 2005).

### 1.8. Sitotoksiste Denemesi

Sitotoksiste, medikal etken bir maddenin hücreler üzerindeki zararlı etkilerini saptamaya yönelik olarak oluşturulmuş, hızlı, duyarlı bir yöntemdir ve tüm medikal denemeler için gereklidir. Sitotoksiste MTT yöntemi, Trypan blue (TB) yöntemi, Sulforhodamine B (SRB) yöntemi, WST yöntemi ve klonojenik yöntem ile ölçülebilir. MTT yöntemiyle bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle nicel olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolyum halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır (McGahon ve ark., 1995; Scinto ve Daffner, 2000). Bu reaksiyon fragil bir mitokondriyal enzim olan süksinat dehidrojenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Tetrazolyum halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Tetrazolyumun formazona dönüşüm ürünleri NADP ve NADPH'ın indirgenmesi ile oluşur. NADH dehidrojenazlar birincil olarak solunum dönüşümünün enerji üretim reaksiyonunda (glikoliz, TCA çevrimi ve oksidatif fosforilasyon) görev

alırlar. NADPH dehidrojenaz ise birincil olarak biyosentezdeki indirgeyici reaksiyonda görev alır. MTT yönteminde canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrojenazı, tetrazolyum halkasını böler ve MTT sitotoksisite yöntemi hücrenin, tetrazolyum tuzunu formazon ürününe çevirebilme yeteneğini ölçer. Sonuç olarak canlı ve mitokondri işlevi bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri işlevi bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. Bu yöntem, hücrelerin MTT boyasıyla inkübasyonu, çöken reaksiyon ürününün çözünür hale getirilmesi ve reaksiyon ürününün kolorimetrik olarak ölçümü basamaklarından oluşmaktadır (Yamada ve ark., 1977).

### 1.9. *Humulus lupulus L.*

Şerbetçi otu, ‘mayaotu’ olarak da bilinir. Kendirginler (*Cannabaceae*) familyasından, tırmanıcı bir bitkidir. Koni biçiminde, sarımsı, yeşil veya sarımsı esmer renkli, kozalak görünüşünde ve 3-4 cm uzunlukta, dişi çiçek durumlarıdır. Anayurdu Avrasya ve Kuzey Amerika’dır. Türkiye’de Kuzey Anadolu’da seyrek olarak rastlanır. Bira endüstrisi için Avrupa’da geniş ölçüde tarımı yapılan bitki, ülkemizde aynı amaçla Bilecik ve Bursa yörelerinde üretilmekte, ayrıca Kuzey Anadolu’da kendi kendine doğada yetişen şerbetçi otu örnekleri seyrek de olsa görülmektedir. Türkiye’de yabani olarak yetişen türlerin kimyasal yapısı henüz araştırılmamıştır. İştah açıcı, idrar söktürücü, terletici, ateş düşürücü vb etkilere sahiptir (Baytop, 1998; Davis 1965-1988). Bitkinin yaş ve kuru örnekleri Şekil 17’de gösterilmiştir.



(a)



**(b)**



**(c)**

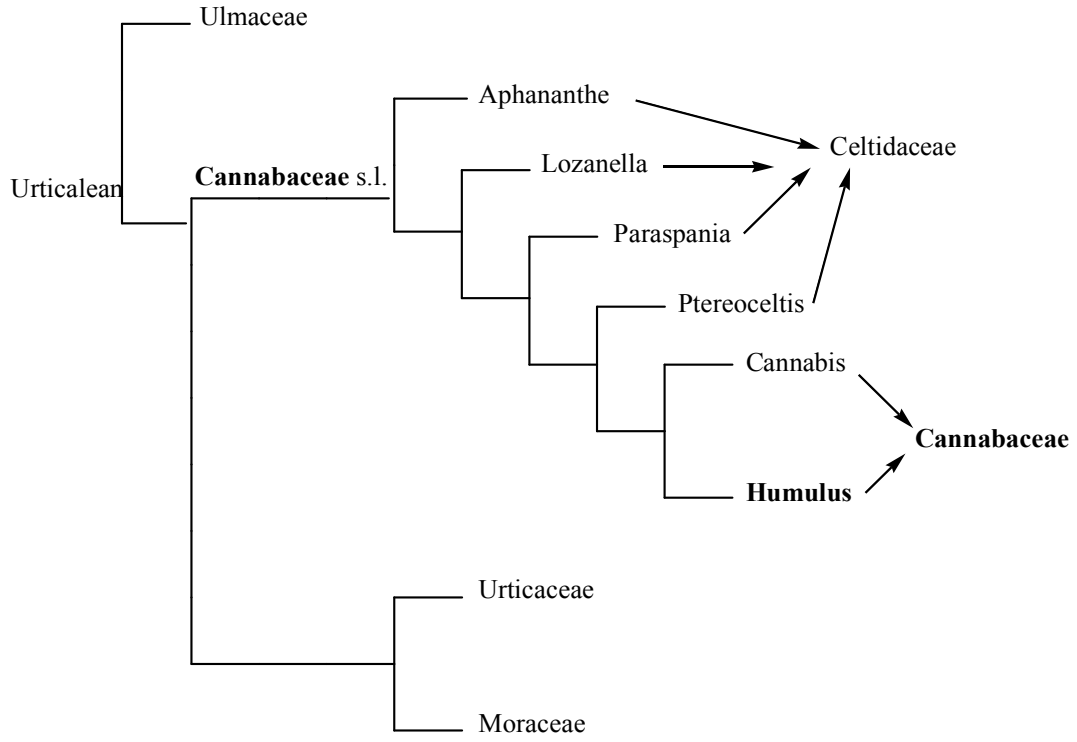


(d)

Şekil 17. *Humulus lupulus* L. (a) Darıca Köyü yol kenarında, bitkinin sarmaşık şeklinde ağaca sarılmış hali, (b) dalından sarkarken ki hali, (c) yol boyunca olgun kozalakları bulup, topladıktan sonra traktörle taşıma anı, (d) Herbaryum örneği.

### 1.10. Cannabinaceae Familyası

Daha önceden Cannabaceae şimdilerde ise Cannabinaceae olarak adlandırılan aile iki evcikli dir. Çiçekleri aktinomorfik (radyal olarak simetrik sel)'tir. Sınıflandırma sistemleri 1990 yılından önce Cronquist (1981) ve Dahlgren (1989) kaynaklara ekledim tarafından tipik olarak aşağıdaki aileleri içeren Urticales öncülüğünde tanımlanmıştır. Moleküler bir Tür'ün evrimi ile ilgili çalışma 2002 yılında oy çokluğuyla yosun, mantar ve bitkiler için sınıflandırılan Uluslararası kod kuralları altında soy ağacı şu şekilde çıkartılmıştır (Sytsma ve ark., 2002) (Şekil 18).



Şekil 18. Cannabinaceae familyasının sınıflandırılması (Anonim).

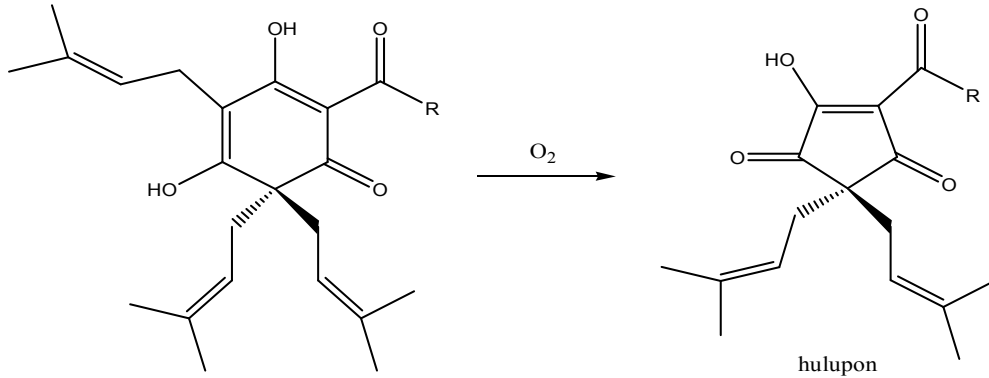
**BÖLÜM 2****ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR****2.1. Botanik Bilgi**

*Humulus lupulus* L. bir yer altı kök kaynağının kök sapından her bahar yeniden büyüyen çok yıllık bir bitkidir. Sarmaşık şeklinde dalları ile her yıl ince uzun, tırmanıcı, 6-9 m'ye kadar uzayan bir bitki olarak tanımlanmıştır (Burgess, 1964; Neve, 1991). Bitki, diğer bitkiler üzerine tırmanması nedeniyle Latin terimi lupus'tan türeyen *Lupulus* adı ile yansıtılmaktadır (Grieve, 1971). Buna ilaveten İngilizce yaygın adı "tırmanmak için" anlamı Anglo-Saxon *hoppan*'dan gelir. *Humulus* isminin merkezi şüphelidir, ancak bitki gelişiminde zengin nemli toprak anlamına gelen *humus*'tan geldiği ortaya atılmıştır. Yaprakları koyu-yeşil renkli, uzun saplı, 3-5 loblu yürek şekilli, keskin dişe benzer çıkıntılıdır ve pürüzlü yüzeye sahiptir. Dal üzerinde biri diğerinin karşısında yerini alır, ancak bazen üst yapraklar dal üzerinde tek tek düzenlenir. Dişi ve erkek çiçekleri ile dioik (ikiyevcikli; üreme organları ayrı canlılara ait) bir bitkidir. Dişi çiçekleri Ağustos-Eylül aylarında olgunlaştığında, renkleri parlak yeşilimsi-sarıdan, sarı-kahveye döndüğünde toplanır. *Humulus lupulus* L. bira endüstrisinde ham materyal olarak dünya'nın her yerinde kullanılan, tanınmış bir bitkidir.

**2.2. *Humulus lupulus* L. Fitokimyasal Analizleri ve Biyoaktif Bileşenleri**

Polifenolik bileşikler ve açıl phloroglukozitlerce zengin dişi çiçekleri (şerbetçi otu kozalakları veya "şerbetçi otu"); bira koruyucu ve biraya özgü tat ve aromayı vermek için büyük ölçüde, tedavi edici amaçlar içinde uzun zamandır kullanılmaktadır. Geleneksel tıpta kullanılan bitkinin sağlık yararları içindeki önemi ile aynı doğrultuda gelişen *Humulus lupulus* L., araştırmacılar tarafından dikkate değer olarak kabul edilmiştir. Yirminci yüzyılın ikinci yarısında başlayan çoğu fitokimyasal çalışma, şerbetçi otu kozalaklarının ve bitkinin diğer kısımlarının bileşimini incelemek için gerçekleştirilmiş olup, flavanonlar, kalkonlar, 1,3,5-trihidroksibenzen türevleri (kemikteki kireci yok eden bir araç olarak kullanılır) gibi farmakolojik olarak önemli olan bileşiklerin ayrılıp saflaştırılması ve tanımlanmasına yol açmıştır. Son on yıl boyunca, *in vivo* ve *in vitro* birçok farmakolojik araştırma geleneksel kullanımları rapor edilen bitkinin bilimsel kanıtını ortaya koymak için denenmiştir.

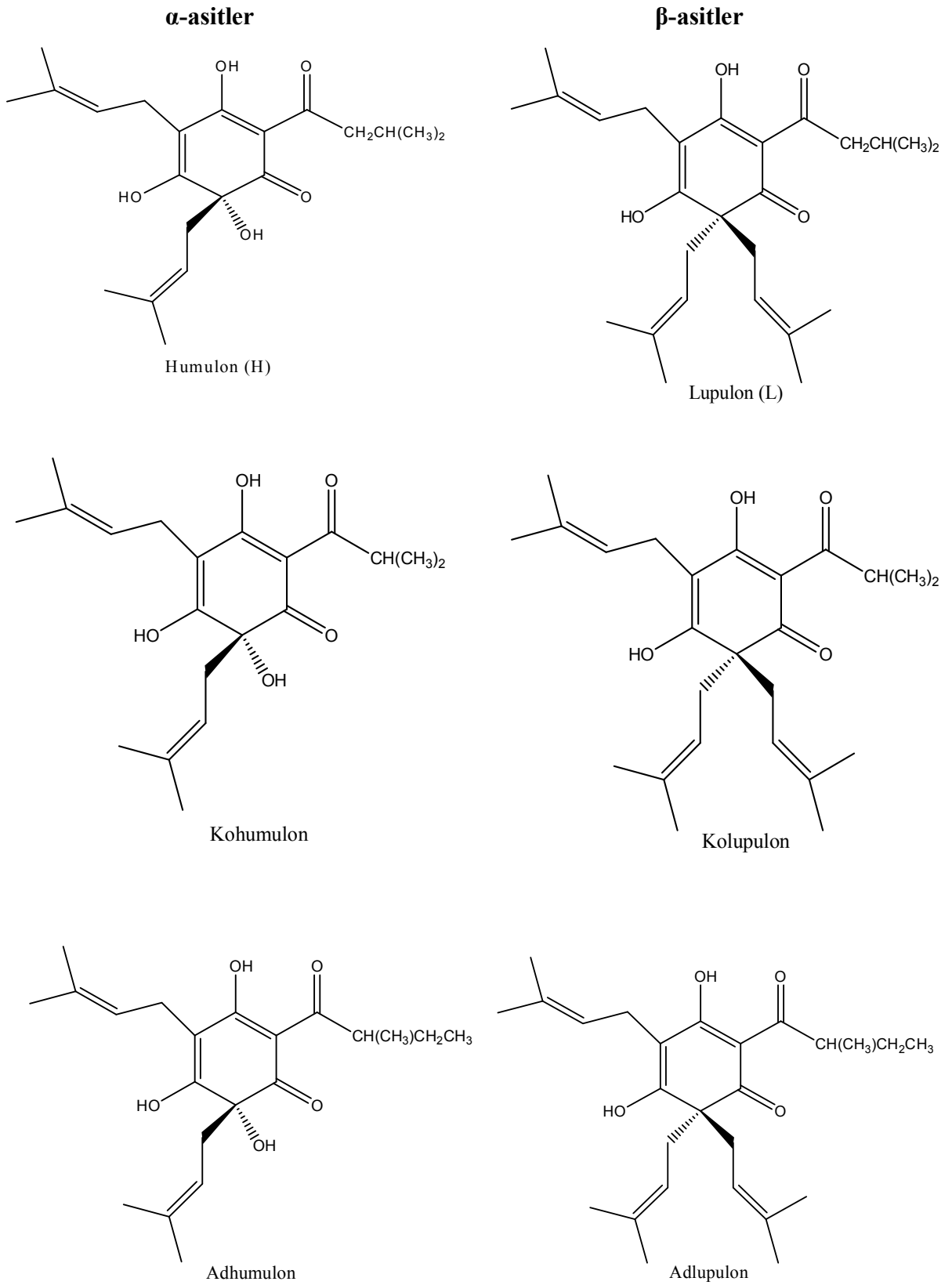
*Humulus lupulus* L. bitkisinin olgun kozalaklarından tanımlanan kimyasal bileşenlerin temel yapısal sınıfları terpenler, sert (acı) asitler ve kalkonlardır. Bitki flavonol glikozitler (kaempferol, kersetin, kersitrin, rutin) (Sägesser ve Deinzer, 1996) ve kateşinler (kateşin gallat, epikateşin gallat) (Gorissen ve ark., 1968). açısından zengindir. Uçucu yağ (şerbetçi otu kozalak ağırlığının % 0,3-1,0) içerisinde yüzlerce terpenoid bileşen tanımlanmıştır. Başlıcaları:  $\beta$ -karyofillen, farnesen, ve humulen (seskiterpenler) ve mirisen (monoterpen) (Malizia ve ark., 1999; Eri ve ark., 2000). Sert asitler (şerbetçi otu kozalak ağırlığının % 5-20) genellikle (şerbetçi otu kozalak ağırlığının % 0,3-1,0)  $\alpha$ -asitler ve  $\beta$ -asitler olarak sınıflandırılan phloroglucinol türevleridir. Her bir grup 3-, 4-, 5-, veya 6-karbon okso-alkil yan zinciri içerir.  $\beta$ -asitler,  $\alpha$ -asitlerden yapısal olarak farklı prenil grubuna sahiptir. Sert asitler, bitki içerisinde çeşitli bileşim ve derişimlerde bulunur. Temel  $\alpha$ -asitlerden humulon (toplam  $\alpha$ -asitlerin % 35-70), kohumulon (% 20-65) ve adhumulon (% 10-15);  $\beta$ -asitlerden lupulon (toplam  $\beta$ -asitlerin % 30-55), kolupulon ve adlupulondur (Şekil 20). Şerbetçi otu sert asitlerinin biyosentezi, izomerizasyonu, yükseltgenmesi ve bozulması geniş ölçüde çalışılmıştır (Verzele ve DeKeukeleire, 1991; Fung ve ark., 1997; Goese ve ark., 1999). Humulon'un hulupon'a yükseltgenmesi reaksiyonu Şekil 19'de gösterilmiştir.



Şekil 19. Hop  $\beta$ -asitlerinin huluponlara yükseltgenmesi (Cleemput ve ark., 2009).

Yüksek pH değeri ve yüksek sıcaklıkta,  $\alpha$ -asitler daha kararlı ve daha sert olan iso- $\alpha$ -asitlere izomerleşir.



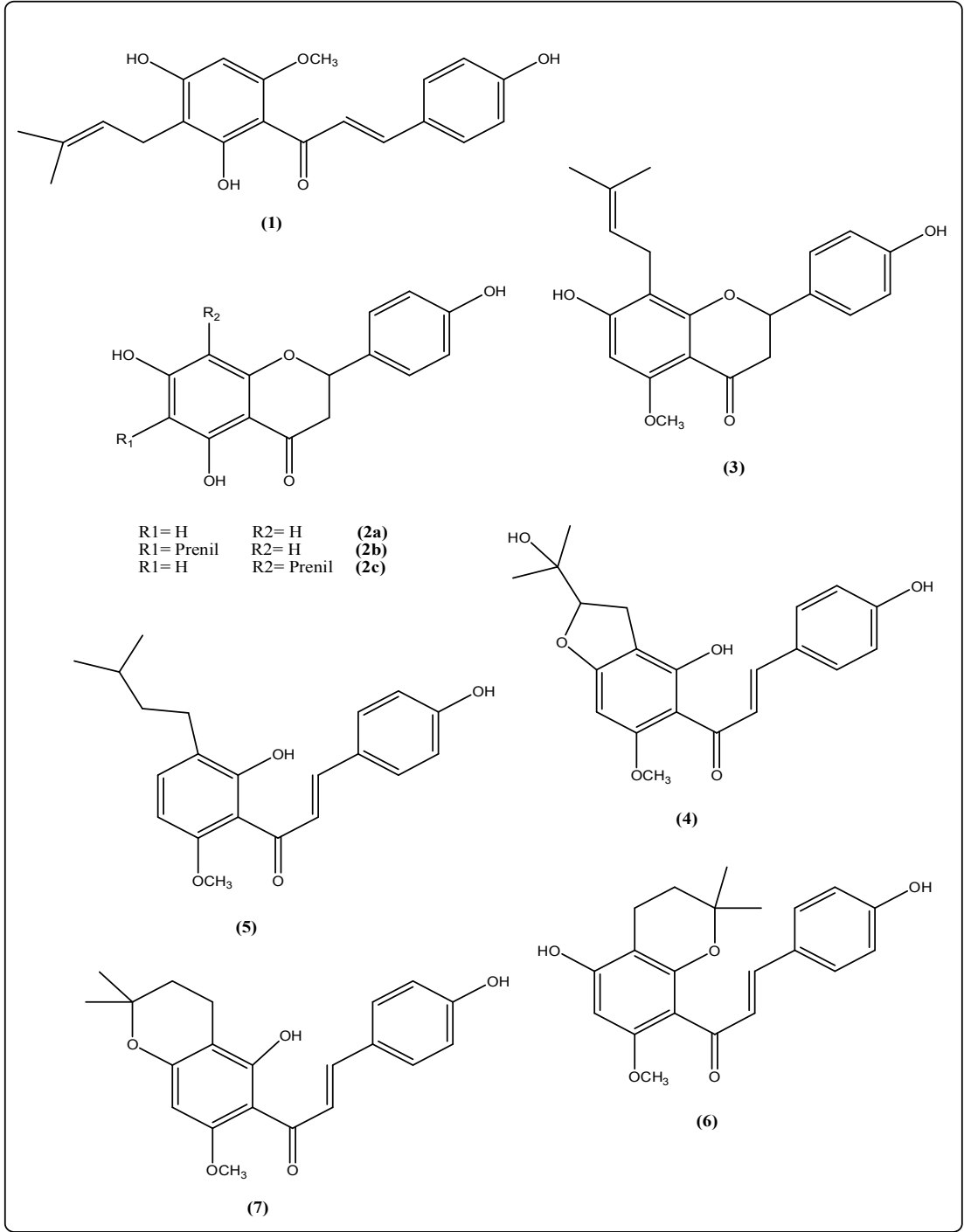


Şekil 20. Hop acı asitlerinin kimyasal yapıları (Zanoli ve ark., 2008).



Uçucu yağ ve sert asitlerin yanı sıra birçok prenilflavonoid tanımlanmıştır. (Stevens ve ark., 1997). Termal davranış ve yüksek sıcaklıkta prenilflavanon olan isoksantohumol'a (IX) dönüşebilen en önemli bileşik kalkon ksantohumol'dur. (XH) (bitkinin kuru ağırlığının % 1'nden fazla) (Stevens ve ark., 1998, 1999). Böylece iso-ksantohumol, bitkideki temel prenilflavonoidtir.

Kuzey Amerika ve Batı Asya'da yetişen bitkinin bazı çeşitlerinde tanımlanan bir kalkon da ksantogalenol'dür (Stevens ve ark., 2000). 2',4',6',4-tetrahidroksi-3'-C-prenylkalkon, genellikle desmetilksantohumol (DMX) olarak adlandırılan bileşik bitki içerisinde var olan çoğu flavonoidin ön maddesi olarak nitelendirilir. (Chadwick ve ark., 2006). Kimyasal izomerleşme vasıtasıyla, rasemik 6-prenilnarinjenin (6-PN) ile birlikte bitkinin temel östrojeni olarak tanımlanan 1:1 rasemat ( $\pm$ )-8-prenilnarinjenin'i (8-PN) meydana getirir. (Hänsel and Schulz, 1988). Ksantohumol'un ve diğer prenilenmiş flavonoidlerin kimyasal, biyolojik aktivite ve biyoteknolojik yönü son zamanlarda yeniden gözden geçirilmiştir. (Stevens ve Page, 2004). Dışı çiçeklerden olgun kozalaklara gelişimi boyunca  $\alpha$ -asitler,  $\beta$ -asitler, DMX ve XH seviyeleri gitgide artar, toplanma oranı bitkinin çeşidine ve iklimsel koşullara bağlıdır. (De Keukeleire ve ark., 2003, 2007). Bitki yaprakları uçucu bileşenler içerir, ancak kozalaklarındaki miktardan daha azdır (<0.05 %) (Langezaal, 1993). Bileşenlerin kimyasal yapıları Şekil 21'de gösterilmiştir.



(1) Ksantohumol, (2a) narinjenin, (2b) 6-prenilnarinjenin, (2c) 8-prenilnarinjenin (3) isoksantohumol, (4) mikrobiyal dönüşüm ürünü, (E)-2''-(2''-hidroksiisopropil)-dihidrofurano[2'',3'':4',3']-2',4-dihidroksi-6'-metoksikalkon,

(5) 2'',3''dihidroksantohumol, (6) pirano-ksantohumol türevi, 2'',2''-dimetil-3'',4''-dihidropirano [2'',3'':3',4']2',4-dihidroksi-6'-metoksikalkon, (7) pirano-ksantohumol türevi, 2'',2''-dimetil-3'',4''-dihidropirano [5'',6'':2',3']4,4'-dihidroksi-6'-metoksikalkon.

Şekil 21. Hop bileşenlerinin kimyasal yapıları (Gerhäuser, 2005).

### **2.3. *Humulus lupulus* L. Bitki Özütleri**

19.yüzyılın başlarında bitkinin özütlenmesi ilk olarak su ve etanol içinde denenmiştir (Gardner, 1987), ama genellikle buhar ve karbon disülfür'ün kullanımı gibi diğer yöntemler rapor edilmiştir (Moir, 2000). Şerbetçi otu özütlerinin üretimi reçine bileşenlerinin reaktifliği ve kimyasal yapısının aydınlatılmasıyla son yüzyılda geliştirilmiştir. Lipofilik yapısından dolayı reçine bileşenlerini çözmek için kloroform, aseton, hekzan ve alkoller içeren etkili çözücülerin geniş bir aralığı kullanılmıştır. Deneysel ve klinik çalışmalarda bitkinin yatıştırıcı etkisi yeterince çalışılmamasına rağmen; Alman Komisyonu E, ‘tedirginlik ve endişe, uyku bozuklukları gibi ruh hali bozuklukları’ tedavileri için şerbetçi otunu denemiştir (Blumenthal, 1998). İlk kez kemirgenlerde gerçekleştirilen inceleme yayımlanmıştır (Hänsel and Wagener, 1967). Araştırmacılar sürükleyici etkinlik içinde değişim gözlemlememiştir. *Humulus lupulus* L. ‘nin farklı özütleri fareler üzerinde denenmiştir (Bravo ve ark.,1974). Yazarlar özütleme yönteminde kullanılan çözücünün çeşidiyle ilgili kendiliğinden olan yürütücü etkinlik içinde bir azalma gözlemlemiştir. Eter özütü, sulu ve alkollü özütler ile karşılaştırıldığında en etken olanıdır. Başka bir çalışmada etanolik ve CO<sub>2</sub> özütlerinin yatıştırıcı etkisi incelenmiştir. Her iki özütte kendiliğinden olan lokomotor aktiviteyi azaltmış, merkezi yatıştırıcı etkiyi teyit eden ketamin-uyarılmış uyku zamanını arttırmış ve vücut sıcaklığını azaltmıştır (Schiller ve ark., 2006). Aniol ve Zolnierczyk (2008), süperkritik karbondioksit özütlemesinin ardından hop asitlerin uzaklaştırılmasıyla kalan kısım üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Harcanan bitki metanol, etanol, aseton ve hekzan ile oda ve kaynama sıcaklıkları, ultrasonik özütleme gibi farklı koşullar altında özütleme işlemine tabii tutulmuştur. Ayrılan asitlerin yüzdeleri uygulanan çözücülerin polaritelerine dayandırılmıştır. Kaynayan çözücü içinde 60 dk. özütleme ile en iyi sonuçlar etanol ve metanol (% 80’den fazla)’den elde edilmiştir. Hekzan özütü (% 30) ise daha düşük sonuç vermiştir. Humulonların isohumulonlara hızlı dönüşümü aşırı ısıtılmış su buharında 121 °C’de gözlenmiştir (Aniol ve Zolnierczyk, 2008).

### **2.4. *Humulus Lupulus* L. Bileşenlerinin Östrojenik Özelliği**

Birçok fitokimyasal incelemeler östrojenik esasları inceleme amacı ile gerçekleştirilmiştir. Nastainczyk (1972) tarafından ilk olarak ‘şerbetçi otu pro-östrojeni’ adlandırılmış; ardından 8-PN ve 6-PN’ nin bir karışımı olarak kararlaştırılmıştır (Hänsel ve Schulz, 1988). Östrojenik özellik gösteren bir şerbetçi otu polifenolik ayrımın farklı bileşenleri (XH, IX, 6-PN, 8-PN) arasında; Ishikawa hücrelerinde bazik fosfataz etkinliğini

uyarmak için östrojenik etkinlik yeteneğine dayalı, duyarlı bir biyo deneme kullanılarak *in vitro* ölçümde 8-PN, yüksek etkinlik göstermiştir (Milligan ve ark., 1999). Bazı çalışmalarda 8-PN'nin yüksek östrojenik etkisi; sıçan dölyatağı sitosolünde bir radioligand bağlı deneme içinde östrojen reseptörleri ile etkileşmesi yeteneğine dayandırılmıştır. Diğer bir deyişle XN aktif değilken, IXN aktiftir; 6-PN çok düşük östrojenik aktivite (<1/100 of 8-PN) göstermiştir. Overk ve ark.,ları (2008)'nin yaptıkları çalışmada; *Humulus lupulus* L., saf bileşenleri IXN ve 8-PN ile *Trifolium pratense* (kırmızı yonca)'nin *in vivo* östrojenik etkileri karşılaştırılmıştır. *Humulus Lupulus* ve *T. Pratense* sıçan rahmi üzerinde östrojenik etkiye sahip değilken, 8-PN sıçan sıvısı, karaciğer ve memeli salgı bezinde ölçülmüş ve saptanmıştır. Eşit dozlarda insan üzerinde bir etkiye sahip olduğu bu nedenle kadınlarda geciktirici etkiye sahip olabileceği düşünülmüştür (Overk ve ark., 2008). 8-prenilnarinjenin, halen bilinen en önemli fitoöstrojenlerden biri olarak nitelendirilmiştir (Zanoli ve Zavatti, 2008).

### **2.5. *Humulus Lupulus* L. Bileşenlerinin Antikanser Özelliği**

Son on yıl boyunca birçok *in vitro* çalışma kemoterapötik ajanlar olarak şerbetçi otu bileşenlerinin olası etkinliğini değerlendirmek için gerçekleştirilmiştir. Şerbetçi otu bileşenleri arasında Ksantohumol, karsinojenlerin *in vitro* başlama, yükselme ve ilerleme safhalarını engelleyen olarak görüldüğü için başlıca kabul edilmiştir, bundan dolayı geniş spektrumlu kemokoruyucu ajan olarak görülmektedir. (Stevens and Page, 2004; Gerhäuser, 2005a; Colgate ve ark., 2007). Gerhäuser ve ark. (2002)'ları tarafından da XN'in antikarsinojenik özellikleri rapor edilmiştir. Son yıllarda bitkinin potansiyel kanser kemoterapötik etkinliklerinin yanı sıra östrojenik özellikleri incelendi ve bitkiden elde edilen bazı etken bileşiklerin çok ilgi gösterdiği kabul edildi. Bunlar arasında, ksantohumol, kanser engelleyici mekanizmaların kan spektrumuna sahip bileşik olarak kanıtlanmıştır (Zanoli ve Zavatti, 2008).

### **2.6. *Humulus Lupulus* L. Bileşenlerinin Antioksidan, Antibakteriyel, Antifungal ve Antiviral Özelliği**

Antioksidan kapasite farklı reaktif oksijen türlerine dayalı yedi farklı metod ile tanımlanmıştır. XN, tek oksijen soğurma kapasitesinin (SOAD) yanı sıra, toplam oksijen radikal soğurma kapasitesi (ORAC-toplam) içinde yüksek etki göstermiştir (Yamaguchi ve ark., 2009).

*Humulus lupulus* L. özütlerinden doğal olarak elde edilen yedi bileşen; *acne vulgaris*'i etkileyen ve temel iltihap oluşturan bakteriler olarak seçilen beş tür (*Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Kocuria rhizophila* ve *Staphylococcus pyogenes*) üzerinde biyolojik etkinliklerinin tanımlanması için denenmiştir. Bitki özütleri, XN ve lupulonlar tüm türlere karşı güçlü durdurucu aktivite göstermişlerdir.

*Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium* ve *Streptomyces*'in bazı türlerini içeren Gram pozitif bakterilere karşı sert asitlerin etkinliği bakteriyel hücre duvarı ile moleküllerin hidrofobik kısımlarının etkileşiminden dolayı birinci membran sızıntısına yol açtığı sanılmaktadır (Teuber ve Schmalreck, 1973). Ksantohumol'un, *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus mutans* Gram pozitif bakterilerini engellediği gösterilmiştir (Gerhäuser, 2005).  $\alpha$ -asitler, antibakteriyel aktivitenin yanı sıra dengeli köpürmeye katkıda bulunan, bira endüstrisinde kullanılan bitkinin kalitesi için çok önemli bileşiklerdir. (Verzele ve De Keukeleire, 1991).

Sert asitlerin, *Candida albicans*, *Trichophyton*, *Fusarium* ve *Mucor* türlerine karşı antifungal etkisi rapor edilmiştir. Özellikle 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'nin en düşük inhibitör derişimini (MIC) gösteren humulonlar, *Trichophyton* ve *Mucor* türlerine karşı lupulonlar' dan (MIC > 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) daha etkin, *Staphylococcus* türüne (MIC = 6.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  vs. 3.13  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) karşı daha az aktif bulunmuştur (Mizobuchi and Sato, 1985). XN ve 6-PN, *Trichophyton* spp. (MIC = 3.13  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ve *Staphylococcus aureus* (MIC = 6.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )' a karşı çok aktif ajanlar olarak tanımlanmış, ancak diğer insan patojenik mantarlarına (*Candida albicans* ve *Fusarium* spp.) (Mizobuchi ve Sato, 1984) karşı etkinlik göstermemiştir.

Ksantohumol,  $\text{EC}_{50}$  (20,74  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) değeri ile PMBC içindeki HIV-1 çoğalmasını engellemiştir. Rekombinan HIV-1 ters transkriptaz'ın etkisi ve HIV-1 girişi XN tarafından engellenmemiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar XN'un HIV-1'e karşı etkili olduğunu ve ilginç yol gösterici bir bileşik olarak çalıştığını öne sürmektedir. (Wang ve ark., 2004).

### **2.7. *Humulus Lupulus* L. Bileşenlerinin Toksikolojik Analizleri**

Toksikolojik çalışmalar; hayvanlarda, 500'den 3500  $\text{mg}/\text{kg}$ 'a değişen oranlarda farelere ağız yoluyla uygulanmıştır (Hänsel ve ark., 1993). Ksantohumol ( $5 \times 10^{-4}$  M)'un 4 hafta laboratuvar faresine ağızdan uygulaması ana organ işlevleri, protein, yağ ve karbonhidrat metabolizmasına etki etmemiştir (Vanhoecke ve ark., 2005b). Üstelik

köpeklerde humulon türevlerinin subkronik (kronik ve yarı hadarası) ağızdan uygulaması bu maddelerin geniş koruyucu kenarlarını gösteren toksisitenin özel işaretleri ile ilişkilendirilmemiştir. (Chappel ve ark., 1998).

Tam kesilen sıçan karaciğer parçalarında; XN'un antigenotoksik etkileri, comet deneyi kullanılarak incelenmiştir. XN'un, koruyucu etkisinin mekanizmasının çok açık olmamasına rağmen; etkin şekilde IQ ve BaP'in genotoksitesine ve oksidatif DNA hasarına karşı DNA'yı koruduğu belirtilmiştir. Sonuçlar XN'un, taze karaciğer dokularında antigenotoksik etkilerini ve kanser koruyucu potansiyeli için ilave kanıt sağladığını göstermektedir. (Plazar ve ark., 2008).

Dietil eter ile özütlenen şerbetçi otu tanecikleri IQ tarafından uyarılan mutasyonlara karşı antimutajenik etki göstermiştir. Kolon kromatografisinin ardından devam edilen yarı-preparatif HPLC ile tanımlanan XN'un (E4d ayrımı), 10 µg/mL derişimde, insan karaciğer tümörü HepG2 hücreleri ile memeli deneme sistemlerinde IQ uyarılmış DNA hasarının oluşumunu tamamen önlemiştir (Kac ve ark., 2008).

Mosmann (1983), tarafından belirtilen yöntemle göre XN'un, sitotoksitesi HepG2 insan karaciğer tümörü hücreleri kullanılarak MTT deneyi ile yapılmıştır. Hücrelerdeki DNA hasarı, XN tarafından engellenmiştir (Plazar ve ark., 2007).

### **2.8. *Humulus Lupulus* L. Bileşenlerinin Kromatografik Analizleri**

European Pharmacopoeia (Avrupa ilaç kataloğu, 2004) ve British Pharmacopoeia (İngiliz ilaç kataloğu, 2007), şerbetçi otu (*Lupuli* flos) mikroskopik ve kromatografik tanımlama denemelerini rapor etmektedir. Kozalakların İnce Tabaka Kromatogramları, 254 nm deki UV ışığında incelenmiş ve XN, humulonlar ve lupulonlar'dan dolayı birçok iç içe geçmiş bantlar gözlenmiştir.

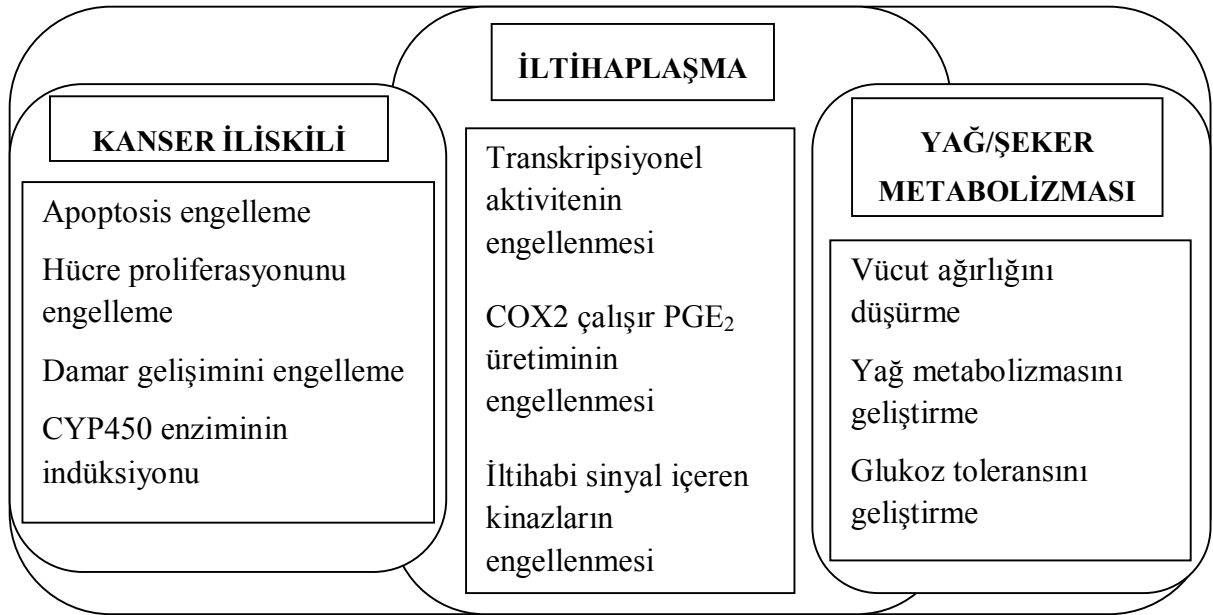
XN'in tanımlanması için Yüksek Ayrırmalı Sıvı Kromatografisi ile donma noktası özütlemesinin kavramı üzerine bir metod geliştirilmiştir. Özütleme ortamı olarak iyonik olmayan yüzey aktif madde (surfaktan) olan Triton X-114 seçilmiştir. Değişkenleri etkileyen CPE belirlenmiş ve en uygun hale getirilmiştir. Ksantohumol'un yüksek özütleme ürünü; pH 5,0 da Triton X-114 (v/v)'ün % 2,5; sodyum klorür (w/v)'ün % 15,70 °C sıcaklık ve 10 dk'lık bir zamanda elde edilmiştir. Bu koşullar altında, XN limiti, 0,003 mg/L' dir. Amaçlanan metot çeşitli bira örnekleri içindeki XN'in tanımlanması için başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Bu örneklerdeki XN' in içeriği 0,052-0,628 mg/L aralığında olup % 90,7'den % 101,9'a kadar geri kazanım sağlanmıştır. Geliştirilen yöntem bira içindeki

XN'in özütlenmesi ve tanımlanması için etkili, yeşil, hızlı ve ucuzdur (Chen ve ark., 2010a).

Şerbetçi otu kozalaklarındaki XN, humulon ve lupulonlar'ın analizi için yarı-kantitatif TLC metodu belirlenmiştir (Hänsel ve ark., 1986). Bu şerbetçi otu ve ürünleri içindeki XN'in tanımlanması için geliştirilen duyarlı HPTLC (YAİTK) yöntemine yol göstermiştir (Kac ve ark., 2006). Benzer tanımlama UV veya MS tanıma ile HPLC (YASK) ve mikroemülsiyon elektrokinetik kromatografisi tarafından başarılmıştır (De Keukeleire ve ark., 2003; Vanhoenacker ve ark., 2000). XN ve IXN, farklı ticari hop ürünlerinde HPLC/DAD ve HPLC-ESI-MS/MS tarafından tanımlanmıştır. 8-PN'in tanımlanması için, elektrosprey iyonizasyon ile HPLC-MS kullanılarak analitik bir yöntem geliştirilmiştir (Rong ve ark., 2000).

### **2.9. *Humulus Lupulus L.* Bileşenlerinin Hastalıklardaki Rolü**

Cleemput ve ark. (2009)'ları, sert asitlerin biyolojik ve farmakolojik özelliklerinin yanı sıra her bir fitokimyasal yönünü içeren şerbetçi otu sert asitlerini özetlemişlerdir. Kanser, diyabet, kemik ve buna yakın eklem iltihabı, osteoporoz ve kardiyovasküler hastalıkları içeren birçok insan hastalıklarının engellenmesi ve tedavisi için şerbetçi otu sert asitleri gösterilmiştir (Şekil 20).



Şekil 22. Hop acı asitlerinin belirgin gruplarının önemli biyolojik özellikleri (Cleemput ve ark., 2009).

$\alpha$ - ve  $\beta$ - asitler kanser ilişkili ve iltihabi; iso- $\alpha$ -asitler, dihidro-iso- $\alpha$ -asitler, tetrahidro-iso- $\alpha$ -asitler, heksahidro- iso- $\alpha$ -asitler ise yağ/şeker metabolizması ve iltihabi hastalıklarını önlemede etkilidirler (Cleemput ve ark., 2009). Şerbetçi otu bitkisinin merkezi sinir sistemi (CNS) düzeyindeki etkisi ve buna ilaveten uyku bozukluklarındaki faydaları laboratuvar hayvanları üzerinde çalışılmış, ama sonuçlar bazen çelişkili olup tekrarlanan incelemeler gerektirmektedir (Zanoli ve Zavatti, 2008).



**BÖLÜM 3****MATERYAL VE YÖNTEM****3.1. Materyaller****3.1.1. Kullanılan kimyasallar**

❖ Çözücü olarak; hekzan, diklorometan, etilasetat, aseton, metanol, etanol, DMSO *Merck ve Sigma-Aldrich firmalarından temin edilmiştir.*

❖ Biyoaktivite çalışmaları için;

▪  $\alpha$ -Kimotripsin (Sigma, C4129-1G), N-Sük-Fenil-p-nitroanililit (Sigma, S2628-1G), Tripsin (bovin pankreasından) (Sigma, T8003-1G), N $\alpha$ -Benzoil-DL-arjinin-4-nitroanilit hidroklorür (Sigma, B4875-500MG), Papain (papaya lateksinden) (Sigma, P3375-25G), Tirozinaz (Mantar tirozinaz) (Sigma, T3824-500 KU), L-Tirozin (Sigma, T3754-100G), penisilinaz (Sigma, P0389), nitrocefın (Calbiochem-484400), karboksipeptidaz A (Sigma-C9268) *Enzim ve substratları Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.*

▪ Tris (hidroksimetil)aminometan (Trizma base, minimum %99,9 titrasyon, Sigma), Sodyum klorür (Sigma, S7853), MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (Sigma, 2670), LiCl (Sigma-213233-100g), potasyum fosfat monobazık, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma, 04243), sodyum fosfat dibazık dihidrat, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O(Sigma, 04272) *enzim çalışmalarında kullanılan tampon çözeltiler için gerekli kimyasallar Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.*

▪ MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür, M5655) *Sigma firmasından temin edilmiştir.*

❖ Antioksidan çalışmaları için;

▪ Trolox (Sigma Aldrich, 238813-5g), DPPH (Sigma Aldrich D9132-1), (Kersetin, Sigma Aldrich, Q4951-10g), (Neokuprein, Sigma aldrich, N1501-1g), Ce(IV)Sülfat, (Sigma, 359009-25g), TPTZ, (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazin) (Sigma, 93285-1g), Ferulik asit (%99), (Sigma, 12,870-8-5g), Folin-Ciocalteu's Fenol Reaktifi (2N), (Sigma, F9252-100 mL), Silikajel 60 (0,063-0,200 mm), (70-230 mesh), (Merck, 107734-1000), TLC silikajel 60 F<sub>254</sub>, DC Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck, 105554.0001) *Merck ve Sigma firmalarından temin edilmiştir.*

**3.1.2. Kullanılan cihazlar**

- ❖ Dörtlü birleşik sistem Sokshelet düzeneği, TERMAL,
- ❖ UV kabini, CAMAG,
- ❖ Döner Buharlaştırıcı, IKA RV 10 control,
- ❖ Combi flash Rf Teledyne ISCO,
- ❖ Acculab, ALC-210.4, Germany, Hassas Terazî,
- ❖ TESCO-KİPA MC09 220-240 V-50Hz Rondo-doğrayıcı,
- ❖ Perkin Elmer lamda 25 UV spektrofotometre,
- ❖ HPLC-UV Dionex Ultimate 3000 preparatif HPLC (ışın-iki kutuplu lamba)

**3.2. Deneysel Yöntemler****3.2.1. Bitkinin toplanması ve tanımlanması*****Humulus lupulus L.***

**Familya:** Cannabinaceae

Bitkinin toprak üstü kısımları, Eylül 2010 tarihinde olgunlaşma döneminde yani fitokimyasal içeriği en yoğun olduğu dönemde toplanmıştır. Toplama işlemi yapılırken yeterli örnek miktarı homojen bir şekilde toplanmış ve populasyona zarar vermemeye dikkat edilmiştir. Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hulusi MALYER tarafından bitki tanımlaması yapıp aşağıdaki şekilde Uludağ Üniversitesi HERBARYUM' una kayıt edilmiştir (Şekil 17).

*Bakıkesir: Balıkesir-Manyas, Darıca Köyü, Yol kenarları, 55m. 12.09.2010, Belma AYAN: 32808*

**3.2.2. Bitkinin kurutulması, öğütülmesi ve depolanması**

Bitki; toplanır toplanmaz içindeki bileşenlerin korunması ve mikroorganizma üremesini engellemek için kurutma aşamasına geçilmiştir. Bunun için evin güneş görmeyen, havadar ve tozlanma oluşmayacak bir bölgesi seçilmiş ve kurutma işlemi bitkinin cinsine bağlı olarak tam kurumayı sağlayacak şekilde 2 ay kadar sürdürülmüştür.

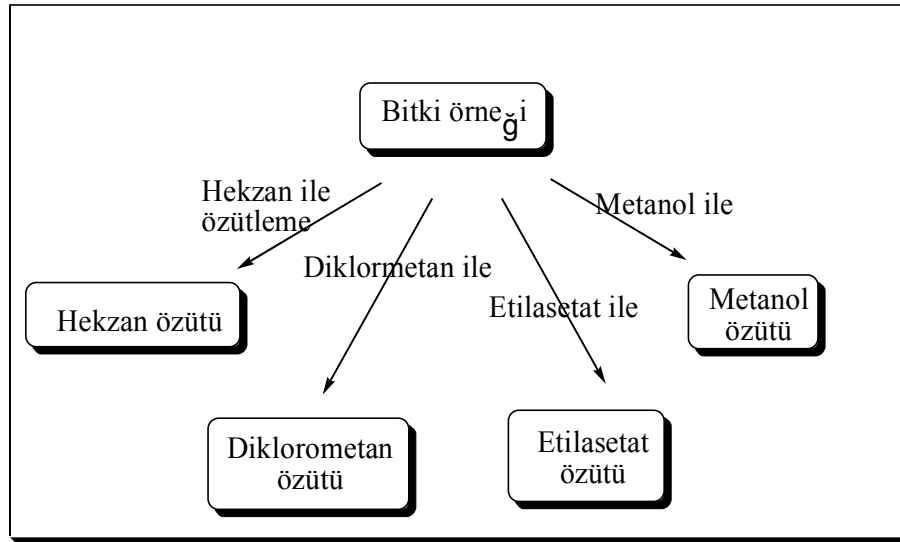
T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Çanakkale İl Müdürlüğü'nün Bitki, Toprak ve Su Analiz Laboratuvarında Kocintok marka bitki öğütme değirmeni kullanılarak öğütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunun için kozalak, yaprak ve saptan oluşan toprak üstü kısımları ayrılarak, kozalak ve bitki sapı önce nemin uzaklaştırılması için 70 °C sıcaklıkta etüvde

kurutulduktan sonra değirmende toz haline getirilmiştir. Yapraklar elde ufalanmıştır. Öğütülen 780 g numune +4 °C de, buzdolabında saklanmıştır.

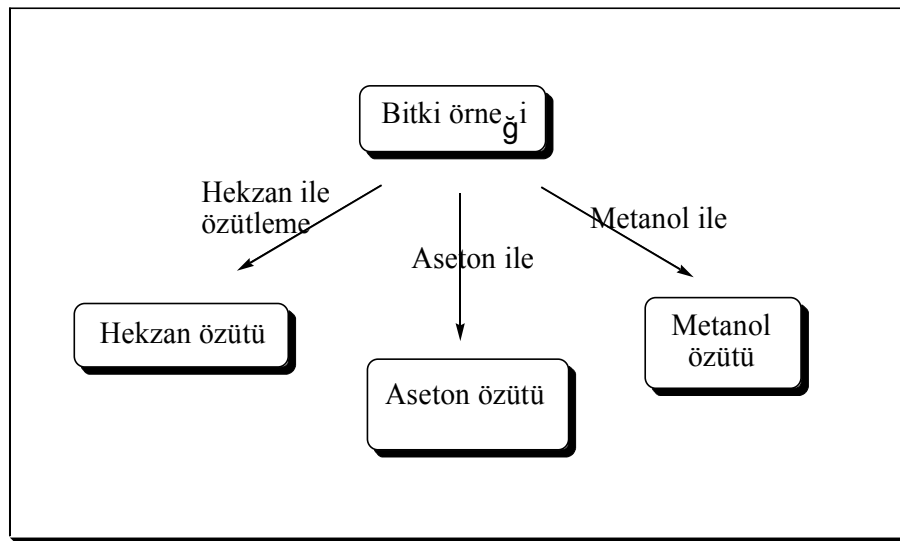
### **3.2.3. Bitki örneklerine özütleme işleminin uygulanması**

Öncelikli amaç lipofilik ve küçük molekül ağırlıklı bileşikleri (klorofil vb) elde etmek olduğundan apolardan polara doğru giden çözücü sistemleri uygulanmıştır. 100 g toz haline getirilmiş bitki numunesi sırayla apolardan polara giden çözücüler ile muamele edilmiştir. Bunun için öğütülmüş numuneden aldığı kadarı süzgeç kağıdından hazırlanan kartuşa konulup Sokshelet kolonuna yerleştirilmiştir. Ardından 500 mL' lik cam balona 350 mL n-hekzan çözücüsü eklenip ısıtıcı yardımıyla bu maddenin buharlaşması sağlanmıştır. Buharlaşan çözücü özütleme kolundan geçerek geri soğutucuya ulaşır. Geri soğutucuda yoğunlaşan çözücü tekrar özütleme koluna gelerek kartuş içerisinde bulunan numuneyle etkileşip cam balona geri döner. Bu işlem çözücünün alabileceği tüm maddeler çözünüp en başta renkli olan sifon rengi berraklaşınca (çözücü rengi) kadar devam eder. 100'er g yaprak ve bitki sapı numuneleri içinde özütleme işlemi uygulanmıştır. 100 g öğütülmüş bitkiden elde edilen özütler biyoaktiflik çalışmalarında kullanılırken, diğer taraftan da öğütülen bitki örneklerine özütleme işlemiyle devam edilerek özüt miktarları çoğaltılmıştır. Zamkimsi (müsilaj) şeklinde elde edilen özütler +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır.

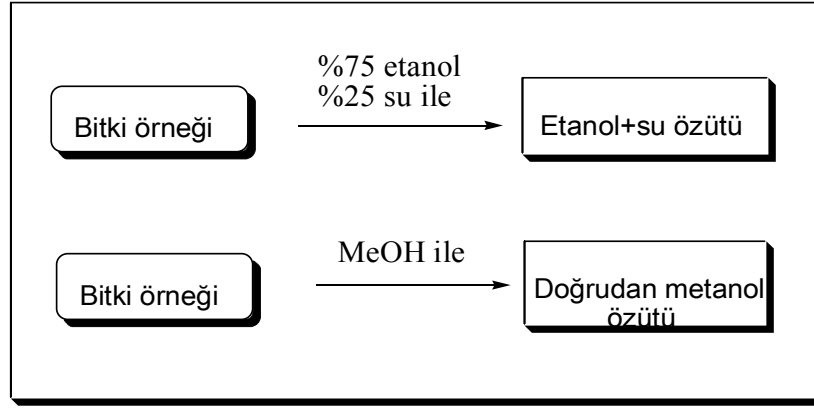
Çalışma kapsamında antioksidan yöntemlerinin birbiri arasında kıyaslanması ve biyoaktiflik denemelerinin hangi aktif özütte daha belirgin olarak saptanacağı amacı ile bitki (kozalak) örneklerine çeşitli çözücüler sırayla uygulanarak farklı özütler elde edilmiştir (Şekil 23-25).



Şekil 23. Bitki örneğinden elde edilen 4 farklı özüt. 1) heksan, 2) diklorometan, 3) etilasetat ve 4) metanol (kademeli) özütleri.



Şekil 24. Bitki örneğinden elde edilen 2 farklı özüt. 1) aseton, 2) aseton sonrası metanol özütleri.



Şekil 25. Bitki örneğinden elde edilen 2 farklı özüt. 1) etanol-su ve 2) metanol (doğrudan) özütleri.

Hekzan, diklormetan, etiasetat ve metanol ile özütleme işlemi bitki yaprak ve sap numuneleri içinde uygulanmıştır.

#### 3.2.4. Bitki özütlerinin aktifliğinin DPPH (1,1-difenil-2-pikril hidrazil) ile nitel olarak belirlenmesi

Döner buharlaştırıcıda çözücüsü uzaklaştırılıp +4 °C’de saklanan özütlerin her birinden bir miktar tartılarak, 10 mL metanolde çözülmüştür. Çözeltilere İnce Tabaka Kromatografisi uygulanarak UV spektrofotometresi ile lekeler gözlenmiştir.

Hekzan özütü için;

Hekzan : EtOAc (4:1), (3:1), (2:1) çözücü karışımı,

Diğer özütler için;

DCM : MeOH (4:1), (3:1), (2:1) çözücü karışımı

Lekeler işaretlendikten sonra 50 mL metanolde hazırlanmış % 4’lük DPPH çözeltisi, İTK plakalarının üzerine püskürtülüp 1-2 dakika içinde DPPH püskürtülmesiyle mor renkli olan lekeler aktif özütlerde parlak sarı renkli hale gelmiştir. Bu şekilde hekzan özütünün organik asitler içerdiği ortama 1-2 damla buzlu asetik asit ilavesiyle kesinleştirilmiştir. Metanol özütleri (doğrudan, kademeli ve aseton sonrası), etanol-su özütü, aseton ve aseton sonrası metanol özütlerinde yoğun sarı renkli parlak lekelerin varlığı ile bitki kozalak örneğinin aktif özütleri belirlenmiştir. Bitki sapı ve yaprak numuneleri için lekelerin 254

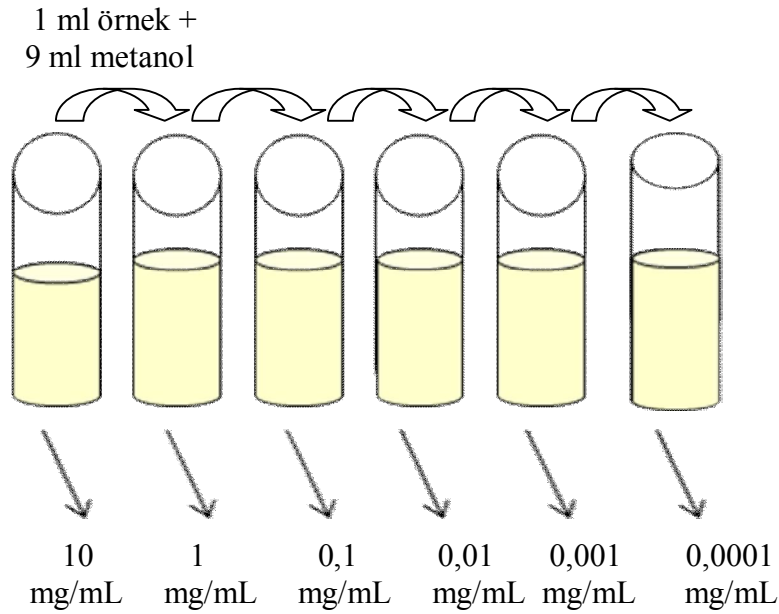
ve 365 nm'de pembe renkli olması ve DPPH püskürtülmesiyle de sarı renkli olmaması nedeniyle aktif özütlerinin olmadığı belirlenmiştir. Bundan sonraki deneysel işlemlere aktif kozalak özütleri ile devam edilmiştir (Çizelge 4).

Çizelge 4. Kozalak örneği aktif özütleri ve özütlerden elde edilen miktarları

Özüt	Özüt miktarı (g)
Hekzan	14,45
Aseton	11,75
Aseton sonrası metanol	9,82
Metanol (kademeli)	25,75
Metanol (doğrudan)	38,25
Etanol-su	35,75

### **3.2.5. DPPH (1,1-difenil 2-pikril hidrazil) serbest radikal süpürücü aktivite tayini**

DPPH ile radikal süpürücü aktivite tayini Prof. Sarker S.D.'in danışmanlığında gerçekleştirilmiştir. (Shoeb ve Sarker, 2007). Metanolde depo çözeltileri (10 mg/mL) hazırlanan özütlerin seri seyreltmeleri (1-0,0001 mg/mL) (Şekil 26), yapıp her bir çözeltilerden 1'er mL tüplere alınarak üzerlerine DPPH (8 mg/100 mL)'in metanoldeki çözeltilisinden 1'er mL eklenmiştir. Örnekler 30 dakika bekletilip 517 nm'de soğurmaları okunmuştur. Soğurmaların ortalamaları alınarak % inhibisyonları hesaplanıp derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. %50 inhibisyona yakın olan aktif derişim aralığı belirlenmiştir. Belirlenen aktif derişimden 100-900 µL arasındaki tüm hacimler alınarak metanol ile 1 mL'ye tamamlanmıştır (Çizelge 5). Her bir çözeltilerden 500 µL alınarak, 500 µL DPPH (8 mg/100 mL)'in metanoldeki çözeltilisinden eklenmiştir. 30 dakika sonra 517 nm'de okunan soğurmaların ortalamaları alınarak % inhibisyonları hesaplanıp derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. Bu grafikten IC<sub>50</sub> değerleri belirlenmiştir. Standart olarak kersetin kullanılmıştır. Soğurmada ki düşüş ne kadar büyükse antioksidan aktivite o kadar yüksek demektir.



Şekil 26. Seri seyreltmelerin şematik gösterimi.

DPPH radikalini süpürme aktivitesi reaksiyonu inhibe etme (önleme) yüzdesi şeklinde ifade edilmek üzere eşitlik (1.2)'deki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\% \text{ İnhibisyon} = [\text{SK} - \text{SÖ} / \text{SK}] \times 100 \quad (1.2)$$

SK: Kontrol (antioksidan içermeyen) örneğin soğurması

SÖ: Örneğin (antioksidan içeren) soğurması

Çizelge 5. Kozalak hekzan numunesi 0,01-0,001 mg/mL derişim aralığının % 50 inhibisyonu için hazırlanan örneklerin miktarları

	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006	0,007	0,008	0,009
	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL
0,01 mg/mL	100 µL	200 µL	300 µL	400 µL	500 µL	600 µL	700 µL	800 µL	900 µL
MeOH µL	900 µL	800 µL	700 µL	600 µL	500 µL	400 µL	300 µL	200 µL	100 µL

Bu çözeltilerin her birinden 0,5'er mL alınarak deney tüplerine aktarılmış üzerlerine 0,5 mL DPPH çözeltisi (8 mg/100 mL metanol) ilave edilmiştir.

Kör deneme için; 0,5 mL DPPH çözeltisi + 0,5 mL metanol

### **3.2.6. Toplam fenolik bileşik miktarı tayini**

Toplam fenolik madde miktarı tayini Velioğlu ve ark., (1998) tarafından kullanılan yöntemle yapılmıştır. Bu amaçla taze olarak stok çözeltisi hazırlanan özütlerden, seri seyreltme ile elde edilen 1 mg/mL derişimdeki çözeltilerden deneme tüplerine 100 µL örnek ve 10 kat saf su ile seyreltilmiş 0,75 mL F-C reaktifinden eklenip vorteks karıştırıcıda karıştırılmıştır. Karışım oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. 0,75 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (w/v)' in % 6'lık çözeltisi eklenip karıştırılmıştır.

Oda sıcaklığında 90 dakika bekledikten sonra soğurmalar UV spektrofotometresi'nde 725 nm'de okunmuştur. Standart olarak ferulik asit (0,01–0,05 mg/mL) kullanılmıştır (Şekil 40). Sonuçlar ferulik asit standart eğrisi üzerinden mg ferulik asit/100 g özüt şeklinde ifade edilmiştir (Bölüm 4.2).

### **3.2.7. (CUPRAC) Bakır(II) indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi**

Bakır(II) indirgeyici antioksidan kapasite tayini Güçlü ve ark., (2006) tarafından kullanılan yöntemle yapılmıştır. 10<sup>-2</sup> M CuCl<sub>2</sub>, 7,5x10<sup>-3</sup> M neokuproin çözeltileri ve amonyum asetat tamponundan (pH 7) 1'er mL alınmıştır. Üzerine son hacim 4,1 mL olacak şekilde, x mL özüt çözeltisi ve (1-x) mL su ilave edilip iyice çalkalanmıştır. Kullanılan hacimler eşitlik (1.3)'te görülmektedir. Tüpler oda sıcaklığında ağzı kapalı olarak 30 dakika bekletilip 450 nm'de soğurmalar okunmuştur. Standart olarak kersetin kullanılmıştır. Sonuçlar kersetin eşdeğeri flavonoid derişimi (QERFC) olarak hesaplanmıştır.

1 mL Cu(II) + 1 mL Nc + 1 mL NH<sub>4</sub>Ac + x mL örnek + (1,1-x) mL su **(1.3)**

V<sub>toplam</sub>: 4,1 mL

1 mg/mL örnek çözeltilerden tüplere sırasıyla;

100 µL, 200 µL, 300 µL, 400 µL, 500 µL, 600 µL, 700 µL, 800 µL, 900 µL

ve (1,1-x) hacim olacak şekilde üzerine sırasıyla su;

1 mL, 900 µL, 800 µL, 700 µL, 600 µL, 500 µL, 400 µL, 300 µL, 200 µL eklenmiştir.



Çözeltilerin hazırlanması: Cu(II) klorür çözeltisi;  $10^{-2}$  M olacak şekilde bakır(II)klorürden ( $\text{CuCl}_2$ ) 0,066 g tartım alınıp su ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Amonyum asetat ( $\text{NH}_4\text{Ac}$ ) tamponu; 1 M (pH=7) olacak şekilde  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 'den 5,25 g ve sodyum asetatın 8,2 g tartım alınıp su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Neocuproin çözeltisi;  $7,5 \times 10^{-3}$  M olacak şekilde (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin)'den 0,078 g tartım alınıp % 96'lık etil alkolle 50 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

### 3.2.8. TEAC (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi) yöntemi

Örneklerin antioksidan kapasitesini belirlemek için yöntem Re ve ark., (1999)'nın belirttiği tekniğe göre gerçekleştirilmiştir.  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  radikal çözeltisi ancak 2-3 gün kararlı halde kalabilmesinden dolayı analizden 1 gece önce hazırlanmıştır. Radikal çözeltisi, 734 nm'de 0,700 ( $\pm 0,02$ ) soğurma değeri gözleninceye dek PBS ile seyreltilmiştir.  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  radikalinin 734 nm'deki soğurma değeri başlangıç soğurması olarak kaydedilmiştir. 1 mg/mL derişimdeki özütlerden farklı hacimlerde ( $20 < \% \text{inhibisyon} < 80$  kuralını sağlayacak şekilde)  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  radikal çözeltisine eklenip 6 dakika boyunca her 1 dakikada soğurma okunmuştur. 6. dakikanın sonundaki soğurma değeri esas alınarak % inhibisyon değerleri eşitlik (1.4)'ten hesaplanmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon oranı} = \frac{\text{Baslangıç soğurma değeri} - \text{Son soğurma değeri}}{\text{Baslangıç soğurma değeri}} \quad (1.4)$$

50  $\mu\text{L}$  örnek alınarak yapılan bu işlemler en az 3 kez tekrarlanmış ve inhibisyon oranları hesaplanarak bunların ortalaması alınmıştır. Daha sonra, örnek hacmi değiştirilerek 75  $\mu\text{L}$  ve 100  $\mu\text{L}$  hacimlerde aynı işlemler tekrarlanmıştır. Elde edilen ortalama yüzde inhibisyon değerleri örnek hacimlerine (50, 75 ve 100  $\mu\text{L}$ ) karşı bir grafiğe aktarılmış ve bu verilere linear regresyon analizi uygulanarak örneğe ilişkin eğriye ve bu eğriyi tanımlayan eşitliğe ulaşılmıştır.

Analize başlamadan önce 2,5 mM Troloks depo çözeltisinden 10 mL'lik 4 ölçü balonuna sırasıyla 2, 4, 6 ve 8 mL alınıp balonlar PBS çözeltisi ile hacme tamamlanarak, standart çözeltiler elde edilmiştir. Böylece bu standart çözeltilerden 10  $\mu\text{L}$  alınıp mikro küvet içerisindeki 1 mL radikal çözeltisine eklendiğinde mikro küvet içerisinde sırasıyla 5, 10, 15 ve 20  $\mu\text{M}$  derişimlerde troloks olması sağlanmıştır. Örneklerle uygulanan

spektrofotometrik uygulamalar troloks standartlarına da uygulanıp, ortalama inhibisyon değerleri hesaplanarak troloks derişimine karşı grafiğe işlenmiştir. Elde edilen verilere linear regresyon analizi uygulanmak suretiyle, troloks standart eğrisine ve bu eğriyi tanımlayan eşitliğe ulaşılmıştır. Sonuçlar TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity; troloks esdeğer antioksidan kapasitesi) değeri olarak ifade edilmiştir.

ABTS<sup>+</sup> radikal çözeltisi: 2,45 mM potasyum persülfat (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) içeren 7 mM'lık 10 mL ABTS çözeltisi hazırlanmıştır (0,0384 g ABTS bir miktar damıtık su ile çözülür ve 12,25 mM K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> çözeltisinden 2 mL eklenir, hacim damıtık su ile 10 mL'ye tamamlanır). Bu çözelti, oda sıcaklığında ve karanlıkta 12-16 saat bekletilerek ABTS<sup>+</sup> radikal katyon çözeltisi hazırlanmış olur.

PBS (pH=7,4 tuzlu fosfat tampon çözeltisi): 19 mL 0,2 M monobazik sodyum fosfat çözeltisi ile 81 mL 0,2 M dibazik sodyum fosfat çözeltisi karıştırılarak, üzerine 8,77 g tuz eklenip hacim 1 L'ye tamamlanmıştır.

### **3.2.9. FRAP (Demir İyon İndirgeyici Antioksidan Güç) yöntemi**

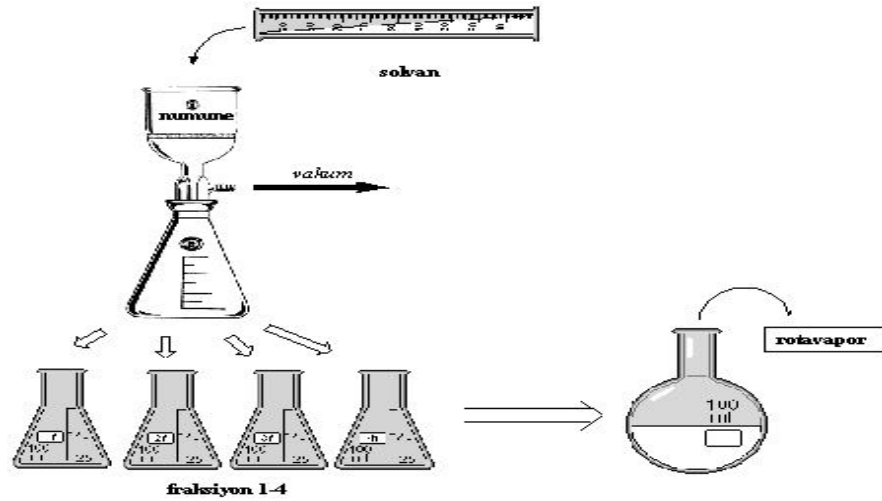
Benzie ve Strain (1996, 1999)'in düzenlenmiş yöntemi kullanılmıştır. 300 mmol/L asetat tamponu (pH: 3,6), 10 mmol/L TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazin) ve 20 mmol/L demir (III) klorür çözeltisi (40 mmol/L HCl'de) hazırlanmıştır.

FRAP çalışma reaktifi: Taze olarak 25 mL asetat tamponu, 2,5 mL TPTZ çözeltisi ve 2,5 mL FeCl<sub>3</sub> çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır.

0,5 mL numune (1mg/mL) 3,5 mL damıtık su ile karıştırılıp 1 mL çalışma reaktifi eklenmiştir. Karışım 37 °C'lik su banyosunda 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. 10 dakika sonunda 593 nm'de soğurma değerleri okunmuştur. Standart olarak FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O kullanılmıştır (Frankel ve Meyer, 2000; Gong ve ark., 2012).

### **3.2.10. Düşük basınç sıvı kromatografisi (VLC)**

Yaklaşık 2-3 g hekzan özütü silikajel (Sigma-Aldrich, Kieselgel, 70-230 Mesh) ile doyurulup kuruması için iyice karıştırılmıştır. Buchner hunisi vakuma bağlanarak üzerine taşlı huniye benzeyen kolona, yarısına gelmeyecek şekilde silikajel (Kieselgel, 70-230 Mesh) ve üzerine elde edilen katı numune eklenmiştir. Silikaya emdirilen numune doldurulmuştur. Yıkama işlemine önce iki kere % 100 hekzan (100 mL) ile başlanmıştır. Ardından çözücü polarlığı % 20, 40, 60, 80 arttırılarak ve son olarak % 100 etil asetat ile yıkama işlemi sonlandırılmıştır (Şekil 27).



Şekil 27. VLC ve VLC sonrası elde edilen ayrımların şematik gösterimi (Kırimer ve ark., 2002).

Toplamda 7 ayırım elde edilmiştir. Çözücüsü uçurulan her bir ayırma n-hekzan:etilasetat çözücü sistemi tarafından İnce Tabaka Kromatografisi ile bakılmıştır. İTK plakaları kurutulup, üzerlerine DPPH çözeltisi (4 mg/50 mL) püskürtülerek antioksidan aktivite olup olmadığı nitel olarak renk değişimlerinden belirlenmiştir. F3-F7 arasındaki tüm ayrımlar DPPH çözeltisi ile renk değişimine uğramıştır. F3, İTK çözücü sisteminde en hızlı yürüyen ayırım olmuştur. Tüm ayrımların çözücülerini döner buharlaştırıcıda uçurularak şişelere boşaltılmış ve içeriğindeki bileşenlerin miktarları belirlenmiştir (Çizelge 6).

Çizelge 6. VLC sonrası elde edilen karışım halindeki katıların miktarları

Katı	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
Miktar	47,7 mg	148 mg	2350 mg	805 mg	455 mg	229 mg	114

### 3.2.11. Katı faz özütlemesi (SPE) ve HPLC-UV

Bu işlem K-Metanol özütüne uygulanmıştır. Bunun için 2-3 g numune silikajel (G60) ile doyurulup iyice kurutulmuştur. Oluşan katı SPE kolonuna Strata C<sub>18</sub> 20 g cartridge (from Phenomenex) boşaltılmıştır. Katı faz kolon düzeneği Nuche erleni üzerine

oturtularak vakuma bağlanmıştır. Sırasıyla polarlık artırılarak aşağıdaki çözücü sistemi kullanılmıştır.

Metanol : su (200 mL); % 20, % 50, % 80 ve % 100 metanol

% 20 metanol içeren çözücü karışımından başlanarak devam eden ayırma işlemi tamamlanıp çözücü fazlası döner buharlaştırıcıda uçurulmuştur. Kurutulan katılar tartılarak miktarları belirlenip 20 mg/mL için çözeltiler hazırlanmıştır. Bunun için katılar diklorometan içinde çözülmüştür. İTK ile incelenip DPPH çözeltisi püskürtülerek antioksidan aktivite gösterip-göstermediklerine bakılmıştır. Katı faz özütlemesi % 100 metanol ayırımından elde edilen katı, HPLC-UV dedektöründe incelenmiştir. 97 bar ve 250 µL enjeksiyon hacminde incelenen örnek için toplam 8 ayırım elde edilmiştir. Çözücüsü uçurulan katıların <sup>1</sup>H-NMR spektrumları alınmıştır (Bölüm 4.6).

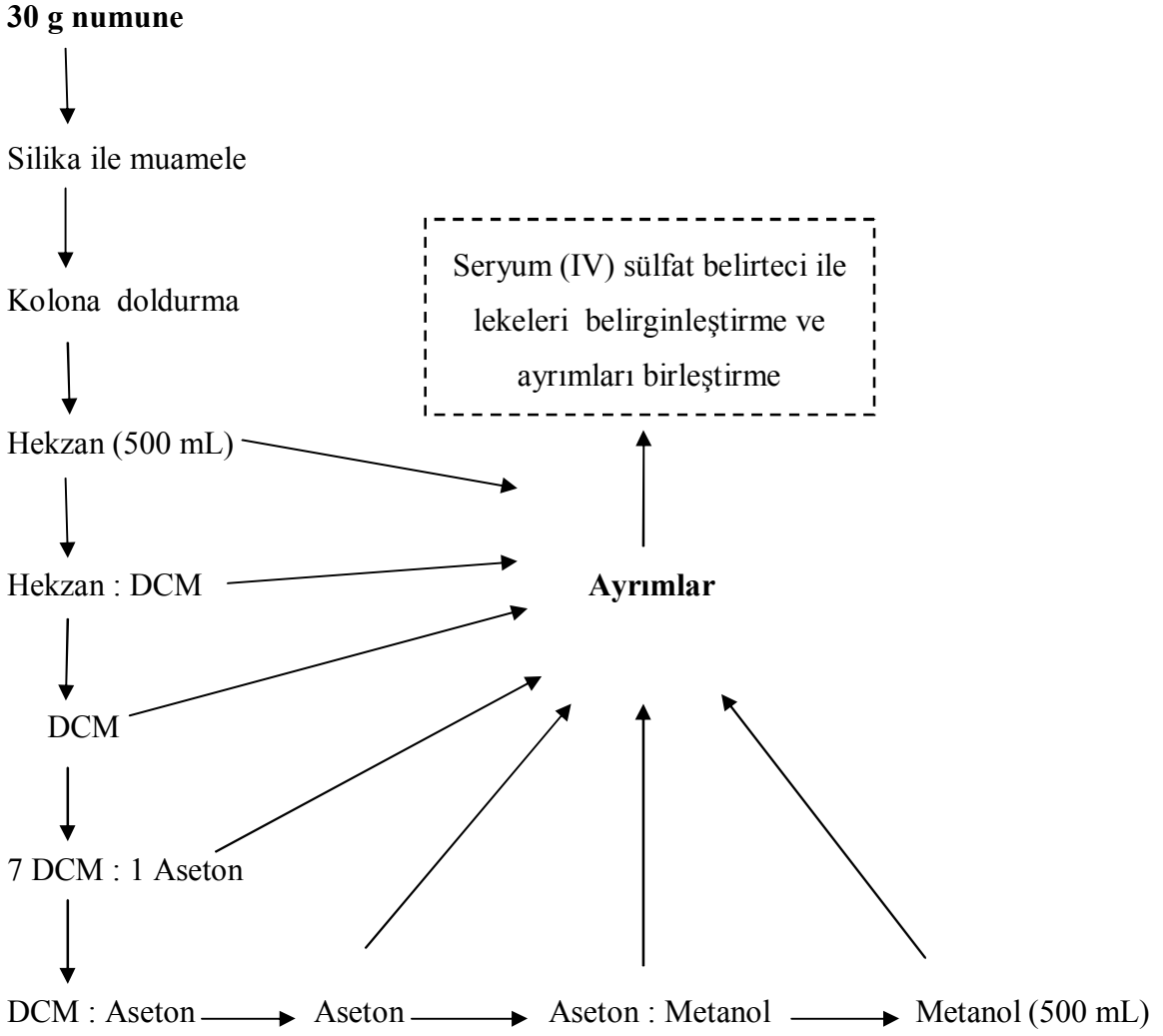
### **3.2.12. Kolon Kromatografisi**

#### **3.2.12.1. Düşük basınç sıvı kromatografisi F3 ayırımı için uygulanan kolon kromatografisi**

Çözücü sistemi hekzan:EtOAc olarak belirlenen 2100 mg numune az miktarda DCM ile çözümlenerek kolona verilmiştir. Yıkama işlemine hekzan (100 mL) ile başlanarak polarlık % 5 etilasetat ile artırılarak % 100 olana dek devam edilmiştir. Sürekli karışım halinde gelen ayırımlar tekrar birleştirilerek 4 kez kolona verilmiştir.

#### **3.2.12.2. D-MeOH özütü kolon kromatografisi**

Tartılan 30 g numune az miktar metanol ile çözümlenerek silikajel (Sigma-Aldrich, Kieselgel, 230-400 Mesh) ile doyurulup, iyice kurutulmuştur. Kolonun 2/3'ü aynı tip silikajel ile doldurulduktan sonra numune kolonun üst kısmına ilave edilmiştir. Polarlığı artırılan çözücü sistemi yardımıyla yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. İlk (hekzan ile) ve son yıkama (metanol ile) işlemi için 500 mL, diğer çözücü sistemleri için ise 250 mL kolona ilave edilmiştir. İşlem basamakları aşağıdaki gibidir.



İTK plakalarına seryum (IV) sülfat belirteci püskürtülerek 105 °C'lik etüvde 5 dakika bekletilip belirlenen lekeler vasıtasıyla elde edilen aynı ayrımlar birleştirilmiştir (Şekil 69).

Seryum (IV) sülfat çözeltisinin hazırlanması: 5 g seryum (IV) sülfat 25 mL % 98'lik sülfürik asit içerisinde çözülerek saf su ile 250 mL'ye tamamlanmıştır.

### 3.2.13. Enzim-Aktivite/İnhibisyon Çalışmaları

#### 3.2.13.1. Proteaz inhibisyon çalışmaları

Bu çalışma Atta-ur-Rahman ve ark., (2005)'nin belirttiği yönteme göre gerçekleştirilmiştir. Bu yönteme toplam hacim 200 µL olacak şekilde özütlerle farklı hacimlerde eklemeler yapılarak aktif derişimin belirlenmesi sağlanmıştır (Çizelge 7). Özütünde eklenmesi ile 37 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakılan karışımların, substratın eklenmesinin ardından spektrofotometrede 410 nm'de soğurmaları okunarak PMSF (fenilmetansülfonilflorür) inhibitörüne karşı grafikleri elde edilmiştir. 10 ve 1 mg/mL'lik çözeltiler derişik geldiğinden dolayı istenilen grafikler elde edilememiş ve bundan sonraki

enzim-aktivite/inhibisyon çalışmalarına 1/5 seyreltilen çözeltiler üzerinden devam edilmiştir. Proteaz bünyesinde tüm enzim çalışmaları için aynı hacimler kullanılmıştır (Karboksipeptidaz A 254 nm, diğerleri 410 nm’de okunmuştur). Tartılan özüt miktarları aşağıda listelenmiştir.

- ❖ Hekzan özütü: 567 mg
- ❖ Aseton özütü: 366 mg
- ❖ Aseton sonrası metanol özütü: 522 mg
- ❖ Etanol-su özütü: 525 mg
- ❖ Metanol (kademeli) özütü: 624 mg
- ❖ Metanol (doğrudan) özütü: 657 mg)

Çizelge 7. Farklı özüt derişimlerine uygulanan enzim ve substrat hacimleri

Özüt derişimleri	Enzim	Tampon çözelti	Özüt	Substrat	Toplam hacim
10 mg/mL	5 µL	135 µL	10 µL	50 µL	200 µL
1/10 seyreltilmiş	10 µL	80 µL	10 µL	100 µL	200 µL
1/5 seyreltilmiş	10 µL	130 µL	10 µL	50 µL	200 µL

-----

37 °C’de 10 dakika

**1.Enzim:** α –Kimotripsin, (61 Unit/mg katı), (65 Unit/mg protein)

0,34 mg tartıldı (22,1 Unit). 200 µL 50 mM Tris-HCl pH 7,5 tampon çözeltisinde hazırlanmıştır. Son hacim 110 U/mL olmuştur.

**Substrat:** N-Süksinil-Fenil-p-nitroanilit

18,23 mg tartıldı. 5 mL 50 mM Tris-HCl pH 7,5 tampon çözeltisinde hazırlanmıştır.

Tampon çözelti hazırlanması: Tris-HCl 50 mM (1,21 g) ve L-sisteinyum klorür 1mM (0,035 g) tartılarak bir miktar saf suda çözülmüştür, 100 mM pH 8,07 olan EDTA.Na<sub>2</sub>

tampon çözeltisinden (4 mL) eklenmiştir. pH metre ile ayarlama yapıldıktan sonra toplam hacim 200 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanmıştır.

**2. Enzim:** Tripsin, (10000 Unit/mg katı)

0,49 mg (4900 Unit) tartıldı. 1 mL 50 mM Tris-HCl pH 7,5 tampon çözeltisinde hazırlanmıştır.

**Substrat:** N $\alpha$ - Benzoil-DL-arjinin-4-nitroanilit hidroklorür

4 mM için 8,7 mg tartıldı. 5 mL 50 mM Tris-HCl pH 7,5 tampon çözeltisinde hazırlanmıştır.

**3. Enzim:** Papain, (1,5-10 Unit/mg katı)

1 mg tartıldı. 250  $\mu$ l 50 mM Tris-HCl pH 7,5 tampon çözeltisinde hazırlanmıştır.

**Substrat:** N $\alpha$ - Benzoil-DL-arjinin-4-nitroanilit hidroklorür

10 mg tartılarak 500 mL 50 mM Tris-HCl pH 7,5 tampon çözeltisinde hazırlanmıştır.

**4.Enzim:** Karboksipeptidaz A, ( $\geq$ 50 unit/mg protein)

20  $\mu$ L enzim, 230  $\mu$ L LiCl (% 10, w/v) çözeltisinde hazırlanmıştır.

**Substrat:** Hippuril-L-Fenilalanin

4,55 mg tartılarak 2030 mL 1M Tris-HCl (pH 7.5) tampon çözeltisinde hazırlanmıştır.

Tampon çözelti hazırlanması: Tris-HCl 1M (24,228 g) ve sodyum klorür 0,5 M (5,84 g) tartılarak bir miktar saf suda çözülmüştür. pH ayarlamasının ardından toplam hacim 200 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanmıştır.

*96 kuyucuklu plakada okuma 254 nm için yapılamadığı için küvet kullanıldı.*

### **3.2.13.2. Tirozinaz inhibisyon çalışması**

**Enzim:** Tirozinaz, (3610 Unit/mg katı)

0,5 mg tartıldı, 1 mL 0,1 M, pH 6.8 fosfat tamponunda hazırlanmıştır.

**Substrat:** L-Tirozin

6,16.10<sup>-3</sup> g tartılarak 0,1 M, pH 6.8 fosfat tamponunda hazırlanmıştır.

Tampon çözelti hazırlanması: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,558 g) ve Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,253 g) tartılarak bir miktar saf suda çözülmüştür. pH ayarlamasının ardından toplam hacim 500 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanmıştır.

Proteaz inhibisyon çalışmasında olduğu gibi aynı hacimler kullanılmıştır (Çizelge 7). 25 °C'de 10 dakika inkübe edildikten sonra spektrofotometre ile 475 nm'de soğurmalar okunmuştur.

### **3.2.13.3. $\beta$ -laktamaz inhibisyon çalışması**

**Enzim:** Penisilinaz, (1,5-3,0 U/mg protein)

5,5 mg tartılarak 1 mL 100 mM fosfat tampon (pH 7) çözeltisinde hazırlanmıştır.

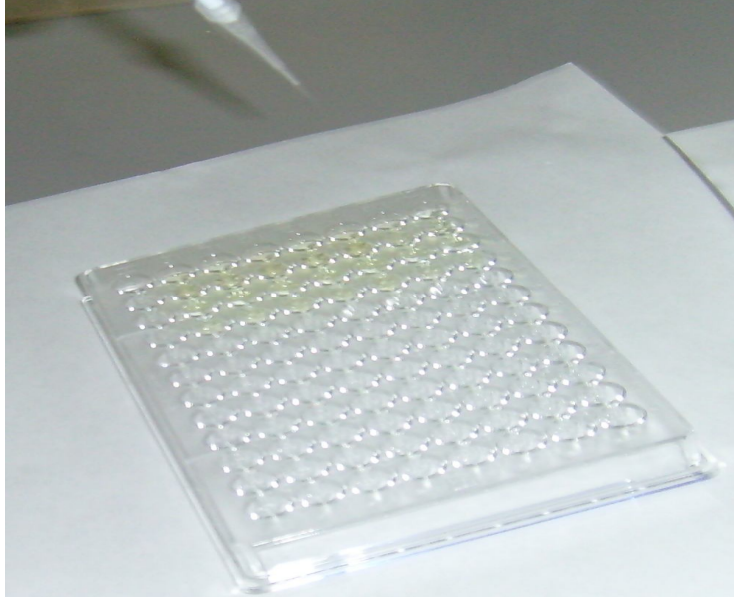
**Substrat:** nitrosefin

1 mg tartılarak 50  $\mu$ L DMSO + 4950  $\mu$ L 100 mM pH 7 fosfat tamponu çözeltisinde hazırlanarak 30 °C'de bekletilmiştir.

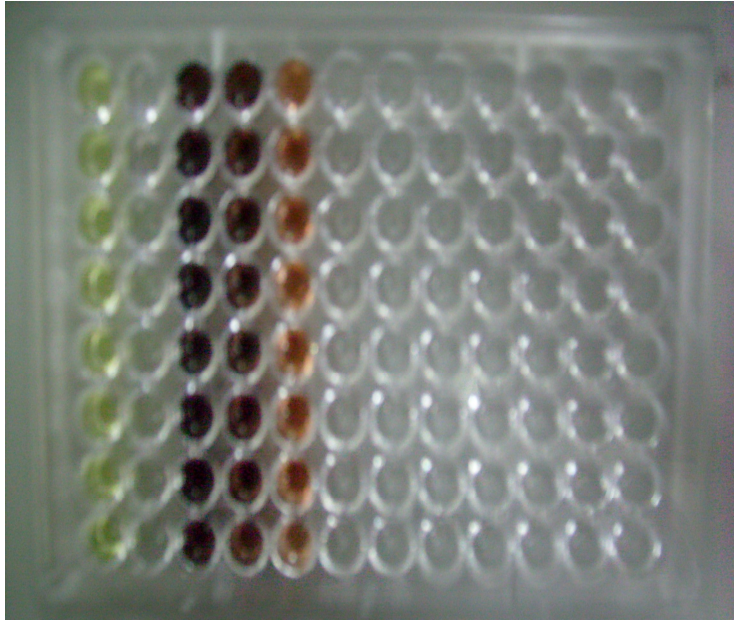
Tampon çözelti hazırlanması: Potasyum fosfat monobazik  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,685 g) ve Sodyum fosfat dibazik dihidrat  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,34 g) tartılarak bir miktar saf suda çözülmüştür. pH ayarlamasının ardından toplam hacim 50 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanmıştır.

Çizelge 7'de olduğu gibi aynı hacimler kullanılmıştır. 10 dakika inkübasyondan sonra spektrofotometre ile 495 nm'de soğurmalar okunmuştur. Enzim aktivite çalışmaları Şekil 28'de gösterilmiştir.





**(a)**



**(b)**

Şekil 28. (a) enzim, özüt ve tampon çözeltilerinin 96 kuyucuklu plakaya ekilişi (renksiz), (b) substrat ekledikten sonra, reaksiyon bitiminin ardından gerçekleşen renk değişimi.

**3.2.14. Şerbetçi Otu Bitki Özütlerine Uygulanan Sitotoksisite Çalışmaları****3.2.14.1. Hücre kültürü medyumunun hazırlanması**

Hücre kültürü ortamı DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) içine L-Glutamin son derişimi 0,2 mM ve FCS son derişimi % 10 olacak şekilde ilave edilmiştir. Tüm bileşenler 0,22 µm steril süzgeçten süzülerek steril edilmiştir.

**3.2.14.2. FCS hazırlanması**

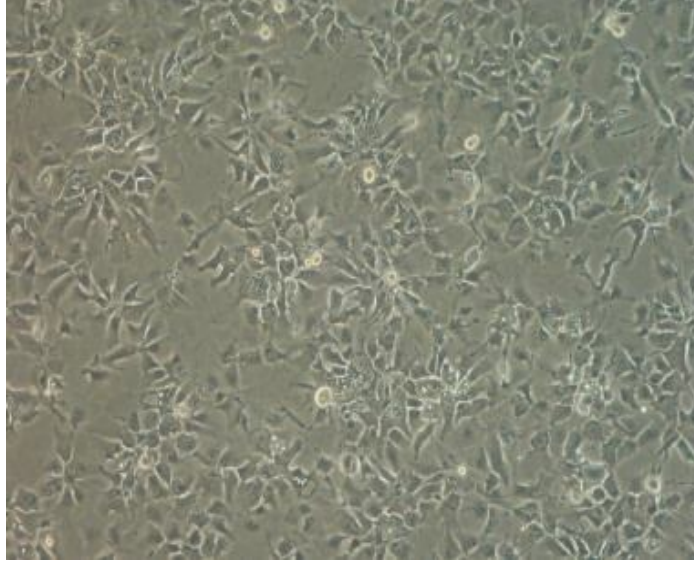
FCS (Fetal Calf Serum) -20 °C'de saklanıp taşınması soğuk zincirle yapılmıştır. Stok serum ilk kullanımdan önce 56 °C'de 1 saat ısı ile etkisizleştirilmiş ve tekrar -20 °C'de saklanmıştır.

**3.2.14.3. PBS tampon çözeltisinin hazırlanması**

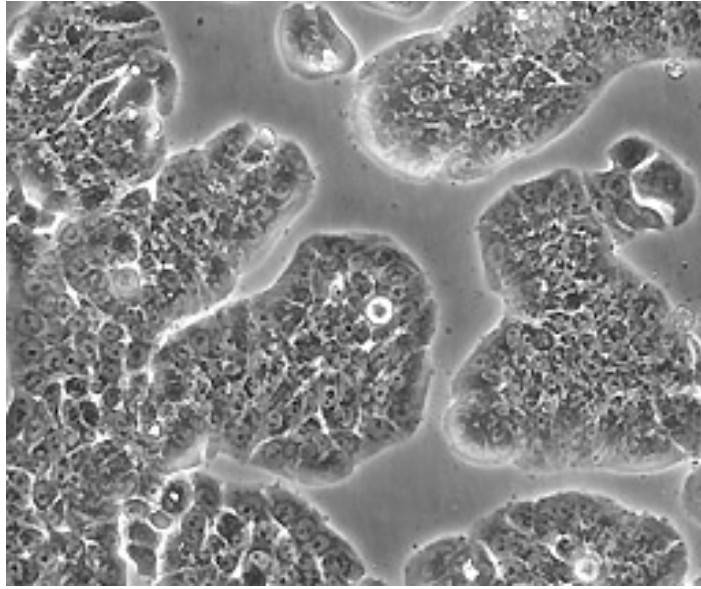
Tablet şeklinde temin edilen PBS ( Fosfat Tampon Tuzu), her tableti 100 mL ddH<sub>2</sub>O (çift damıtılmış) ile hazırlanmıştır, otoklavlanıp 2-8 °C'de saklanmıştır.

**3.2.14.4. Çalışmada kullanılan hücre soyları**

Bu çalışmada kullanılan İnsan karaciğer karsinomu (Hep3B) hücre hattı Cardiff Üniversitesi Dr. Ramji'den sağlanmıştır. İnsan kolon karsinom (HT-29) hücre hattı Ankara Şap Enstitüsü'nde, Hücre Bankası sorumluluğunda olan ve Avrupa Kültür Koleksiyonları Organizasyonu üyesi olan Hayvan Hücre Kültürü Koleksiyonu (HÜKÜK)'ndan sağlanmıştır. Hücre hatları 15 mL ortamda 75 cm<sup>2</sup> flasklarda, içerisinde 0,2 mM L-Glutamin ve % 10 FCS içeren DMEM ortamı içerisinde haftada 2 kez rutin pasaj yapılarak üretilmiştir.



**(a)**



**(b)**

Şekil 29. a) Hep3B (İnsan hepatoma) hücre hattı, b) HT-29 (İnsan kolon kanseri) hücre hattı.

**3.2.14.5. Hücre soyunun başlatılması**

Uzun dönemde -80 °C'de saklanan hücre hatlarının büyütülmesi için -80 °C'den çıkarılan hücreler 37 °C sıcaklığındaki su banyosuna alınıp hızlıca çözümleri sağlanmıştır. Çözünen hücreler % 10'luk FCS içeren ortama alınıp, alt üst edilmiştir ve 1000 devir/dk hızda 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte kalan çözelti uzaklaştırılıp, oluşan pellet ortamda çözülmüştür ve flasklara ekim yapılmıştır. Flasklar etiketlenip 37 °C, % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre konulmuştur.

**3.2.14.6. Hücrelerin büyütülmesi**

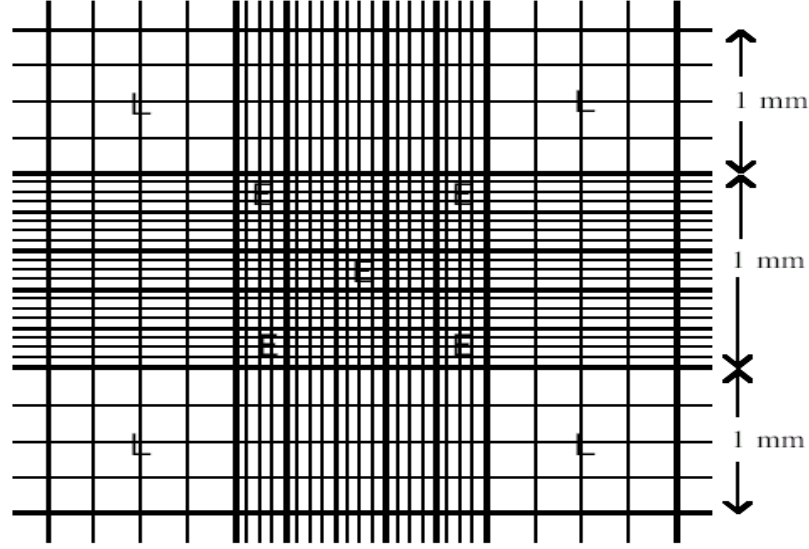
Hücreler 15 mL medyumda 75 cm<sup>2</sup> flasklarda, içerisinde 0,2 mM L-Glutamin ve % 10 FCS içeren DMEM ortamı içerisinde haftada 1 kez rutin pasaj yapılarak üretilmiştir.

**3.2.14.7. Hücrelerin pasajlanması**

Hücreler buldukları yüzeyi % 80-90 oranında kaplayınca, içerisindeki medyum uzaklaştırılmıştır. Hücreler 2 kez steril PBS ile yıkanıp 75 cm<sup>2</sup> flasklar için 3 ml Tripsin-EDTA ile tripsinizasyon yapılmıştır. Hücreler yüzeyden ayrılınca medyum eklenip 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj ile hücreler çöktürülmüştür. Süpernatant uzaklaştırılıp, pellet ortamda çözülmüştür ve flasklara ekim yapılmıştır. Flasklar etiketlenip 37 °C, % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre konulmuştur.

**3.2.14.8. Canlı hücrelerin belirlenmesi (Trypan Blue Exclusion) ve hücre sayısı**

Toplam hücre süspansiyonun mililitresindeki hücre sayısı hesaplamak için üzeri 25 küçük kareye ayrılmış, 1mm<sup>2</sup> alan, 0,1 mm derinliği olan ve böylelikle toplam hacmin hesaplanabildiği hemositometre (Şekil 30) lamı kullanılmıştır. Canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek için 10 µL hücre süspansiyonu eşit hacimde trypan blue (1:1 seyrelme oranında) ile 3-5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilip sayım yapılmıştır. Maddelerin uygulamasından önce 96 kuyulu kültür kaplarına her kuyu için 50000 hücre olacak şekilde trypan blue uygulaması ile sayılarak konulmuş ve hücrelerin buldukları yüzeye tutunmaları için 24 saat beklenmiştir.



Şekil 30. Hemositometre

Süspansiyonun mililitresindeki toplam hücre sayısı için eşitlik (1.5)'ten faydalanılır.

$$\text{Toplam canlı hücre sayısı/mL} = \text{hemositometre sayım sonucu} \times 2 \times 10^4 \quad (1.5)$$

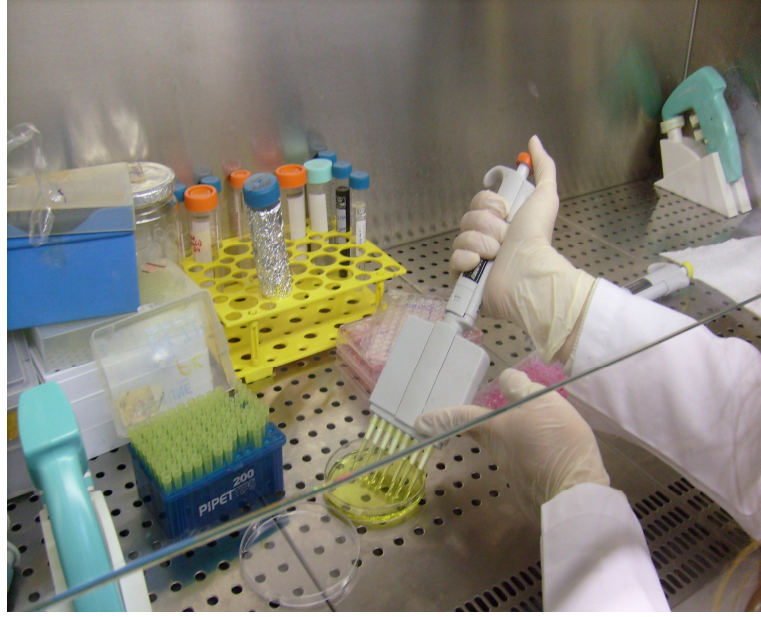
### 3.2.14.9. Maddelerin uygulanması

24 saat sonunda hazırlanan ana depo çözeltiler (1mg/mL) 0,22 mikronluk süzgeçten geçirilerek steril edilmiştir. Daha sonra 0,1 mg/mL ile 1 mg/mL olacak şekilde hazırlanan 10 farklı derişimden 50 µL her bir kuyucuğa uygulanmıştır. Her bir madde için içinde çözüldüğü DMSO ve/veya PBS kontrol olarak uygulanmıştır. Tartılan özüt miktarları aşağıda listelenmiştir.

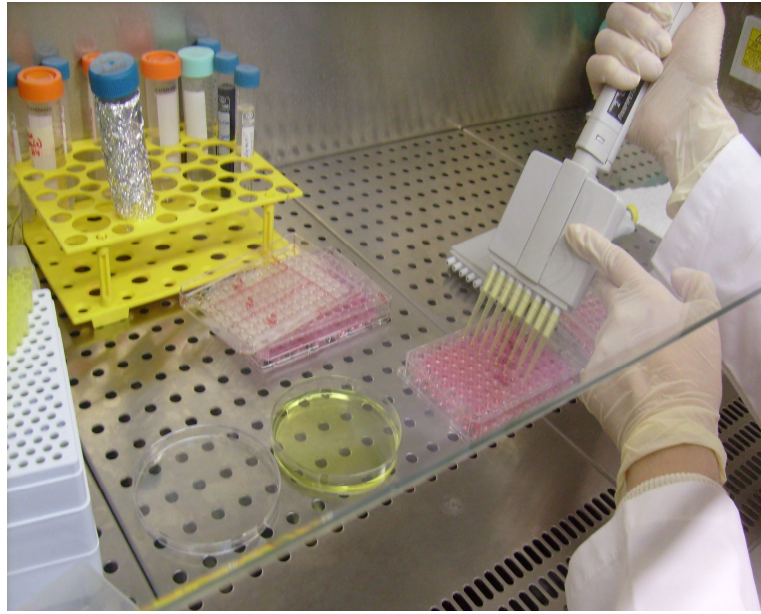
- ❖ Hekzan özütü: 416 mg
- ❖ Aseton özütü: 385 mg
- ❖ Aseton sonrası metanol özütü: 342 mg
- ❖ Metanol (kademeli) özütü: 657 mg
- ❖ Metanol (doğrudan) özütü: 375 mg
- ❖ Etanol-su özütü: 290 mg

Canlı hücrelerin ve örneklerin 96 kuyucuklu plakaya uygulanması işlemi Şekil 31'de gösterilmiştir.

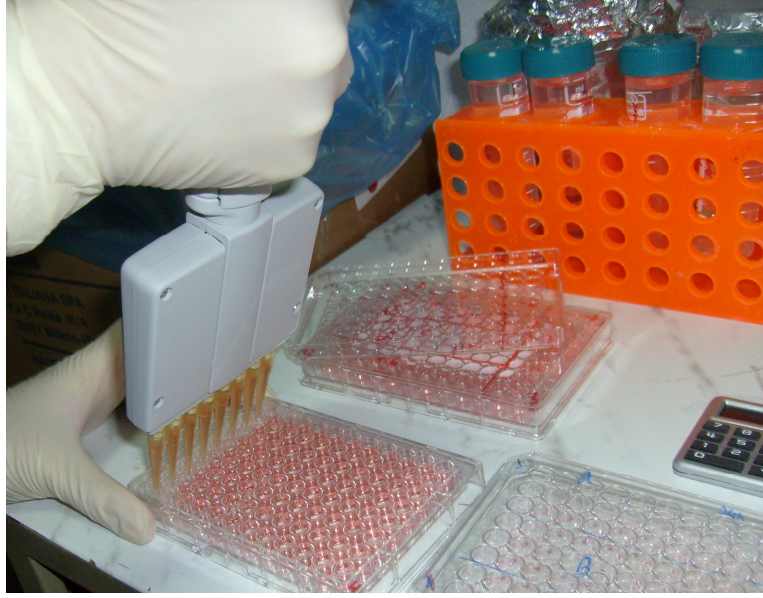




**(a)**



**(b)**



**(c)**



**(d)**

Şekil 31. (a,b,c) Canlı hücrelerin 96 kuyucuklu plakaya ekilmesi, (d) örneklerin uygulanması işlemi.

**3.2.14.10. MTT denemesi**

20 µL MTT çözeltisi her bir kuyuya uygulanmış ve hücrelerin MTT'yi metabolize etmeleri için 37 °C'de 4 saat beklenmiştir. Ortam uzaklaştırılmıştır. 0,004 M HCl içeren isopropanol uygulanarak oluşan Formazan kristalleri çözülmesi için kuyucuklar çalkalanmış ve hücrelerin 570 nm dalga boyunda soğurma değerleri alınmıştır.



## BÖLÜM 4

## ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

## 4.1. DPPH (Serbest Radikal Süpürücü Kapasite) Sonuçları

DPPH• kararlı bir serbest radikaldir. Kararlı bir diamanyetik molekül oluşturmak için bir elektron veya hidrojen radikalini bünyesine kabul eder. Bölüm 3.2.4’de belirtildiği üzere, antioksidan ile DPPH•’in oluşturduğu reaksiyon karışımının gösterdiği soğurma ne kadar düşük ise antioksidanın serbest radikal giderme kapasitesi o kadar yüksek demektir. DPPH• radikalinin ortamdaki miktarının azalması ile soğurmanın azalması belli bir antioksidan derişimine kadar doğru orantılıdır. Soğurmanın düşmesinin sebebi radikal ile antioksidan moleküllerin reaksiyonu sonucu hidrojen bağlanması ile radikalın giderilmesidir. Farklı derişimlerdeki şerbetçi otu özütleri ve standart için elde edilen DPPH radikali süpürme kapasitelerinin % inhibisyon cinsinden hesaplanan antioksidan aktiviteleri Çizelge 8’de görülmektedir.

Çizelge 8. 517 nm’de soğurmaları ölçülen özütlerin eşitlik (1.2)’ten hesaplanan % inhibisyon değerleri

Derişim (mg/mL)	Hekzan	Aseton	A.S. Metanol	K- Metanol	D- Metanol	Etanol-su	Kersetin
1	% 79	% 78	% 87,5	% 25,17	% 18,68	---	% 92,2
0,1	% 85,5	% 23,2	% 18	% 89,76	% 62,7	% 65,07	% 92,6
0,01	% 55	% 3	---	% 33,41	% 54,78	% 51	% 90,7
0,001	% 4,5	---	---	% 7,4	% 9,1	% 7,83	% 12,4
0,0001	% 5,2	---	---	% 4,24	% 2,54	% 1,53	% 2,24

--- negatif değer olarak verilecektir.

% 50 inhibisyona yakın derişimlerin IC<sub>50</sub> değerini bulmak için kullanıldığı Bölüm 3.2.4’de belirtilmiştir. Örneğin D-Metanol özütü için 0,01-0,001 mg/mL derişim aralığında % 54,78 inhibisyondan daha küçük olan % 50 inhibisyon değeri olduğu bilinmektedir

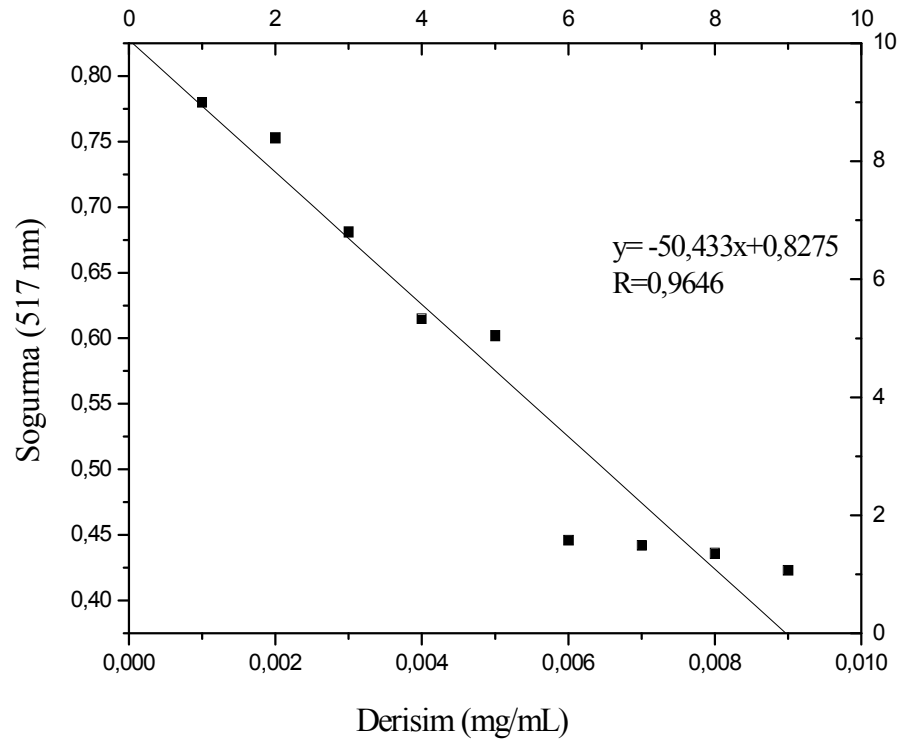
(Çizelge 8). Bu amaçla D-Metanol özütü 0,01 mg/mL'lik çözeltisine Çizelge 5'de ki uygulamalar yapılarak 517 nm'de soğurmaları okunup, eşitlik (1.2)'ten % inhibisyonları hesaplanmıştır. 0,001-0,009 mg/mL derişim aralığına karşı % inhibisyonları grafiğe geçirildiğinde ise 0,009 mg/mL derişimde % 51,1 inhibisyon ile IC<sub>50</sub> değerine sahip olduğu görülmüştür. Sonuç olarak D-Metanol özütü IC<sub>50</sub>= 0,009 mg/mL'dir.

Başka bir ifadeyle IC<sub>50</sub> değeri bulmak istediğimizde; 0,001-0,009 mg/mL derişim aralığına karşı soğurmaları grafiğe geçirildiğinde elde edilen  $y = mx+n$  denkleminde y yerine ölçülen maksimum soğurmanın yarısı yazılıp denkleminde x çekildiğinde çıkan değer IC<sub>50</sub> değeri olarak ifade edilmiştir. D-Metanol özütü grafiğinden elde edilen  $y = -46,683x + 0,8306$  denkleminde 'y' yerine 0,396 yazıldığında IC<sub>50</sub>=0,00932 µg/mL olarak belirlenmiştir. Bu şekilde sonucun sağlaması yapılmış olur. Özütlerin ve standardın IC<sub>50</sub> değerleri Şekil 32-38'de gösterilmiştir.

Metanol (doğrudan) özütü için IC<sub>50</sub> değerinin hesaplanması:

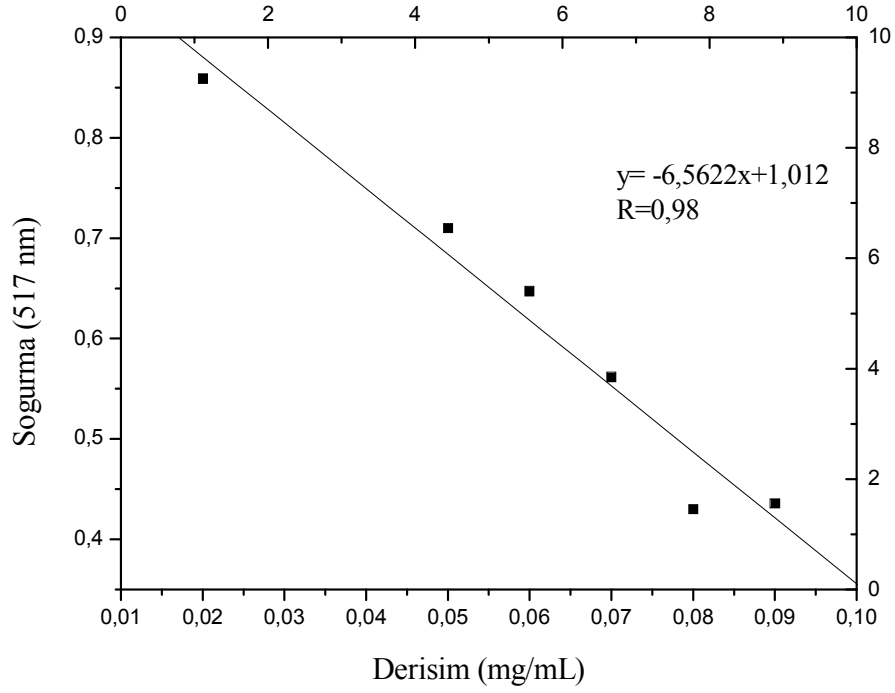
$$\begin{aligned} y &= -46,683x + 0,8306 \\ &\downarrow \\ 0,396 &= -46,683x + 0,8306 \quad (0,8306/2 = 0,396) \\ &\downarrow \\ x &= 0,00932 \mu\text{g/mL} \quad (\text{IC}_{50}=0,00932 \mu\text{g/mL}) \end{aligned}$$

Diğer özütlerinde iki şekilde IC<sub>50</sub> değerleri hesaplanmış ve bu şekilde sağlamaları yapılmıştır.



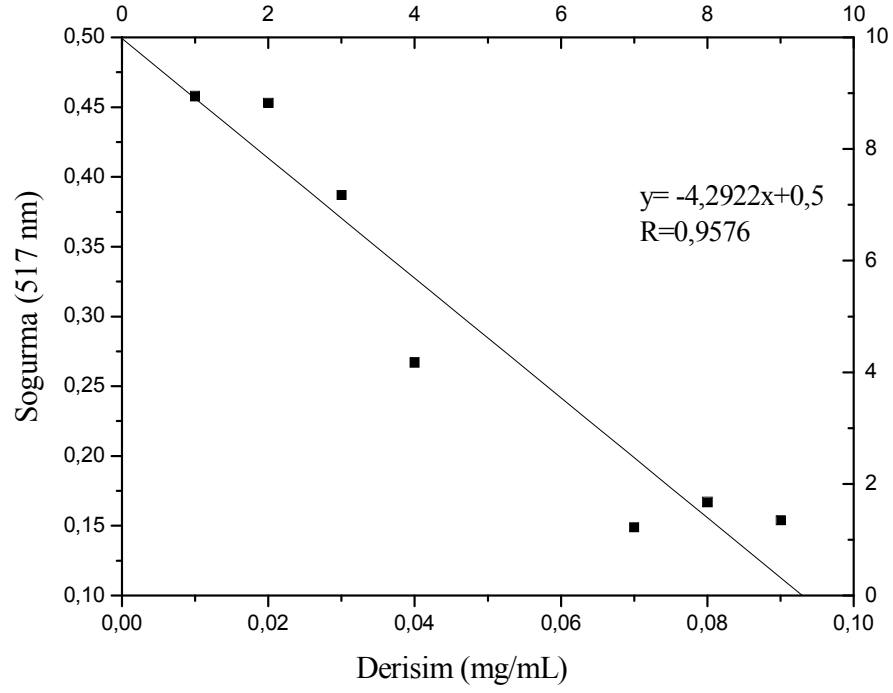
SD (hata değeri): 0,04039; ( $P < 0,0001$ ).

Şekil 32. Şerbetçi otu hekzan özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi. Grafik numune derişimi 517 nm'deki soğurmaya karşı grafiğe geçirilerek elde edilmiştir, aktivite kontrolün soğurmasını (en yüksek soğurma) yarıya düşüren numune derişimi ( $IC_{50}$ ) olarak ifade edilmiştir ( $IC_{50} = 0,00867 \pm 0,0007$  mg/mL). Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.



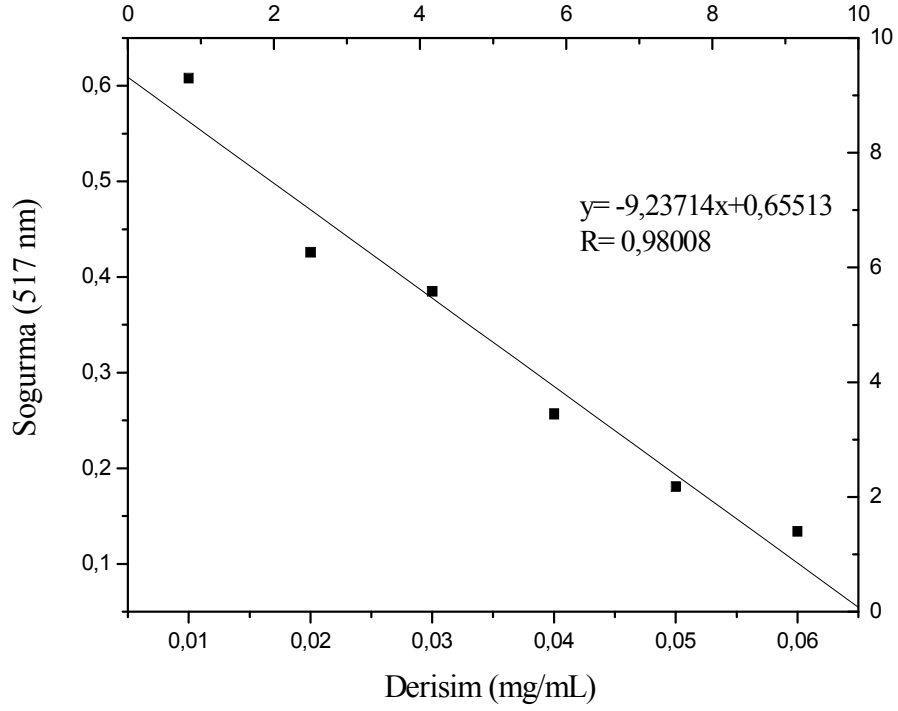
SD (hata değeri): 0,03719; (P=0,00061).

Şekil 33. Şerbetçi otu aseton özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi. Grafik numune derişimi 517 nm'deki soğurmaya karşı grafiğe geçirilerek elde edilmiştir, aktivite kontrolün soğurmasını (en yüksek soğurma) yarıya düşüren numune derişimi (IC<sub>50</sub>) olarak ifade edilmiştir (IC<sub>50</sub> =0,091±0,0069 mg/mL). Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.



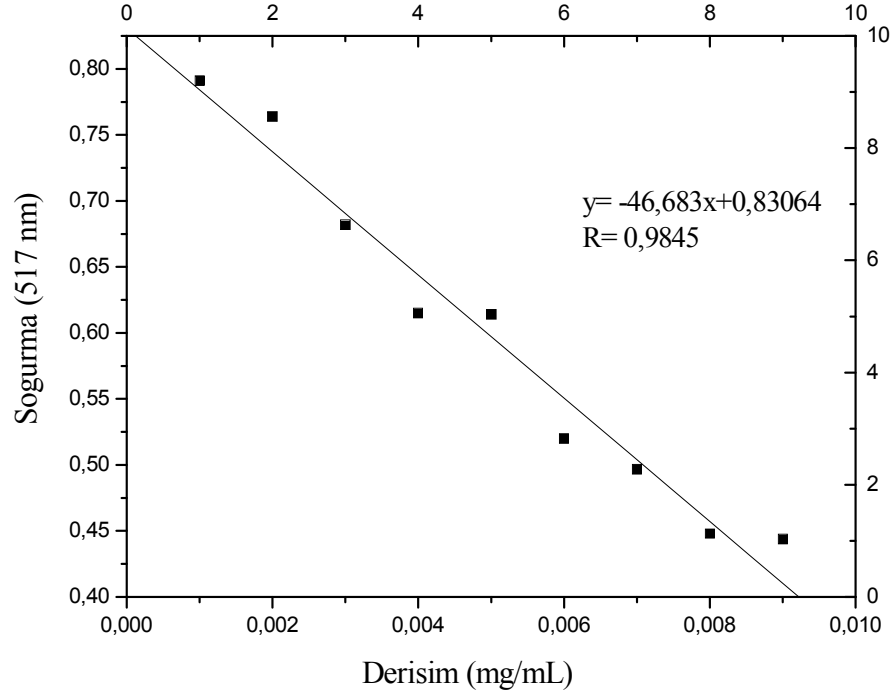
SD (hata değeri): 0,04427; (P=0,0007).

Şekil 34. Şerbetçi otu aseton sonrası metanol özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi. Grafik numune derişimi 517 nm'deki soğurmaya karşı grafiğe geçirilerek elde edilmiştir, aktivite kontrolün soğurmasını (en yüksek soğurma) yarıya düşüren numune derişimi (IC<sub>50</sub>) olarak ifade edilmiştir (IC<sub>50</sub> =0,0492±0,0044 mg/mL). Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.



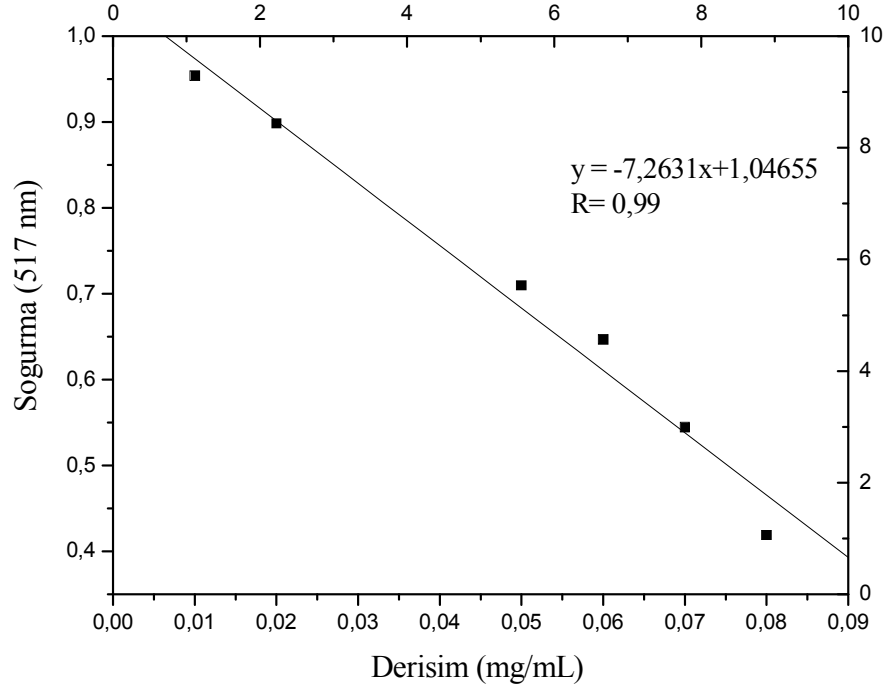
SD (hata değeri): 0,03915; (P=0,00059).

Şekil 35. Şerbetçi otu metanol (kademeli) özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi. Grafik numune derişimi 517 nm'deki soğurmaya karşı grafiğe geçirilerek elde edilmiştir, aktivite kontrolün soğurmasını (en yüksek soğurma) yarıya düşüren numune derişimi (IC<sub>50</sub>) olarak ifade edilmiştir (IC<sub>50</sub> =0,044±0,0035 mg/mL). Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.



SD (hata değeri): 0,02432; ( $P < 0,0001$ ).

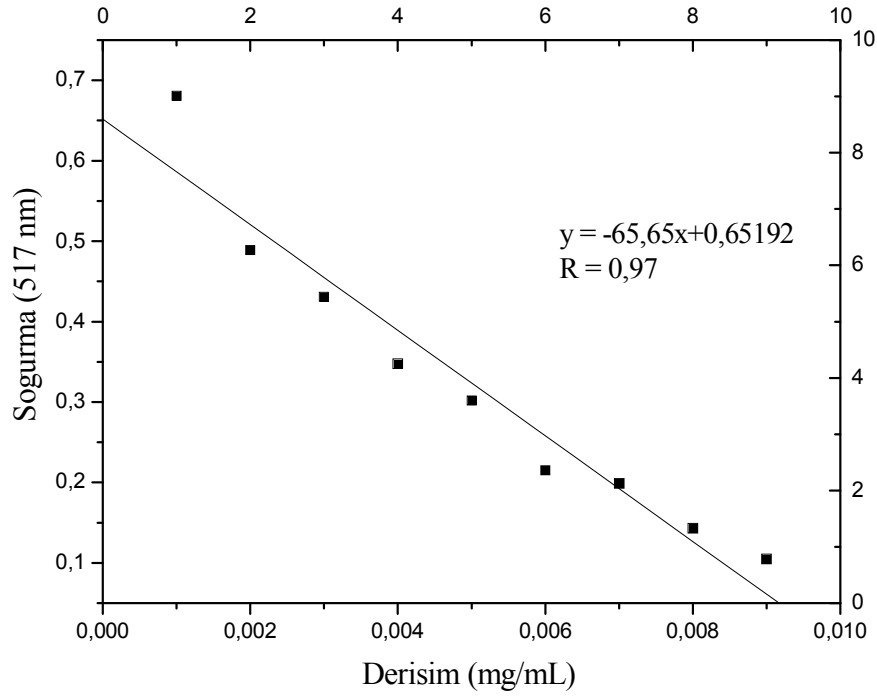
Şekil 36. Şerbetçi otu metanol (doğrudan) özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi. Grafik numune derişimi 517 nm'deki soğurmaya karşı grafiğe geçirilerek elde edilmiştir, aktivite kontrolün soğurmasını (en yüksek soğurma) yarıya düşüren numune derişimi ( $IC_{50}$ ) olarak ifade edilmiştir ( $IC_{50} = 0,0093 \pm 0,0005$  mg/mL). Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.



SD (hata değeri): 0,03405; (P=0,00019).

Şekil 37. Şerbetçi otu etanol-su özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi. Grafik numune derişimi 517 nm'deki soğurmaya karşı grafiğe geçirilerek elde edilmiştir, aktivite kontrolün soğurmasını (en yüksek soğurma) yarıya düşüren numune derişimi (IC<sub>50</sub>) olarak ifade edilmiştir (IC<sub>50</sub> =0,0787±0,0057 mg/mL). Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

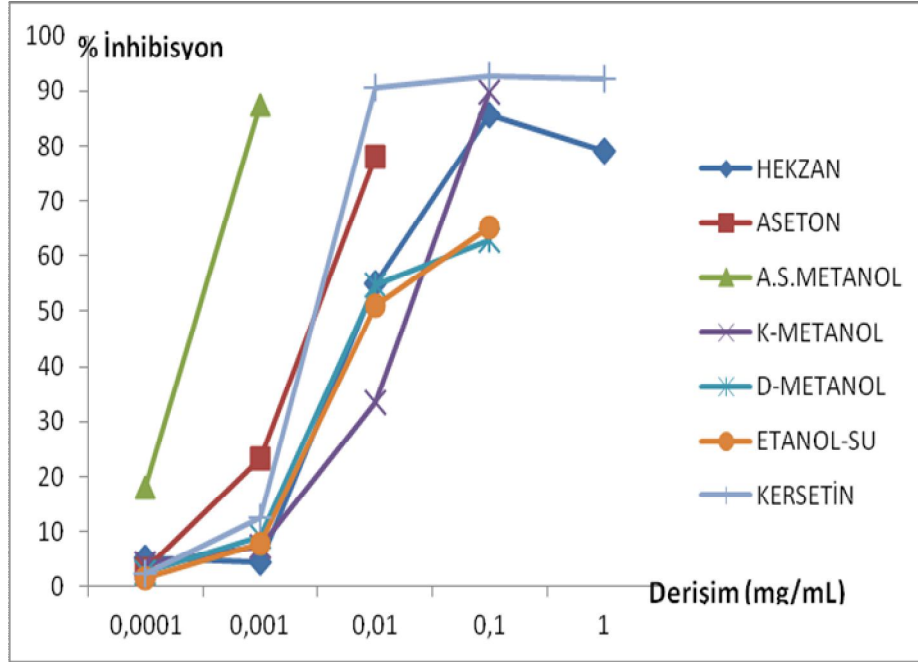




SD (hata değeri): 0,04901; (P<0,0001).

Şekil 38. Kersetin'in DPPH• radikali temizleme kapasitesi. Grafik numune derişimi 517 nm'deki soğurmaya karşı grafiğe geçirilerek elde edilmiştir, aktivite kontrolün soğurmasını (en yüksek soğurma) yarıya düşüren numune derişimi (IC<sub>50</sub>) olarak ifade edilmiştir (IC<sub>50</sub>=0,00475±0,0005 mg/mL). Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

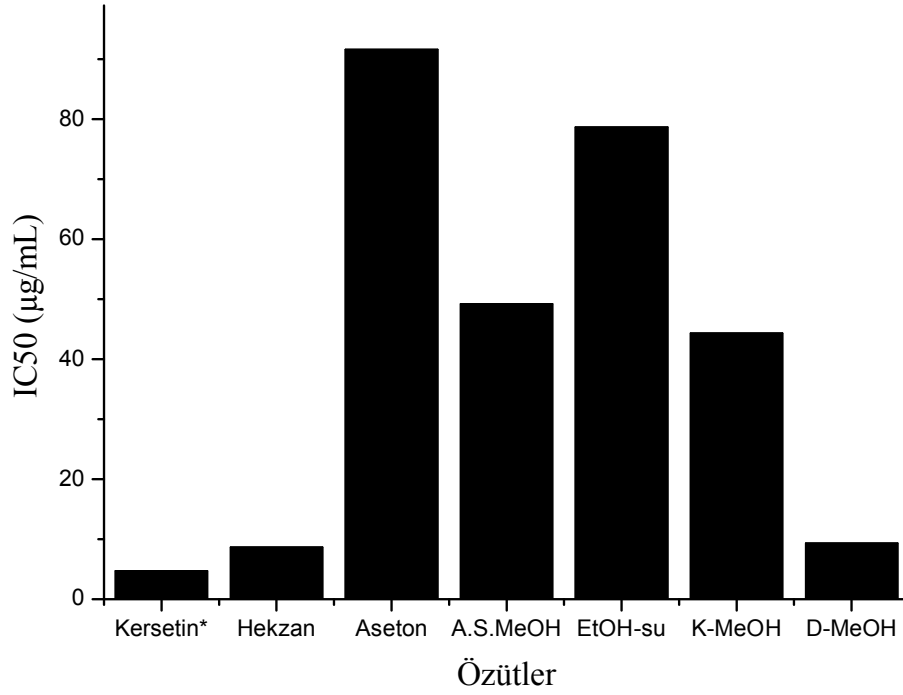
Bitki özütlerinin etkinliği DPPH ile nitel olarak Bölüm 3.2.3'de belirtilmiştir. Buradan elde edilen sonuçlar doğrultusunda DPPH çözeltisi püskürtüldüğünde özellikle aseton, aseton sonrası metanol ve etanol-su özütlerinin parlak sarı renkli hal alması bu özütlerin diğer özütlere göre DPPH ile daha etkin olduğunu düşündürmüştü.



Şekil 39. Şerbetçi otu özütleri ve standartın DPPH radikali süpürücü aktiviteleri.

Şekil 39’de görüldüğü üzere, standart antioksidan olan kersetinin DPPH• radikali süpürücü etkisi özütlere göre daha yüksektir. Şerbetçi otu aseton ve etanol-su özütlerinin DPPH• radikali süpürücü etkisi ise standart ve diğer özütler arasında en düşüktür. Aseton sonrası metanol özütü ise iki pozitif değeri olduğu için grafikte yer bile edinememiştir.

Bu yöntemde bir antioksidan için ölçülen  $IC_{50}$  değeri ne kadar küçük ise antioksidan etkisi o kadar yüksek demektir. Şekil 4.1-7’de görüleceği üzere DPPH radikalini süpürme kapasitesi Kersetin > Hekzan özütü > D-metanol özütü > K-metanol özütü > Aseton sonrası metanol özütü > Etanol-su özütü > Aseton özütü sırasını izlemektedir. Sütun grafiğinde bu sıralama ayrıca gösterilmiştir (Şekil 40).



\*Kersetin standart olarak verilecektir.

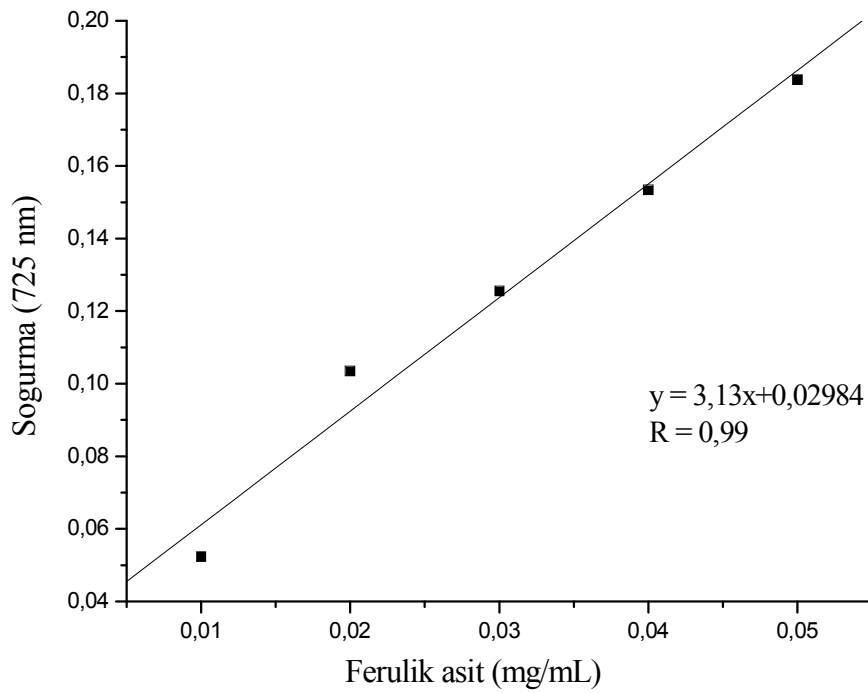
Şekil 40. Özütlerin DPPH yöntemi ile belirlenen IC<sub>50</sub> değerlerinin sütun grafiği.

#### 4.2. Toplam Fenolik Bileşen Miktar Tayini Sonuçları

Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak yapılan toplam fenolik bileşik tayininde en sık kullanılan standart bileşik gallik asittir. Toplam fenolik bileşen miktarı Velioglu ve ark., (1998)'nin uyguladığı yöntemle göre yapıldığından, standart olarak ferulik asit kullanılmıştır. Ferulik asit standart grafiği (Şekil 41) ve ölçülen soğurmaları (Çizelge 9) görülmektedir. Özütlerin depo çözeltileri soğurmalarında 1'in üzerinde değerler verdiği için 1 mg/mL'lik çözeltilerinin 725 nm'deki soğurmaları ölçülmüştür.

Çizelge 9. Ferulik asit derişimleri ve 725 nm’de ölçülen soğurmaları

Derisim (mg/mL)	Soğurma (725 nm)
0,01	0,0523
0,02	0,1035
0,03	0,1256
0,04	0,1535
0,05	0,1838



SD (hata değeri): 0,00842;  $P < 0,00132$ .

Şekil 41. Toplam fenolik bileşen tayininde kullanılan Ferulik asit standardı çalışma grafiği.

Ferulik asit standart grafiğinden elde edilen doğru denklemi

$$\text{Soğurma} = 3,13 (\text{Toplam fenolik bileşen (Ferulik asit)}) + 0,0298 \quad (1.6)$$

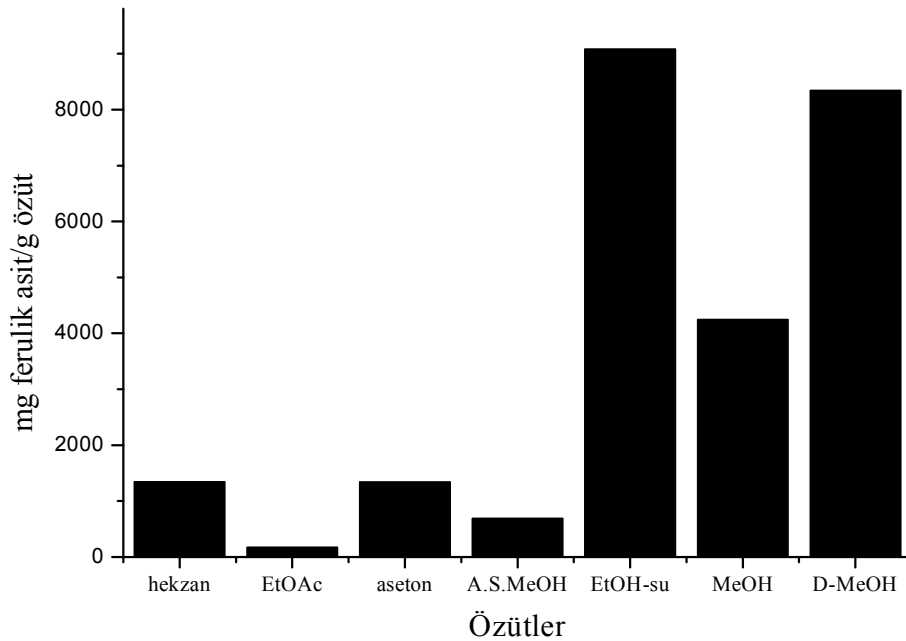
Eşitlik (1.6) kullanılarak özütlerin 100  $\mu\text{L}$  örneklerindeki Ferulik asit değerleri hesaplanmıştır ve başlangıçtaki toplam özüt miktarına geçilerek toplam fenolik bileşen miktarları belirlenmiştir.

Çizelge 10. Şerbetçi otu özütlerinin toplam fenolik bileşen miktarları

Numune (özüt)	Fenolik bileşen içeriği (mg ferulik asit/100 g özüt)
Aseton sonrası metanol	687,89 ± 18,39
Aseton	1338 ± 34,29
Hekzan	1344 ± 31,52
Kademeli Metanol	4244 ± 88,74
Doğrudan Metanol	8343 ± 158,39
% 75 EtOH + % 25 H <sub>2</sub> O	9079 ± 187,83

\* Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

Bölüm 3.2.4 ve Çizelge 4’de 100’er g bitkiden elde edilen özütlerin miktarları belirtilmiştir. 10 mg/mL depo çözeltileri ve seyreltme etkenide dikkate alınarak hesaplanan fenolik bileşen miktarları görülmektedir (Çizelge 10).

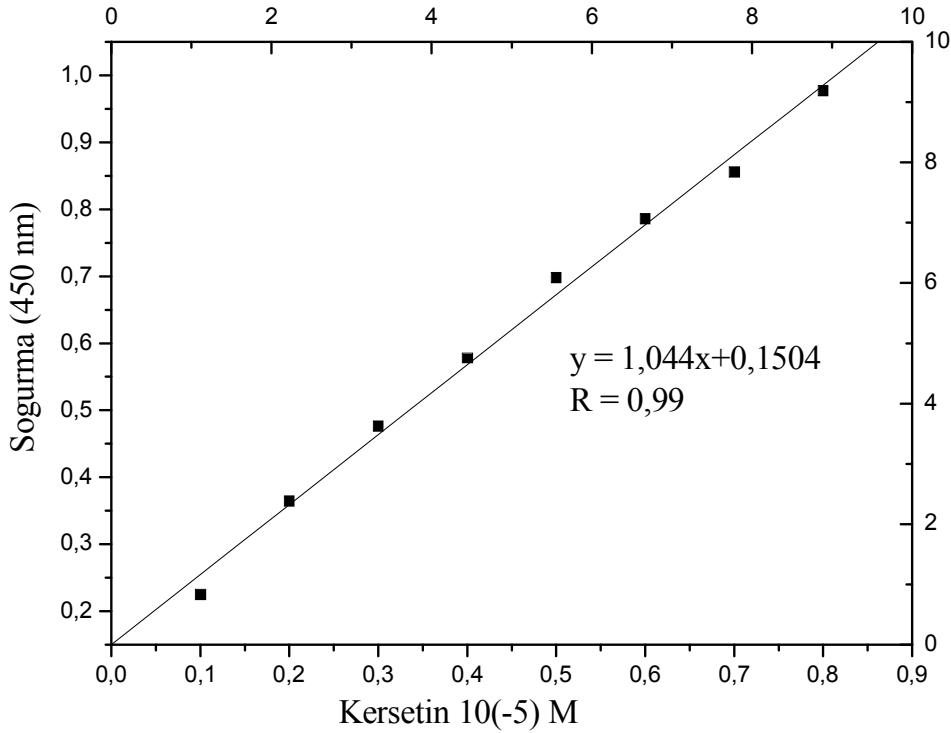


Şekil 42. Özütlerin fenolik bileşen içeriklerinin (mg ferulik asit/g özüt) sütun grafiği.

Etanol-su ve D-Metanol özütleri fenolik bileşen açısından en zengin özütler olarak belirlenmişlerdir. Etilasetat özütü DPPH yöntemiyle az da olsa aktivite göstermiştir. Ancak etilasetat özütüne, sadece CUPRAC yöntemi uygulanmıştır. Etilasetat özütüne içeriğindeki fenolik bileşen miktarını belirlemek amacı ile denemesi yapılmıştır ve (Şekil 42) sütun grafiğinde de görüldüğü üzere fenolik bileşen içeriği en az olan özüt, etilasetat özütüdür.

### 4.3. CUPRAC (Cu(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi) Sonuçları

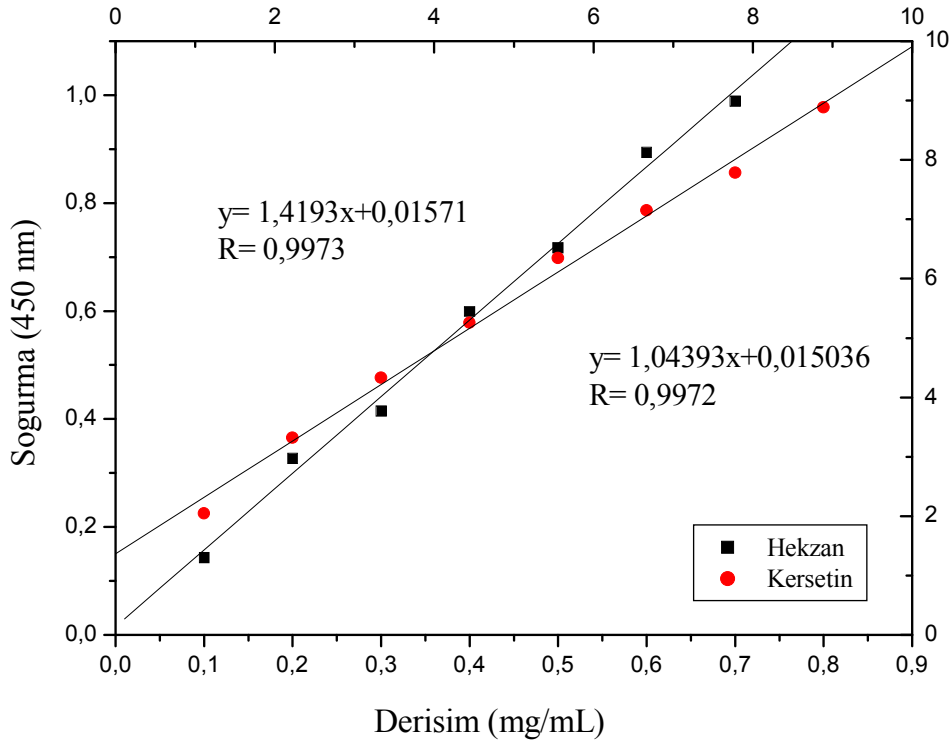
CUPRAC yöntemi; 1 mg/mL örnek çözeltilerden alınan dokuz farklı derişime uygulanarak, aktif derişim aralıkları belirlenmiştir (Bölüm 3.2.7) ve standardın derişime karşı soğurma grafikleri çizilerek grafiklerin eğimleri oranlanmıştır. Bu çalışmada Kersetin için elde edilen grafik gösterilmiştir (Şekil 43).



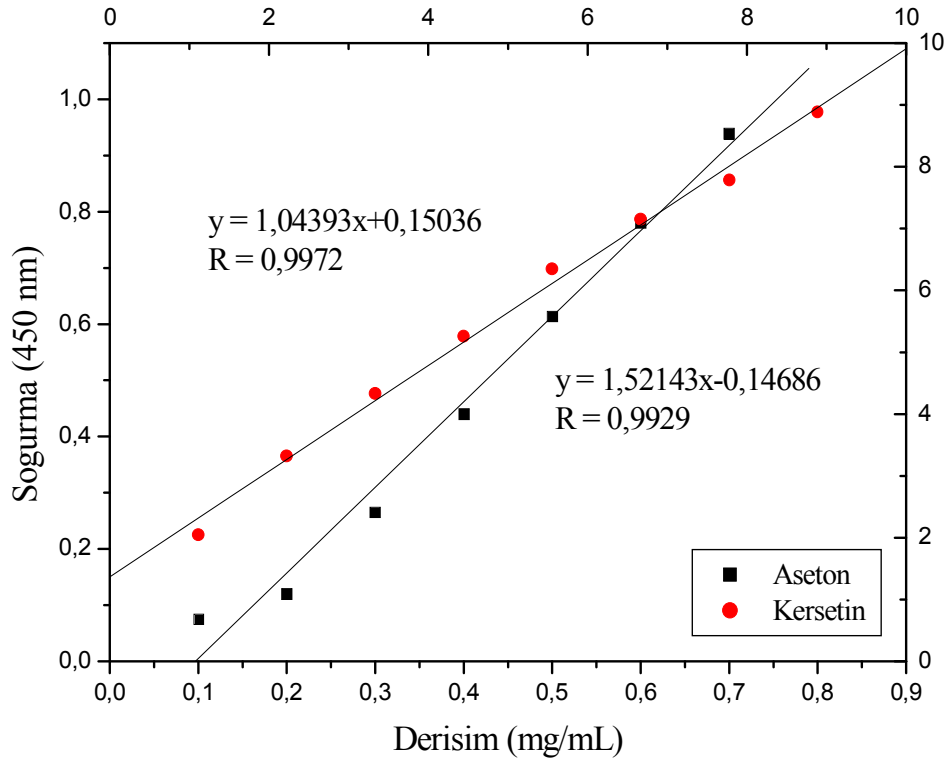
SD (hata değeri): 0,02091; P < 0.0001.

Şekil 43. CUPRAC tayininde kullanılan kersetin standardı çalışma grafiği.

Fenolik bileşiklerin molar absorplama katsayıları ( $\epsilon$ ) CUPRAC yöntemine göre molar derişim-soğurma arasındaki kalibrasyon eğrilerinin eğimleri hesaplanarak elde edilmiştir. Grafikteki her bir doğrunun eğimi kersetin için elde edilen doğru denkleminin eğimine oranlanmış ve  $QR_{CUPRAC}$  değerleri elde edilmiştir (Çizelge 10).

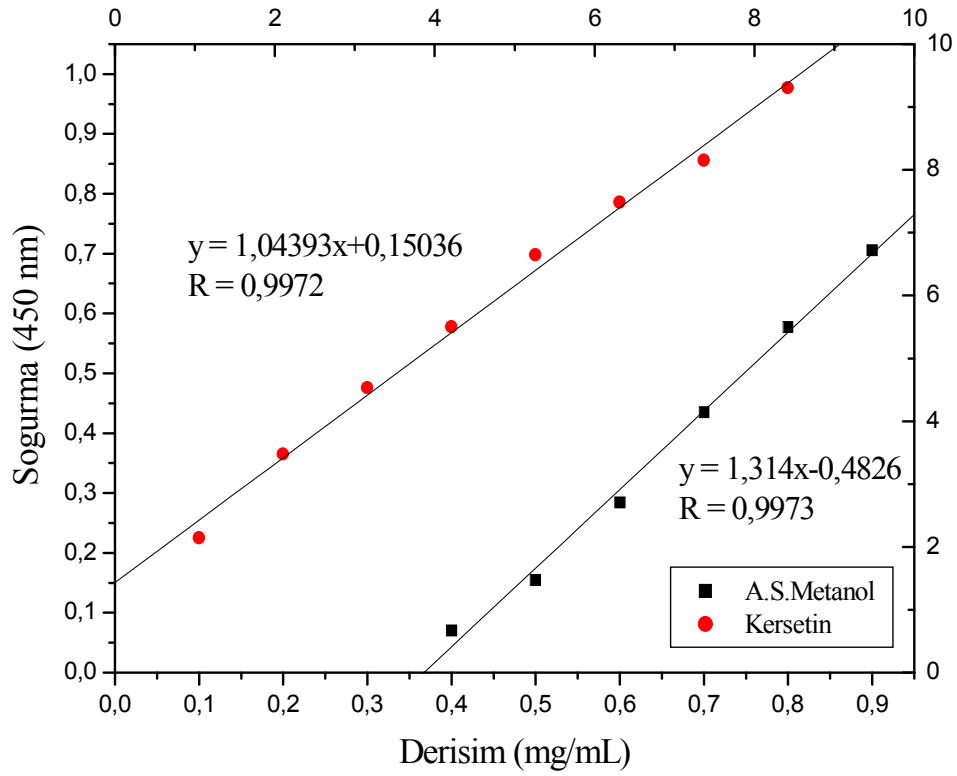


Şekil 44. Hekzan özütü ve standart olarak kullanılan kersetinin farklı derişimlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları.

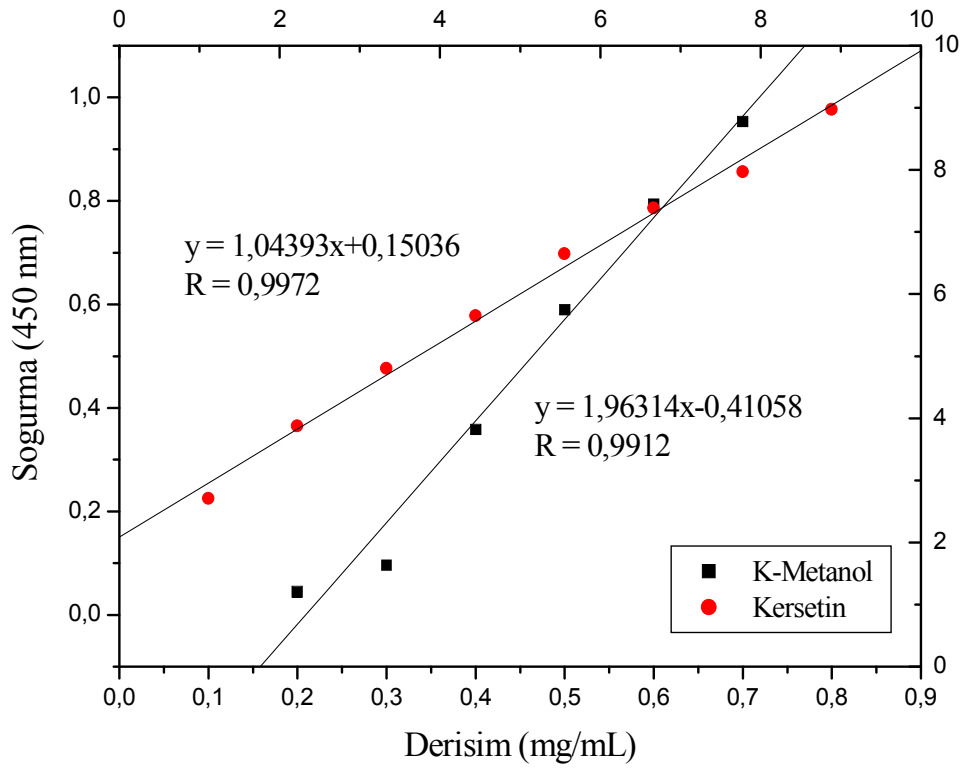


Şekil 45. Aseton özütü ve standart olarak kullanılan kersetinin farklı derişimlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları.

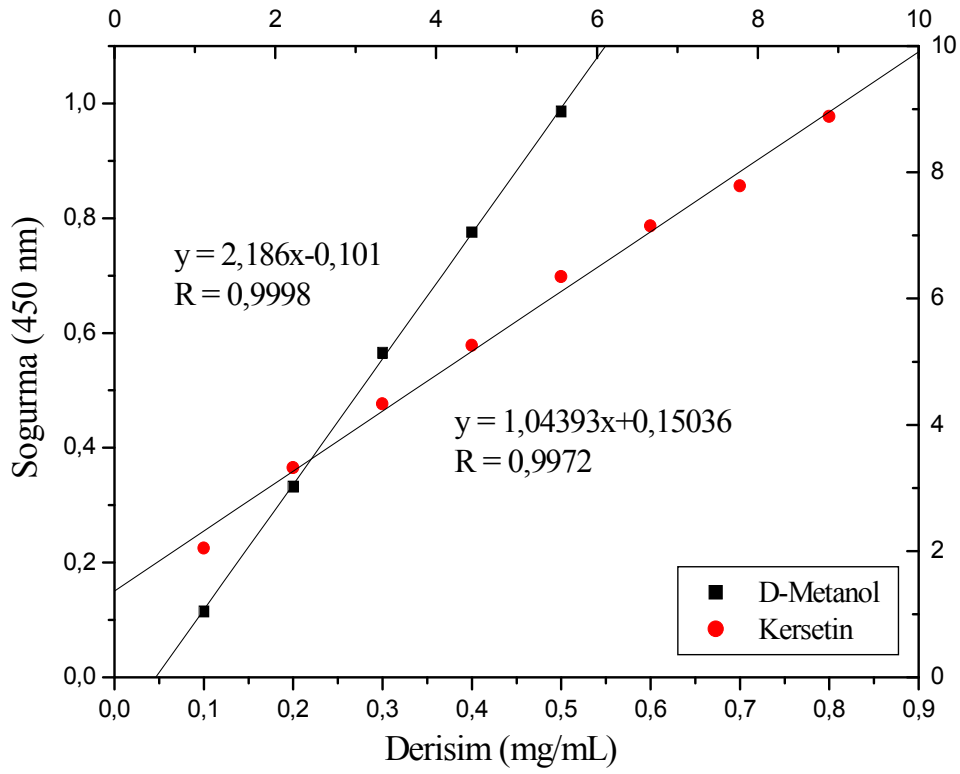




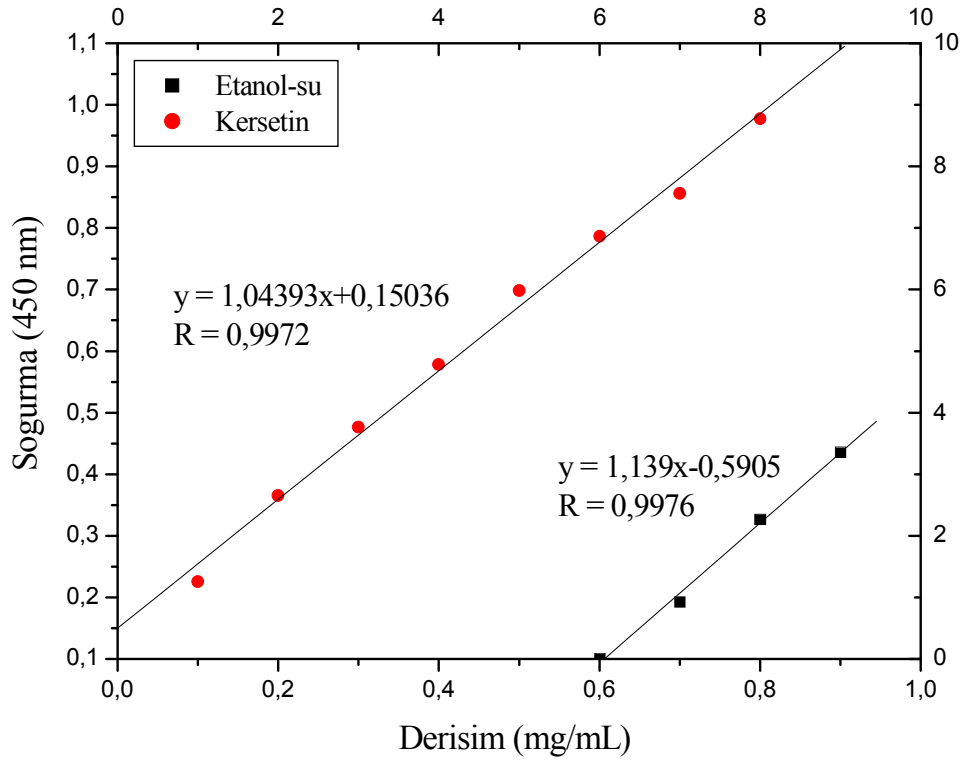
Şekil 46. Aseton sonrası metanol özütü ve standart olarak kullanılan kersetinin farklı derişimlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları.



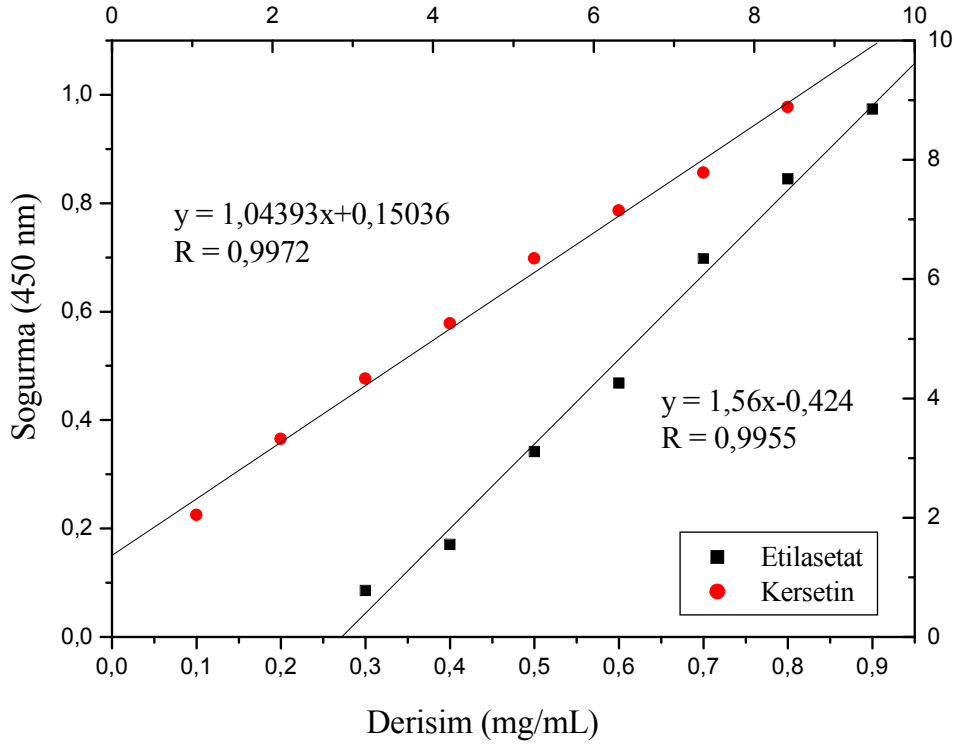
Şekil 47. Metanol (kademeli) özütü ve standart olarak kullanılan kersetinin farklı derişimlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları.



Şekil 48. Metanol (doğrudan) özütü ve standart olarak kullanılan kersetinin farklı derişimlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları.

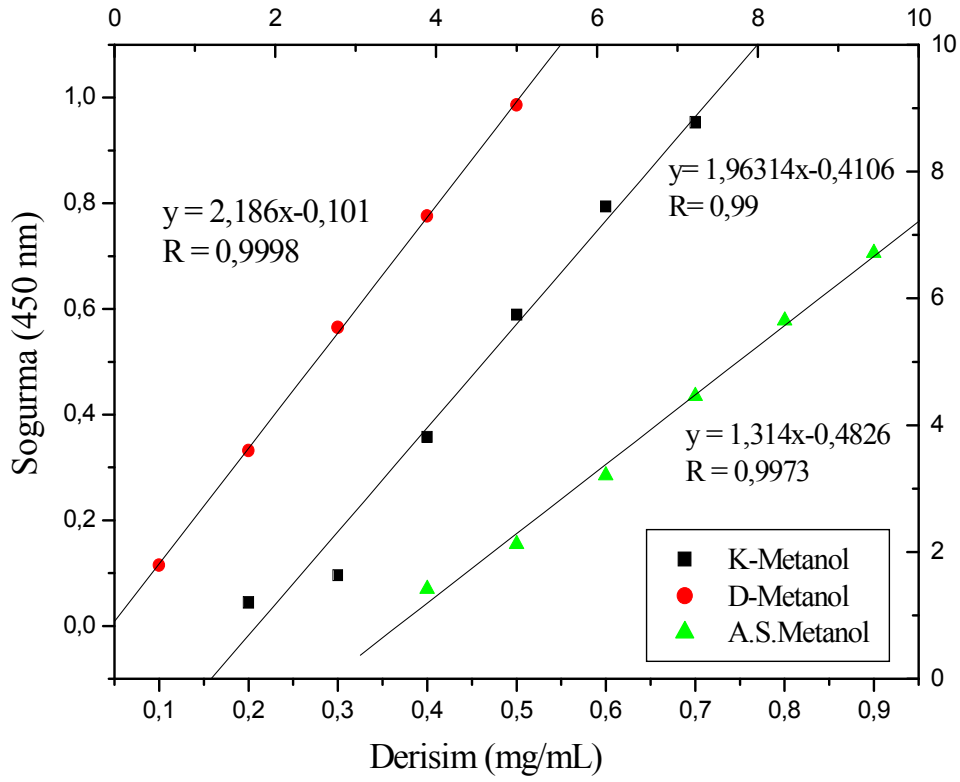


Şekil 49. Etanol-su özütü ve standart olarak kullanılan kersetinin farklı derişimlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları.

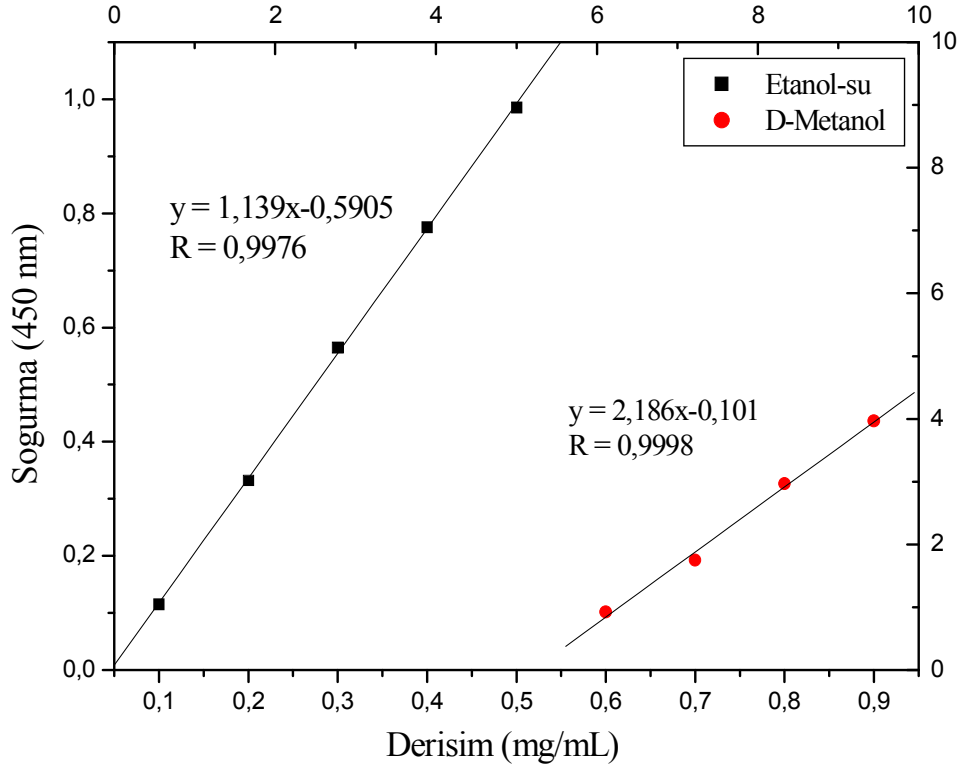


Şekil 50. Etil asetat özütü ve standart olarak kullanılan kersetinin farklı derişimlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları.

DPPH yöntemiyle etkinlik göstermeyen etil asetat özütüne CUPRAC yöntemi uygulanmıştır. EtOAc özütünün içerdiği fenolik bileşen miktarı diğer özütlerden daha azdır. (Etilasetat  $170,5 \pm 4,05$  mg ferulik asit/g özüt) DPPH yöntemiyle de çok aktif bulunmamış olup sadece CUPRAC yöntemiyle denemesi yapılmıştır. Standartta olduğu gibi doğrusal olarak artış göstermiştir (Şekil 50).



Şekil 51. Metanol (doğrudan), Metanol (kademeli) ve A.S.Metanol özütlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları.

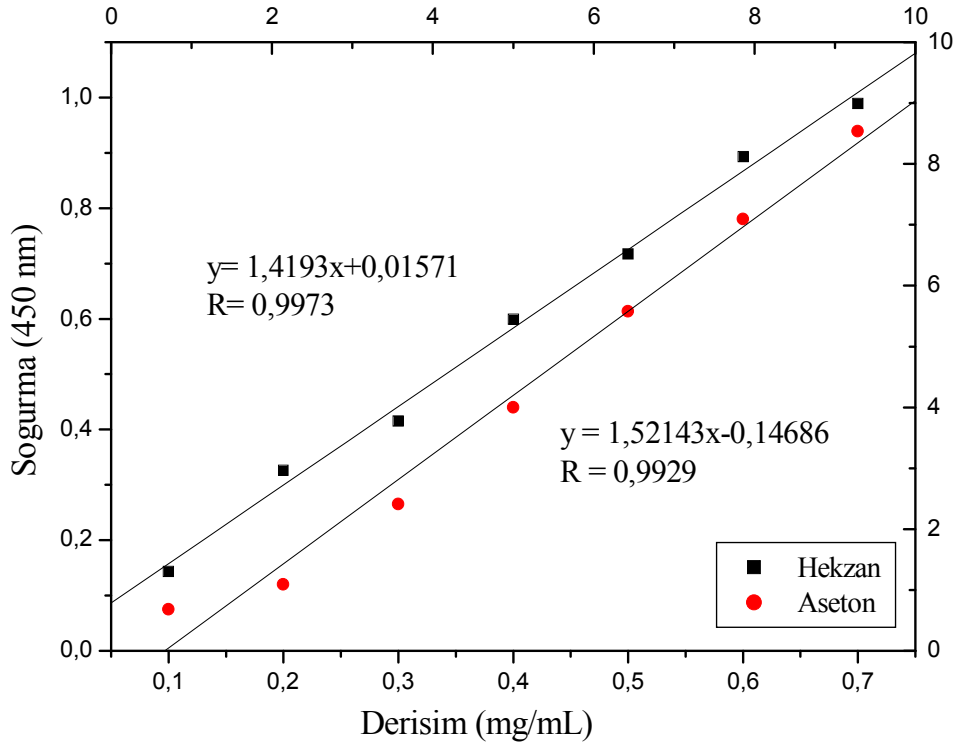


Şekil 52. Etanol-su ve Metanol (doğrudan) özütlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları.

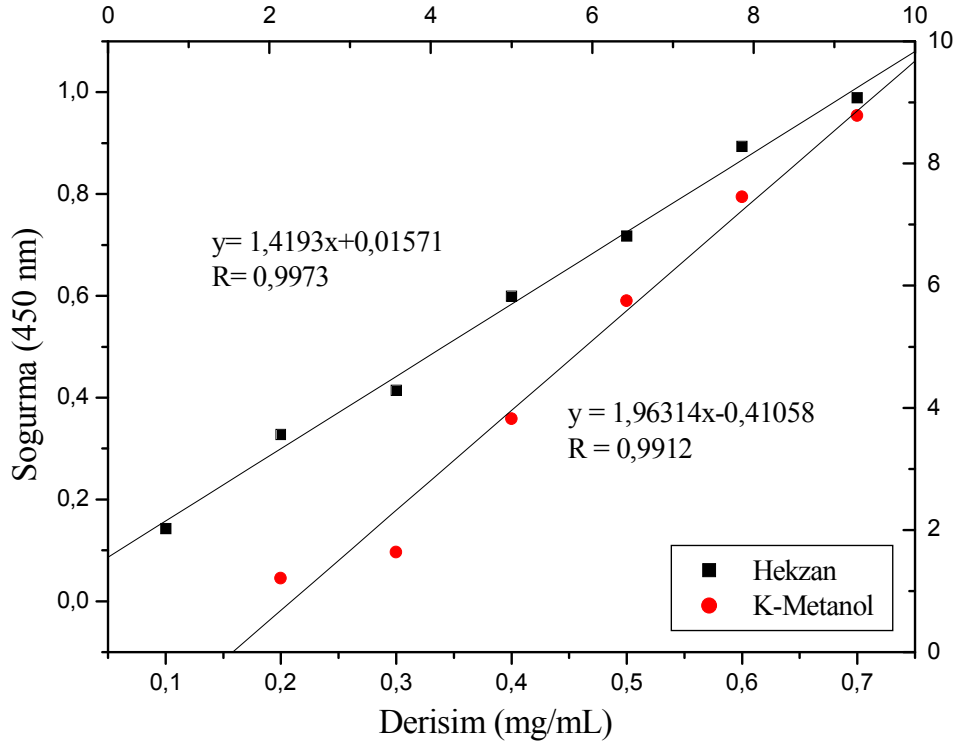
CUPRAC yöntemi ile Metanol özütlerinin üçününde farklı derişimlerde sogurma verdikleri görülmektedir (Şekil 51).

D-Metanol özütü daha seyreltik derişimlerde aktiflik göstermiş olup daha yüksek QERFC değerine sahiptir. A.S.Metanol özütü, Metanol (doğrudan ve kademeli) özütlerine göre daha derişik derişim aralığında aktiflik göstermiş ve QERFC değeri daha düşük bulunmuştur (Çizelge 11). Ancak bu şekilde bir yorumlama her zaman yapılamaz.

Etanol-su ve metanol (doğrudan) özütleri ise fenolik bileşen içerikleri açısından birbirine çok yakındır (Çizelge 10). Bu yöntem ile örnekteki flavonoid derişiminin kersetin eşdeğeri olarak verildiği bilinmektedir. Normal CUPRAC yöntemine göre özütlerin her ikisinde farklı derişim aralığında aktiflik göstermişlerdir. Etanol-su özütünün 0,1-0,5 mg/mL derişim aralığı aktifken; D-Metanol özütünün 0,5-0,9 mg/mL derişim aralığı aktiftir (Şekil 51). Etanol-su özütünün, D-Metanol özütüne göre daha fazla fenolik bileşen içermesi QERFC değerinin en yüksek olacağı anlamına gelmediği gibi, metanol (doğrudan-kademeli) özütlerinden daha düşük sonuç vermiştir (Çizelge 11).



Şekil 53. Hekzan ve aseton özütlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları.



Şekil 54. Hekzan ve Metanol (kademeli) özütlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları.



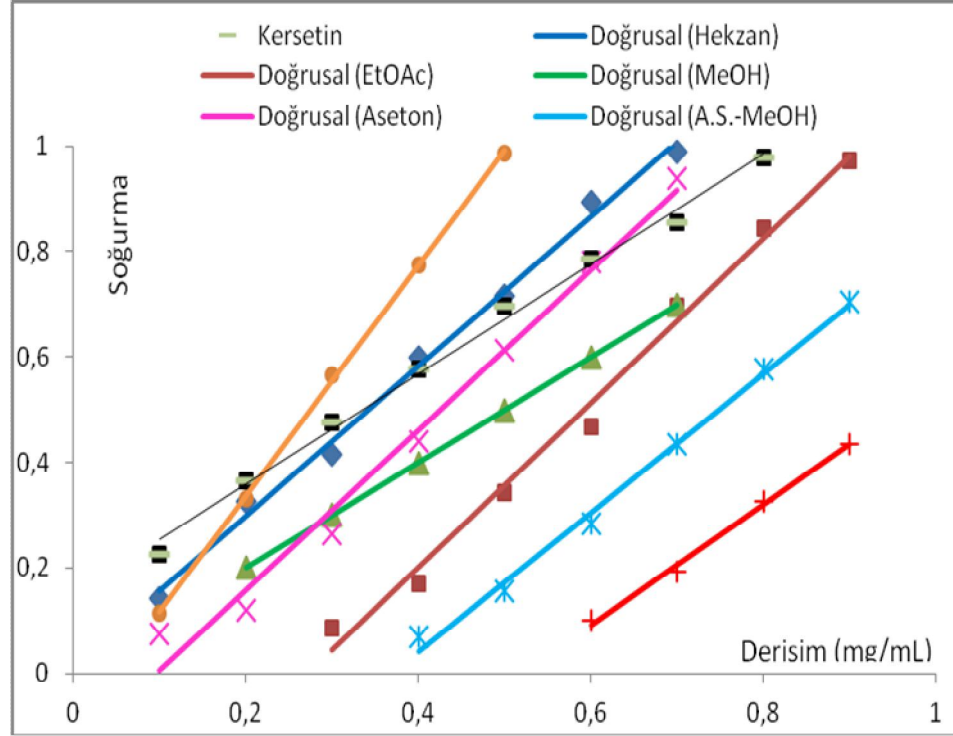
Hekzan özütü genelde aktiflik göstermez ve işleme tabii tutulmaz, ama şerbetçi otu bitkisinin hekzan özütü çoğu zaman bitkinin daha polar olan özütleriyle birebir aktivite göstermiş bazen de ilk sırada yer almıştır. Bu da içeriğindeki antioksidan gücü yüksek acı asitlerin varlığından ileri gelmektedir. Hekzan özütünün QERFC değeri aseton özütüne daha yakındır (Çizelge 11). Bu durum grafikteki, doğrusal artışta görülmektedir (Şekil 53). K-Metanol özütünün QERFC değeri hekzan özütüne göre daha fazladır; grafikte de bu durum görülmektedir (Şekil 54).

Çizelge 11. Özütlerin CUPRAC yöntemine göre doğru denklemleri, molar soğurmaları ve QREFC (kersetin eşdeğeri flavonoid derişimi) değerleri

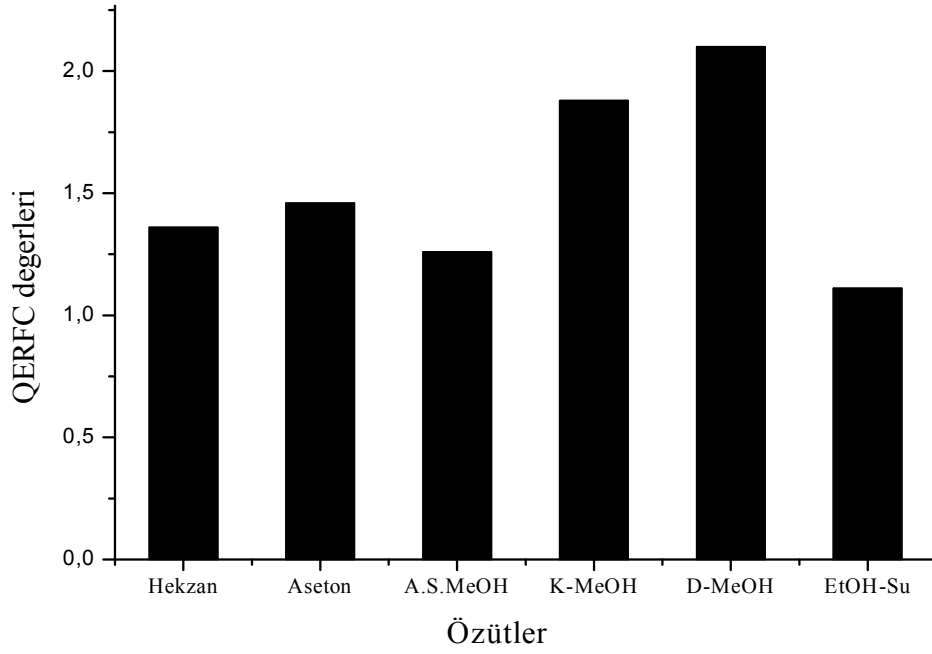
Özüt	Doğru denklemi	$\epsilon$ (Lmol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	QREFC
Hekzan	$y=1,4193x+0,01571$ $R^2= 0,9973$	1,4193	1,36
Aseton	$y=1,52143x-0,14686$ $R^2= 0,9929$	1,5214	1,46
A.S.Metanol	$y=1,314x-0,4826$ $R^2= 0,9973$	1,314	1,26
Metanol (kademeli)	$y=1,96314x-0,41058$ $R^2= 0,9912$	1,9631	1,88
Metanol (doğrudan)	$y=2,186x-0,101$ $R^2= 0,9998$	2,186	2,1
Etanol-su	$y=1,139x-0,5905$ $R^2= 0,9976$	1,139	1,11
*Kersetin	$y=1,04393x-0,015036$ $R^2= 0,9972$	1,0439	---

\*Kersetin standart olarak verilecektir.

Örnek ve standardın antioksidan derişimine karşı CUPRAC yöntemi ile verdikleri soğurma grafikleri Şekil 55’de, özütlerin sütun grafikleri ise Şekil 56’de topluca sunulmuştur.



Şekil 55. Özütler ve standardın CUPRAC yöntemi ile verdikleri soğurma grafiklerinin toplu gösterimi.



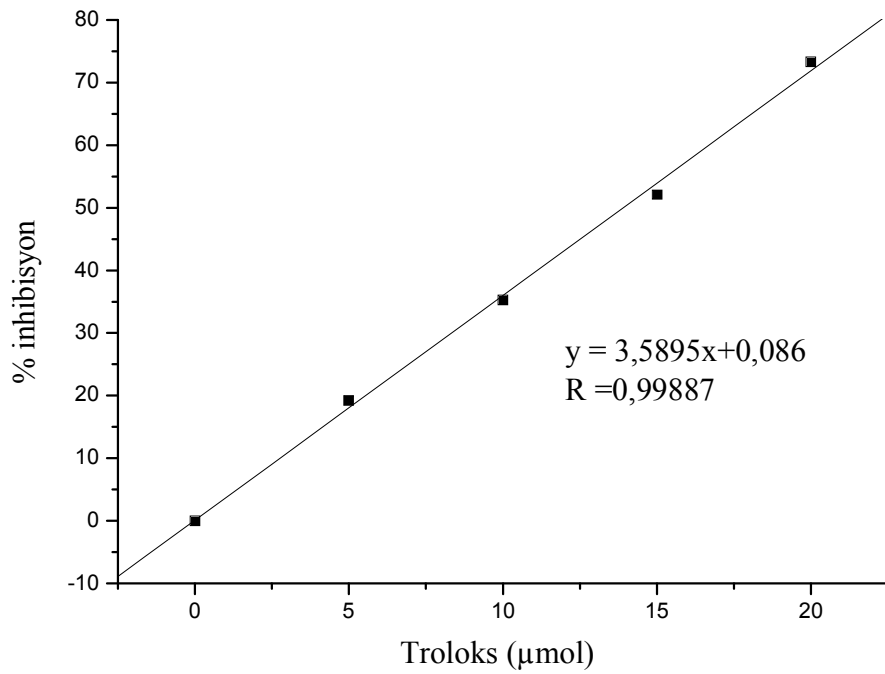
Şekil 56. Özütlerin CUPRAC yöntemine göre QERFC (kersetin eşdeğeri flavonoid derişimi) değerleri sütun grafiğı.

#### 4.4. TEAC (ABTS<sup>+</sup> Radikal Giderme Aktivitesi) Sonuçları

TEAC değerinin tayininde Troloks standart antioksidanının ABTS<sup>+</sup> radikalini süpürme etkisi ölçülerek standart çalışma grafiğı çizilmiştir (Şekil 57). Süpürme etkisi % inhibisyon olarak eşitlik (1.4)'ten hesaplanmıştır. Örneklerin % inhibisyon değerleri Çizelge 12-18'de % inhibisyon grafikleri ise Şekil 58-63'de görölmektedir. Özütlerin % inhibisyon değerlerinin çakıştırılmış halleri ise Şekil 64'de görölmektedir.

Çizelge 12. Eklenen troloks miktarı ve % inhibisyonları

eklenen miktar ( $\mu\text{L}$ )	% inhibisyon
0	0
5	19,23
10	35,27
15	52,105
20	73,3

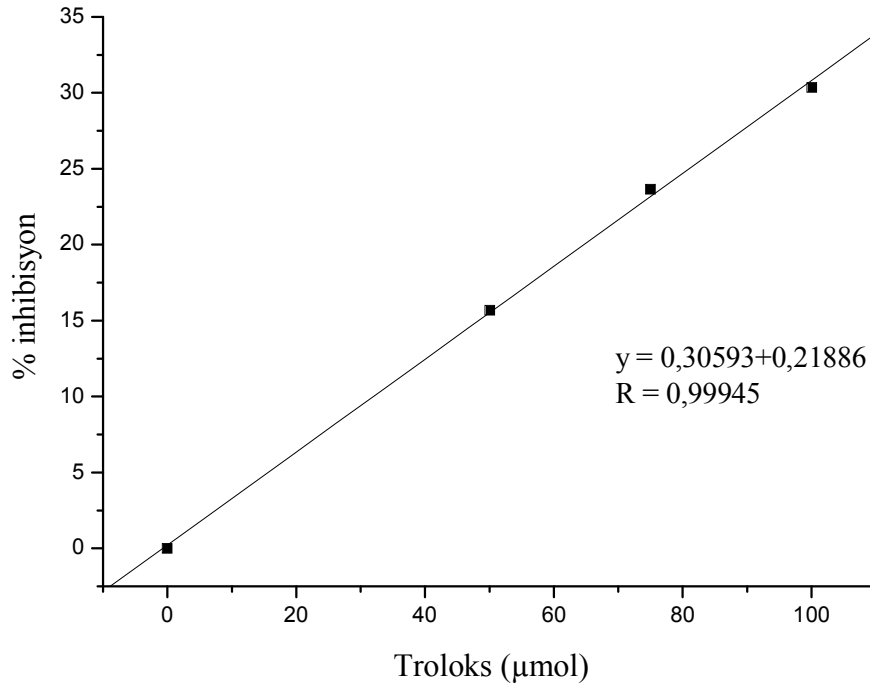


SD (hata değeri): 1,55964; ( $P < 0,0001$ ).

Şekil 57. TEAC tayininde kullanılan Troloks standardı çalışma grafiği.

Çizelge 13. Hekzan özüt çözeltisi (1 mg/mL)'nden eklenen miktar ve % inhibisyonları

eklenen miktar ( $\mu\text{L}$ )	% inhibisyon
0	0
50	15,7
75	23,67
100	30,34

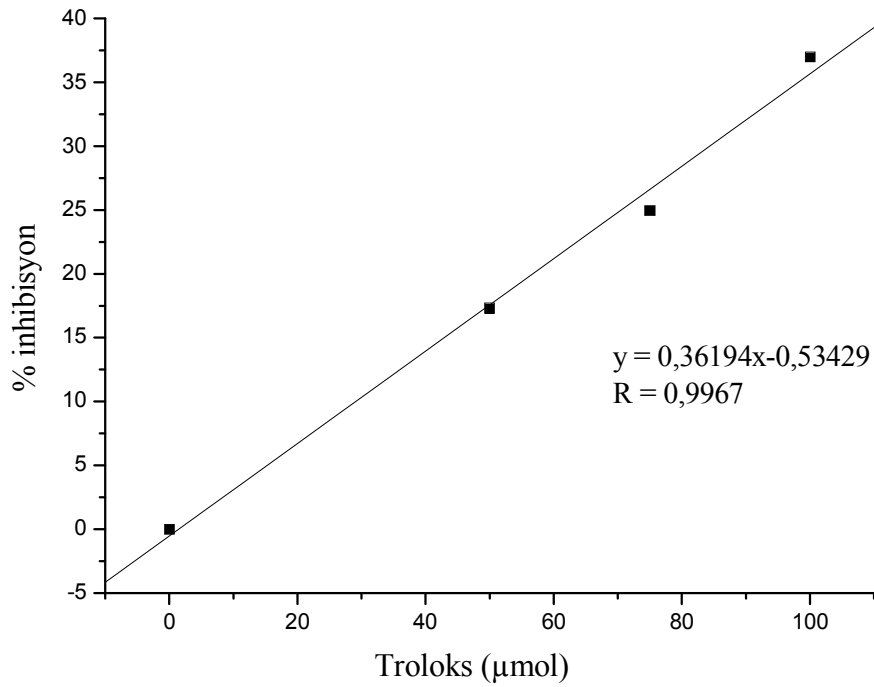


SD (hata değeri): 0,52966; (P=0,00054).

Şekil 58. Şerbetçi otu hekzan özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS<sup>+</sup> radikalini süpürme etkisi.

Çizelge 14. Aseton özüt çözeltisi (1 mg/mL)'nden eklenen miktar ve % inhibisyonları

eklenen miktar ( $\mu\text{L}$ )	% inhibisyon
0	0
50	17,3
75	25
100	37

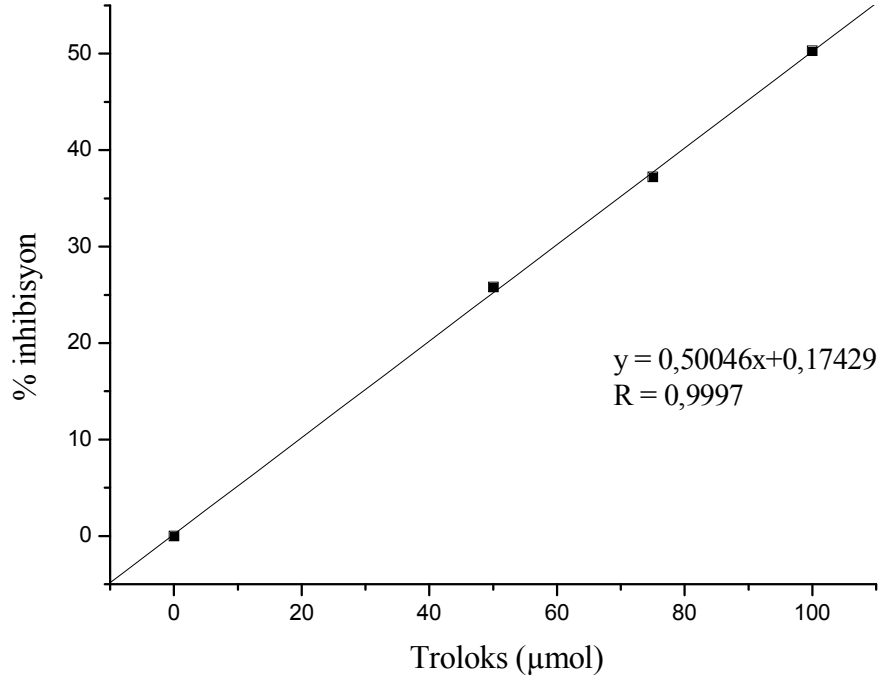


SD (hata değeri): 1,54059; (P=0,0033).

Şekil 59. Şerbetçi otu aseton özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS<sup>++</sup> radikalini süpürme etkisi.

Çizelge 15. Aseton sonrası metanol özüt çözeltisi (1 mg/mL)'nden eklenen miktar ve % inhibisyonları

eklenen miktar (µL)	% inhibisyon
0	0
50	25,8
75	37,2
100	50,3

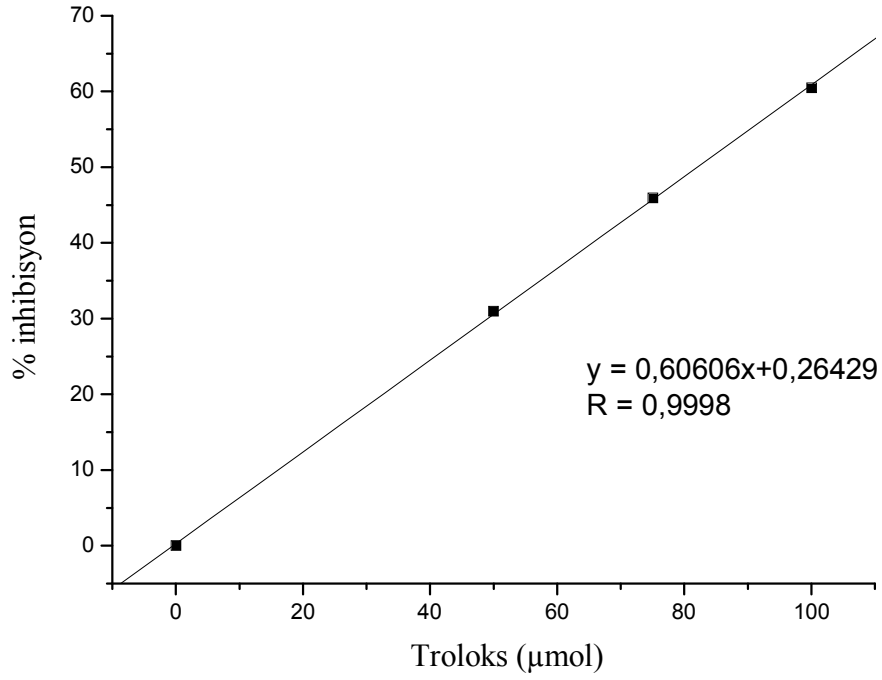


SD (hata değeri): 0,57396; (P=0,00024).

Şekil 60. Şerbetçi otu aseton sonrası metanol özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS<sup>•+</sup> radikalini süpürme etkisi.

Çizelge 16. Metanol (kademeli) özüt çözeltisi (1 mg/mL)'nden eklenen miktar ve % inhibisyonları

eklenen miktar (µL)	% inhibisyon
0	0
50	31
75	45,91
100	60,51



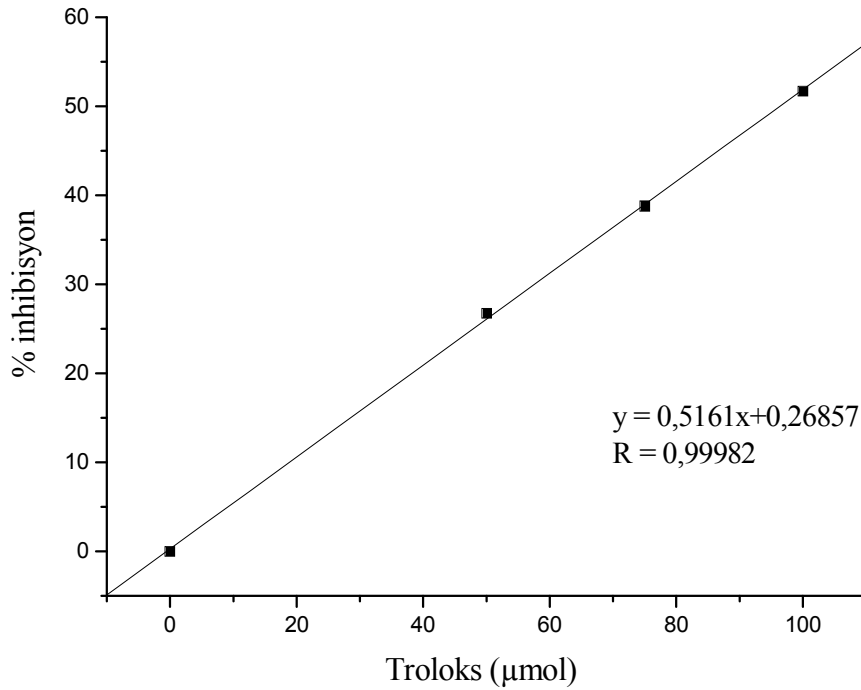
SD (hata değeri): 0,46014; (P<0,0001).

Şekil 61. Şerbetçi otu metanol (kademeli) özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS<sup>•+</sup> radikalini süpürme etkisi.



Çizelge 17. Metanol (doğrudan) özüt çözeltisi (1 mg/mL)'nden eklenen miktar ve % inhibisyonları

eklenen miktar (µL)	% inhibisyon
0	0
50	26,7
75	38,8
100	51,7

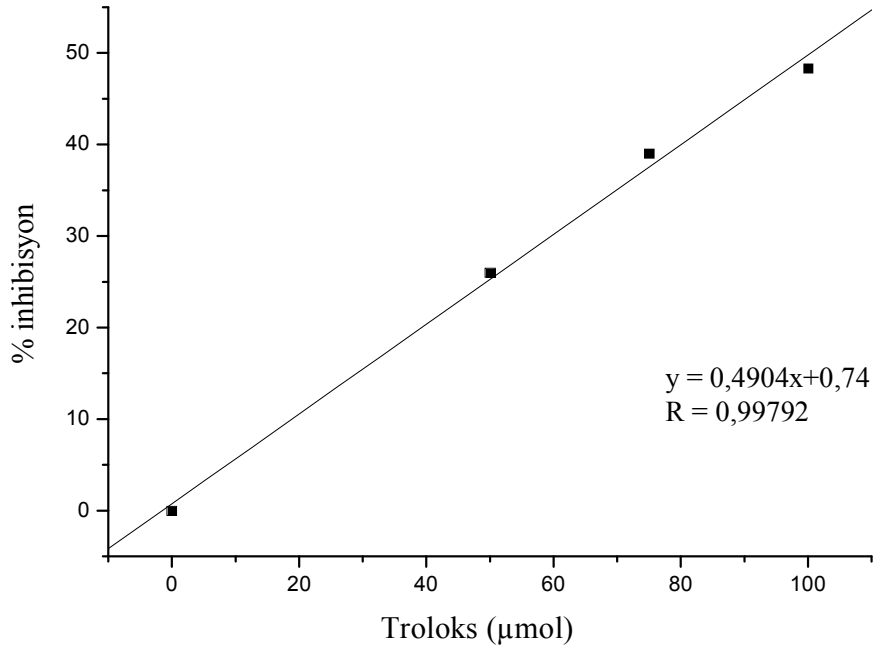


SD (hata değeri): 0,51353; (P=0,00018).

Şekil 62. Şerbetçi otu metanol (doğrudan) özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS<sup>•+</sup> radikalini süpürme etkisi.

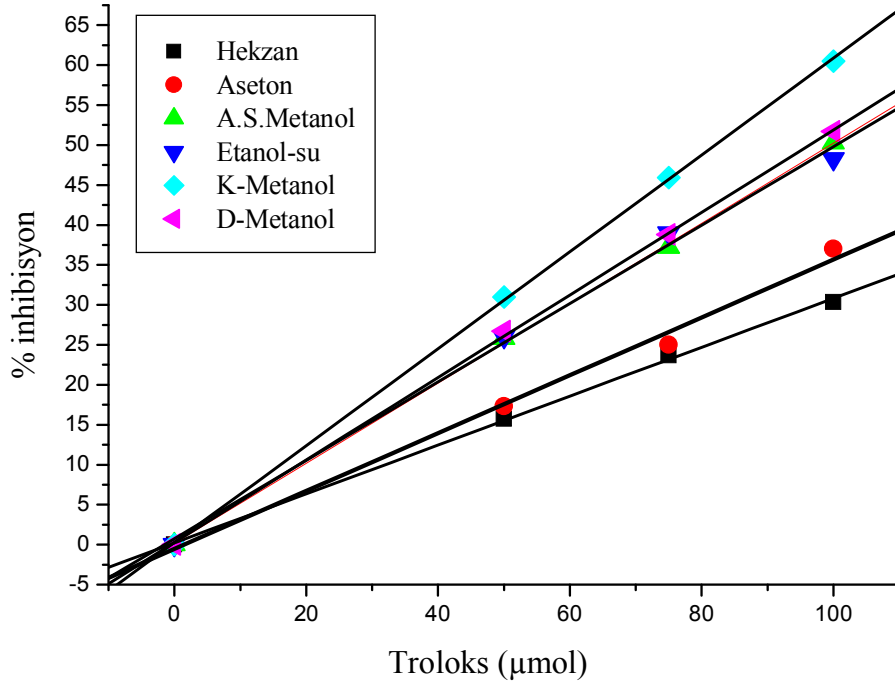
Çizelge 18. Etanol-su özüt çözeltisi (1 mg/mL)'nden eklenen miktar ve % inhibisyonları

eklenen miktar ( $\mu\text{L}$ )	% inhibisyon
0	0
50	26
75	39
100	48,3



SD (hata değeri): 1,65469; (P=0,0021).

Şekil 63. Şerbetçi otu etanol-su özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen  $\text{ABTS}^{*+}$  radikalini süpürme etkisi.



Şekil 64. Özütlerin % inhibisyon değerlerinin toplu gösterimi.

Bitki özütleri (1mg/mL)'nden 50, 75, 100 µL alınarak benzer ölçümler yapıldığında elde edilen % inhibisyon değerleri Çizelge 12-18'de görülmektedir. % inhibisyon grafiklerin eğimleri standart grafiğin eğimine oranlanarak örnekler için katsayılar bulunmuştur. Bu yöntem için tartılan miktarların, seyrelme etkenine bölünmesi ve buradan elde edilen sonuç ile eğimlerin oranlanmasıyla elde edilen katsayıların çarpılması sonucunda örneklerin Troloks eşdeğeri antioksidan aktivitesi (TEAC) hesaplanmıştır.

Şerbetçi otu özütlerinin (50-100 µg/mL) TEAC yöntemi ile belirlenen % inhibisyon değerlerinin çakıştırılmış grafiği gösterilmiştir (Şekil 64).

Özütlerin mM Troloks/g özüt cinsinden hesaplanan TEAC değerleri ise Çizelge 19' de gösterilmiştir.

Çizelge 19. Şerbetçi otu özütlerinin TEAC değerleri (mM Troloks/g özüt)

Özütler	Hekzan	Aseton	A.S.Metanol	K-Metanol	D-Metanol	Etanol-su
TEAC değeri	4,48	5,25	7,35	6,34	7,22	6,91

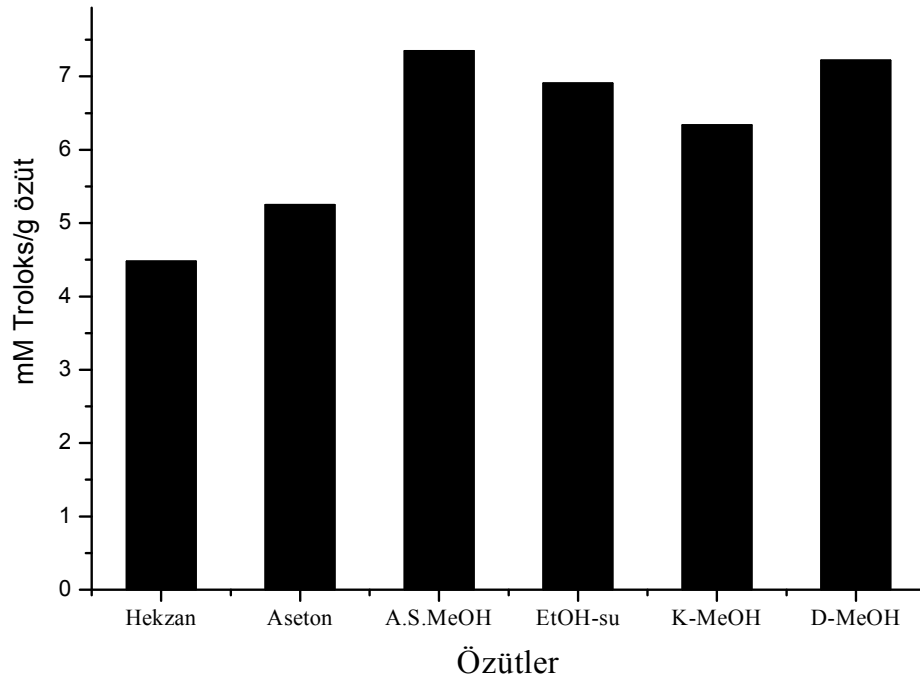
Çizelge 19’de görüldüğü üzere TEAC değeri aseton sonrası metanol özütünde en yüksektir (7,35 mM Tr/g özüt). Özütlerin TEAC değerleri (mM Tr/g özüt) Şekil 65’de gösterilmiştir.

Örnek grafiklerinin eğimleri standart Troloks grafiğinin eğimine oranlandığında, radikal molekül olarak yöntemde ABTS kullanıldığı için sonuçlar TEAC<sub>ABTS</sub> şeklinde ifade edilmiştir (Çizelge 20).

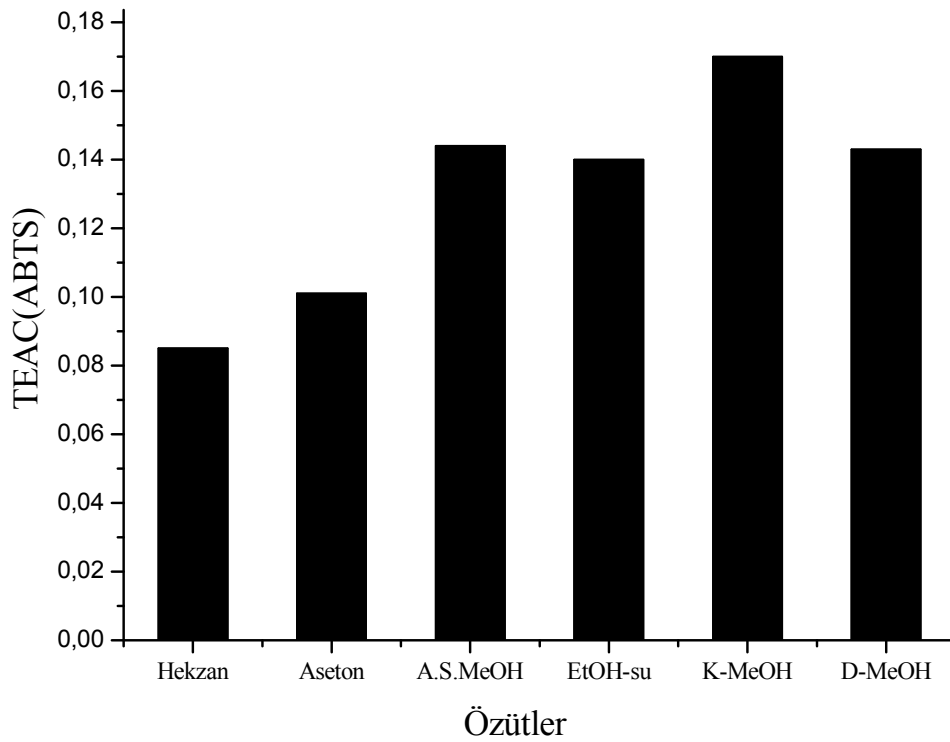
Çizelge 20. Şerbetçi otu özütlerinin TEAC<sub>ABTS</sub> değerleri

	Troloks	Hekzan	Aseton	A.S.Metanol	K-Metanol	D-Metanol	Etanol-su
TEAC <sub>ABTS</sub>	1	0,085	0,101	0,144	0,17	0,143	0,14

Çizelge 20’de görüldüğü üzere şerbetçi otu hekzan özütü eşdeğer miktardaki standart Troloks antioksidanının etkisinin yaklaşık 0,085’i kadar antioksidan etki göstermiştir. Diğer özütler içinde aynı şekilde yorum yapılabilir (Şekil 66).



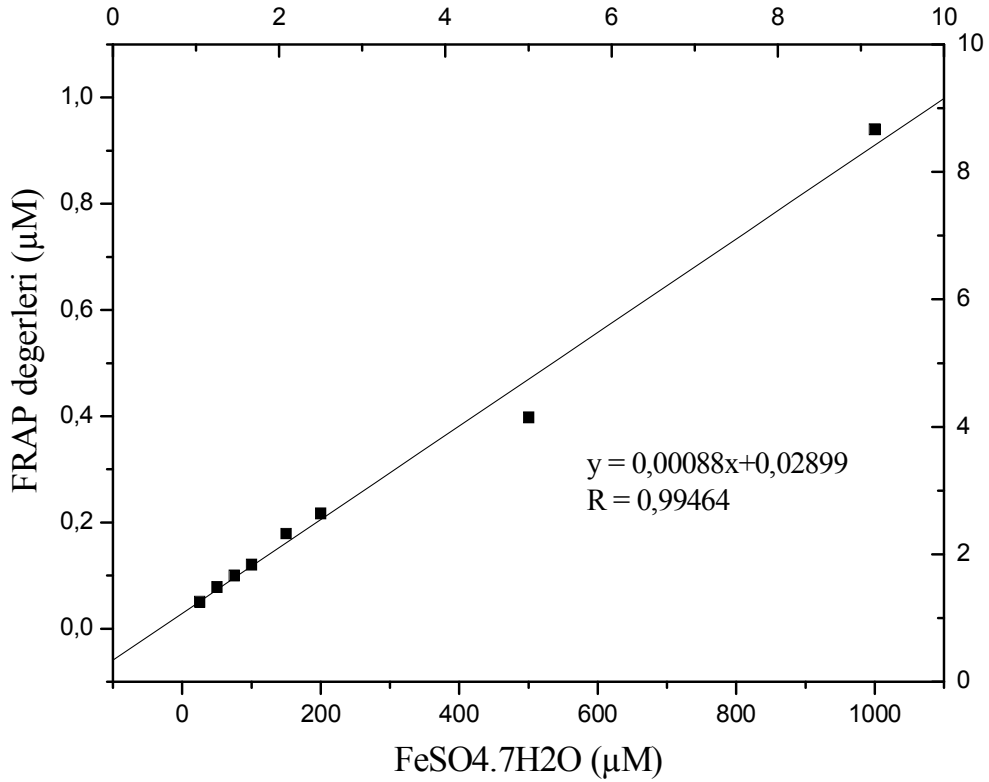
Şekil 65. Özütlerin TEAC değerleri (mM Tr/g özüt) sütun grafiği.



Şekil 66. Özütlerin TEAC<sub>ABTS</sub> değerleri sütun grafiği.

#### 4.5. FRAP (Demir İyon İndirgeyici Antioksidan Güç) Sonuçları

Bu yöntemde  $Fe^{+3}$ 'i,  $Fe^{+2}$ 'ye indirgeyen antioksidanların hangi özütte daha etkin olduğu belirlenmiş olup, 1 mg/mL örnek çözeltilere göre sonuçlandırılmıştır. Standart olarak 50-1000  $\mu$ M arasındaki  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  derişimleri kullanılmıştır. Örneklerin FRAP değerleri  $FeSO_4$  mM/g özüt şeklinde hesaplanmıştır. Standardın garfiği Şekil 67'de verilmiştir.



SD (hata değeri): 0,03302; (P<0,0001).

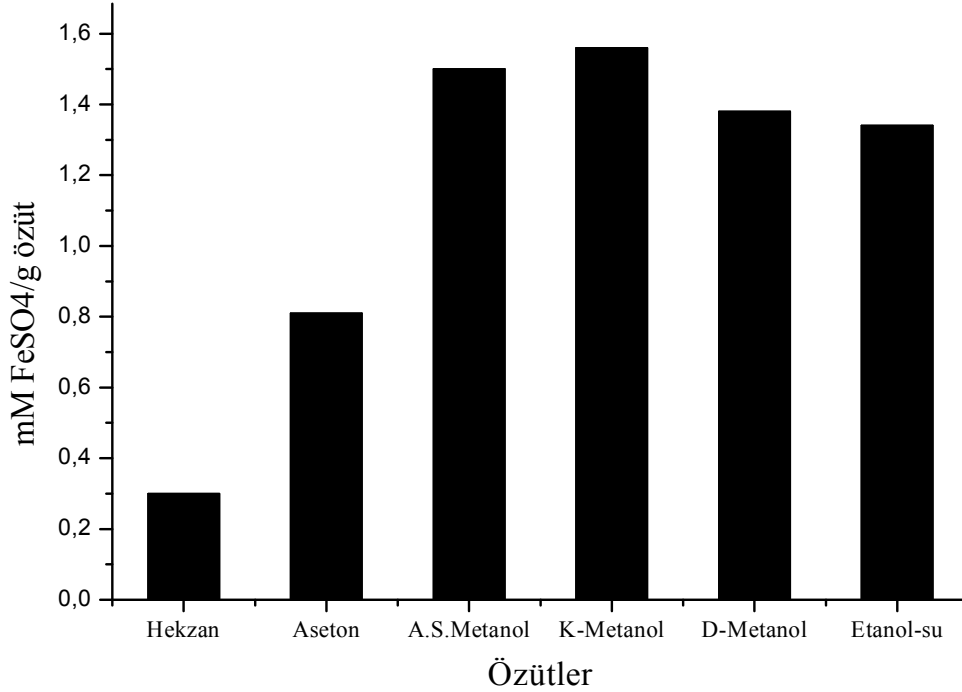
Şekil 67. FRAP yönteminde kullanılan  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  standart grafiği.

Çizelge 21. Özütlerin FRAP değerleri (mM  $FeSO_4$ /g özüt)

Özütler	Hekzan	Aseton	A.S.Metanol	K-Metanol	D-Metanol	Etanol-su
FRAP değeri	0,3	0,81	1,5	1,56	1,38	1,34

Çizelge 21’de görüldüğü üzere FRAP değeri en yüksek olan özüt kademeli şekilde elde edilen metanol özütüdür. Aseton sonrası metanol özütü ile aralarında çok fazla fark olmadığı görülmektedir (Çizelge 21). Hekzan özütü ise yapısındaki acı asitlerin varlığından dolayı çok düşük sonuç vermiş ve TEAC değerleri sıralamasında olduğu gibi en son sırada yerini almıştır (Şekil 68).

TEAC ve FRAP yöntemleri genellikle özütlerin içeriğindeki vitaminler ile ilişkilidir. Şerbetçi otu özütleri fenolik bileşikler açısından zengin olduğu için bu yöntemlerle elde edilen sonuçlar genelde düşük bulunmuştur.



Şekil 68. Özütlerin FRAP değerleri (mM FeSO<sub>4</sub>/g özüt) sütun grafiği.

#### 4.6. HPLC-UV ve <sup>1</sup>H-NMR Sonuçları

Katı-faz özütlemesi % 100 ayırımından elde edilen katı, HPLC-UV sisteminde incelenmiştir (Bölüm 3.2.11).

Basınç: 97 bar

Enjeksiyon hacmi: 250 µL

Akış oranı: 2 mL/dakika

Toplam 8 ayırım elde edilip, ilk 30 dakikada aktif bileşenler toplanmıştır. 3-4,4 dakika aralığında tüm polar bileşikler elde edilmiştir. 10,49; 12,16; 13,39 ve 15,49 dakikalarda gözlenen piklerin aromatik bileşikler (çoğunlukla flavonoidler) ve kumarinler, 24,82 ve 29,19 dakikalarda gözlenen piklerin lignanlar, 30,27. dakikada gözlenen pikin kumarinler olduğu öngörülmüştür. HPLC-UV kromatogramları Ek 1-12' de gösterilmiştir.

Chen ve ark., (2010); Dhooghe ve ark., (2010) tarafından UV-VIS spektrumunda 220-450 nm soğurma aralığında gözlenen piklerin XN, IXN, 8-PN ve 6-PN gibi prenil flavonoidlerine ait olduğu rapor edilmiştir.

❖ HPLC-UV spektrumuna ait pikler temel bileşikleri tanımlamaya yetmektedir. 10,49. dakikada gelmeye başlayan ve 12,16; 13,39, 15,49 (Ek 5-8) ve 30,27. dakikalarda gelen, 349,6 ve 370 nm aralığında görülen yayvan pikin ksantohumol bileşiğine ait olduğu belirlenmiştir (Ek 11).

❖ 24,82 ve 29,19. dakikalarda, 292,2 ve 296,7 nm'de gözlenen yayvan pikin isoksantohumol bileşiğine ait olduğu belirlenmiştir (Ek 9-10).

❖ 10,49; 12,16; 13,39, 15,49, 24,82 ve 29,19, 30,27. dakikalarda sırasıyla 201,5, 196,8, 202,1 194,6, 191,4, 191,5 ve 194,8 nm de gözlenen piklerin 6-PN ve 8-PN bileşiklerine ait olduğu belirlenmiştir (Ek 5-11).

❖ HPLC-UV kromatogramlarından elde edilen sonuçlar doğrultusunda saf olduğu düşünülen katıların alınan <sup>1</sup>H-NMR spektrumları gösterilmiştir (Ek 12, 16-18).

❖ Ek 12, Kersetin glukozit bileşiğine ait bir spektrumdur. <sup>13</sup>C-NMR spektrumları alınmadığı için glukozun C-3 veya C-7'de bağlı olduğu öngörülmüştür. Kersetin, kersetin-3-O-glukozit ve kersetin-7-O-glukozit bileşiklerinin teorik spektrumları karşılaştırma yapmak amaçlı hesaplanmış ve Ek 13-15'te gösterilmiştir.

❖ Kersetin-3-O-glukozit için hesaplanan teorik <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda; ppm (δ): 7,72, 7,84 (aromatik B halkası, 2',6' -H'ler), 7,14 (aromatik ve şeker halkası, -OH), 7,0 (B halkası, 5' -H), 6,44, 6,29 (aromatik A halkası, 6, 8 -H'ler), 5,87, 4,99, 4,06, 3,66 (aromatik C halkası, şeker yapısı H'leri) proton pikleri, 5,0 ve 3,31 (MeOD) çözücü pikleri görülmektedir (Ek 14).

❖ Kersetin-7-O-glukozit için hesaplanan teorik <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda; ppm (δ): 6,70 (aromatik ve şeker halkası -OH) protonlarını göstermektedir (Ek 15). Kersetin-3-O-glukozit'ten farkı; diğer pik yerlerinde farklılaşma olmamakla birlikte, -OH protonları yüksek alana kaymıştır.



❖ Kersetin glukozit bileşimine ait spektrumda; ppm ( $\delta$ ): 8-7,5; 6-7; 5,30-5,0 ve 3-4 arası pikler görülmektedir (Ek 12). Kersetin-3-*O*-glukozit ve Kersetin-7-*O*-glukozit bileşik yapıları ile örtüşmektedir. Kersetin için hesaplanan teorik <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda elde edilen saf bileşenin yapısının kersetin türevi olduğunu doğrulamaktadır (Ek 13).

❖ 3-Hidroksiflavanon bileşimine ait bir spektrum Ek 17’de gösterilmiştir. Ancak çözücü piki 3,33 ppm’de çıkması gerekirken 1,729 ppm’de çıkmıştır. Bu nedenle tüm pikler 1,5 ppm düşük alana kaymaktadır. 1,5 ppm düşük alana kayma ile pikler 8,0, 6,82, 6,30, 6,10, 5,20, 4,88, 3,60, 3,40, 3,10 ppm değerlerini alır. Pikler, spektrumda net olarak görülmediği için tam olarak değerlendirme yapılamamıştır. Ancak spektrum bileşiğin karakterisitik piklerini göstermektedir.

❖ Temel bileşik rutin olan karışımın <sup>1</sup>H-NMR spektrumu verilmiştir (Ek 19). Karışım olduğu için yapı net tayin edilememiş, ancak 3-4,0 ppm arası çoklu pikler yapıda şeker halkasının bağlı olduğunu göstermiştir. Spektrum rutin bileşiğinin yapısını göstermektedir. Şeker halkasının C3 ve C7’ye bağlı olduğu teorik spektrumlar hesaplanmış ve kıyas bileşikleri olarak kullanılmıştır (Ek 20-21).

❖ C7’de şeker halkası bağlı rutin bileşimine ait <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda (Ek 20). ppm ( $\delta$ ): 8,10 (A halkası, C5), 7,58, 7,42 (B halkası C2’, 3’), 7,0-6,97 ( A halkası, C6, 8), 5,70 (-OH piki), 3-4,0 (çoklu pikler, şeker grubu), 1,20 (-CH<sub>3</sub>) piklerini göstermektedir. Skolmosid gibi bir rutin türevine ait spektrumdur.

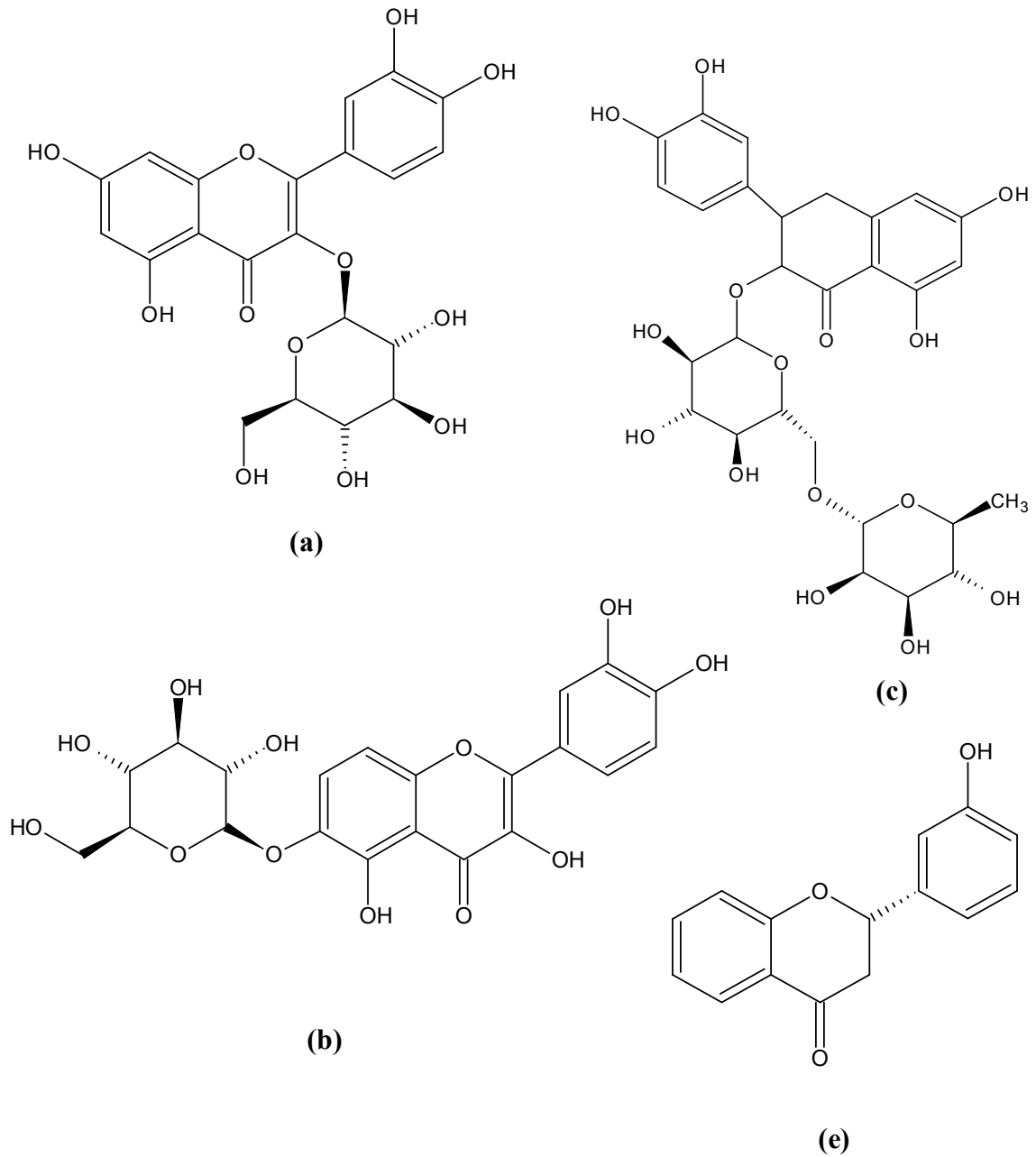
❖ C3’te şeker halkası bağlı rutin bileşimine ait <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda (Ek 21) ppm ( $\delta$ ): 7,78 (B halkası, C2’,3’), 6,95 (A halkası C3’), 6,62 (-OH), 6,42, 6,30 (C6, 8), 5,46 (C halkası, C3’e bağlı şeker protonu), 3-4,0 (çoklu pikler, şeker grubu), 0,95 (-CH<sub>3</sub>).

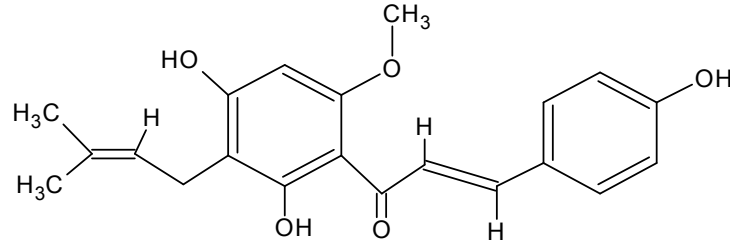
❖ Rutin bileşimine ait bir <sup>1</sup>H-NMR spektrumu Ek 22’de verilmiştir (Anonim1). Teorik olarak hesaplanan spektrum (Ek 21) ile uyumluluk göstermektedir. Bu spektrumlar esas alındığında karışımın spektrumunda (Ek 19) temel bileşenin rutin olduğu görülmektedir.

❖ Ksantohumol olduğu düşünülen bileşiğin spektrumunda (Ek 16) ppm ( $\delta$ ): 7,80-7,50, 6,80, 6,00 5,15, (3,90 karakteristik –OCH<sub>3</sub> piki), 5,0 ve 3,31 çözücü pikleri, 1,80-1,70 arası pikler görülmektedir. Ksantohumol türevi için hesaplanan teorik spektruma göre –OH piki 4,80 civarında görülmektedir. Nookandeh ve ark., (2004) tarafından ksanthohumol <sup>1</sup>H-NMR spektrumu rapor edilmiştir. 7,80, 7,68, 7,56, 6,87, 6,09, 5,15, 3,88, 3,20, 1,73, 1,64 ppm karakteristik ksantohumol pikleri rapor edilmiştir (500 MHz, MeCN-D<sub>2</sub>O) (Nookandeh ve ark., 2004). Ek 16 ve 17’de de görüleceği üzere bileşik yapısı ksantohumol ile örtüşmektedir.

❖ Ksantohumol türevi için hesaplanan teorik  $^1\text{H-NMR}$  spektrumunda (Ek 17) ppm ( $\delta$ ): 10,48 (-OH), 7,83, 7,80 (çift bağ H'leri), 7,50 (2', 6' H'leri), 6,83 (3', 5' H'leri), 6,04 (A halkası, C8), 3,80 (-OCH<sub>3</sub>), 3,20 (-CH<sub>2</sub>), 1,72 (-CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C-NMR}$  ve 2D-NMR spektrumları alınmadığı için kıyas bileşikleri kullanılarak karakteristik piklerden ve şerbetçi otu bileşenlerinden yola çıkılarak yapılar öngörülmüştür (Şekil 4.33).





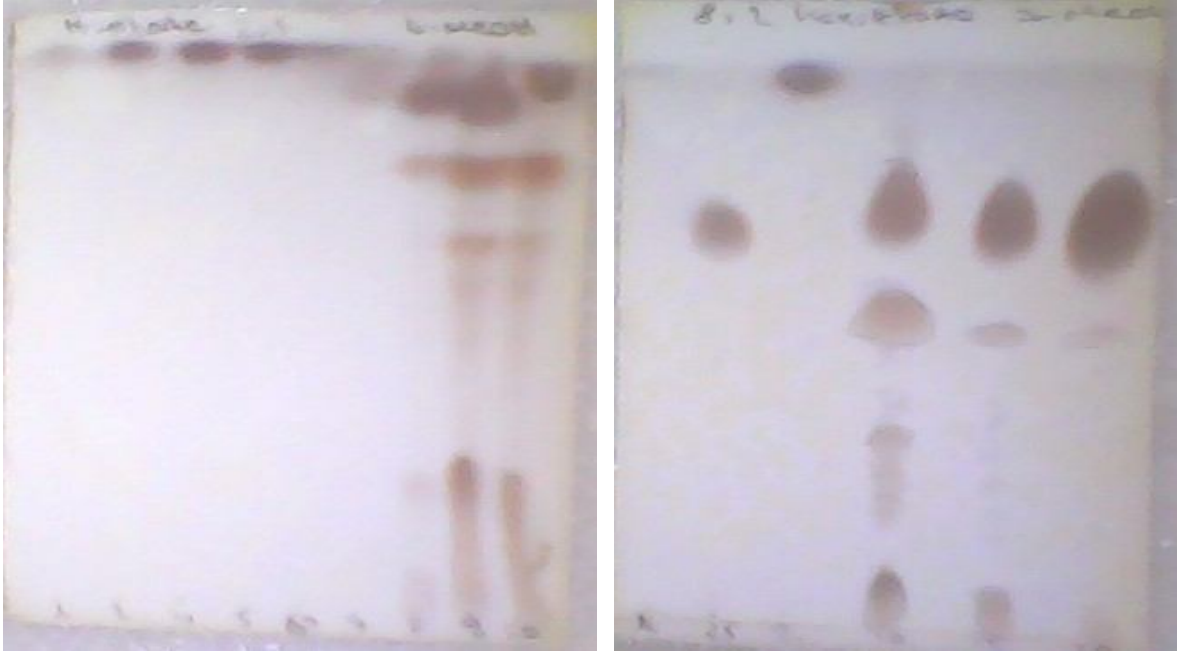
(d)

Şekil 69. (a) Kersetin-3-O-glukozit, (b) Kersetin-7-O-glukozit, (c) Rutin, (d) Ksantohumol, (e) 3-Hidroksiflavanon kimyasal yapıları.

#### 4.7. Kolon Kromatografisi Sonuçları

Düşük Basınç Sıvı Kromatografisi (VLC) F3 ayrımı 2100 mg numune için uygulanan kolon kromatografisinden elde edilen aynı ayrımların birleştirilerek silika jel ilave etmeden 4 kez kolona verildiği Bölüm 3.2.12.1’de belirtilmiştir. Numune miktarının çok az olması ve bileşenlerin sürekli karışım halinde gelmesi nedeniyle saflaştırma işlemi yapılamamıştır. İçeriğindeki bileşenlerin silika jel ile ayrılamadığı görülmüştür. Basit kolon ile yıkama yapılarak elde edilen ayrımların içeriğindeki etkin bileşenlerin sayısı azaltılmış olup, ayırma-saflaştırma işlemi, Combi Flash Rf cihazı ile C<sub>18</sub>, C<sub>4</sub> gibi silika kolon kullanılarak gerçekleştirilecektir. Düşük basınçlı, yüksek akış hızlı çalışılan bu cihazla belirlenen soğurma aralığında bileşenlerin geldiği piklere göre ayrımlar tek tek toplanmaktadır. Bu nedenle bileşen sayısı azaltılmış ayrımların bu şekilde saflaştırılacağı düşünülmektedir. Başlangıç madde miktarıda etkili olduğu için aksi durumda uygun çözücü sistemi seçilerek ayrımlara preparatif ince tabaka kromatografisi uygulanacaktır.

30 g Metanol (doğrudan) özütüne Bölüm 3.2.12.2’de belirtildiği şekilde çözücü sistemleri uygulanarak yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Ayrımların İTK plakalarına seryum (IV) sülfat belirteci püskürtülerek 105 °C’lik etüvde 5 dakika bekletilmesinin ardından belirlenen lekeler vasıtasıyla elde edilen aynı ayrımlar birleştirilmiştir (Şekil 70).

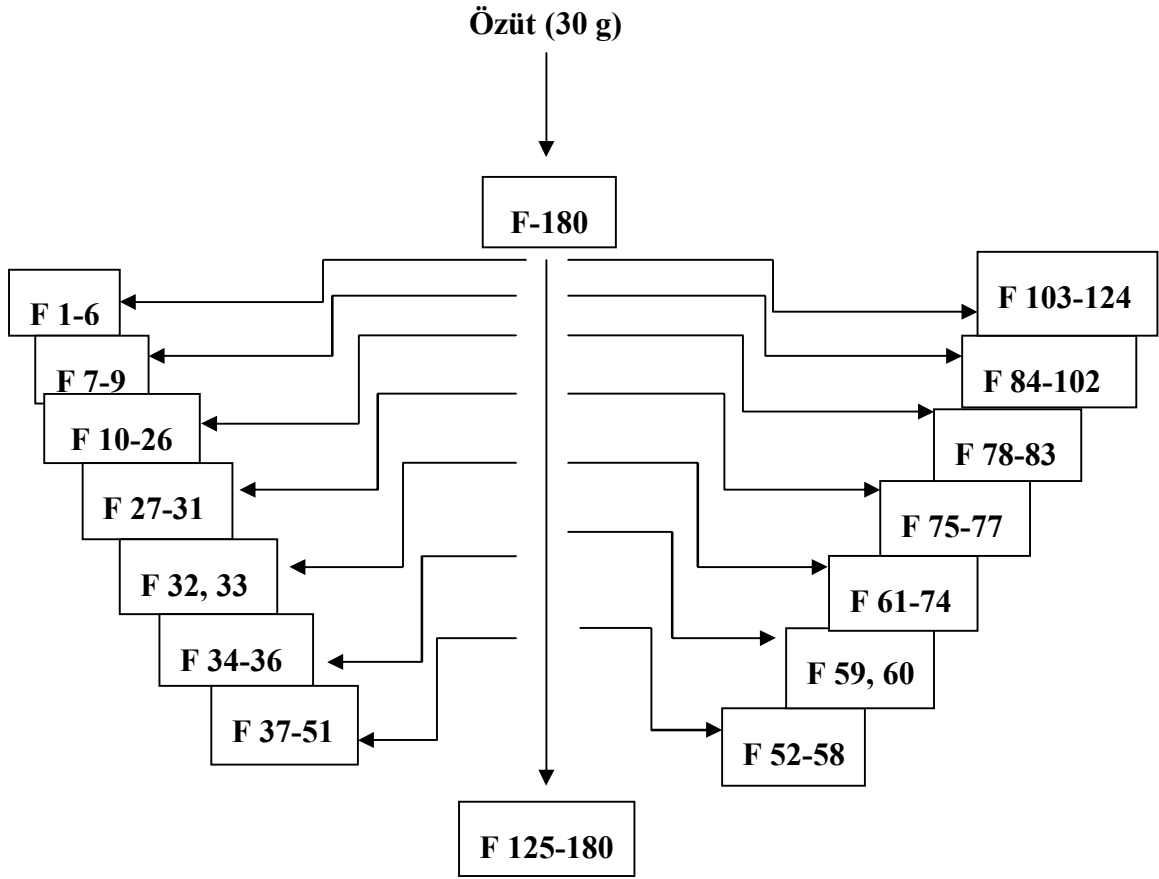


Şekil 70. Hekzan:Etilasetat çözücü sisteminde yürütülen lekeler. F1-6 ve F7-10 (solda) ve F10,15,20,25 (sağda).

Şekil 70’de görüldüğü üzere F10 hekzan:etilasetat (2:1) çözücü sisteminde olduğu gibi, (8:2) çözücü sistemiyle aynı Rf değerine sahip değildir ve ayrımlar, hekzan:etilasetat polarlıkları farklı oranlarda artırılarak birleştirilmiştir. F52-58 itibariyle DCM:Metanol çözücü sistemi farklı polarlıkları kullanılmıştır.

Madde miktarına göre seçilen kolon yardımıyla ayrımlara; sırasıyla hekzan, giderek artan oranlarda kloroform, kloroform % 100’e ulaştıktan sonra aseton, aynı oranda aseton miktarı % 100’e ulaştıktan sonra metanol (% 100 olana kadar) yıkama işlemi; çok çözücü kullanımı, elde edilen ayırım miktarlarının azlığı, Rf değerlerinin İTK ile belirlendikten sonra kolonda madde kaybı olması vb nedenlerle uygulanmayarak Combi Flash Rf cihazı tercih edilmiştir.

Çoğu sarı renkli olan bu ayrımların ve ham özütlerin spektral analizleri GC-MS ve LC-MS ile yapılmıştır (Ek 23-35). Saflaştırma işlemleri devam etmektedir. Birleştirilen 180 ayırım ve nasıl kodlandığı aşağıda gösterilmiştir.



#### 4.8. GC-MS Sonuçları

GC-MS analizi (F10-26);

Kolon: VF-WAX ms 60 m x 0,25 mm x 0,25 um

Sıcaklık programı:	Derece	Sıcaklık	Tutulan zaman (dk)
		50 °C	5
	5 °C/dk	250 °C	10

❖ **F10-26 ayrımı için uygulanan GC-MS analizi için kullanılan kolonun özellikleri ve sıcaklık programı yukarıda verilmiştir. İçeriğinde humulon ve lupulonların (acı asitler) olabileceği düşünülen sarı jelatinimsi numune için tanımlanan bileşikler verilmiştir (Çizelge 22).**

Çizelge 22. F10-26 ayrımı için uygulanan GC-MS analizi ile tanımlanan bileşikler, alıkonma zamanları ve bölgeleri (%)

Alıkonma zamanı	Bileşikler	Bölge %
16,22	Kaproik asit, metil ester	1,4
21,85	Kaprilik asit, metil ester	2,2
25,91	Benzaldehit dimetil asetal	1,4
31,04	7,7-dimetoksi, heptanoik asit	1,3
31,88	Adipik asit, dimetil ester	1,3
33,26	Araşidik asit, metil ester	1,3
35,31	Oktanoik asit, 6,6-dimetoksi, metil ester	0,7
36,05	Oktandioik asit, dimetil ester	0,5
36,64	9-oksononanoik asit, metil ester	0,5
*37,26	8,8-dimetoksi-2-oktanol	11,7
38,02	Nonandioik asit, dimetil ester	4,7
38,16	Linolenik asit, metil ester	1,4
38,92	8,11-Eikosadienoik asit, metil ester	0,4
39,33	Palmitik asit, metil ester	15,9
42,79	Stearik asit, metil ester	3,9
43,13	Dokosan	1,1
43,19	Oleik asit, metil ester	12,6
43,30	Elaidik asit, metil ester	1,4
44,00	Linoleik asit, metil ester	25,9
44,51	6,9,12-oktadekatrienoik asit, metil ester	1,8
45,06	9,12,15-dokosatrienoik asit, metil ester	8,6

F10-26 ayrımı GC-MS kromatogramı Ek 23'te verilmiştir. Muhtemel bileşikler cihazın kütüphanesinde tanımlı olmadığı için belirlenememiştir.

GC-MS analizi (ham özütler);

Kolon: DB-5 30 m x 0,25 mm x 0,25 um

Sıcaklık programı:	<u>Derece</u>	<u>Sıcaklık</u>	<u>Tutulan zaman (dk)</u>
		50 °C	5
	5 °C\dk	250 °C	10

❖ **Ham özütler için uygulanan GC-MS analizi** için kullanılan kolonun özellikleri ve sıcaklık programı yukarıda verilmiştir. Ham özütler için tanımlanan bileşikler verilmiştir (Çizelge 23).

Metanol (maserasyon) özütü GC-MS kromatogramı (Ek 24), metanol (doğrudan) özütü GC-MS kromatogramı (Ek 25), metanol (kademeli) özütü GC-MS kromatogramı (Ek 23), etanol-su özütü GC-MS kromatogramı (Ek 27), Hekzan özütü GC-MS kromatogramı (Ek 28), aseton özütü GC-MS kromatogramı (Ek 29) verilmiştir.

Aseton sonrası metanol özütü yerine metanol (maserasyon) özütü analiz edilmiştir.

Çizelge 23. Ham özütler için uygulanan GC-MS analizi ile tanımlanan bileşikler

Alıkonma zamanı	Bileşikler	MeOH (maserasyon)	MeOH-doğrudan	MeOH-kademeli	EtOH-su	Hekzan	Aseton
10,14	Glutarik asit, dimetil ester	-	0,8	-	0,4	-	-
11,48	Benzaldehit dimetil asetal	-	0,7	-	0,4	0,4	0,5
16,13	5-hekzenoik asit, 5-bromo-, metil ester	-	0,6	-	-	-	-
22,78	Nonandioik asit, dimetil ester	2,2	0,8	0,9	0,5	-	-
25,51	Selinen	-	-	-	-	0,6	-
26,86	Miyristik asit, metil ester	1,3	1,2	1,2	1,3	0,8	0,7
27,61	indol-3-butirik asit, metil ester	-	-	6,4	-	-	-
28,93	Pentadekanoik asit, metil ester	-	-	-	-	0,6	0,5
29,12	Benzoik asit, fenil ester	21,7	-	-	-	-	-
29,33	Ferulik asit, metil ester	6,6	-	2,3	-	-	-
30,44	7,10,13-hekzadekatrienoik asit, metil ester	5,5	-	-	-	-	-
30,54	11-hekzadekenoik asit, metil ester	-	0,4	-	-	-	-
31,05	Palmitik asit, metil ester	20,1	11,5	29,1	9,1	9,7	11,8
31,34	<b>Kohulopon</b>	-	3,0	-	-	-	-



---

32,22	2-Benzoiloksisuksinik asit, dimetil ester	2,2	-	-	-	-	-
32,67	3,4,5-trimetoksi, benzenbutanoik asit	-	-	2,9	-	-	-
32,87	Heptadekanoik asit, metil ester	-	3,9	1,7	-	2,0	3,4
33,84	phytyl metil eter	4,4	4,9	-	5,8	8,1	9,9
33,98	Araşidonik asit, metil ester	-	-	-	2,6	-	-
34,05	2-Fenazinkarboksilik asit, metil ester	2,6	-	-	-	-	-
34,27	Linoleik asit, metil ester	8,8	20,0	23,2	16,8	16,2	19,4
34,30	Linolenik asit, metil ester	17,5	-	18,9	15,1	20,3	19,5
34,38	Oleik asit, metil ester	-	19,5	1,2	16,1	18,6	18,2
34,74	Stearik asit, metil ester	2,6	4,9	6,4	3,6	6,1	9,2
38,13	Eikosanoik asit, metil ester	1,8	4,0	2,9	5,8	6,5	4,6
39,42	2,4,6-Tri-tert-butil benzoik asit	1,1	7,9	-	-	4,0	-
40,63	<b>β-Lupulik asit</b>	0,9	7,9	-	18,3	-	-
41,29	Trikosanoik asit	0,7	4,0	2,9	3,3	6,1	2,3
41,39	<b>Eupulon</b>	-	2,0	-	-	-	-
44,16	Lignoserik asit, metil ester	-	2,0	-	0,9	-	-

---

**4.9. LC-MS Sonuçları**

Ham özütlerin LC-MS analizlerinin kromatogramları eklerde verilmiştir. Aseton özütü LC-MS kromatogramı (Ek 30), metanol (doğrudan) özütü LC-MS kromatogramı (Ek 31), metanol (kademeli) özütü LC-MS kromatogramı (Ek 32), hekzan özütü LC-MS kromatogramı (Ek 33), metanol (maserasyon) özütü LC-MS kromatogramı (Ek 34), etanol-su özütü LC-MS kromatogramı (Ek 35).

Aseton sonrası metanol özütü yerine metanol (maserasyon) özütü analiz edilmiştir.

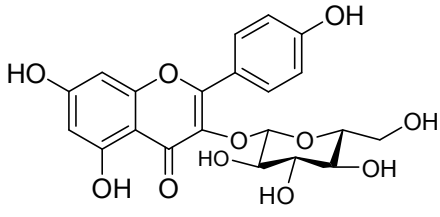
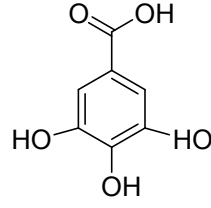
LC-MS analizleri ile ham özütlerden tanımlanan belirgin bileşikler ve bileşiklerin elde edildikleri özütler belirtilmiştir (Çizelge 24).

Çizelge 24. Ham özütlere uygulanan LC-MS analizlerinden tanımlanan bileşikler

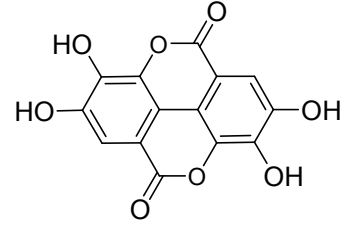
	Aseton	D-metanol	K-metanol	Metanol (maserasyon)	Etanol-su	Hekzan
Askorbik asit	✓	✓	✓	✓	---	---
Gallik asit	✓	---	---	---	✓	✓
Ellagik asit	---	✓	✓	---	✓	Çok az ---
Ferulik asit	---	---	---	✓	---	---
<i>p</i> -kumarik asit	---	---	---	✓	---	---
Kersetin	---	✓	✓	---	✓	✓
Epigallol	---	---	---	---	---	✓
Piragallol	---	---	---	---	✓	---
Kaemferol-3-O-Glukozit	✓	✓	✓	---	✓	✓

LC-MS analiz sonuçlarına göre sadece metanol (maserasyon) özütünde ferulik asit ve *p*-kumarik asit bileşikleri tanımlanmıştır.

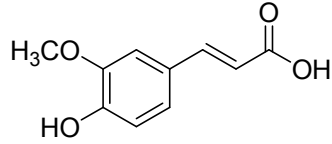
Özütlerde ortak bulunan ve tanımlanan bileşiklerin kimyasal yapıları aşağıda gösterilmiştir.

Kaemferol-3-*O*-Glukozyt

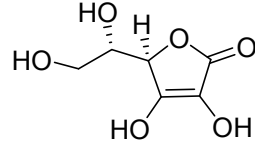
Gallik asit



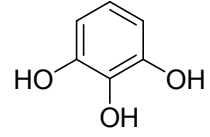
Ellagik asit



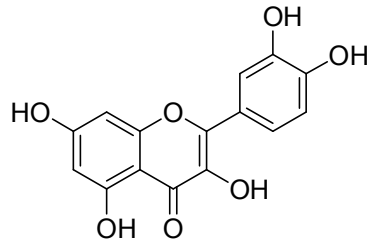
Ferulik asit



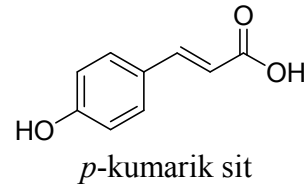
Askorbik asit



Piragallol



Kersetin

*p*-kumarik sit

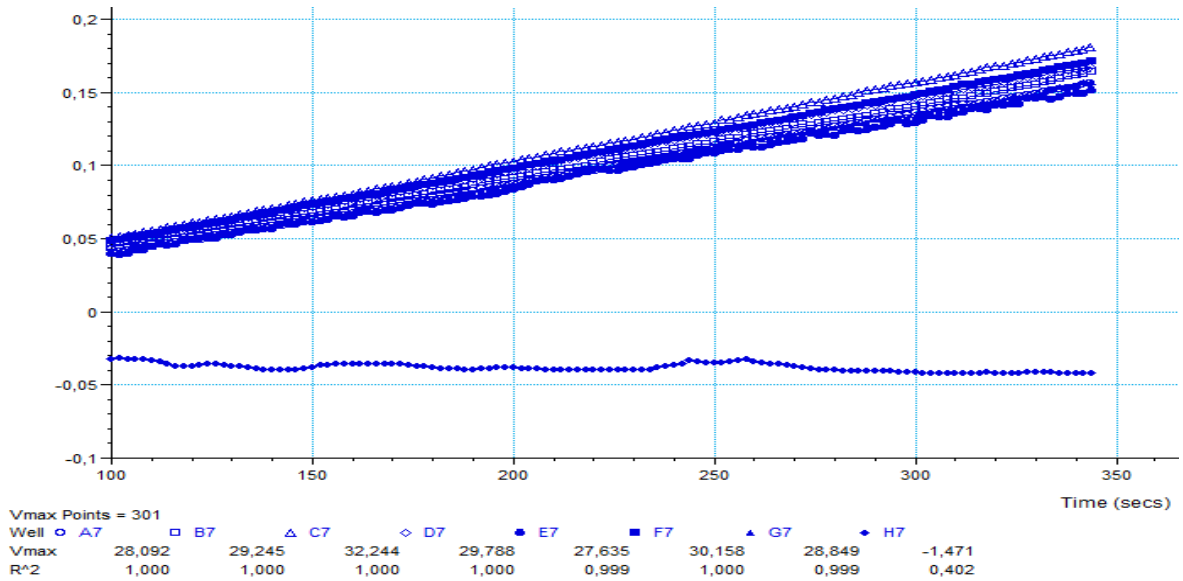
#### 4.10. Enzim-Aktivite/İnhibisyon Sonuçları

##### 4.10.1. Proteaz inhibisyon sonuçları

Bölüm 3.2.11’de bahsedilen enzim inhibisyon çalışmaları 2-3 tekrarlı çalışıldı. Proteaz inhibitörü olarak PMSF inhibitörü (0,0017 mg/mL) kullanılmıştır. Örneklerin 410 nm’de soğurmalarına karşı elde edilen  $V_{max}$ ’lar (en az 2 tekrar) arasındaki farktan yararlanılarak % inhibisyonları hesaplanmıştır. 96 kuyucuklu plakaya uygulanan örneklerin sırası aşağıdaki gibidir.

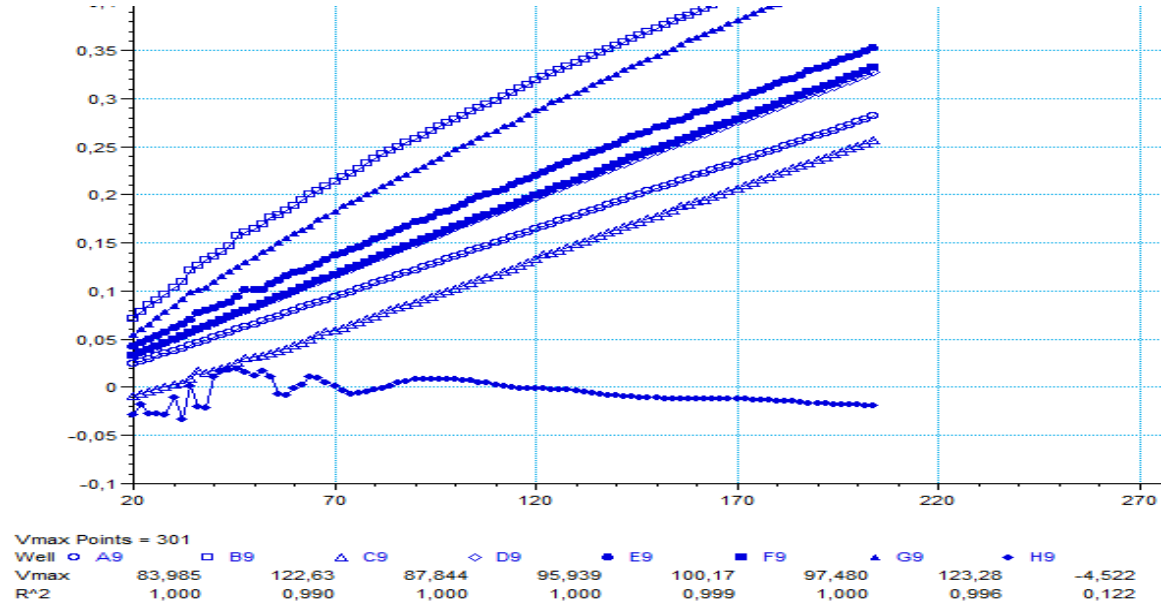
- A1 → DMSO+tampon çözelti+enzim+substrat  
 B1 → hekzan özütü+enzim+tampon çözelti+substrat  
 C1 → aseton özütü..... »  
 D1 → aseton sonrası metanol özütü .....»  
 E1 → etanol-su özütü.....»  
 F1 → metanol (kademeli).....»  
 G1 → metanol (doğrudan) özütü.....»  
 H1 → PMSF .....»

Özütlerin enzim-aktivite/inhibisyon spektrumları gösterilmiştir (Şekil 71-78).



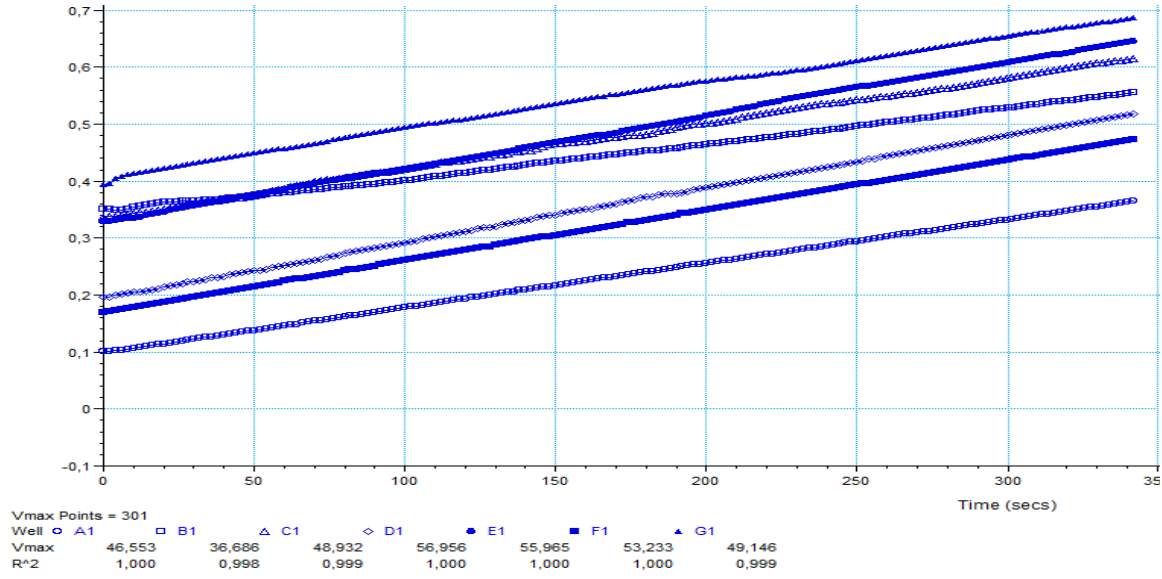
Şekil 71. Örneklerin,  $\alpha$ -kimotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği. İnhibitör olarak PMSF kullanılmıştır.

PMSF (0,0017 mg/mL), 1167 kat örneklerden daha düşük olmasına rağmen, örneklerde bir o kadar PMSF inhibitöründen seyreltik olmalarına rağmen, PMSF' nin  $\alpha$ -kimotripsin ve tripsin enzimlerini inhibe etme yeteneğine ulaşamamışlardır ve inhibisyon görülmedi olarak değerlendirilmiştir (Şekil 71-73).



Şekil 72. Örneklerin, tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği. İnhibitör olarak PMSF kullanılmıştır.

Eğer özütlerin proteaz enzimlerini inhibe etmiş olsaydı; örneklerin gidiş yönü PMSF inhibitörü ile aynı yönde olacaktı.



Şekil 73. Örneklerin, inhibitör olmadan papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.

Örneklerin tekrarlanan ölçümleri doğrultusunda Vmaks'ları arasındaki fark belirlenip özütleri kıyaslamak amaçlı en yüksek değer % 100 kabul edilerek bunun üzerinden % inhibisyon değerleri belirlenmiştir (Çizelge 25).

Çizelge 25. Örneklerin  $\alpha$ -kimotripsin enzimi ile % inhibisyon değerleri

	B1	C1	D1	E1	F1	G1
$\Delta V_{max}$	5,64	0,82	0,65	0,93	1,86	6,16
% inhibisyon	91,6	13,31	10,6	15,18	30,2	<b>100</b>

Metanol (doğrudan) özütünün  $\Delta V_{maks}$  değerinin yüksek olması nedeniyle inhibisyon değeri % 100 kabul edildiğinde diğer özütlerin buna göre hesaplanan % inhibisyonları Çizelge 25'de görülmektedir. Bu bağlamda özütleri % inhibisyon değerlerine göre sıraladığımızda Hekzan > K-metanol > Etanol-su > Aseton > Aseton sonrası metanol şeklindedir.

Çizelge 26. Örneklerin papain enzimi ile % inhibisyon değerleri

	B1	C1	D1	E1	F1	G1
$\Delta V_{max}$	2,841	6,93	1,78	2,431	11,349	0,75
% inhibisyon	40,1	<b>100</b>	25,69	35,08	---	10,82

--- ölçümleri sırasında hava kabarcığı oluşmuştur.

Aseton özütünün  $\Delta V_{maks}$  değerinin yüksek olması nedeniyle inhibisyon değeri % 100 kabul edildiğinde diğer özütlerin buna göre hesaplanan % inhibisyonları Çizelge 26'de görülmektedir. Bu bağlamda özütleri % inhibisyon değerlerine göre sıraladığımızda hekzan > etanol-su > aseton sonrası metanol > D-metanol şeklindedir.

Çizelge 27. Örneklerin tripsin enzimi ile % inhibisyon değerleri

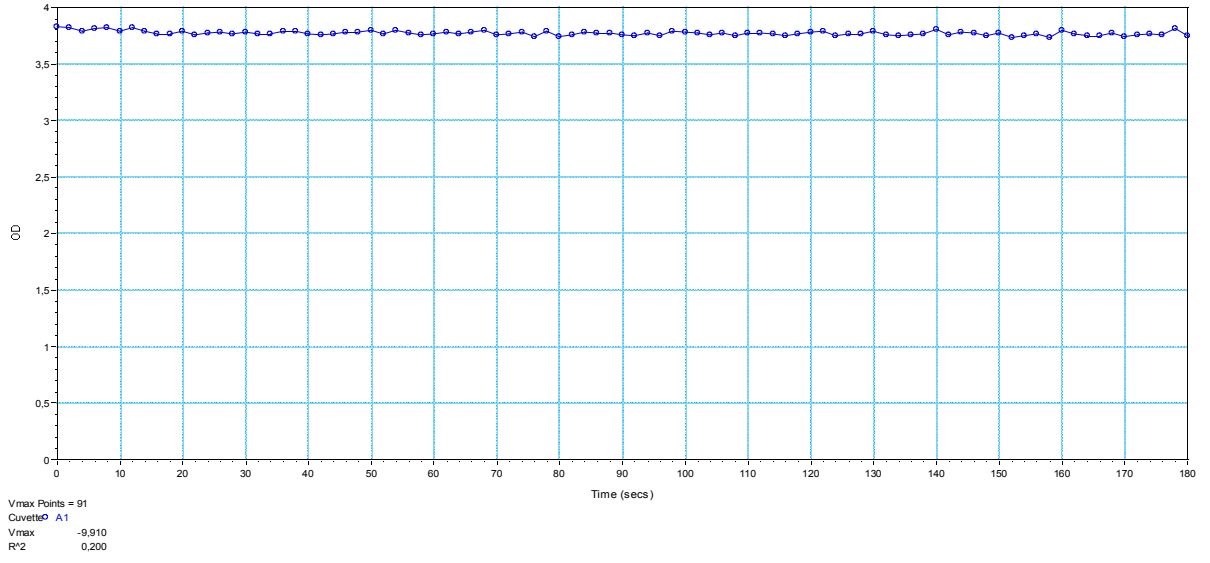
	B1	C1	D1	E1	F1	G1
$\Delta V_{max}$	---	5,21	0,801	7,9	3,93	---
% inhibisyon	---	65,94	10,14	<b>100</b>	49,75	---

--- ölçümleri sırasında hava kabarcığı oluşmuştur.

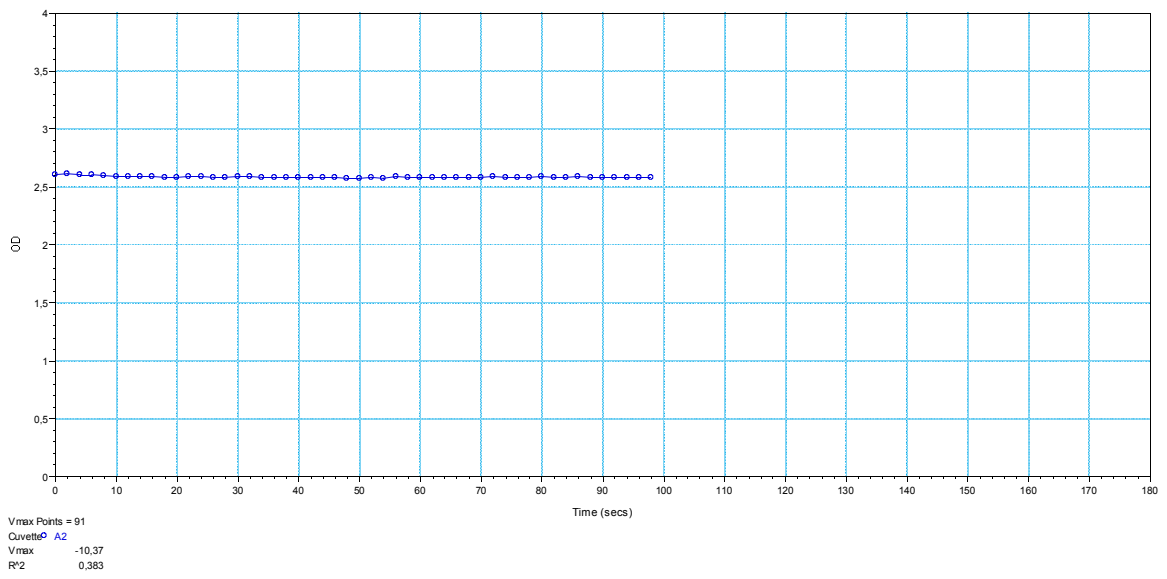
Etanol-su özütünün  $\Delta V_{maks}$  değerinin yüksek olması nedeniyle inhibisyon değeri % 100 kabul edildiğinde diğer özütlerin buna göre hesaplanan % inhibisyonları Çizelge 27'de görülmektedir. Bu bağlamda özütleri % inhibisyon değerlerine göre sıraladığımızda aseton > K-metanol > aseton sonrası metanol şeklindedir.

Karboksipeptidaz A enzimi inhibisyon çalışması 254 nm'de, 2 mL'lik küvet kullanılarak yapılmıştır. Bu nedenle Çizelge 7'de ki 1/5 seyreltilmiş numune ve enzim, tampon çözelti, substrat miktarları 4 kat olacak şekilde küvete eklenmiştir.

Karboksipeptidaz A enzim çalışması için; OD değeri ilk ölçümde ortamda numune varken 4 civarında (Şekil 74); numune yokken 2,5 (Şekil 75); enzim miktarı 40  $\mu$ L'den 5 $\mu$ L'ye düşürüldüğünde 2,3 (Şekil 76); enzim miktarı 100  $\mu$ L substrat miktarı 50  $\mu$ L'ye düşürüldüğünde 2,0 (Şekil 77) ve bu reaksiyon sırasında ortama tekrar enzim ilave edildiğinde ise 1,8 civarında okunduğu için çalışmaya devam edilmemiştir (Şekil 78).

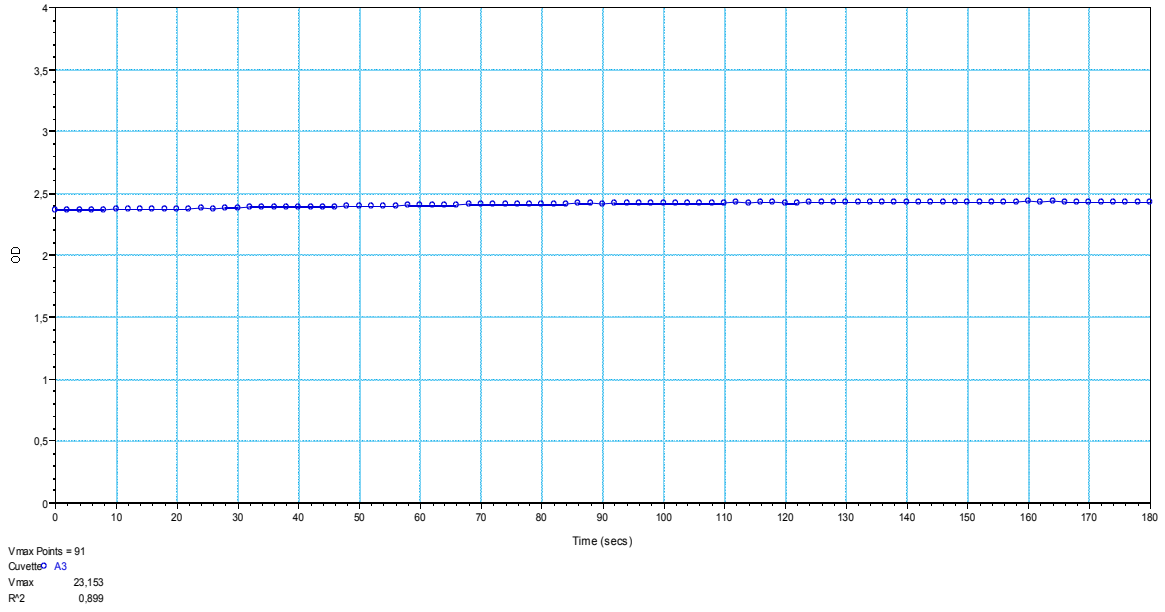


Şekil 74. Özüt ve karboksipeptidaz A aktivitesi.

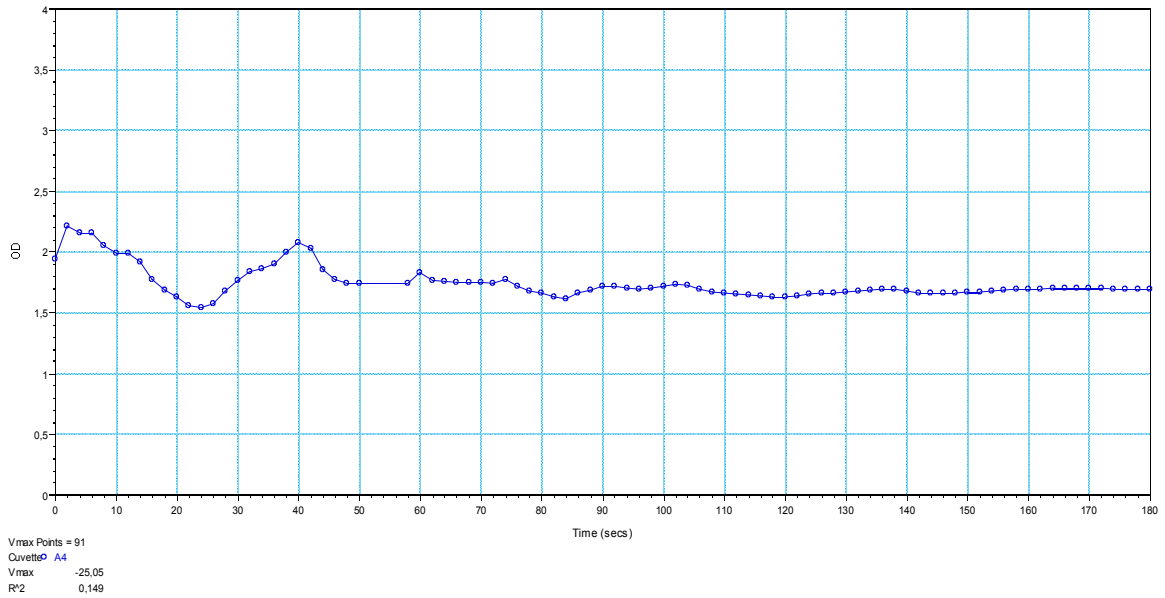


Şekil 75. Karboksipeptidaz A aktivitesi.

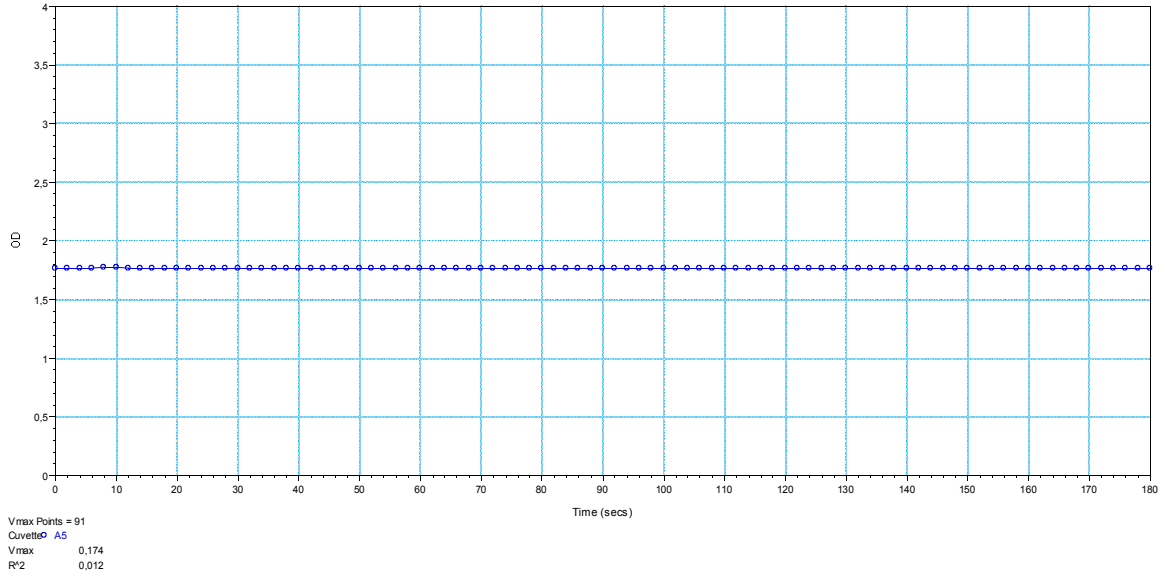




Şekil 76. Enzim miktarı 40  $\mu$ L'den 5  $\mu$ L'ye düşürüldüğünde karboksipeptidaz A aktivitesi.



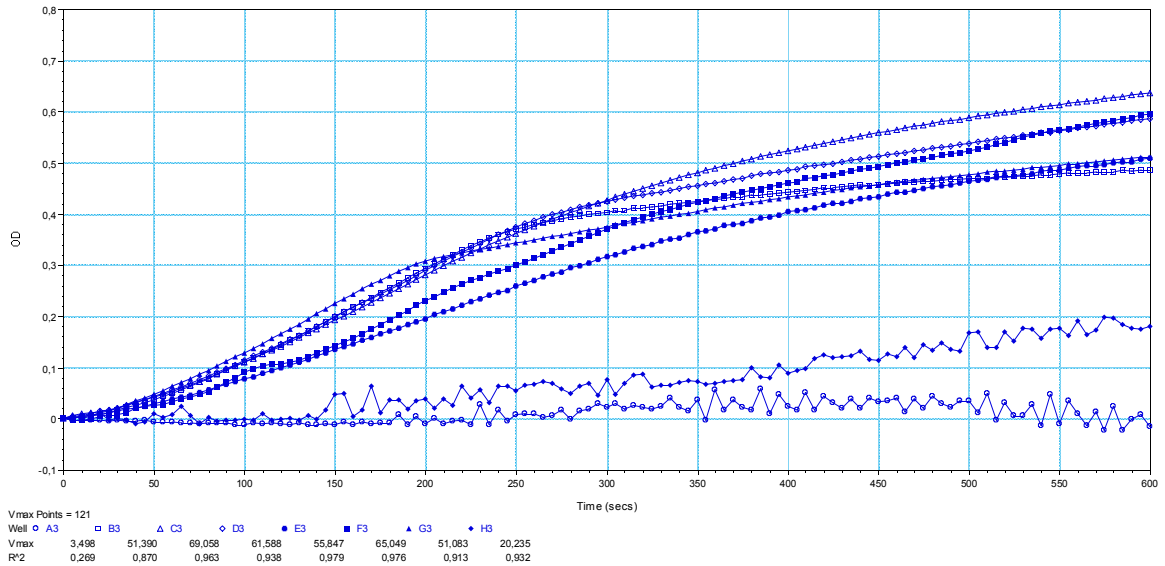
Şekil 77. Enzim miktarı 100  $\mu$ L substrat miktarı 50  $\mu$ L'ye düşürüldüğünde karboksipeptidaz A aktivitesi.



Şekil 78. Reaksiyon sırasında ortama tekrar enzim ilave edildiğinde karboksipeptidaz A aktivitesi.

#### 4.10.2. Tirozinaz inhibisyon sonuçları

Bölüm 4.8.1’de belirtilen örneklerin tirozinaz enzimi ile elde edilen Vmaks’ları doğrultusunda % inhibisyonları hesaplanmıştır (Çizelge 28) (Şekil 79).



Şekil 79. Örneklerin, tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.

Çizelge 28. Örneklerin tirozinaz enzimi ile % inhibisyon değerleri

	B1	C1	D1	E1	F1	G1
$\Delta V_{max}$	2,85	2,19	5,89	0,424	2,832	0,289
% inhibisyon	48,39	37,18	<b>100</b>	7,2	48,08	4,91

Tirosinaz enzim inhibisyonu çalışması, proteaz enzim inhibisyon çalışması ile aynı şekilde yorumlanabilir. Aseton sonrası metanol özütünün  $\Delta V_{maks}$  değerinin yüksek olması nedeniyle inhibisyon değeri % 100 kabul edildiğinde diğer özütlerin buna göre hesaplanan % inhibisyonları Çizelge 28’de görülmektedir. Bu bağlamda özütleri % inhibisyon değerlerine göre sıraladığımızda Hekzan > K-metanol > Aseton > Etanol-su > D-metanol şeklindedir.

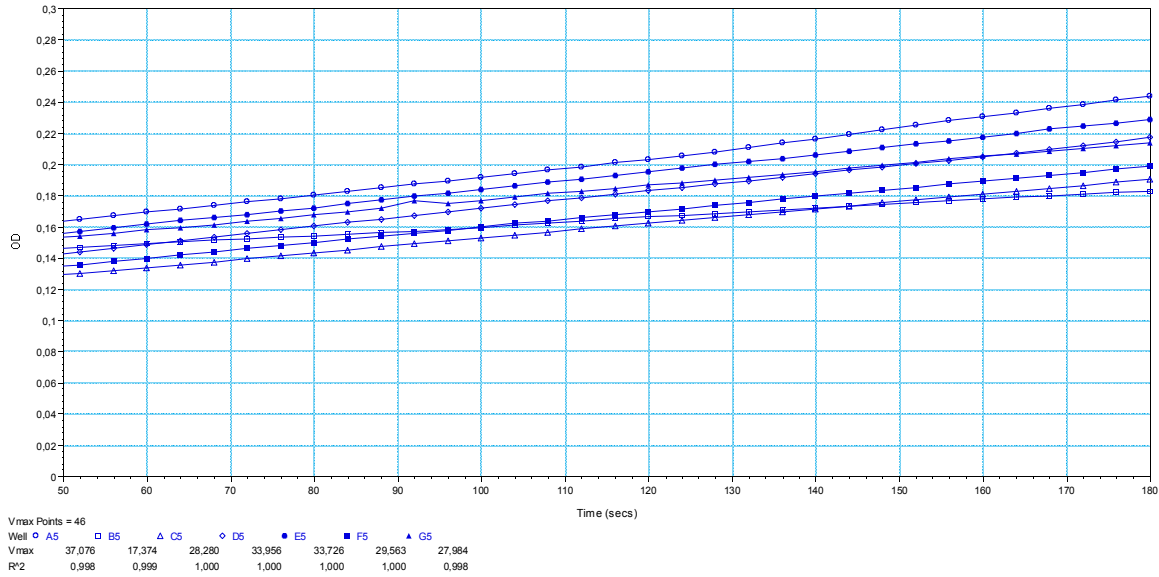
Chen ve ark., (2010) tirozinaz enzim inhibisyon çalışmasını *Sapindus mukorossi* bitkisinin hekzan, etilasetat ve metanol özütleri için uygulamışlardır. Deneme örneği, sulu DMSO (10,0 mg/mL) içinde çözüldükten sonra 50 mM fosfat tamponu (pH 6,8) içinde hazırlanan L-tirozin (2,5 mg/mL) ile inkübe edilip, aynı tampon içinde hazırlanan tirozinaz (25U/mL)’dan ilave edilmiştir. Karışım 37 °C’de 30 dakika inkübe edildikten sonra inhibitör aktivite 490 nm’de tanımlanmıştır. Metanol özütü % 17,8, etil asetat özütü % 12,3, hekzan özütü için % inhibisyon değeri bulunamamıştır şeklinde rapor edilmiştir (Chen ve ark., 2010).

Türkiye’de 33 *Scutellaria* bitki türünün metanol özütleri için asetilkolinesteraz, bütilkolinesteraz ve tirozinaz enzim inhibisyon çalışmaları yapılmış ve literatürde belirtilen türlerin 1000 µg/mL derişimde tirozinaz enzimi üzerine inhibisyon etkisinin olduğu saptanmıştır. Çalışma 80 µL fosfat tamponu (pH 6,8) ile DMSO içinde çözülen özütlerden 40 µL, tirozinaz enzim ve L-DOPA substrattan 40’ar µL alınıp 96 kuyucuklu plakalarda soğurmaları okuma şeklinde gerçekleştirilmiştir (Şenol ve ark., 2010).

Şenol ve ark., (2010) tarafından yapılan çalışmada da bizim kullandığımız yöntem esas alınmıştır.

### 4.10.3. $\beta$ -laktamaz inhibisyon sonuçları

Bölüm 4.8.1’de belirtilen örneklerin  $\beta$ -laktamaz enzimi ile elde edilen  $V_{max}$ ’ları doğrultusunda % inhibisyonları hesaplanmıştır (Şekil 80).



Şekil 80. Örneklerin,  $\beta$ -laktamaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.

Çizelge 29. Örneklerin  $\beta$ -laktamaz enzimi ile % inhibisyon değerleri

	B1	C1	D1	E1	F1	G1
$\Delta V_{max}$	2,18	4,0	2,83	6,28	5,90	6,68
% inhibisyon	32,63	60	42,37	94,01	88,32	<b>100</b>

Metanol (doğrudan) özütünün  $\Delta V_{max}$  değerinin yüksek olması nedeniyle inhibisyon değeri % 100 kabul edildiğinde diğer özütlerin buna göre hesaplanan % inhibisyonları Çizelge 29’de görülmektedir. Bu bağlamda özütleri % inhibisyon değerlerine göre sıraladığımızda Etanol-su > K-metanol > Aseton > Aseton sonrası metanol > Hekzan şeklindedir.

Şerbetçi otu bileşenleri için literatürde enzim inhibisyon çalışmaları rapor edilmiştir. Siklooksijenaz enzimlerinden; COX1 için, ksantohumol ve 8-prenilnarinjenin, COX2 için ise ksantohumol’un inhibisyonu incelenmiş ve  $IC_{50}$  değer aralığı sırasıyla 16–27 ve 41,5

$\mu\text{M}$  bulunmuştur. Nitrik oksit sentaz'ın inhibisyonunu da aynı şekilde ksantohumol ve isoksantohumol  $\text{IC}_{50}$  değeri 12-22  $\mu\text{M}$  aralığında sağlamıştır (Gerhäuser ve ark. 2002). Sonuç olarak ksantin oksidaz, lipoksijenaz, protein kinaz C, siklooksijenaz, mikrosomal monooksijenaz, mitokondriyal süksinoksidaz ve NADPH oksidaz gibi öncü-yükseltgen enzimlerinin inhibisyonu potansiyel terapötik araçlar olarak belirtilen flavonoidler tarafından sağlanmaktadır (Havsteen, 2002; Pietta, 2000; Middleton ve ark., 1994; Amić, ve ark., 2007).

Ancak Şerbetçi otu bitkisi, 1,3,5-trihidroksibenzen türevleri (kemikteki kireci yok eden bir araç olarak kullanılır) gibi farmakolojik olarak önemli olan bileşenleri içermesi (Zanoli ve Zavatti, 2008) ve içeriğindeki prenil flavonoidlerden dolayı kemo-koruyucu araç olarak gösterilen yeterli sayıda çalışmaya sahip olmasına rağmen (Stevens and Page, 2004; Gerhäuser, 2005a; Colgate ve ark., 2007); proteaz enzim inhibisyon çalışmaları için Bölüm 1.5.1'de tanımlanan ‘ ‘ Kanser, akciğer doku ve organları arasında hava kalması, beslenme yetersizliğine bağlı olarak kasların gelişmemesi, kireçlenme, pankreasın çalışmasını durdurabilecek derecede tahriş olması gibi hastalıkların bir çeşidi proteazların aşırı aktivitesi ile ilişkilendirilir. *Proteaz veya proteinazların* bahsi geçen hastalıklardaki rolü nedeniyle, *bu enzimlere karşı doğal kaynaklardan inhibitörler gibi terapötik ajanların bulunması büyük önem taşımaktadır.*’ ’ Bahsi geçen paragrafla çelişki sağlar.

Eğer proteaz enziminin aşırısı bu tür hastalıklara sebep oluyorsa ve bu fazlalığı yok edecek doğal bir inhibitöre gereksinim duyuluyorsa ve Şerbetçi otu bitkisi içeriğindeki bileşenlerden dolayı inhibitör görevini üstlenmesi gerekirken, neden böyle bir etki göstermedi? sorusu ise üzerinde durulması gereken bir araştırma konusudur.

#### **4.11. Şerbetçi Otu Özütlerinin Sitotoksisite Çalışmasının Sonuçları**

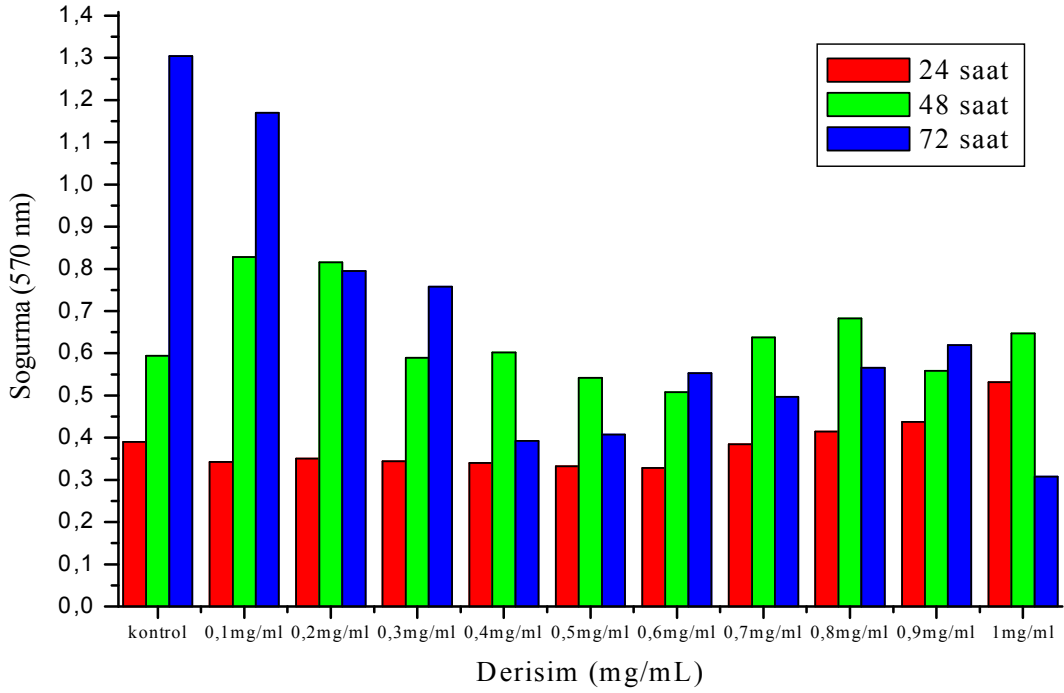
Bu çalışmada HT-29 ve Hep3B hücre hatlarının nasıl ve ne şekilde çalışıldığı Bölüm 3.2.12'de ayrıntılı şekilde anlatılmıştır. Depo çözeltilerin çok derişik olması nedeniyle 1 mg/mL derişimdeki örnek çözeltilerden farklı enjeksiyon hacimleri alınarak ilk olarak HT-29 hücre hattına uygulanmıştır. Bunun için metanolde hazırlanan depo çözeltilerin 1/10 seyreltilmesi ile elde edilen 1mg/mL' lik örnek çözeltilerden 50  $\mu\text{L}$  alınarak, ortamında büyütülen ve her bir kuyucuğa enjekte edilen HT-29 hücrelerinin üzerine eklenmiştir. 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Örnekler 3 tekrar çalışılarak, 24 ve 48 saat bekleme süresi sonunda bölünerek çoğalmadığı görülmüştür. Buna rağmen MTT çözeltisi eklenip soğurmalar 570 nm'de okunmuştur. MTT ile tetrazolyum tuzunun formazon kristaline dönüşmesi ve rengin mavi olması gerekiyorken renk değişimi olmamıştır.

Metanolün inkübasyon sırasında buharlaşarak hücelere geçtiği ve bölünerek çoğalmalarını engellediği kanısına varılmıştır.

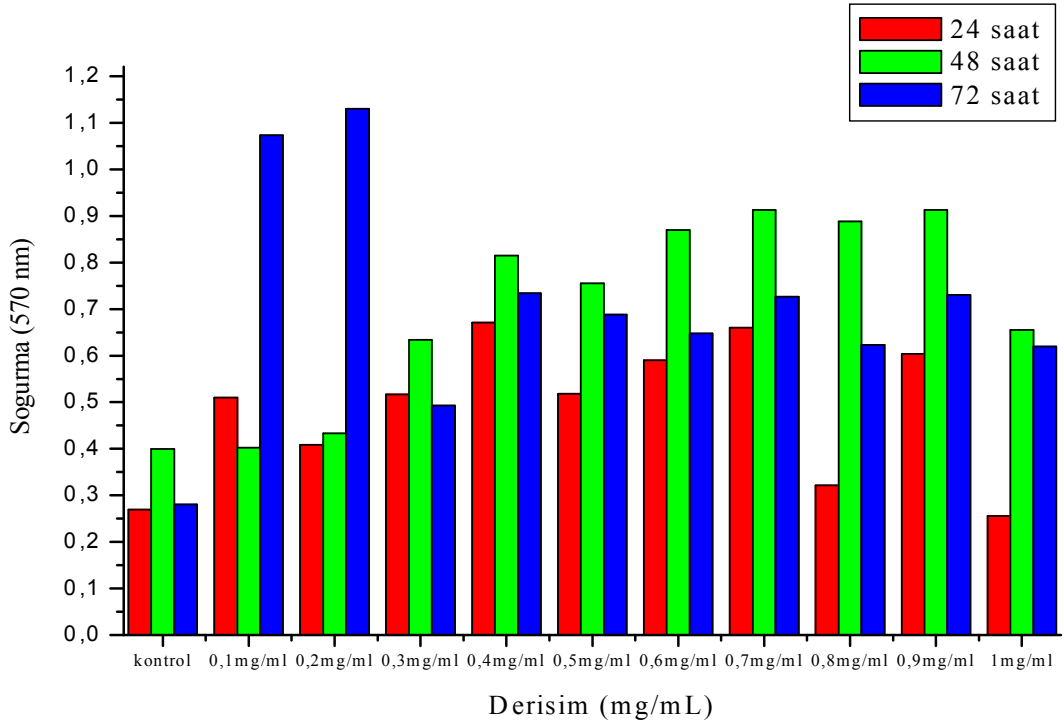
Tüm çözeltiler, hücelere zarar vermeyen DMSO kullanılarak tekrar hazırlanıp aynı işlemler uygulanmıştır.

Kontrol olarak; 96 kuyucuklu plakada bir sütun yalnız DMSO, bir sütun yalnız hücre olacak şekilde kullanılmıştır.

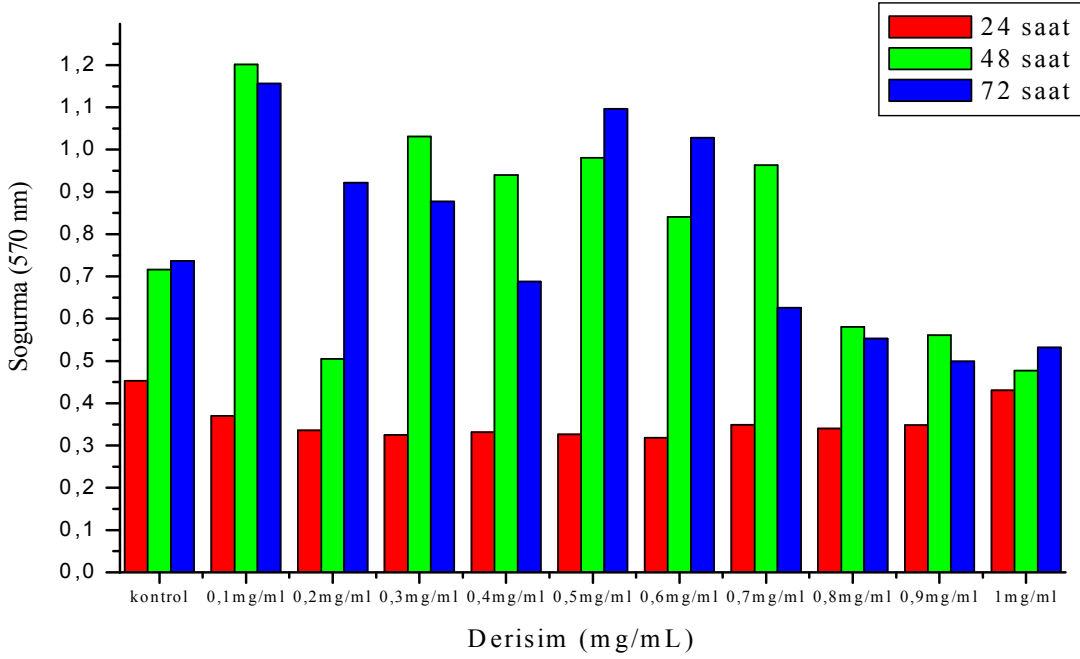
Hep3B ve HT-29 hücelere uygulanan özütlerin farklı dozları için 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında MTT deneyi ile 570 nm’de okunan soğurma grafikleri gösterilmiştir (Şekil 81-92).



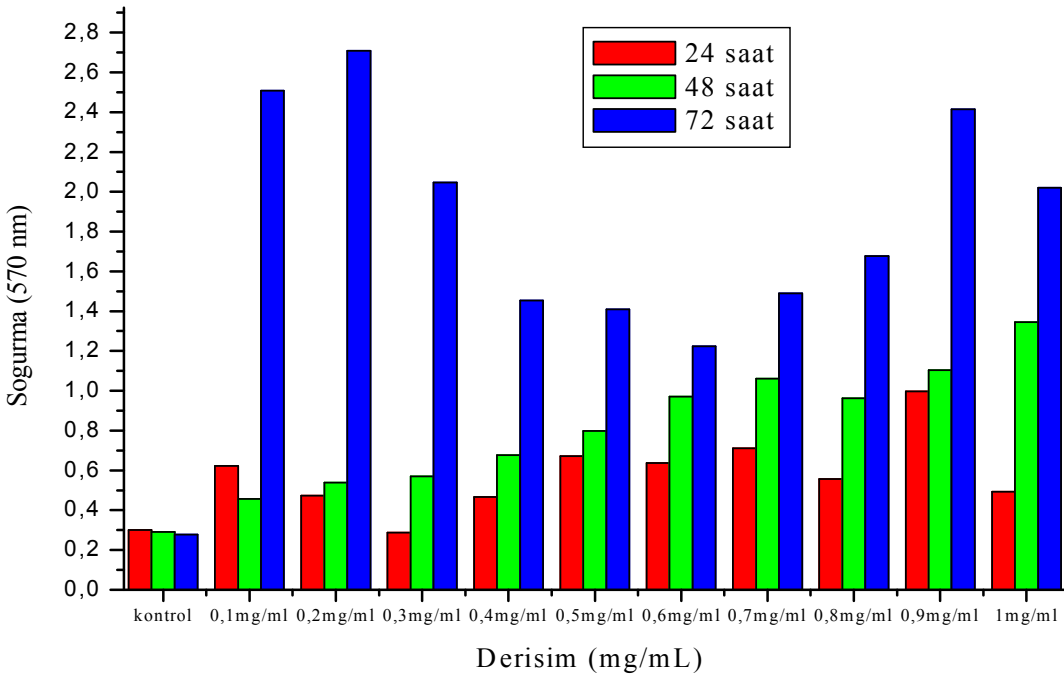
Şekil 81. Hep3B hücresine uygulanan hekzan özütü farklı dozları için 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında MTT denemesi ile 570 nm’de okunan soğurma değerleri.



Şekil 82. HT-29 hücresine uygulanan hekzan özütü farklı dozları için 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında MTT denemesi ile 570 nm’de okunan soğurma değerleri.

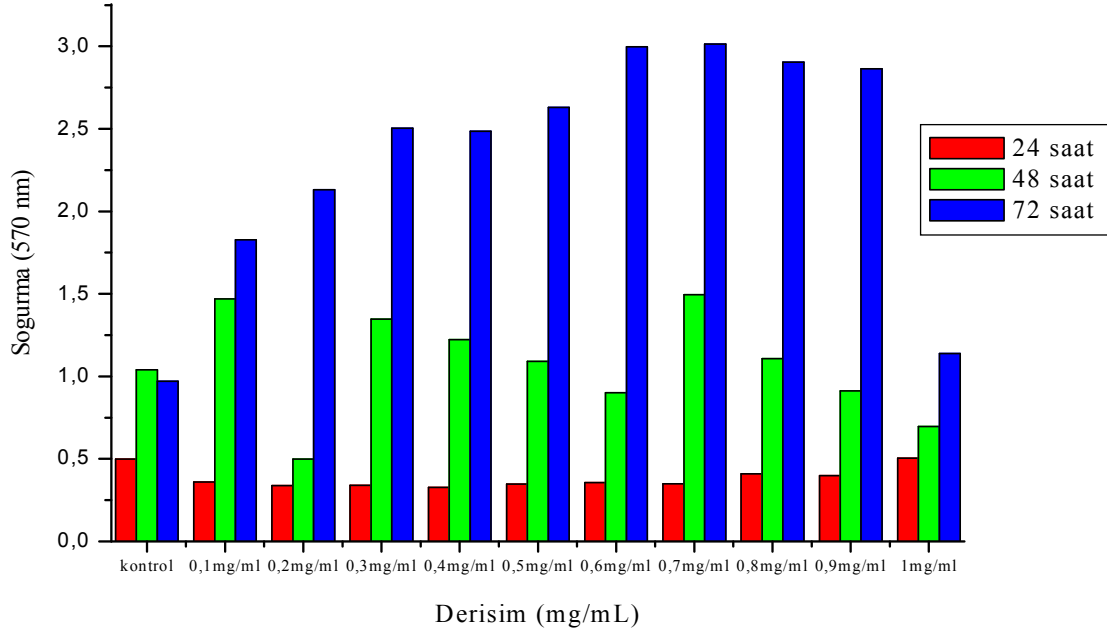


Şekil 83. Hep3B hüresine uygulanan aseton özütü farklı dozları için 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında MTT denemesi ile 570 nm’de okunan soğurma değerleri.

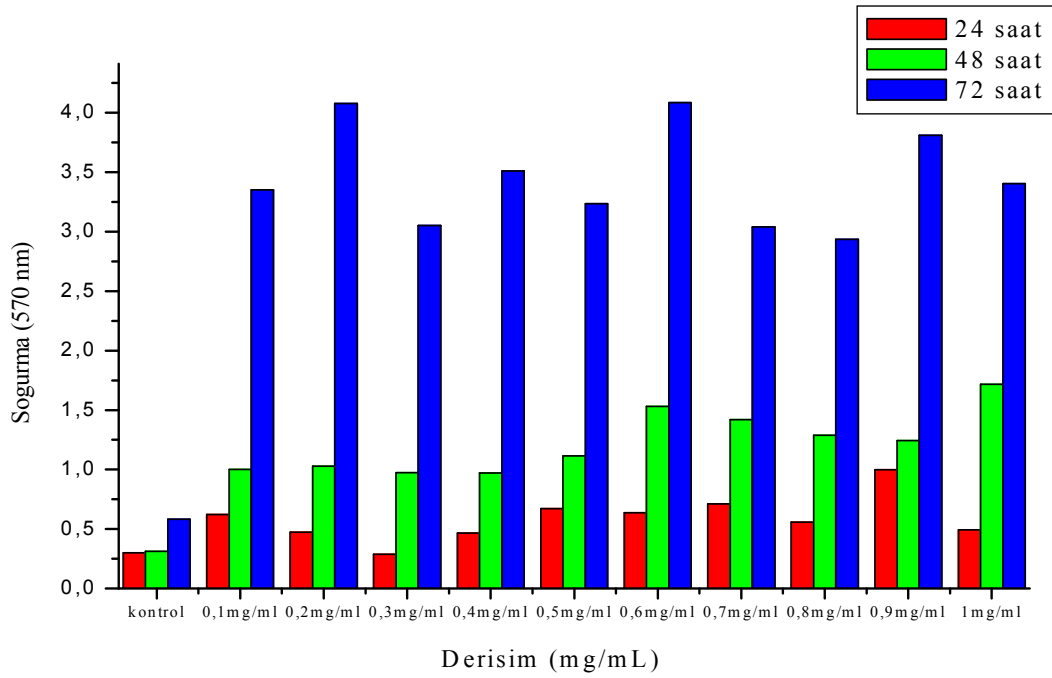


Şekil 84. HT-29 hüresine uygulanan aseton özütü farklı dozları için 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında MTT denemesi ile 570 nm’de okunan soğurma değerleri.

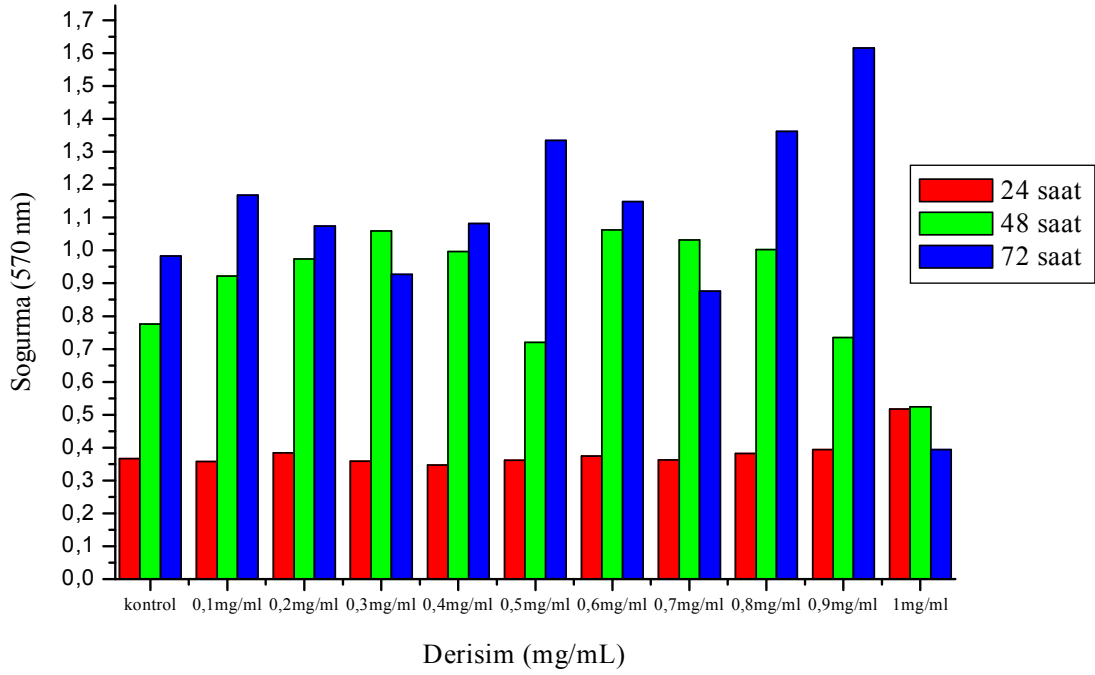




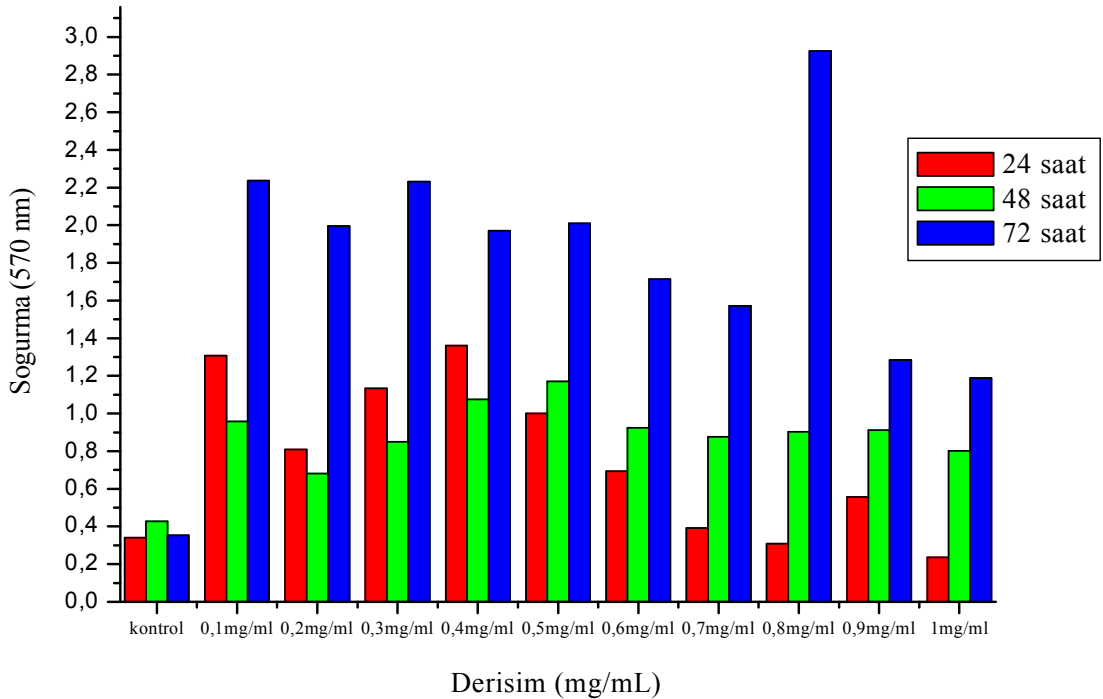
Şekil 85. Hep3B hücresine uygulanan aseton sonrası metanol özütü farklı dozları için 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında MTT denemesi ile 570 nm’de okunan soğurma değerleri.



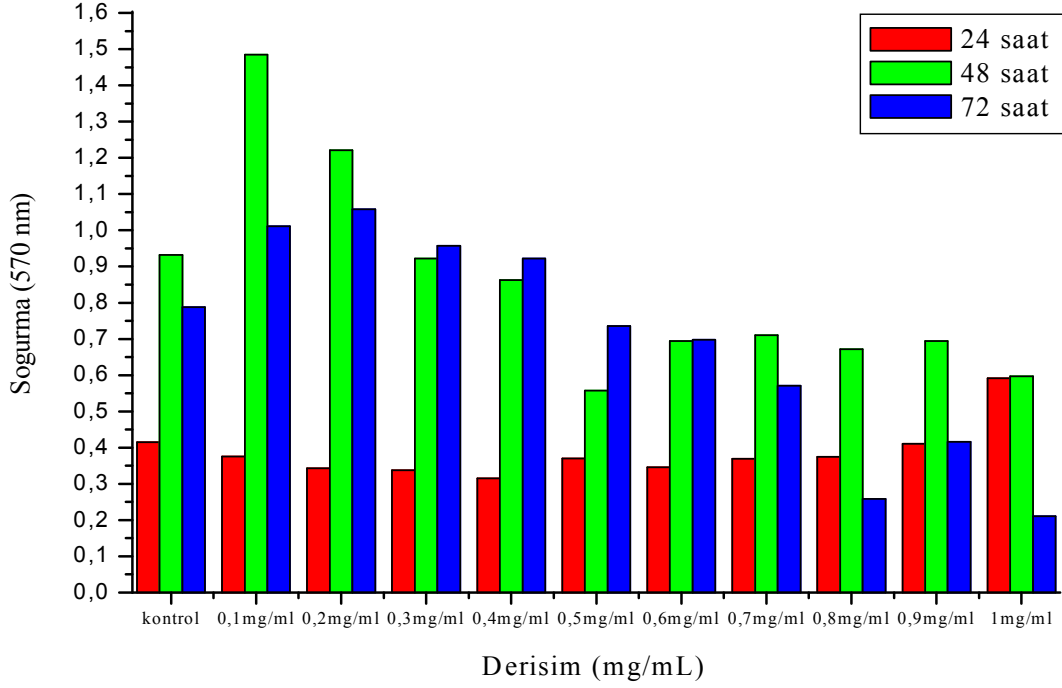
Şekil 86. HT-29 hücresine uygulanan aseton sonrası metanol özütü farklı dozları için 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında MTT denemesi ile 570 nm’de okunan soğurma değerleri.



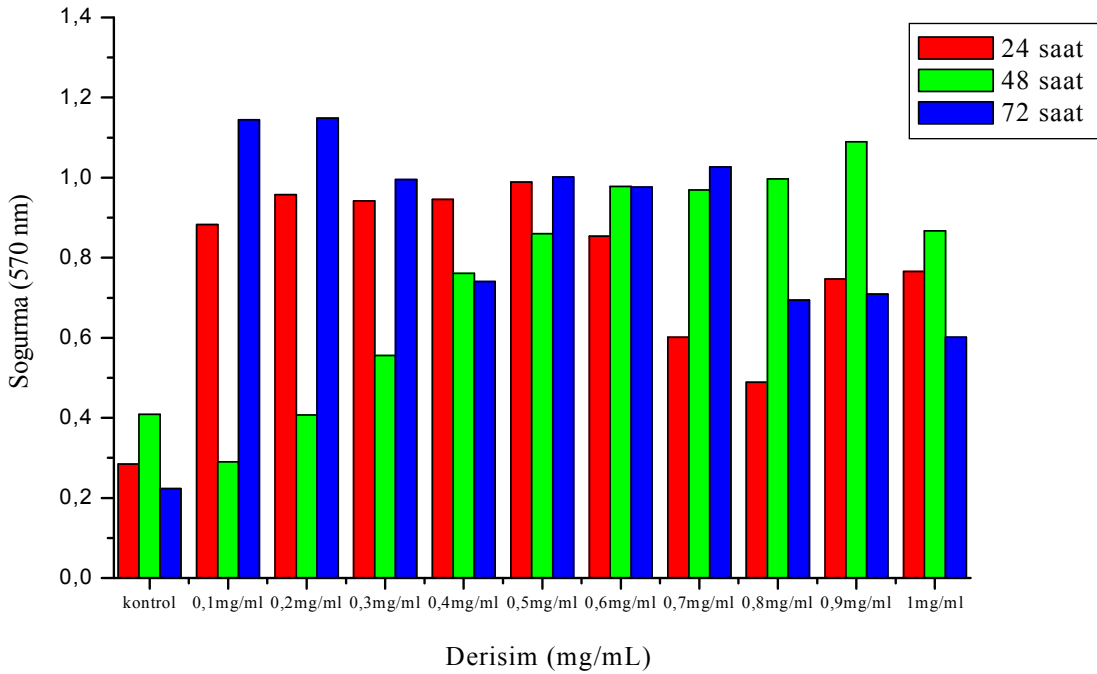
Şekil 87. Hep3B hücrelerine uygulanan metanol (kademeli) özütü farklı dozları için 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında MTT denemesi ile 570 nm’de okunan soğurma değerleri.



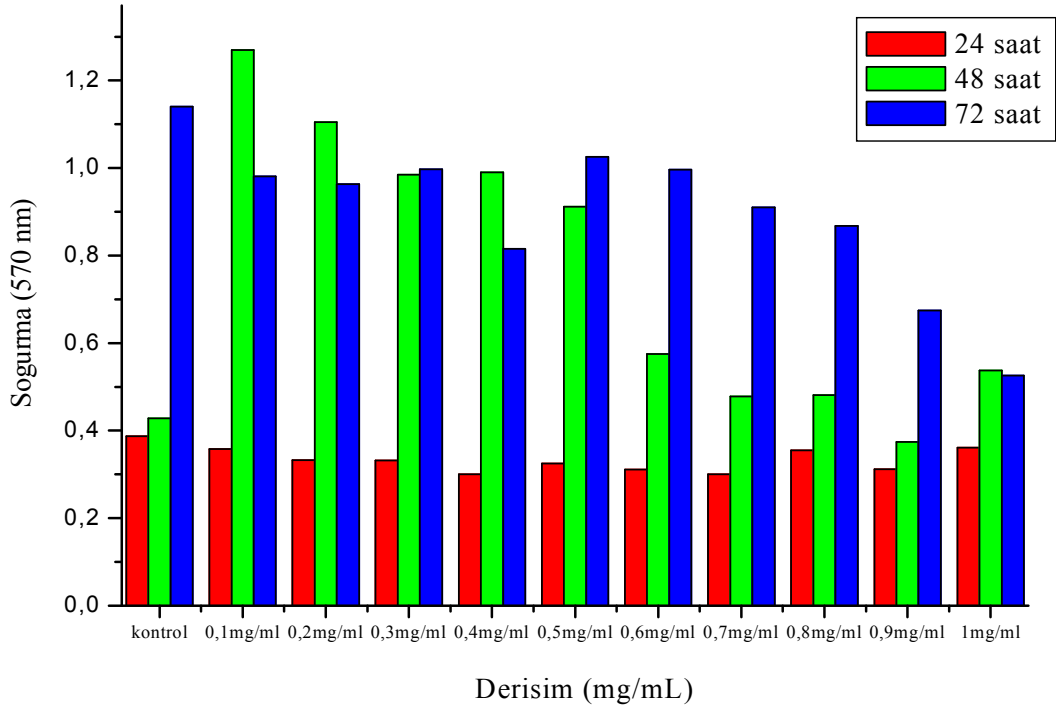
Şekil 88. HT-29 hücrelerine uygulanan metanol (kademeli) özütü farklı dozları için 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında MTT denemesi ile 570 nm’de okunan soğurma değerleri.



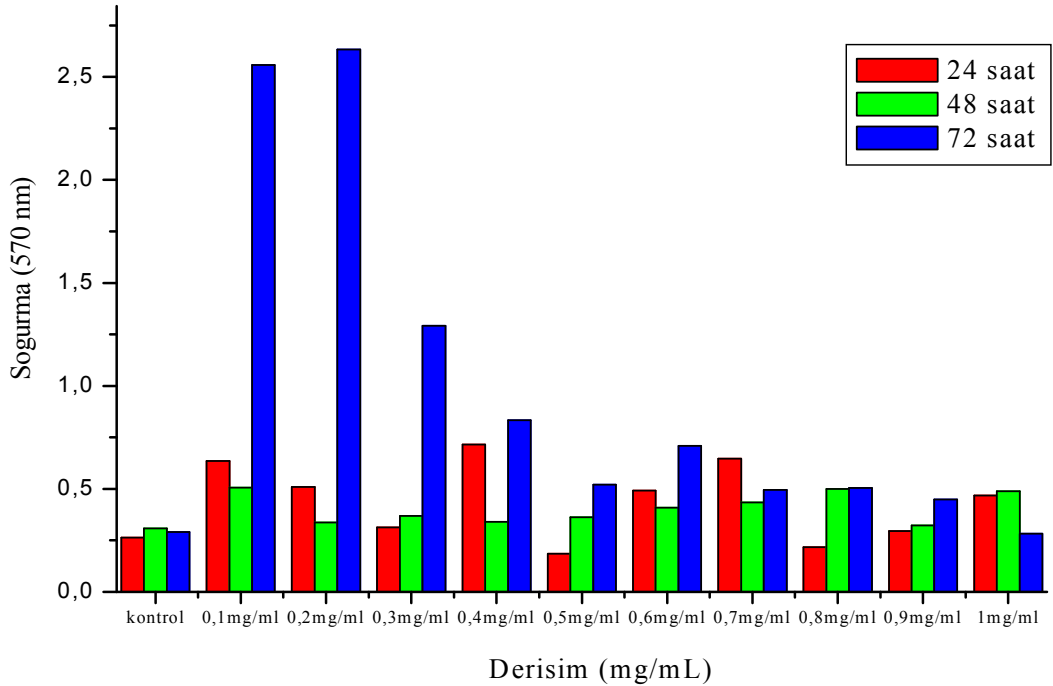
Şekil 89. Hep3B hücresine uygulanan metanol (doğrudan) özütü farklı dozları için 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında MTT denemesi ile 570 nm’de okunan soğurma değerleri.



Şekil 90. HT-29 hücresine uygulanan metanol (doğrudan) özütü farklı dozları için 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında MTT denemesi ile 570 nm’de okunan soğurma değerleri.



Şekil 91. Hep3B hücresine uygulanan etanol-su özütü farklı dozları için 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında MTT denemesi ile 570 nm’de okunan soğurma değerleri.



Şekil 92. HT29 hücresine uygulanan etanol-su özütü farklı dozları için 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında MTT denemesi ile 570 nm’de okunan soğurma değerleri.

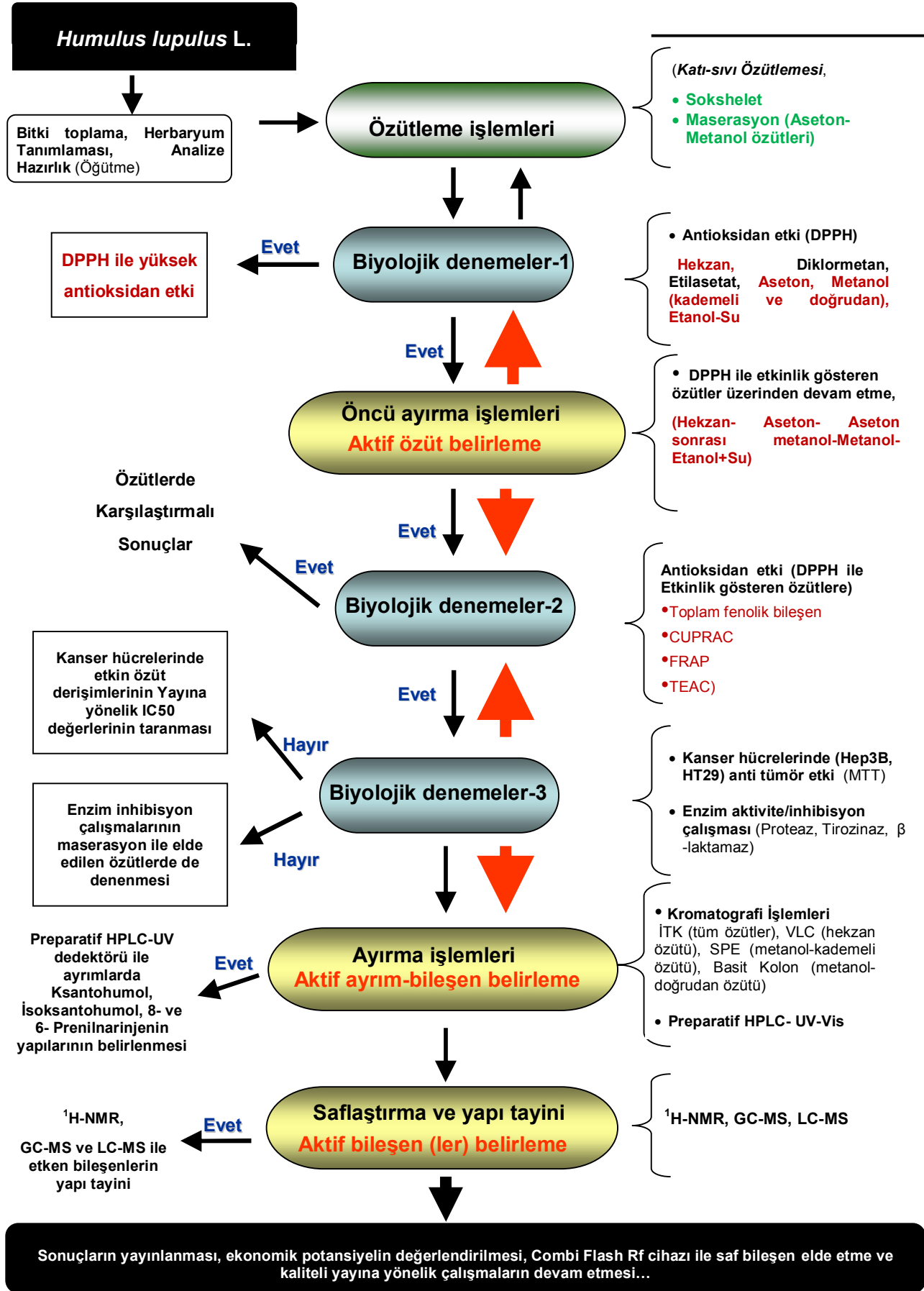
Şerbetçi otu bileşenlerinin bugüne kadar yapılan sitotoksosite çalışmalarında; Mosmann (1983) tarafından belirtilen yöntemle göre XN'un, sitotoksitesi HepG2 insan karaciğer tümörü hücreleri kullanılarak MTT deneyi ile yapılmıştır. DNA hasarı, hücrelerdeki XN tarafından engellenmiştir (Plazar ve ark., 2007).

Kac ve ark., (2008) tarafından XN'un, 10 µg/mL derişimde karaciğer tümörü HepG2 hücreleri ile memeli deneme sistemlerinde IQ uyarılmış DNA hasarının oluşumunu tamamen önlediği rapor edilmiştir.

Plazar ve ark., (2008) XN'un 20 µM derişimde DNA hasarını önemli derecede arttırdığını; yüksek derişimlerde (25-100 µM) ise canlı hücrelerde doz-bağımsız DNA hasarını önemli derecede düşürdüğünü rapor etmiştir.

Sitotoksosite çalışmalarının sonuçlarını çizilen soğurma grafiklerine göre yorumlamak yanlışlığa sebebiyet verebilir. Bu sebeple sonuçlar ANOVA istatistiksel analizi yapılarak değerlendirilecek ve özütlerin etkin derişim aralıkları ve IC50 değerleri o şekilde belirlenecektir.

*Humulus lupulus* L. bitkisine çalışma kapsamında uygulanan işlemlerin akış şeması özetle aşağıda gösterilmiştir.



**BÖLÜM 5****SONUÇLAR VE ÖNERİLER**

Geleneksel tıpta kullanılan ve sağlık yararları içindeki önemi ile aynı doğrultuda gelişen *Humulus lupulus* L., araştırmacılar tarafından dikkate değer olarak kabul edilmiştir. (Zanoli ve Zavatti, 2008).

*Humulus lupulus* L. bitkisi, özellikle elde edilen etken bileşenlerinin farmakolojik ve fitokimyasal özellikleri üzerine yurtdışında oldukça fazla çalışma olmasına rağmen, Türkiye’de henüz çalışması yapılmamış, ağırlıklı olarak halk tıbbında kullanılmıştır ve buna ilaveten bira endüstrisi için Bilecik’te kültürü yapılmaktadır.

Tez kapsamında Şerbetçi otu bitkisinin antioksidan, sitotoksik, enzim-aktif özüt ve bileşenlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla bitki için farklı çözücü sistemleri seçilmiştir ve bu çözücü sistemleri kademeli ve doğrudan olacak şekilde uygulanmıştır. Hangi özütün daha antioksidatif olduğu ve bu özütlerin içerdiği etken bileşenlerin ne derece etkili olduğu konusu ise tek elektron aktarımı (EA) reaksiyonlarına dayanan yöntemleri içeren DPPH, CUPRAC, TEAC, FRAP ve Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile toplam fenolik madde analizi ile belirlenmiştir. Antioksidan özelliği belirlenen etken özütler sitotoksisite ve enzim-aktivite/inhibisyon çalışmalarında kullanılmıştır. Sitotoksisite çalışmaları için Hep3B (İnsan hepatoma) ve HT-29 (İnsan kolon kanseri) hücre hatları seçilmiştir. Enzim-aktivite/inhibisyon çalışmaları için ise proteaz, tirozinaz ve  $\beta$ -laktamaz enzimleri ve bunların substratları seçilmiştir.

Antioksidan aktivite çalışmalarında özütlerin ve standart olarak kullanılan kersetinin DPPH radikalini süpürme kapasitesi;

Kersetin > Hekzan özütü > D-metanol özütü > K-metanol özütü > Aseton sonrası metanol özütü > Etanol-su özütü > Aseton özütü şeklinde bulunmuştur.

Şerbetçi otu bitkisinin antioksidan aktivitesi sadece DPPH yöntemi ile tayin edilmiş olsa idi; standart antioksidan olan kersetin ile karşılaştırıldığında şerbetçi otunun antioksidan aktivitesinin yok denecek kadar az olduğu söylenebilirdi. Hekzan özütü için; DPPH’nin metanoldeki çözeltisi İTK plakaları üzerine püskürtülerek nitel olarak tayin yapıldığında lekeler toplu halde yürüdüğü için çözücü ortamına 1-2 damla buzlu asetik asit damlatılarak acı asitlerin varlığı tespit edilmiştir. Lipofilik yapılarından dolayı bu

bileşenleri bünyesine alan hekzan özütü, denenen antioksidan kapasite yöntemlerinden FRAP hariç DPPH, CUPRAC ve TEAC (biraz daha düşük) yöntemleri ile yüksek antioksidan etkinlik göstermiş olup neredeyse polar çözücülerle elde edilen özütlerle (metanol, etanol-su) çoğu zaman yarışmalı olarak davranmıştır. Hekzan ve diğer özütler içeriklerinde farklı tip bileşenler bulundurmalarına rağmen; bazen hekzan özütü diğer özütlerden daha fazla etkinlik göstermiştir ( $CUPRAC_{Hekzan} > CUPRAC_{Etanol-su}$  gibi).

Verzele ve De Keukeleire (1991); Fung ve ark., (1997); Goese ve ark., (1999) tarafında  $\alpha$ - ve  $\beta$ - acı asitlerin yüksek antioksidan aktivite gösterdiği rapor edilmiştir.

Şerbetçi otunun metanol, etanol, aseton ve hekzan özütleri oda sıcaklığı (maserasyon), kaynama noktası, mikrodalga, süperkritik karbondioksit ve ultrasonik özütleme gibi farklı koşullarda elde edilmiştir (Schiller ve ark., 2006; Aniol ve Zolnierczyk, 2008). Ancak bu özütler uyku bozuklukları gibi ruh hali bozuklukları tedavileri için kullanılmıştır (Blumenthal, 1998). Bizim çalışmamızın amacı ile aynı doğrultuda değildir.

Yamaguchi ve ark., (2009) tarafından antioksidan kapasite farklı reaktif oksijen türlerine dayalı yedi farklı yöntem ile tanımlanmıştır. Bu amaçla Humulonlar, lupulonlar, isohumulonlar, indirgenmiş isohumulonlar, tetrahidro-isohumulonlar ve ksantohumol saf bileşenlerinin  $ORAC_{toplam}$ , FRAP, SOD, NORAC, HORAC ve DPPH yöntemleri ile antioksidan kapasiteleri incelenmiş ve standart olarak polifenon 60 ve Vitamin E kullanılmıştır. Ksantohumol, tek oksijen soğurma kapasitesinin (SOAD) yanı sıra, toplam oksijen radikal soğurma kapasitesi ( $ORAC_{toplam}$ ) içinde yüksek etkinlik göstermiştir. Aynı şekilde SOD, HORAC ve FRAP yöntemleriyle de yüksek etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. Humulonların ise DPPH ve NORAC ile yüksek antioksidan etkinlik gösterdiği rapor edilmiştir (Yamaguchi ve ark., 2009). Özütlere uygulanan antioksidan etkinlik çalışması rapor edilmemiştir.

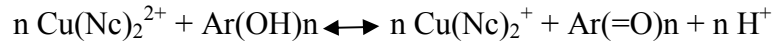
Kullanılan toplam fenolik bileşik tayini yöntemi renk reaksiyonuna dayalı bir yöntemdir. Bu yöntemin kullanılabilir olduğu lineer aralık yapılan çalışmalarda genellikle tespit edilmemektedir. Yüksek derişimlerde doğrusallıktan sapma gözlenebilen bir durumdur (Singleton ve ark., 1999). Derişimdeki artışın fenolik bileşik miktarında aynı oranda artışa neden olmaması bu sapmadan kaynaklanabilir. Özütlerin toplam fenolik bileşen miktarları aşağıdaki gibi sıralanabilir.

Etanol-su > D-metanol > K-metanol > Hekzan > Aseton > Aseton sonrası metanol



Etanol-su özütünün fenolik bileşen içeriği, diğer çözücülere göre daha polar olan etanol-su karışımı ile özütlenmesinden ileri gelmektedir. Ayrıca şerbetçi otu bitkisinin hekzan özütü de en etkin özütlerden biri olduğu için etanol-su ve metanol (doğrudan) özütleri, hekzan ile alınan bileşenleri de (acı asitleri) aldığı için fenolik bileşen içeriği açısından diğer özütlere göre farklılık göstermiştir. Literatürde şerbetçi otu bitkisinin fenolik bileşen içeriğini belirten herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Spektrofotometrik yolla antioksidan kapasitelerinin tayin edilmesinde kullanılan CUPRAC yöntemi, bu tez çalışmasında şerbetçi otu altı farklı aktif özütüne uygulanarak toplam flavonoid kapasite tayininde kullanılmıştır. CUPRAC yönteminin kromojenik oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc reaktifi, polifenollerle (Ar(OH)<sub>n</sub>) aşağıdaki reaksiyonu vermektedir:



Bu reaksiyonda, polifenollerin uygun konumlanmış reaktif Ar-OH grupları karşılık olan kinon bileşiklerine dönüşürken, Cu(II)-Nc ise 450 nm’de en yüksek soğurma gösteren Cu(I)-Nc kelatına dönüşmektedir. Cu(I)-Nc, yüksek molar soğurmalı bir yük-aktarma kompleksidir.

Analizlenen fenolik bileşikler için CUPRAC spektrofotometrik yöntemi ile elde edilen molar soğurma katsayıları kıyas bileşik olarak seçilen kersetinin molar soğurma katsayısına bölünerek (  $\epsilon_{\text{fenolik}} / \epsilon_{\text{QR}}$  ) aynı şartlarda karşılaştırma yapılabilecek kersetin (QR) eşdeğeri flavonoid derişimi (QREFC) değerleri elde edilmiştir.

Şerbetçi otu özütlerinin CUPRAC yöntemine göre bulunan toplam flavonoid derişimleri büyükten küçüğe şöyle sıralanmaktadır:

Metanol (doğrudan) > Metanol (kademeli) > Aseton > Hekzan > Aseton sonrası metanol > Etanol-su.

CUPRAC yöntemi şimdiye kadar bahsedilen DPPH yöntemi ve toplam fenolik bileşen miktarlar ile farklılıklar göstermektedir. Etanol-su özütü toplam fenolik bileşen içeriği en fazla hesaplanan özüt iken, kersetin eşdeğeri flavonoid derişimi olarak belirlenen CUPRAC yöntemi ile en son sırada yer almaktadır. Literatürde şerbetçi otu bitkisi için CUPRAC yöntemi uygulamasına rastlanılmamıştır.

DPPH yöntemiyle etkinlik göstermeyen etilasetat özütüne CUPRAC yöntemi uygulanmıştır (Şekil 50). EtOAc özütünün içerdiği fenolik miktarı diğer özütlerden daha azdır (Etilasetat  $170,5 \pm 4,05$  mg ferulik asit/g özüt). DPPH yöntemiyle de çok etkin bulunmamış olup sadece CUPRAC yöntemiyle denemesi yapılmıştır. Standartta olduğu gibi doğrusal olarak artış göstermiştir. Etil asetatın CUPRAC yöntemi ile belirlenen kersetin eşdeğeri flavonoid derişimi 1,49' dur. Bu durumda sıralamada metanol (kademeli) özütünden sonra gelmektedir. Anlaşılacağı üzere sonuçlar her yöntemde farklılık göstermektedir.

TEAC yönteminde karşılaştırma maddesi olan Troloks standart bir antioksidan olup katkı maddesi olarak da kullanılan ve çok düşük derişimleri çok yüksek antioksidan etkinlik gösteren bir bileşiktir. Şerbetçi otu özütlerinin TEAC değerleri (mM Troloks/g özüt) karşılaştırıldığında şu şekilde sıralanmaktadır.

Aseton sonrası metanol > Metanol (doğrudan) > Etanol-su > Metanol (kademeli) > Aseton > Hekzan.

TEAC<sub>ABTS</sub> değerleri ise;

Troloks > Aseton sonrası metanol > Metanol (doğrudan) > Metanol (kademeli) > Etanol-su > Aseton > Hekzan şeklinde sıralanmaktadır.

Sonuç olarak TEAC yönteminde; her iki ifade de standart olarak troloks kullanılmasına rağmen TEAC<sub>Troloks</sub> ve TEAC<sub>ABTS</sub> değerleri bile farklılık göstermiştir.

Hekzan özütü eşdeğer miktardaki standart Troloks antioksidanının etkinliğinin yaklaşık 0,085'i kadar antioksidan etkinlik göstermektedir. Aseton özütü, Aseton sonrası metanol özütü, Metanol (kademeli) ve Metanol (doğrudan), Etanol-su özütleri içinde sırasıyla 0,101; 0,144; 0,17; 0,143; 0,14 değerleri ifade edilir.

Örneklerin FRAP değerleri mM FeSO<sub>4</sub>/g özüt olarak ifade edilmiştir. FRAP değeri en yüksek olan özüt kademeli şekilde elde edilen metanol özütüdür. Aseton sonrası metanol özütü ile aralarında çok fazla fark olmadığı görülmektedir. Hekzan özütü ise yapısındaki acı asitlerin varlığından dolayı çok düşük sonuç vermiştir. Şerbetçi otu özütlerinin FRAP değerleri (mM FeSO<sub>4</sub>/g özüt) karşılaştırıldığında şu şekilde sıralanmaktadır.

Metanol (kademeli) > Aseton sonrası metanol > Metanol (doğrudan) > Etanol-su > Aseton > Hekzan.

Sonuç olarak farklı analitik yöntemlerin karşılaştırılması araştırmacılara yöntem seçiminde ve yöntemin sonuçlarının değerlendirilmesinde yardımcı olabilir. Bu noktadan yola çıkarak çeşitli analitik antioksidan kapasite tayin yöntemlerinin farklı örneklerle karşılaştırıldığı pek çok çalışma vardır. Örneğin, Cao ve Prior (1998) insan serumunda toplam antioksidan kapasite tayini için üç yöntem kullanmış ve bunları karşılaştırmıştır. Kullandıkları yöntemler ORAC, Randox-TEAC ve FRAP yöntemleridir. Araştırmacılar serum ORAC ve serum FRAP yöntemleri arasında zayıf fakat anlamlı doğrusal uyumluluk tespit etmişlerdir. Serum ORAC ve serum TEAC arasında veya serum FRAP ile serum TEAC arasında uyumluluk tespit etmemişlerdir. Bu çalışmada ayrıca serum seyreltilmesinin Randox-TEAC yöntemini etkilediği ifade edilmiştir. FRAP yönteminin SH- grubu içeren antioksidanları ölçmediği de ifade edilmiştir.

TEAC yöntemi besin örneklerinin analizinde çok kullanılmaktadır (Re ve ark.,1999). DPPH yöntemi de meyve sebze sularında veya özütlerinde antioksidan kapasitesini ölçmek için başarı ile kullanılmıştır (Sanchez-Moreno, 2002).

Bütün bu analiz yöntemleri birbirinden kullanılan substrat, prob, reaksiyon koşulları ve hesaplama yöntemleri açısından farklıdırlar. Bu nedenle Frankel ve Meyer (2000) farklı yöntemlerin sonuçlarının karşılaştırılmasının çok zor olduğunu belirtmişlerdir. Bu arada antioksidan kapasiteyi ölçtüğünü iddia eden yeni yöntemler de rapor edilmektedir (Buratti ve ark., 2001; Cervellati ve ark., 2001). Standart bir yöntemin eksikliği farklı araştırma gruplarının sonuçlarının karşılaştırılmasını olanaksız kılarken, besin ve bitki kaynaklı ilaç endüstrisinin antioksidan ürünlerde sıkı kalite kontrolün yapabilmesini de sınırlamaktadır (Huang ve ark., 2005). Sonuç olarak farklı analiz yöntemleri antioksidan etkinlik hakkında özgün fakat sınırlı bilgi vermektedir. Bu nedenle analiz tekniklerinin gücü ve sınırlamaları onların en fazla uygulanabilir oldukları durumları belirler. Bu nedenle antioksidan kapasite tayinlerinde uygun kıyas maddesinin seçimi, oksitlenebilen maddenin ve oksidasyon koşullarının seçimi, ölçülen değişkenin ne olduğu, analizin hızı, duyarlılığı, uygulanabilirliği ve gereken aygıtların temin edilebilirliği dikkate alınması gereken değişkenlerdir. Bu çalışmada da sunulduğu üzere örneklerin değişik antioksidan kapasite tayin yöntemleri ile ölçülen antioksidan etkinlikleri arasında bir uyumluluk olma zorunluluğu yoktur.

Özütlere uygulanan enzim inhibisyon çalışmaları enzim inhibisyonu görülmedi olarak değerlendirilmiş olup bunun kaynağı birçok sebep olabilir. Bölüm 4.10'de örnek ve enzim aktivitesine bağlı olarak çalışma grafiğinden de görülmektedir. Bu nedenle örneklerin IC<sub>50</sub> değerlerine bağlı net derişimleri saptanamamıştır. En yüksek hızların

(Vmaks) ortalamaları kullanılarak özütleri birbirleriyle karşılaştırmak amaçlı % inhibisyonları bulunmuştur.

$\alpha$ -Kimotripsin enzim çalışması için örneklerin % inhibisyonları; Metanol (doğrudan) > Hekzan > K-metanol > Etanol-su > Aseton > Aseton sonrası metanol şeklindedir.

Papain enzim çalışması için örneklerin % inhibisyonları; Aseton > Hekzan > Etanol-su > Aseton sonrası metanol > D-metanol şeklindedir.

Tripsin enzim çalışması için örneklerin % inhibisyonları; Etanol-su > Aseton > K-metanol > Aseton sonrası metanol şeklindedir.

Karboksipeptidaz A enzim inhibisyonu için geçerli bir yöntem oluşturulamamıştır.

Tirozinaz enzim çalışması için örneklerin % inhibisyonları; Aseton sonrası metanol > Hekzan > K-metanol > Aseton > Etanol-su > D-metanol şeklindedir.

$\beta$ -laktamaz enzim çalışması için örneklerin % inhibisyonları; D-metanol > Etanol-su > K-metanol > Aseton > Aseton sonrası metanol > Hekzan şeklindedir.

Enzim-aktivite/inhibisyon çalışmaları son yıllarda sıklıkla yapılan çalışmalar arasındadır.

Şerbetçi otu bitkisi içeriğindeki bileşenlerden dolayı inhibitör görevini üstlenmesi gerekirken, neden böyle bir etki göstermedi? sorusu içinse; örnek çözeltilerin derişimleri ile oynayarak, özütleme sırasında enzim ile reaksiyona girecek etken bileşenlerin sıcaklıkla bozunma ihtimaline karşılık özütleme tekniğini değiştirerek, enzim-substrat miktarlarını arttırıp/azaltmak gibi farklı çalışmalar yapılarak, enzimin ortamdaki etken bileşenlerin bir veya birkaçıyla etkileşmesi sağlanabilir. Ayrıca özütteki fenolik bileşiklerin bir araya gelmesiyle birlikte enzimle aynı dalga boyunda soğurma yapıyor olmaları bile inhibisyonu engeller. Şerbetçi otu özütleri için içeriğindeki etken bileşenlerden dolayı inhibisyon görülmedi şeklinde açıklama olası bir durum değildir. Gerçi inhibisyon görülmedi terimi her ne kadar negatif sonuçmuş gibi anlaşılabilir da öyle olmayabilir. Bazı hastalıklar proteazların veya diğer enzim etkinliğinin aşırısı durumunda ortaya çıkmaktaydı, ama bazı koşullarda bitki bileşenleri herhangi bir şekilde vücuda alındığında etkin gelerek normal seyrinde ilerleyen proteaz, tirozinaz veya laktamaz enzimlerinden biri ile reaksiyona girerek enzimi inhibe etme durumunda ise enzim etkinliği azalarak metabolizmada farklı tip hastalıklara sebep olabilir. Sonuçta sadece enzimin aşırısı ile değil eksikliğinde de hastalıklar söz konusu olmaktadır.

Literatürde proteaz, tirozinaz,  $\beta$ -laktamaz inhibisyon çalışmalarının şerbetçi otu bileşenlerine veya özütlerine uygulaması yoktur. Kaliteli yayına dönük denemeler yukarıda bahsi geçen koşulları değiştirerek devam ettirilebilecektir.

Sitotoksisite çalışmamızda; bitki örneklerinin doku kültüründe farklı kanserli hücre hatlarında sitotoksik etkilerinin araştırılması, bitki örneklerinin uygulanması ve antikanser aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu test sistemleri; morfolojik olarak hücre hasarın gözlenmesi, hücre hasarın çeşitli ölçüm yöntemleri ile belirlenmesi, hücre büyümenin belirlenmesi, hücre metabolizmadaki herhangi bir değişikliğin belirlenmesi amacıyla yapılmaktadır.

Özütlerin Hep3B ve HT-29 hücre hatlarına uygulanan örneklerin 1 mg/mL farklı derişimlerinin sonuçları, grafikleri daha net açıklayabilmek amacıyla birbirleri arasında ve kontrole göre karşılaştırılmıştır (Bölüm 4.11).

Özütlere uygulanan sitotoksisite sonuçları düşünüldüğünde; hazırlanan örnek çözeltilerin derişimlerinin (mg/mL) etkili olduğu, tek bir saf bileşenin derişimleri bile sonuçları bu kadar etkiliyorsa, özütteki her bir etken bileşenin sinerjik etki yaratarak sonuçları değiştirdiği düşünülebilir (Bölüm 4.11).

Şerbetçi otu özütlerinin farklı derişimleri hücre hatları üzerinde denenerek sitotoksisite çalışmaları devam ettirilebilir, etken derişim aralıkları taranarak  $IC_{50}$  değerleri belirlenebilir veya özütleme tekniği (maserasyon vb) değiştirilerek elde edilen yeni özütlere uygulanan sitotoksisite çalışmaları, çalışılan bu özütlerle karşılaştırmalı olarak incelenebilir.

Saf bileşen elde etmekle birlikte antioksidan etkinlik, enzim inhibisyon ve sitotoksisite çalışmaları, bileşen(ler) üzerinde de denenecek, yayına dönük çalışmalar bu şekilde devam edecektir

Ayırma ve saflaştırma işleminde eskiden olduğu gibi her bir bileşeni ayırma işlemi yapılmamaktadır. En etken bileşeni ayırmak ve çalışmalara onun üzerinden devam etmek talep edilmektedir. Tez çalışmamızın bu konu ile ilgili amacı da bu idi. Bu nedenle tüm bileşenleri ayırma işlemine girişilmemiş, eskiden olduğu gibi upuzun kolonlarda litrelerce çözücü harcayarak ayırma-saflaştırma işlemi yapılmamıştır. Özütü, ham halinden kurtarmak için klasik kolonda yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Benzer ayrımlarla saflaştırma işlemi kolaylaşacak ardından da Combi Flash Rf (hızlı kolon) cihazı

kullanılarak daha hızlı, basit ve ekonomik bir süreç olacaktır. Bu konuda çalışmalar devam etmektedir.

Bazı hastalıkların nedeni, bir enzimin işlevini yerine getirememesi olabilir; herhangi bir etken, bir enzimi inhibe ederek enzimin katalizlediği kimyasal olayı bozabilir veya bir farmakolojik ajan, bir hastalığı enzim inhibisyonu üzerinden tedavi edebilir. İnhibisyon çalışmaları;

- ❖ Metabolik yollar hakkında bilgi,
- ❖ İlaç ve toksinlerin etkilerini nasıl gösterdiğinin açıklanması,
- ❖ Enzim reaksiyon mekanizmalarının daha iyi aydınlatılması,
- ❖ Aktivitelerinin düzenlenmesiyle kontrol sisteminde etkili olmaları,
- ❖ Substrat analogları kullanarak önemLi araştırmalar yapılması açısından fayda sağlar.

Son çalışmalar bitki kökenli antioksidanları serbest radikal süpürücü özelliklerini raporlamıştır, bunların oksidatif hasardan dolayı oluşan birçok hastalıkta terapötik araçlar olarak çok büyük önemi vardır.

Bitki özütleri ve fitobileşenler; lipid peroksidasyonunun inhibitörleri ve etkili radikal süpürücüler olarak bulunmuşlardır. Sentetik antioksidanların çoğu zehirli ve mutajenik etki gösterir.

Canlı floranın fizyolojik fonksiyonlarının bir kısmı olan bitki veya bitkisel ilaç içinde kimyasal bileşenler bulunur, böylece insan vücudu ile daha iyi bağdaştırıldığına inanılır. Bitkilerden elde edilen doğal ürünler zengin kaynaklardır. Biyoaktif bitki-türevli bileşenlerin kullanımı gün geçtikçe artmaktadır, çünkü sentetik ilaçların kullanımı ile doğal etkiler temel sorun teşkil etmektedir.

Bitki türevli ilaçlar, sağlığı destekleyen ve hastalıkları azaltan doğal maddeler içermeleri üzerine esaslıdır ve güvenli daha dayanıklı tolerans sağlayabilirler.

Fitobileşenlerin, serbest radikalleri süpürücü etkisi ve oksidatif stresten dolayı hastalıkları iyileştirmede ki kullanımlarının klinik olarak etkili olduğu belirlenmiştir ve mevcut ilaçlardan daha az toksik oldukları saptanmıştır (Sen ve ark., 2010).

Bitki biyoaktif bileşenlerinin elde edilmesi ve ilaca yönelik çalışmaları düşünülüyorsa eğer; antioksidan çalışmalar, enzim-aktivite/inhibisyon ve sitotoksosite çalışmaları ile desteklenmelidir. Bazı biyoaktif bileşenlerin antioksidan özelliği olduğu gibi öncü-yükseltgen özelliği olduğunda unutulmamalıdır.

## KAYNAKLAR

- Albayrak S., Sağdıç O., Aksoy A., 2010. Bitkisel Ürünlerin ve Gıdaların Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Erciyes Üniversitesi Fen BilimLeri Enstitüsü Dergisi*, 26(4):401-409.
- Ames B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M., 1993. Oxidants, Antioxidants, and The Degenerative Diseases of Aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (90) 7915-7922.
- Amić D., Davidovic-Amić D., Beclo D., Rastija V., Lucic B. ve Trinajstic N., 2007. SAR and QSAR of the Antioxidant Activity of Flavonoids. *Current Medicinal Chemistry*, 14: 827-845.
- Aniol M., Zolnierczyk A., 2008. Extraction of Spent Hops Using Organic Solvents. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 66 (4): 208-214.
- Apak R., Güçlü K., Özyürek M., ve Karademir S. E., 2004. A Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols, Vitamin C and E Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 7970-7981.
- Apak R., Güçlü K., Özyürek M., Karademir S. E., ve Altun M., 2005. Total Antioxidant Capacity Assay of Human Serum Using Copper (II)-Neocuproine as Chromogenic Oxidant: The CUPRAC method. *Free Radical Research*, 39: 949-961.
- Atta-ur-Rahman M., Choudhary I., Thomsen W. J., 2005. *Bioassay Techniques for Drug Development*, 103, 104, 106-114, 125-133, 136-138 p.
- Babu P.V.A., ve Liu D., 2008. Green Tea Catechins and Cardiovascular Health: An Update, *Current Medicinal Chemistry*, 15: 1840-1850.
- Balsano C., ve Alisi A., 2009. Antioxidant Effects of Natural Bioactive Compounds. *Current Pharmaceutical Design*, 15: 3063-3073.
- Baytop T., 1986. *Genel Farmakognozi İstanbul Üniversitesi Yayınları* (4. Baskı).
- Baytop T., 1999. *Türkiye’de Bitkiler İle Tedavi*. Nobel Tıp Kitabevleri, 348 p.



- Benzie I.F.F., Strain J.J., 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power” The FRAP Assay. *Anal. Biochem.*, 239 (1): 70–76.
- Benzie I.F.F., Strain J.J., 1999. Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay: Direct Measure of Total Antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic Acid Concentration. *Methods Enzymol.*, 299: 15– 27.
- Blois M.S., 1958. Antioxidant Determinations by The Use of a Stable Free Radical, *Nature*, 181: 1199-1200.
- Blumenthal M., 1998. The Complete German Commission E Monograph: Therapeutic Guide to Herbal Medicines. *American Botanical Council*, Austin, TX, 147 p.
- Borkowski B., Krug H., 1960, *Biol. nst. Rosl. Teczn.*, 6,18.
- Bors W., Michel C.; Schikora S., 1995. *Free Radic. Biol. Med.*, 19: 45.
- Brand-Williams W., Cavalier M. E., Berset C., 1995. Use of Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Food Science and Technology*, 28(1): 25-30.
- Bravo L., Cabo J., Fraile A., Jimenez J., Villar A., 1974. Estudio Farmacodinamico Del Lupulo (*Humulus Lupulus* L.). Accion Tranquilizante. *Bollettino Chimico Farmaceutico*, 113: 310–315.
- British Pharmacopoeia Commission, 2007. British Pharmacopoeia 2008. *Hop Strobile*, I: 1074 p.
- Buratti S., Pellegrini N., Brenna O. V., ve Mannino S., 2001. Rapid Electrochemical Method for The Evaluation of The Antioxidant Power of Some Lipophilic Food Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 5136-5141.
- Burgess A., 1964. Hops: Botany, Cultivation and Utilization. Leonard Hill, London.
- Cao G., Sofic E., ve Prior L., 1997. Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relations. *Free Radical Biology ve Medicine*, 22 (5), 749–760.

- Cao G., Prior R.L., 1998. Comparison of Different Analytical Methods for Assessing Total Antioxidant Capacity of Human Serum. *Clinical Chemistry*, 44(6): 1309-1315.
- Cao G. and Prior R.L., 1999. In Vivo Antioxidant Capacity: Comparison of Different Analytical Methods. *Free Radical Biology and Medicine*, 27: 1173-1181.
- Cervellati R., Höner K., Furrow S. D., Neddens C. ve Costa S., 2001. The Briggs-Rascher Reaction as a Deneme to Measure the Activity of Antioxidants. *Analytica Chimica Acta*, 84: 3533-3547.
- Chappel C.I., Smith S.Y., Chagnon M., 1998. Subchronic Toxicity Study of Tetrahydroisohumulone and Hexahydroisohumulone in The Beagle Dog. *Food and Chemical Toxicology*, 36: 915–922.
- Chadwick L.R., Pauli G.F., Farnsworth N.R., 2006. The Pharmacognosy of *Humulus Lupulus* L. (Hops) With an Emphasis on Estrogenic Properties. *Phytomedicine*, 13: 119–131.
- Chen L., Zhao Q., Jin H., Zhang X., Xu Y., Yu A., Zhang H., Ding L., 2010a. Determination of Xanthohumol in Beer Based on Cloud Point Extraction Coupled With High Performance Liquid Chromatography. *Talanta*, 81: 692–697.
- Chen Chung-Yi, Kuo Po-Lin, Chen Yen-Hsu, Huang Jin-Cherng, Ho Mei-Ling, Lin Rong-Jyh, Chang Jo-Shu, Wang Hui-Min. 2010. Tyrosinase Inhibition, Free Radical Scavenging, Antimicroorganism and Anticancer Proliferation Activities of Sapindus Mukorossi Extracts. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 41:129–135.
- Cleemput V.M., Cattoor Ko, De Bosscher K., Haegeman G., De Keukeleire D., Heyerick A., 2009. Hop (*Humulus lupulus*)-Derived Bitter Acids as Multipotent Bioactive Compounds. *J. Nat. Prod.*, 72: 1220–1230.
- Colgate E.C., Miranda C.L., Stevens J.F., Bray T.M., Ho E., 2007. Xanthohumol, a Prenylflavonoid Derived from Hops Induces Apoptosis and Inhibits NF-Kappab Activation in Prostate Epithelial Cells. *Cancer Letters*, 246: 201–209.

- Cronquist, A., 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press, Nueva York.
- Cuttler R.G. ve Pryor, W.A. 1984. In Free Radical in Biology. *Free Radicals in Biology*, 6: 371-423.
- Dahlgren G., 1989. An Updated Angiosperm Classification. *Botanical Journal of the Linnean Society* 100 (3): 197–203.
- Davis P. H., 1965-1988. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. 10 cilt, Edinburgh.
- De Keukeleire J., Ooms G., Heyerick A., Roldan-Ruiz I., Van Bockstaele E., De Keukeleire D., 2003. Formation and Accumulation of  $\alpha$ -Acids,  $\beta$ -Acids, Desmethylxanthohumol, and Xanthohumol During Flowering of Hops (*Humulus lupulus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 4436– 4441.
- De Keukeleire J., Janssens I., Heyerick A., Ghekiere G., Cambie J., Roldan-Ruiz I., Van Bockstaele E., De Keukeleire D., 2007. Relevance of Organic Farming and Effect of Climatological Conditions on The Formation of  $\alpha$ -Acids,  $\beta$ -Acids, Desmethylxanthohumol and Xanthohumol in Hop (*Humulus lupulus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 61–66.
- Decker E.A., Wagner K., Richards M.P. ve Shahidi F., 2005. Measuring Antioxidant Effectiveness in Food. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 4303-4310.
- Dhooghe L., Naessens T., Heyerick A., De Keukeleire D., Vlietinck A. J., Pieters L., Apers S., 2010. Quantification of Xanthohumol, Isoxanthohumol, 8-Prenylnaringenin, and 6-Prenylnaringenin in Hop Extracts and Derived Capsules Using Secondary Standards. *Talanta* 83: 448–456.
- Dorman H. J. D., Peltoketo A., Hiltunen R., ve Tikkanen M. J., 2003. Characterization of The Antioxidant Properties of De-Odorized Aqueous Extracts from Selected Lamiaceae Herbs. *Food Chemistry*, 83(2): 255-262.
- Eri S., Khoo B.K., Lech J., Hartman T.G., 2000. Direct Thermal Desorption Gas Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry Profiling of Hop

- (*Humulus Lupulus* L.) Essential Oils in Support of Varietal Characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 1140–1149.
- Erdik, E., 2007, Denel Organik Kimya. *Gazi Kitabevi*, (4.Baskı). 146 p.
- European Pharmacopoeia, 2004. *Hop Strobile*, (5th ed.). 1730–1731 p.
- Frankel E. N. and Meyer A. S., 2000. The Problems of Using One-Dimensional Methods to Evaluate Multifunctional Food and Biological Antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agricultural*, 80: 1925-1941.
- Fridovich I., 1975, Superoxide Dismutases, *Annu. Rev. Biochem.*, 44: 147-159.
- Fung S.Y., Zuurbier K.W.M., Paniago N.B., Scheffer J.J.C., Verpoorte R., 1997. Conversion of Deoxyhumulone into The Hop  $\alpha$ -Acid Humulone. *Phytochemistry*, 44, 1047–1053.
- Gardner D.S.J., 1987. Hop Extracts. In: An Introduction to Brewing Science and Technology, Series II, vol. 1, Hops. Institute of Brewing.
- Gerhäuser C., Alt A., Heiss E., Gamal-Eldeen A., Klimo K., Knauff J., Neumann I., Scherf H.R., Frank N., Bartsch H., ve Becker H., 2002. Cancer Chemopreventive Activity of Xanthohumol, a Natural Product Derived from Hop. *Molecular Cancer Therapeutics*. 1: 959–969, September.
- Gerhäuser C., 2005. Broad Spectrum Antiinfective Potential of Xanthohumol from Hop (*Humulus Lupulus* L.) in Comparison with Activities of Other Hop Constituents and Xanthohumol Metabolites. *Mol. Nutr. Food Res.*, 49: 827 – 831.
- Gerhäuser C., 2005a. Beer Constituents as Potential Cancer Chemopreventive Agents. *European Journal of Cancer*, 41: 1941–1954.
- Grieve M., 1971. *A Modern Herbal*. Dover Publications, Inc., New York.
- Goese M., Kamhuber K., Bacher A., Zenk M.H., Eisenreich W., 1999. Biosynthesis of Bitter Acids in Hops. *European Journal of Biochemistry*, 263: 447–454.

- Gorissen H., Bellink C., Vancraenenbroeck R., Lontie R., 1968. Separation and Identification of (+)-gallo catechine in Hops. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*, 76: 932–934.
- Gong Y., Liu X., He W., Xu H., Yuan F., Gao Y., 2012. Investigation into the Antioxidant Activity and Chemical Composition of Alcoholic Extracts from Defatted Marigold (*Tagetes erecta* L.) Residue, *Fitoterapia*, 83: 481-489.
- Gökpınar Ş., Koray T., Akçiçek E., Göksan T., Durmaz Y., 2006. Algal Antioksidanlar. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi* 23 - Ek (1/1): 85-89.
- Güçlü K., Sözgen K., Tütem E., Özyürek M., ve Apak R., 2005. Spectrophotometric Determination Of Ascorbic Acid Using Copper (II)- Neocuproine Reagent in Beverages and Pharmaceuticals. *Talanta*, 65: 1226- 1232.
- Güçlü K., Altun M., Özyürek M., Karademir S. E., ve Apak R., 2006. Antioxidant Capacity of Fresh, Sun-and Sulphited-Dried Malatya Apricot (*Prunus armeniaca*) Assayed by CUPRAC, ABTS/ TEAC and Folin Methods. *International Journal of Food Science and Technology*, 41: 76-85.
- Hänsel R., Wagener H. H., 1967. Attempts to Identify Sedative-Hypnotic Active Substances in Hops. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*, 17: 79–81.
- Hänsel R., Schulz J., 1988. Desmethylxanthohumol: Isolierung Aus Hopfen und Cyclisierung zu Flavanonen. *Archiv der Pharmazie (Weinheim)*, 321: 37–40.
- Hänsel R., Keller K., Rimpler H., Schneider G., 1993. Hagers Handbuch der Pharmazeutische Praxis, Hrsg. *Springer Verlag*, Berlin. 447-458.
- Harborne J.B., Mabry T.J. (Eds.), 1982. The Flavonoids: Advances in Research, Vols. 1–2, Chapman & Hall, London. 48, 52 pp.
- Harman D., 1956. A Theory Based on Free Radicals and Radiation Chemistry. *J Gerontol*, 11: 298-300.
- Havsteen B.H., 2002. *Pharmacol. Ther.*, 96: 67.

- Huang D., Ou B., Prior R.L., 2005. The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays, *J. Agric. Food Chem.*, 53: 1841-1856.
- Ikawa M., Schaper T. D., Dollord C. A. ve Sosner J. J., 2003. Utilization of Folin-Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(7): 1811-1815.
- Jeney, E., Uri, J., 1954, *Die Pharmazie*, 9, 553.
- Kac J., Milnaric A., Umek A., 2006. *J. Planar Chromatogr.* 19: 58–61.
- Kac J., Plazar J., MLinarić A., Žegura B., Lahb T.T., Filipić M., 2008. Antimutagenicity of Hops (*Humulus lupulus* L.): Bioassay-Directed Fractionation and Isolation of Kanthohumol. *Phytomedicine*, 15: 216–220.
- Kahkönen M. P., Hopia A. I., Vuorela H. J., Rauha J. P., Pihlaja K., Kujala T.S. ve Heinonen M., 1999. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 3954-3962.
- Kaur C. ve Kapoor H. C., 2001. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of some Asian Vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, 37 (2): 153-161.
- Kırırmer N., Demirci F., Başer K. H. C., 2002. Monoterpenlerin Mikrobiyal Transformasyonu. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler.
- Koleva I. I., Van Beek A. T., Linssen J. P. H., de Groot, A. ve Evstatieva L. N., 2002. Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: A Comparative Study on Three Denemeing Methods. *Phytochemical Analysis*, 13: 8-17.
- Langezaal C.R., 1993. A pharmacognostical Study of Hop, *Humulus lupulus* L. *Pharmacy World and Science*, 15: 178–179.
- Lopez-Alarcon C. ve Lissi E., 2005. Interaction of Pyrogallol Red with Peroxyl Radicals. A Basis for a Simple Methodology for The Evaluation of Antioxidant Capabilities. *Free Radical Research*, 39 (7): 729-736.

- MacDonald-Wicks L.K., Wood L.G. ve Garg M.L., 2006. Methodology for the Determination of Biological Antioxidant Capacity *in vitro*: a review, *J. Sci. Food Agric.*, 86: 2046–2056.
- McGahon A. J., Martin S. J., Bissonnette R. P., Mahbaubi A., Shi Y., Mogil R. J., Nishioka W. K., ve Green D.R., 1995. The End of the (cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis *in vitro*. In *Methods in Cell Biology, Cell Death*, Schwartz LM, Osborne BA (eds.), *Academic Press*, San Diego. 46: 150-181.
- Magalhães L.M., Segundo M.A., Reis S., Lima J.L.F.C., 2008. Methodological Aspects About *in vitro* Evaluation of Antioxidant Properties, *Anal. Chim. Acta*, 613: 1–19.
- Malizia R.A., Molli J.S., Cardell D.A., Grau R.J.A., 1999. Essential Oil of Hop Cones (*Humulus lupulus* L.). *Journal of Essential Oil Research*, 11: 13–15.
- Markham G. D., Tabor C. W., Tabor H., 1982. *J. Biol. Chem.* 257: 12063-12068.
- Middleton Jr. E, Kandaswami C., Theoharides T. C., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* 52: 673-751.
- Middleton Jr. E., Kandaswami C., 1986. In *The Flavonoids: Advances in Research Since*, Chapman and Hall: London, 1994, p 619.
- Miliauskas G., Venskutonis P. R. ve Van Beek T. A., 2004. Screening of Radical Scavenging Activity of Some Medicinal and Aromatic Plant Extracts. *Food Chemistry*, 85 (2): 231-237.
- Miller N.J., Rice-Evans C.A., Davies M.J., Gopinathan V., Milner A., 1993. A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and Its Application to Monitoring The Antioxidant Status in Premature Neonates. *Clin. Sci.*, 84: 407-412.
- Milligan S.R., Kalita J.C., Heyerick A., Rong H., De Cooman L., De Keukeleire D., 1999. Identification of a Potent Phytoestrogen in Hops (*Humulus lupulus* L.) and Beer. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83: 2249–2252.
- Mizobuchi S., Sato Y., 1984. A New Flavanone with Antifungal Activity Isolated from Hops. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48: 2771–2775.

- Mizobuchi S., Sato Y., 1985. Antifungal Activities of Hop Bitter Resins and Related Compounds. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49: 399–403.
- Mogalhaes L. M., Segundo M. A., Reis S., Lima L. L. F. C., ve Rangel O. S. S., 2006. Automatic Method for the Determination of Folin-Ciocalteu Reducing Capacity in Food Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (15): 5241-5246.
- Moir M., 2000. Hops—A Millennium Review. *Journal of the American Society of Brewing Chemistry*, 58: 131–146.
- Molyneux P., 2004. The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Journal of Science and Technology*, 26 (2): 211-219.
- Mosmann T., 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods*, 65: 55–63.
- Nagai T., Myoda T. and Nagashima T., 2005. Antioxidative Activities of Water Extract and Ethanol Extract from Field Horsetail (tsukushi) *Equisetum Arvense*. *Food Chemistry*, 91: 389-394.
- Nastainczyk W., 1972. Untersuchung über die östrogene Wirkung des Hopfen und des Bieres. Ph. D. Dissertation. Universität Saarbrücken, Germany.
- Nookandeh A., Frank N., Steiner F., Ellinger R., Schneider B., Gerhäuser C., Becker H., (2004). Xanthohumol Metabolites in Faeces of Rats. *Phytochemistry*. 65 (5): 561–570.
- Neve R.A., 1991. *Hops*. Chapman and Hall, New York.
- Overk C. R., Guo J., Chadwick L.R., Lantvita D.D., Minassic A., Appendinoc G., Chena S.N., Lankina D.C., Farnswortha N.R., Pauli G. F., van Breemena R.B., Boltona J.L., 2008. *In vivo* Estrogenic Comparisons of *Trifolium pratense* (red clover) *Humulus lupulus* (hops), and The Pure Compounds Isoxanthohumol and 8-prenylnaringenin. *Chemico-Biological Interactions*, 176: 30–39.



- Pellegrini N., Re R., Yang M. ve Rice-evans C., 1999. Screening of Dietary Carotenoids and Carotenoid-Rich Fruit Extracts for Antioxidant Activities Applying 2,2' azinobis(3-ethylene benzothiazoline-6-sulfonic Acid Radical Cation Decolorization Assay. *Methods Enzymol.*, 299: 379-389.
- Pellegrini N., Serafini M., Colombi B., Del Rio D., Salvatore S., Bianchi M. ve Brighenti F., 2003. Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different *in vitro* Assays, *J. Nutr.*, 133: 2812–2819.
- Plazar J., Žegura B., Lah T.T., Filipî M., 2007. Protective Effects of Xanthohumol Against The Genotoxicity of benzo(a)pyrene (BaP), 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) and *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH) in HepG2 Human Hepatoma Cells. *Mutation Research*, 632. 1–8.
- Plazar J., Filipić M., Groothuis G.M.M., 2008. Antigenotoxic Effect of Xanthohumol in Rat Liver Slices. *Toxicology in Vitro*, 22: 318–327.
- Price J.A., Sanny C.G., Shevlin D., 2006. Application of Manual Assessment of Oxygen Radical Absorbent Capacity (ORAC) for Use in High Throughput Assay of “Total” Antioxidant, Activity of Drugs and Natural Products, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 54: 56 – 61.
- Prior R. L., ve Cao G., 1999. *In vivo* Total Antioxidant Capacity: Comparison of Different Analytical Methods, *Free Radical Bio. Med.*, 27: 1173–1181.
- Prior R. L., Wu X., Schaich K., , 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, *J. Agric. Food Chem.*, 53: 4290- 4302.
- Rao G. R., Konjilal G., ve Mohan K. R., 1978. Extended Application of Folin- Ciocalteu Reagent in the Determination of Drugs. *The Analyst*, 103: 993-994.
- Re R., Pellegrini N., Protrggente A., Pannala A., Yang M., ve Rice-Evans C., 1999. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26: 1231-1237.

- Rice-Evans C. A., ve Miller N. J., 1984. Total Antioxidant Status in Plasma and Body Fluids. *Methods in Enzymology*, 234: 279-293.
- Rice-Evans C. A., Miller N. J. ve Paganga G. 1997. Antioxidant Properties of Phenolic Compounds. *Trends in Plant Science*, 2: 152-159.
- Rong H., Zhao Y., Lazou K., De Keukeleire D., Milligan S.R., Sandra P., 2000. *Chromatographia* 51: 545–552.
- Rus A. F., Kulikov A. A., 1971, *Trudi Alt. s.-x. in-ta.*, 23, 32.
- Satooka H., ve Kubo I., 2011. Effects of Thymol on Mushroom Tyrosinase-Catalyzed Melanin Formation. *J. Agric. Food Chem.*, 59: 8913.
- Sägesser M., Deinzer M., 1996. HPLC-Ion Spray-Tandem Mass Spectrometry of Flavonol Glycosides in Hops. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 54: 129–134.
- Sanchez-Moreno C. 2002. Review: Methods Used to Evaluate The Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *International Journal of Food Science & Technology*, 8(3): 121-137.
- Schiller H., Forster A., Vonhoff C. , Hegger M., Biller A., Winterhoff H., 2006. Sedating Effects of *Humulus lupulus* L. Extracts. *Phytomedicine*, 13: 535–541.
- Scinto L. F., ve Daffner K. R., 2000. Early Diagnosis of Alzheimer’s Disease. *Humana pres.* 1-31 p.
- Sen S., Chakraborty R., Sridhar C., Reddy Y. S. R., Biplab De, 2010. Free Radicals, Antioxidants, Diseases and Phytomedicines: Current Status and Future Prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 3 (1) July – August.
- Senol F.S., Orhan I., Yilmaz G., Cicek M., Sener B., 2010. Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase, and Tyrosinase Inhibition Studies and Antioxidant Activities of 33 *Scutellaria* L. Taxa from Turkey. *Food and Chemical Toxicology* 48:781–788.

- Shoeb M., Macmanus S.M., Kong-Thoo-Lin P., Celik S., Jaspars M., Nahar L., Sarker S.D., 2007. Bioactivity of The Extracts and Isolation of Lignans and a Sesquiterpene from The Aerial Parts of *Centaurea pamphylica* (Asteraceae). *Daru* 15 (3): 119.
- Singleton V. L. and J.L., Rossi. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 16: 144-158.
- Singleton V. L., Orthofer R. and Lamuela-Raventos R. M., 1999. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*, 299: 152-178.
- Somogyi A., Rosta K., Pusztai P., Tulassay Z. ve Nagy G., 2007. Antioxidant Measurements. *Physiol. Meas.*, 28: 41–55.
- Spencer J. P. E., 2010. Conference on Over- and Undernutrition: Challenges and Approaches Nutrition Society Silver Medal Lecture Beyond Antioxidants: The Cellular and Molecular Interactions of Flavonoids and How These Underpin Their Actions on the Brain. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69: 244–260.
- Stevens J.F., Ivancic M., Hsu V.L., Deinzer M.L., 1997. Prenylflavonoids from *Humulus lupulus*. *Phytochemistry*, 44: 1575–1585.
- Stevens J.F., Miranda C.L., Buhler D.R., Deinzer M.L., 1998. Chemistry and Biology of Hop Flavonoids. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 56: 136–145.
- Stevens J.F., Taylor A.W., Deinzer M.L., 1999. Quantitative Analysis of Xanthohumol and Related Prenylflavonoids in Hops and Beer by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 832: 97–107.
- Stevens J.F., Taylor A.W., Nickerson, G.B., Ivancic M., Henning J., Haunold A., Deinzer M.L., 2000. Prenylflavonoid Variation in *Humulus lupulus*: Distribution and Taxonomic Significance of Xanthogalenol and 4'-O-methylxanthohumol. *Phytochemistry*, 53: 759–775.
- Stevens J.F., Page J.E., 2004. Xanthohumol and Related Prenylflavonoids from Hops and Beer: To Your Good Health! *Phytochemistry*, 65: 1317–1330.

- Sytsma K.J., Morawetz J., Pires J. C., Nepokroeff M., Conti E., Zjhra M., Hall J. C., and Chase M. W., 2002. Urticalean Rosids: Circumscription, Rosid Ancestry, and Phylogenetics Based on *rbcL*, *trnL-F*, and *ndhF* Sequences. *American Journal of Botany*, 89 (9): 1531–1546.
- Teuber M., Schmalreck A.F., 1973. Membrane Leakage in *Bacillus subtilis* 168 Induced by the Hop Constituents Lupulone, Humulone, Isohumulone and Humulinic Acid. *Archiv fur Mikrobiologie*, 94: 159–171.
- Trouillas P., Calliste C. A., Allais D. P., Simon A., Marfak A., Delage C., ve Duroux J. L., 2003. Antioxidant, Anti-Inflammatory and Antiproliferative Properties of Sixteen Water Plant Extracts Used in the Limousin Countryside as Herbal Teas. *Food Chemistry*, 80(3): 399-407.
- Tütem E., ve Apak R., 1991. Simultaneous Spectrophotometric Determination of Cystine and Cysteine in Amino Acid Mixtures Using Copper(II)-Neocuproine Reagent. *Analytica Chimica Acta*, 255: 121-125.
- Tütem E., Apak R., Günaydın E. ve Sözgen K., 1997. Spectrophotometric Determination of Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) Using Copper(II)-Neocuproine Reagent. *Talanta*, 44: 249-255.
- Valko M., Rhodes C.J., Moncola J., Izakovic M., Mazura M., 2006. Free Radicals, Metals and Antioxidants in Oxidative Stress-Induced Cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160: 1-40.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J., 2007. Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39: 44–84.
- Van Acker S.A.B.E., Van den Berg D.-J., Tromp M.N.J.L., Griffioen D.H., Van Bennekom W.P., Van der Vijgh W.J.F., Bast A., 1996. *Free Radic. Biol. Med.*, 20: 331.
- Van den Berg R., Haenen R. M. M., van den Berg H., ve Bast A., 1999. Applicability of and Improved Troloks Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) Assay for

- Evaluation of Antioxidant Capacity Measurement of Mixtures. *Food Chemistry*, 66: 511-517.
- Vanhoecke B.W., Delporte F., Van Braeckel E., Heyerick A., Depypere H.T., Nuytinck M., De Keukeleire D., Bracke M.E., 2005b. A Safety Study of Oral Tangeretin and Xanthohumol Administration to Laboratory Mice. *In Vivo*, 19: 103–107.
- Vanhoenacker G., Rong H., De Keukeleire D., Baeyens W., Van Der Weken G., Sandra P., 2000. *Biomed. Chromatogr.* 14: 34–36.
- Velioğlu Y. S., Mazza G., Gao L., ve Oomah B. D., 1998. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4113–4117.
- Verzele M., De Keukeleire D., 1991. Chemistry and Analysis of Hop and Beer Bitter Acids. *Elsevier*, Amsterdam.
- Vinson J., Zubik L., Bose P., Sammon N., ve Proch J. 2005. Dried fruits: Excellent *in vitro* and *in vivo* Antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*, 24 (1): 44-50.
- Yamada Y., ve Azuma K., 1977. Evaluation of the *in vitro* Antifungal Activity of Allicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, April, 743-749.
- Yamaguchi N., Yamaguchi K. S., Ono M., 2009. *In vitro* Evaluation of Antibacterial, Anticollagenase, Andantioxidant Activities of Hop Components (*Humulus lupulus*) Addressing *acnevulgaris*. *Phytomedicine*, 16: 369–376.
- Yoshino M., Haneda M., Naruse M., Murakami K., 1999. *Mol. Genet. Metab.*, 68: 468.
- Wang Q., Ding Z.H., Liu J.K., Zheng Y.T., 2004. Xanthohumol, a Novel Anti-HIV-1 Agent Purified from Hops *Humulus lupulus*. *Antiviral Research*, 64: 189–194.
- Wei Y.H., Pang C.Y., 2005. The Role of Mitochondria in Human Aging Process. *Biotech International*, 17: 8-13.
- Wetherilt H., 1996. Beslenme ve Cilt Sağlığı. *Gıda Teknolojisi*, 1(6): 84-88.

Zanoli P. ve Zavatti M., 2008. Pharmacognostic and Pharmacological Profile of *Humulus lupulus* L. *Journal of Ethnopharmacology* 116: 383–396.

## EKLER

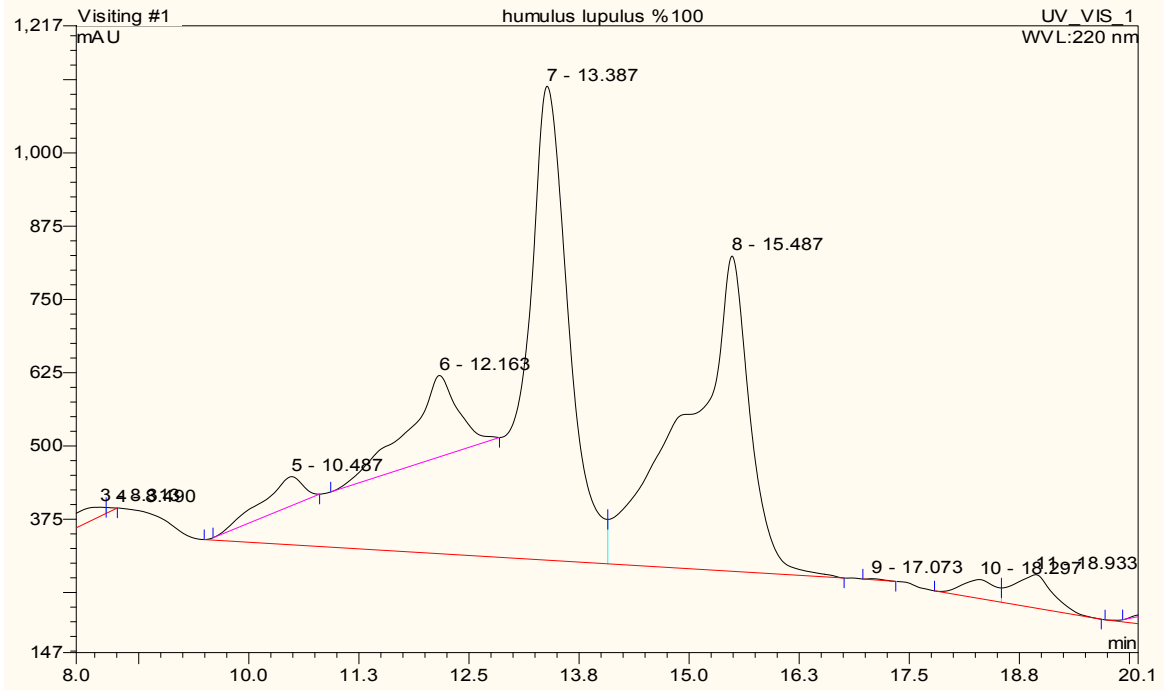
### Sayfa No

Ek 1. <i>Humulus lupulus</i> L. Metanol (kademeli) özütü % 100 metanol SPE ayırımının HPLC-UV kromatogramı. ....	III
Ek 2. <i>Humulus lupulus</i> L. Metanol (kademeli) özütü % 100 metanol SPE ayırımının HPLC-UV kromatogramı. ....	III
Ek 3. <i>Humulus lupulus</i> L. Metanol (kademeli) özütü katı faz özütlemesinden elde edilen 7. ayırımın 220 nm’de UV-VIS spektrumu. ....	IV
Ek 4. <i>Humulus lupulus</i> L. Metanol (kademeli) özütü % 100 SPE ayırımının HPLC-UV’de 4,12. dakikada toplanan ayırımın UV-VIS spektrumu ....	IV
Ek 5. <i>Humulus lupulus</i> L. Metanol (kademeli) özütü % 100 SPE ayırımının HPLC-UV’de 10,49. dakikada toplanan ayırımın UV-VIS spektrumu. ....	V
Ek 6. <i>Humulus lupulus</i> L. Metanol (kademeli) özütü % 100 SPE ayırımının HPLC-UV’de 12,16. dakikada toplanan ayırımın UV-VIS spektrumu. ....	V
Ek 7. <i>Humulus lupulus</i> L. Metanol (kademeli) özütü % 100 SPE ayırımının HPLC-UV’de 13,39. dakikada toplanan ayırımın UV-VIS spektrumu. ....	VI
Ek 8. <i>Humulus lupulus</i> L. Metanol (kademeli) özütü % 100 SPE ayırımının HPLC-UV’de 15,49. dakikada toplanan ayırımın UV-VIS spektrumu. ....	VI
Ek 9. <i>Humulus lupulus</i> L. Metanol (kademeli) özütü % 100 SPE ayırımının HPLC-UV’de 24,82. dakikada toplanan ayırımın UV-VIS spektrumu. ....	VII
Ek 10. <i>Humulus lupulus</i> L. Metanol (kademeli) özütü % 100 SPE ayırımının HPLC-UV’de 29.19. dakikada toplanan ayırımın UV-VIS spektrumu. ....	VII
Ek 11. <i>Humulus lupulus</i> L. Metanol (kademeli) özütü % 100 SPE ayırımının HPLC-UV’de 30,27. dakikada toplanan ayırımın UV-VIS spektrumu. ....	VIII
Ek 12. Kersetin glukozit bileşiğine ait <sup>1</sup> H-NMR spektrumu ....	IX
Ek 13. Kersetin için hesaplanan teorik <sup>1</sup> H-NMR spektrumu. ....	X
Ek 14. Kersetin-3-O-glukozit için hesaplanan teorik <sup>1</sup> H-NMR spektrumu. ....	X
Ek 15. Kersetin-7-O-glukozit için hesaplanan teorik <sup>1</sup> H-NMR spektrumu. ....	XI
Ek 16. Ksanthohumol türevi <sup>1</sup> H-NMR spektrumu. ....	XII

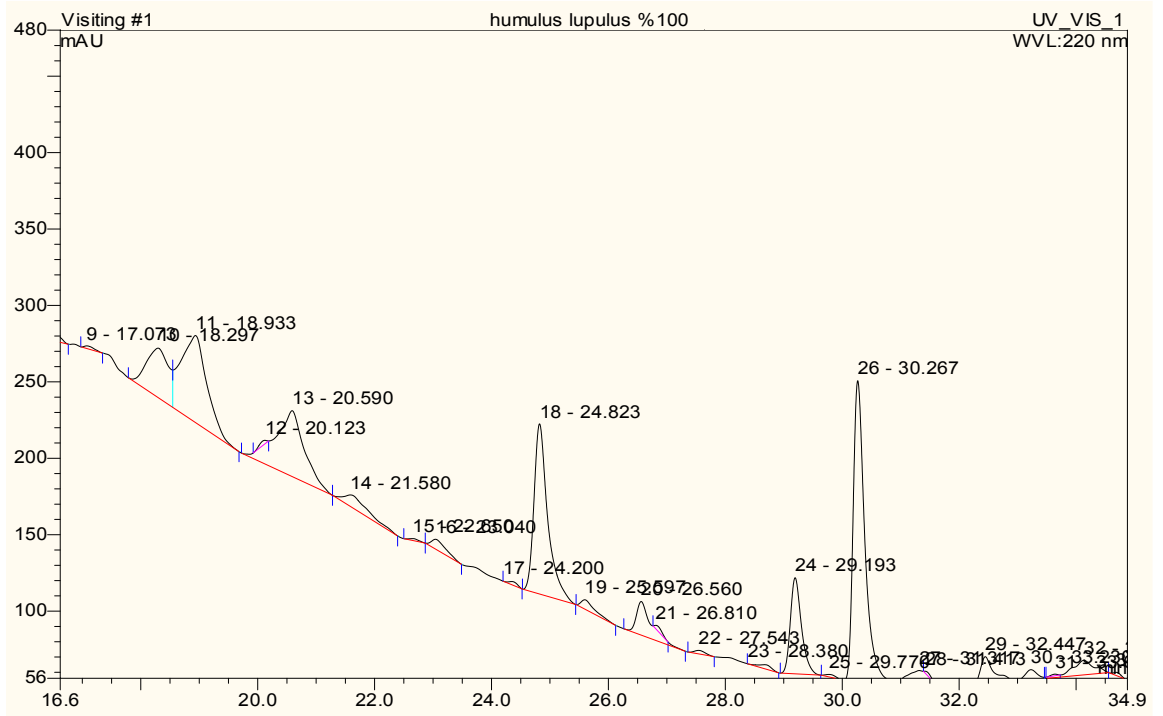
Ek 17. Ksanthohumol türevi için hesaplanan teorik $^1\text{H-NMR}$ spektrumu .....	XIII
Ek 18. 3-Hidroksiflavanon türevi bileşğine ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu .....	XIV
Ek 19. Temel bileşeni rutin olan karışımın $^1\text{H-NMR}$ spektrumu .....	XV
Ek 20. Rutin bileşğine C7'de şeker halkası bağlı iken hesaplanan teorik $^1\text{H-NMR}$ spektrumu.....	XV
Ek 21. Rutin bileşğine C3'te şeker halkası bağlı iken hesaplanan teorik $^1\text{H-NMR}$ spektrumu.....	XVI
Ek 22. Rutin bileşğine ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu .....	XVI
Ek 23. F10 ayrımı GC-MS kromatogramı.....	XVII
Ek 24. Metanol (maserasyon) özütü GC-MS kromatogramı.....	XVIII
Ek 25. Metanol (doğrudan) özütü GC-MS kromatogramı .....	XIX
Ek 26. Metanol (kademeli) özütü GC-MS kromatogramı.....	XX
Ek 27. Etanol-su özütü GC-MS kromatogramı.....	XXI
Ek 28. Hekzan özütü GC-MS kromatogramı.....	XXII
Ek 29. Aseton özütü GC-MS kromatogramı .....	XXIII
Ek 30. Aseton özütü LC-MS kromatogramı.....	XXIV
Ek 31. Metanol (doğrudan) özütü LC-MS kromatogramı.....	XXV
Ek 32. Metanol (kademeli) özütü LC-MS kromatogramı .....	XXVI
Ek 33. Hekzan özütü LC-MS kromatogramı .....	XXVII
Ek 34. Metanol (maserasyon) özütü LC-MS kromatogramı .....	XXVIII
Ek 35. Etanol-su özütü LC-MS kromatogramı.....	XXIX



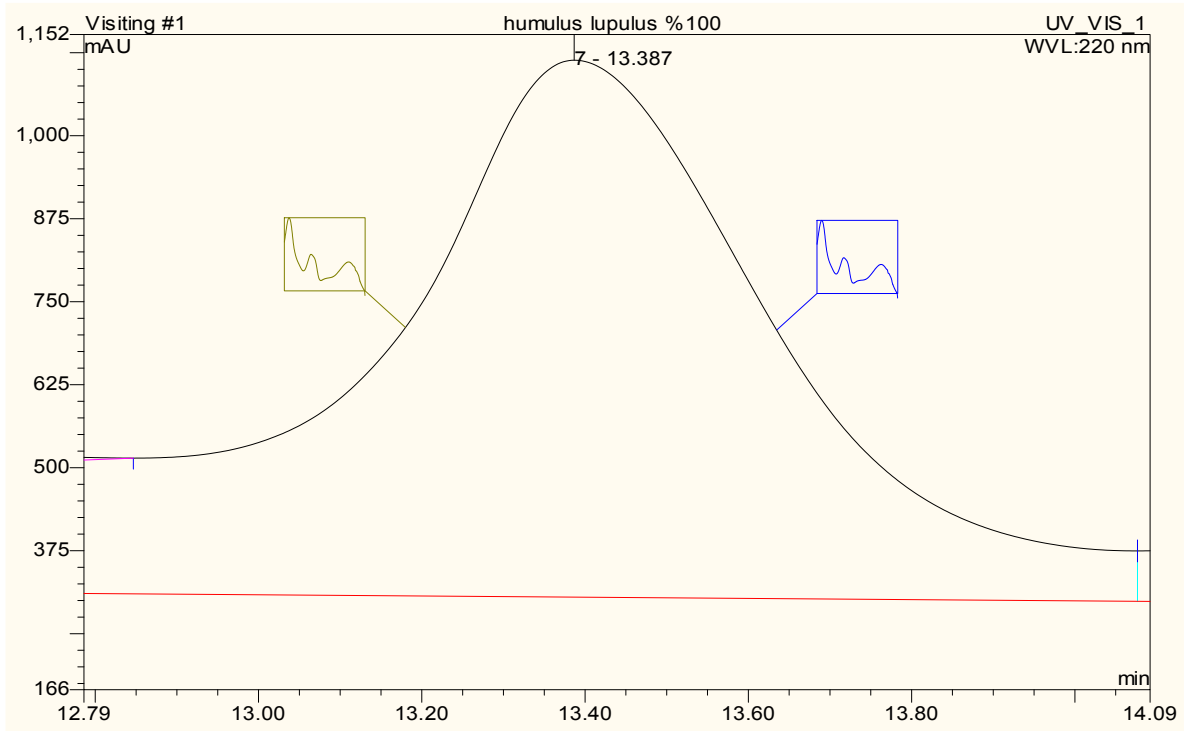
## EKLER



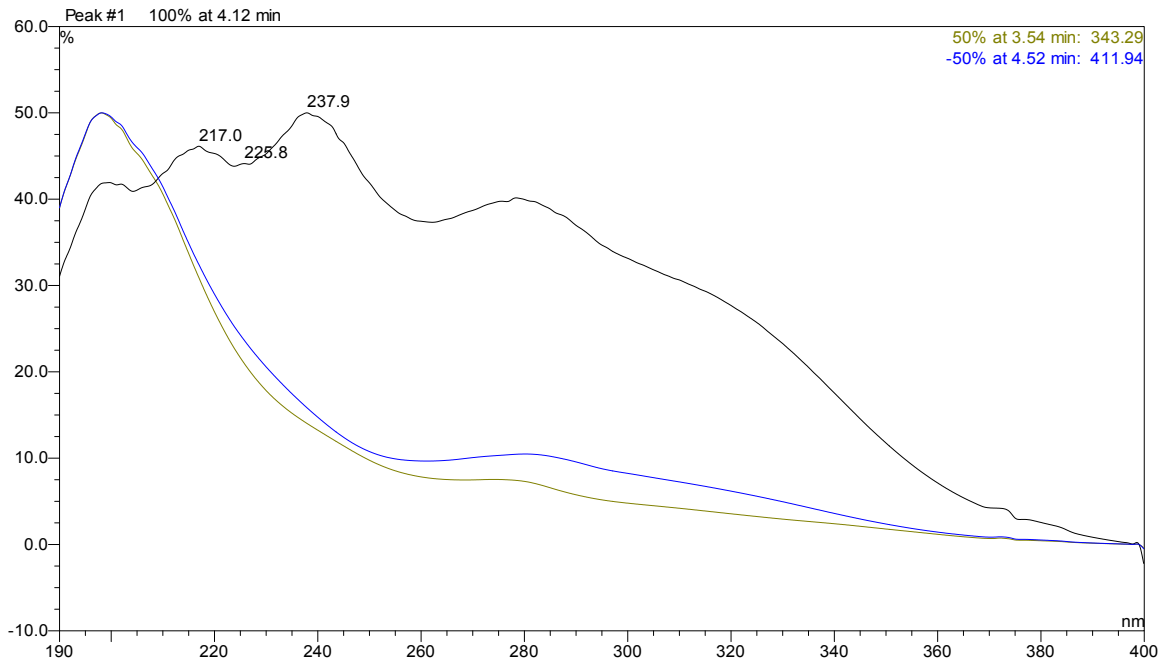
Ek 1. *Humulus lupulus* L. Metanol (kademeli) özütü % 100 metanol SPE ayırımının HPLC-UV kromatogramı.



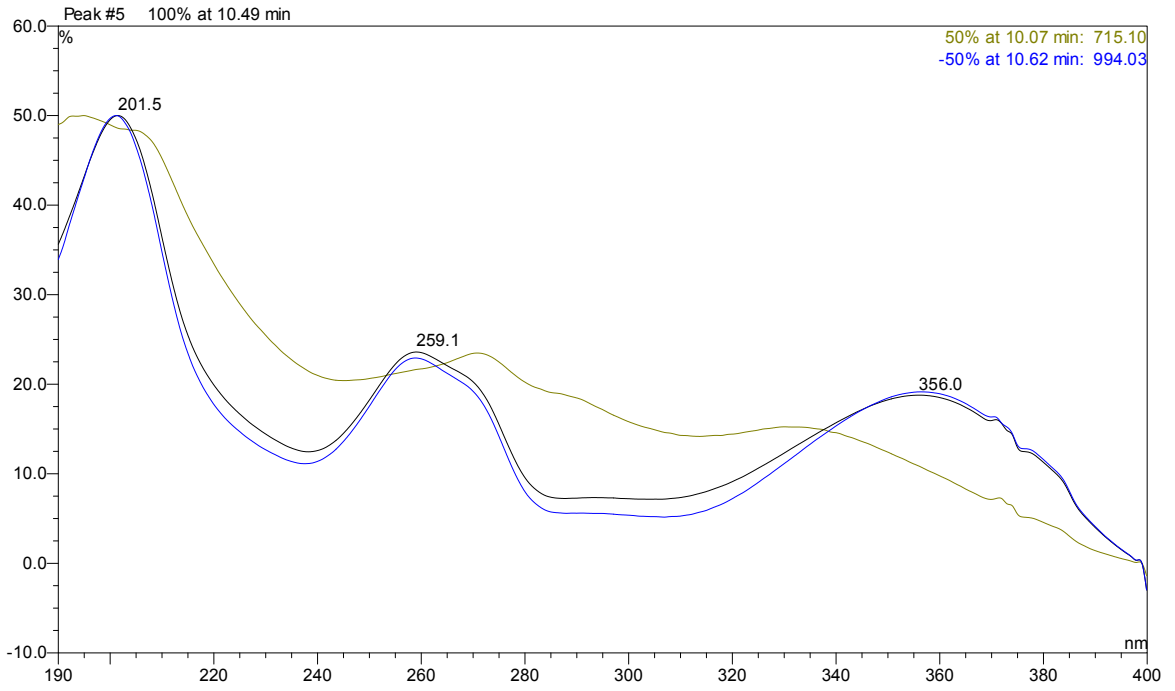
Ek 2. *Humulus lupulus* L. Metanol (kademeli) özütü % 100 metanol SPE ayırımının HPLC-UV kromatogramı.



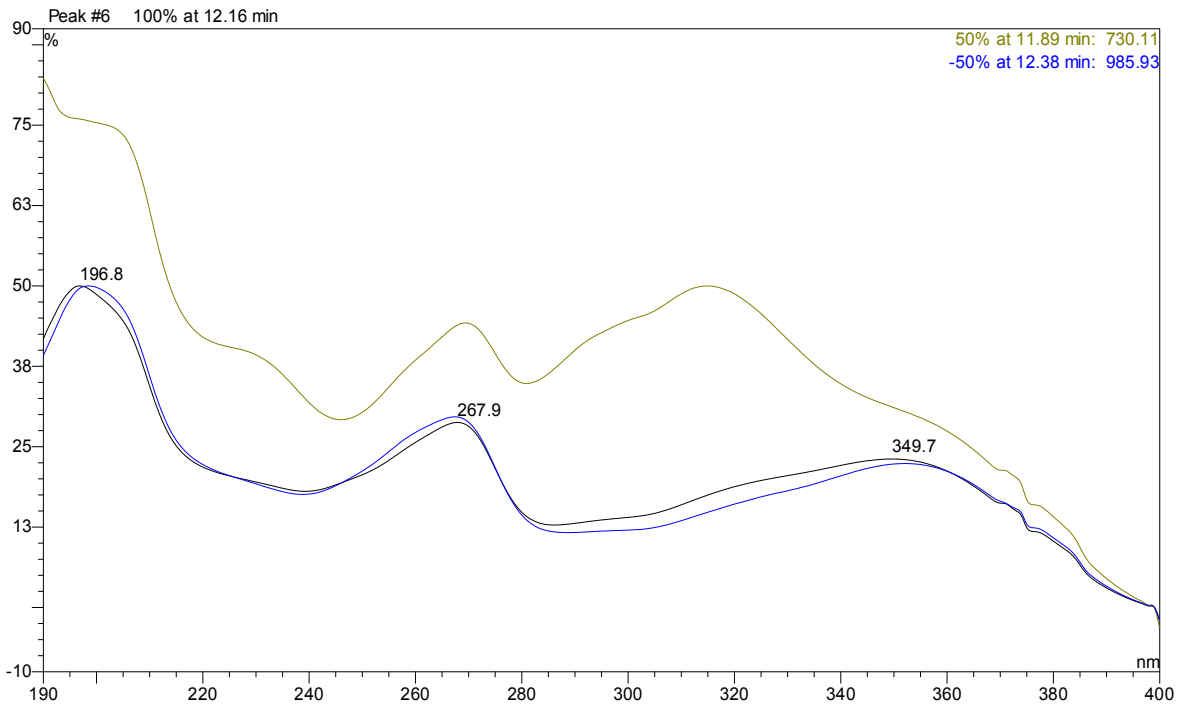
Ek 3 *Humulus lupulus* L. Metanol (kademeli) özütü % 100 metanol SPE ayrımının HPLC-UV de alınan 7. ayrımının UV-VIS spektrumu.



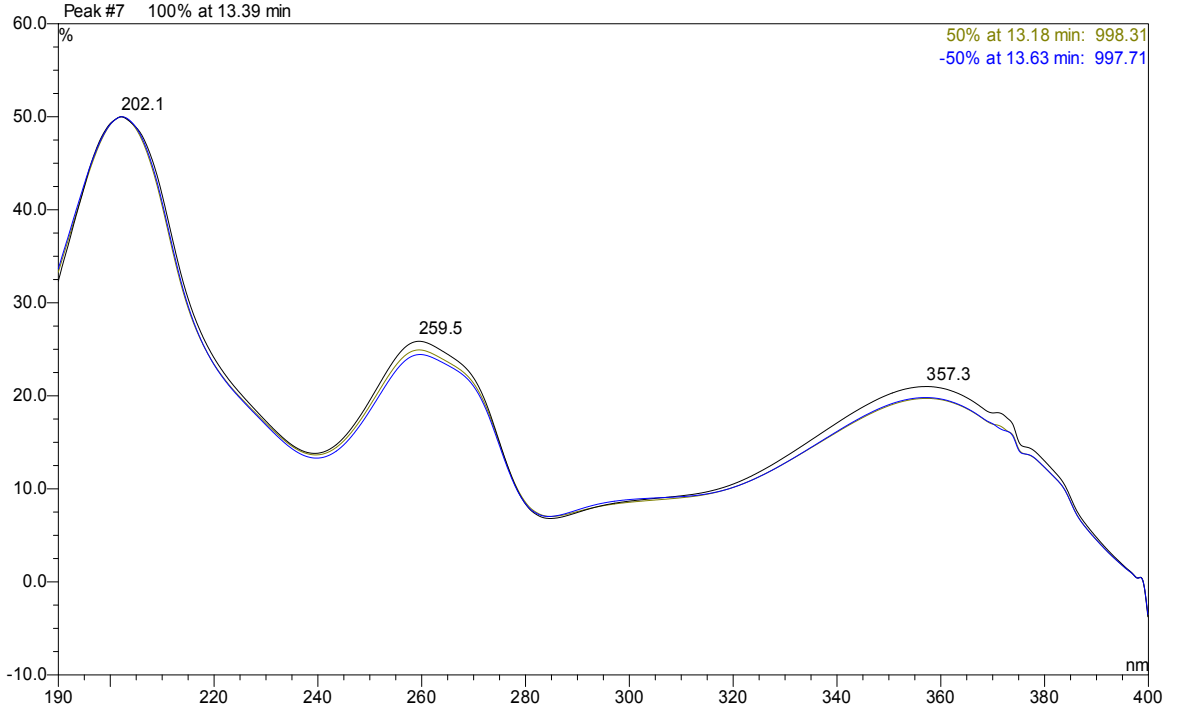
Ek 4. *Humulus lupulus* L. Metanol (kademeli) özütü % 100 metanol SPE ayrımının HPLC-UV'de 4,12. dakikada toplanan ayrımın UV-VIS spektrumu.



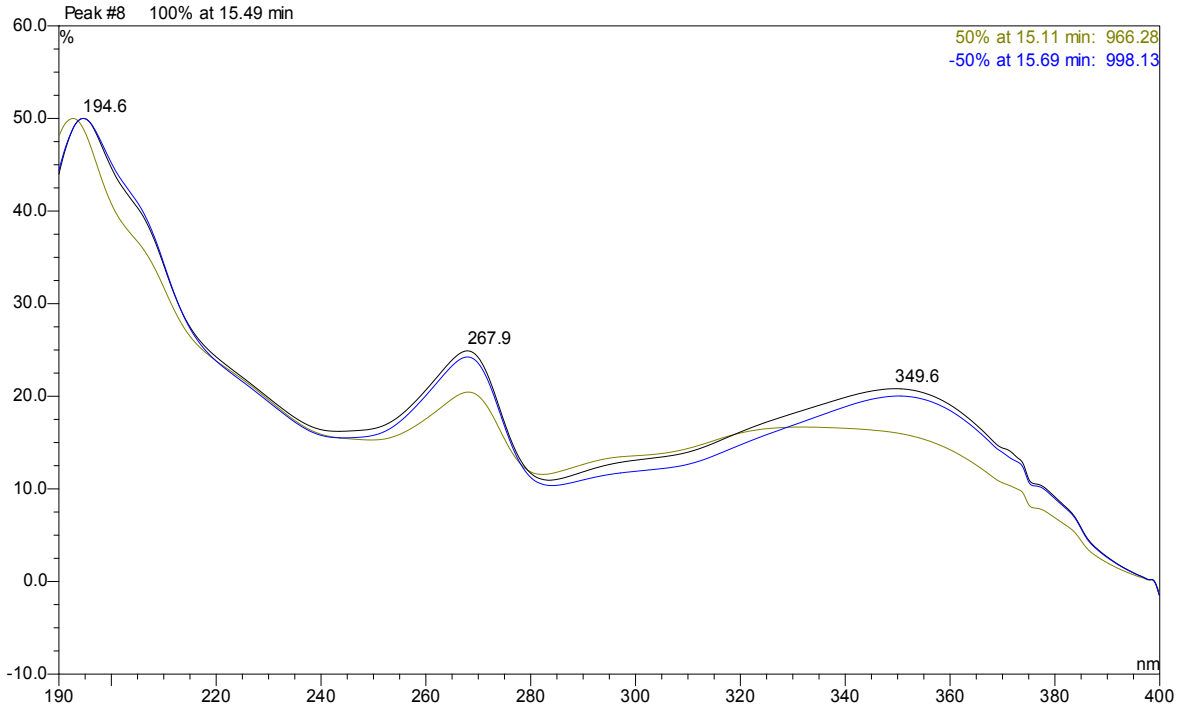
Ek 5. *Humulus lupulus* L. Metanol (kademeli) özütü % 100 metanol SPE ayrımının HPLC-UV'de 10,49. dakikada toplanan ayrımın UV-VIS spektrumu.



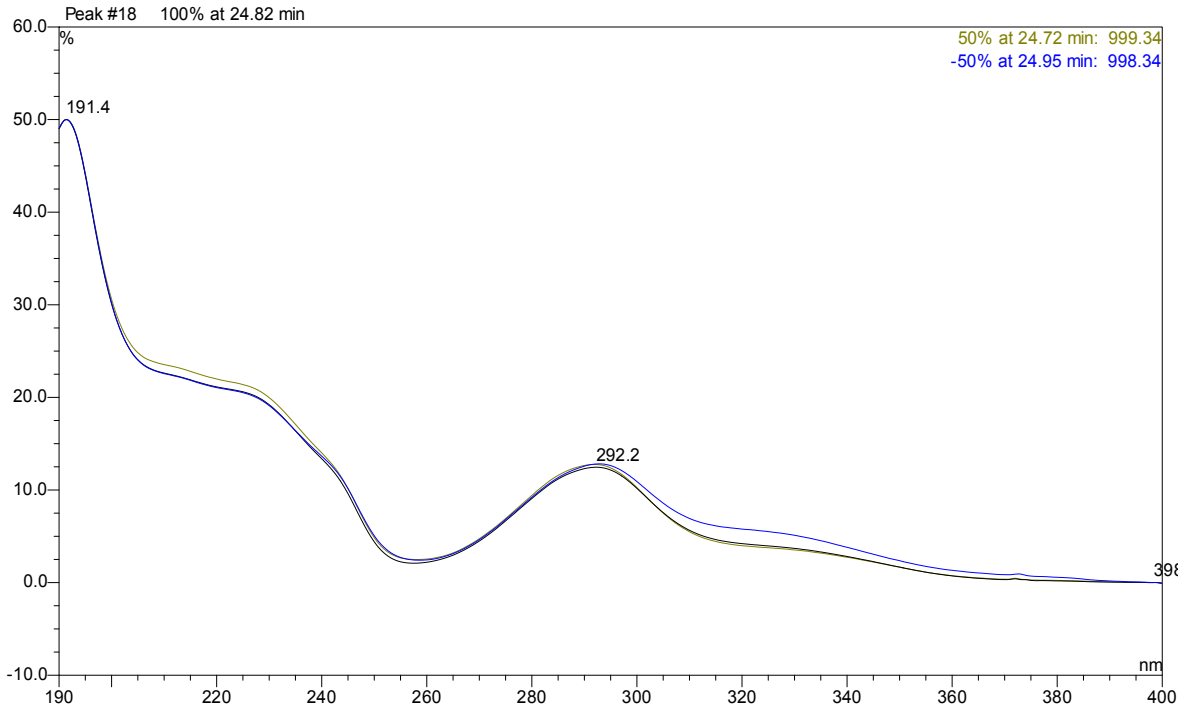
Ek 6. *Humulus lupulus* L. Metanol (kademeli) özütü % 100 metanol SPE ayrımının HPLC-UV'de 12,16. dakikada toplanan ayrımın UV-VIS spektrumu.



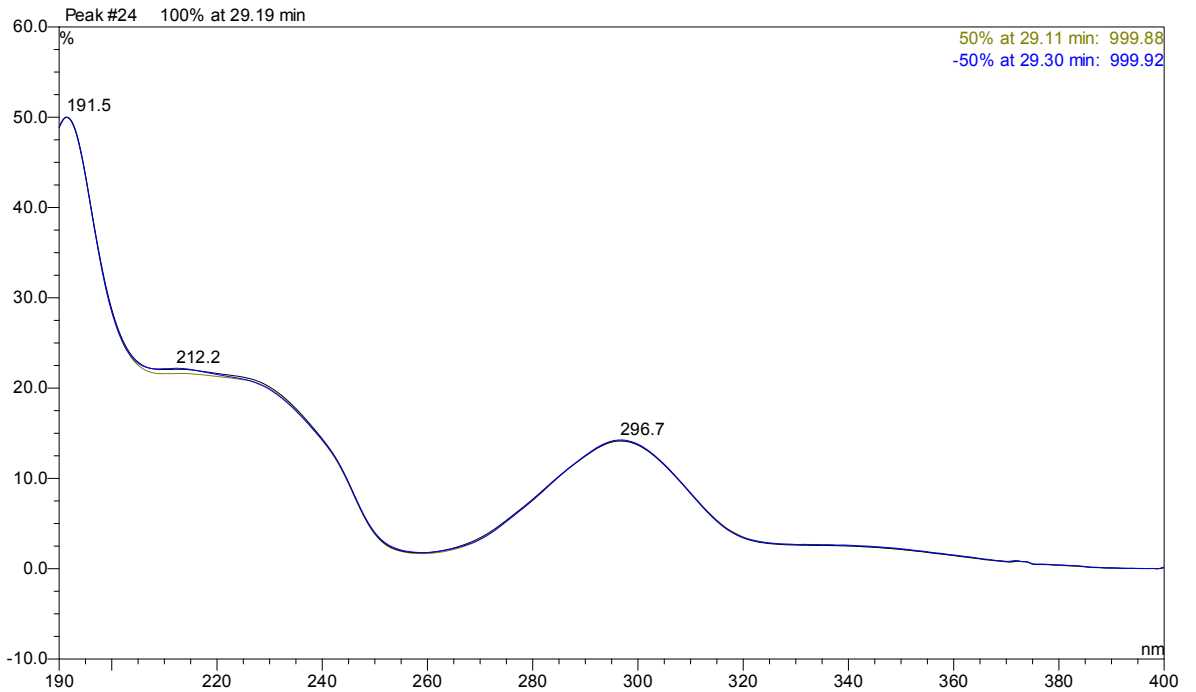
Ek 7. *Humulus lupulus* L. Metanol (kademeli) özütü % 100 metanol SPE ayrımının HPLC-UV'de 13,39. dakikada toplanan ayrımın UV-VIS spektrumu.



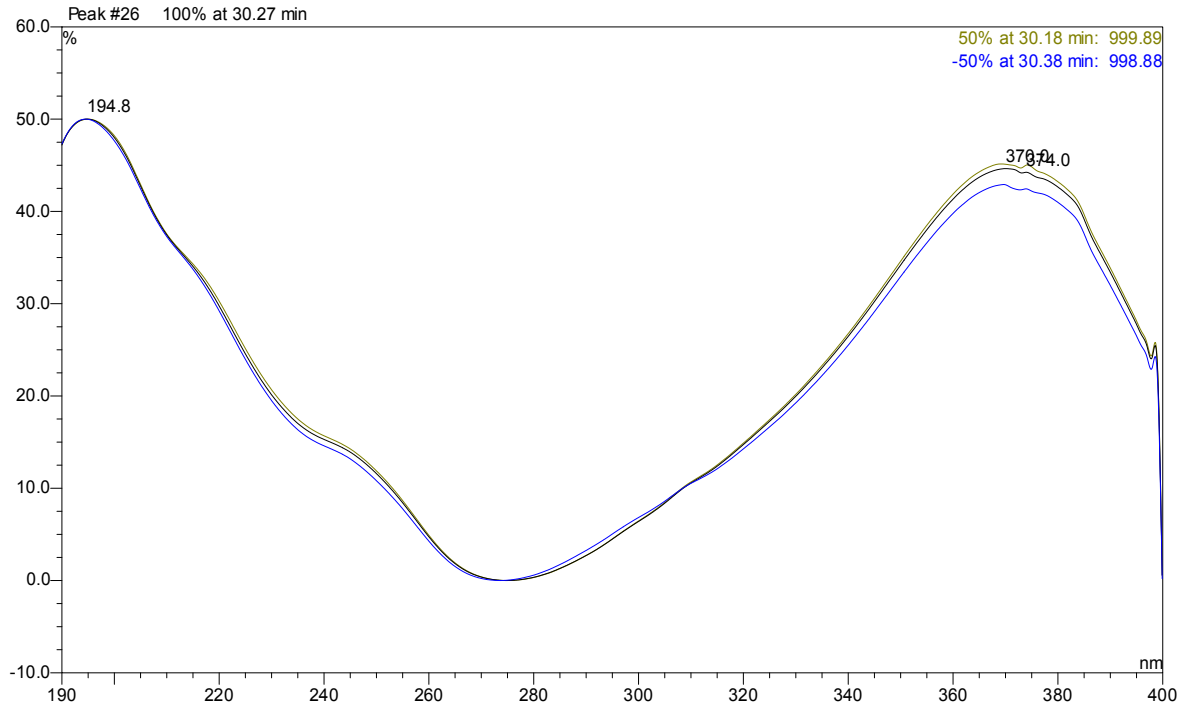
Ek 8. *Humulus lupulus* L. Metanol (kademeli) özütü % 100 metanol SPE ayrımının HPLC-UV'de 15,49. dakikada toplanan ayrımın UV-VIS spektrumu.



Ek 9. *Humulus lupulus* L. Metanol (kademeli) özütü % 100 metanol SPE ayırımının HPLC-UV'de 24,82. dakikada toplanan ayırımın UV-VIS spektrumu.

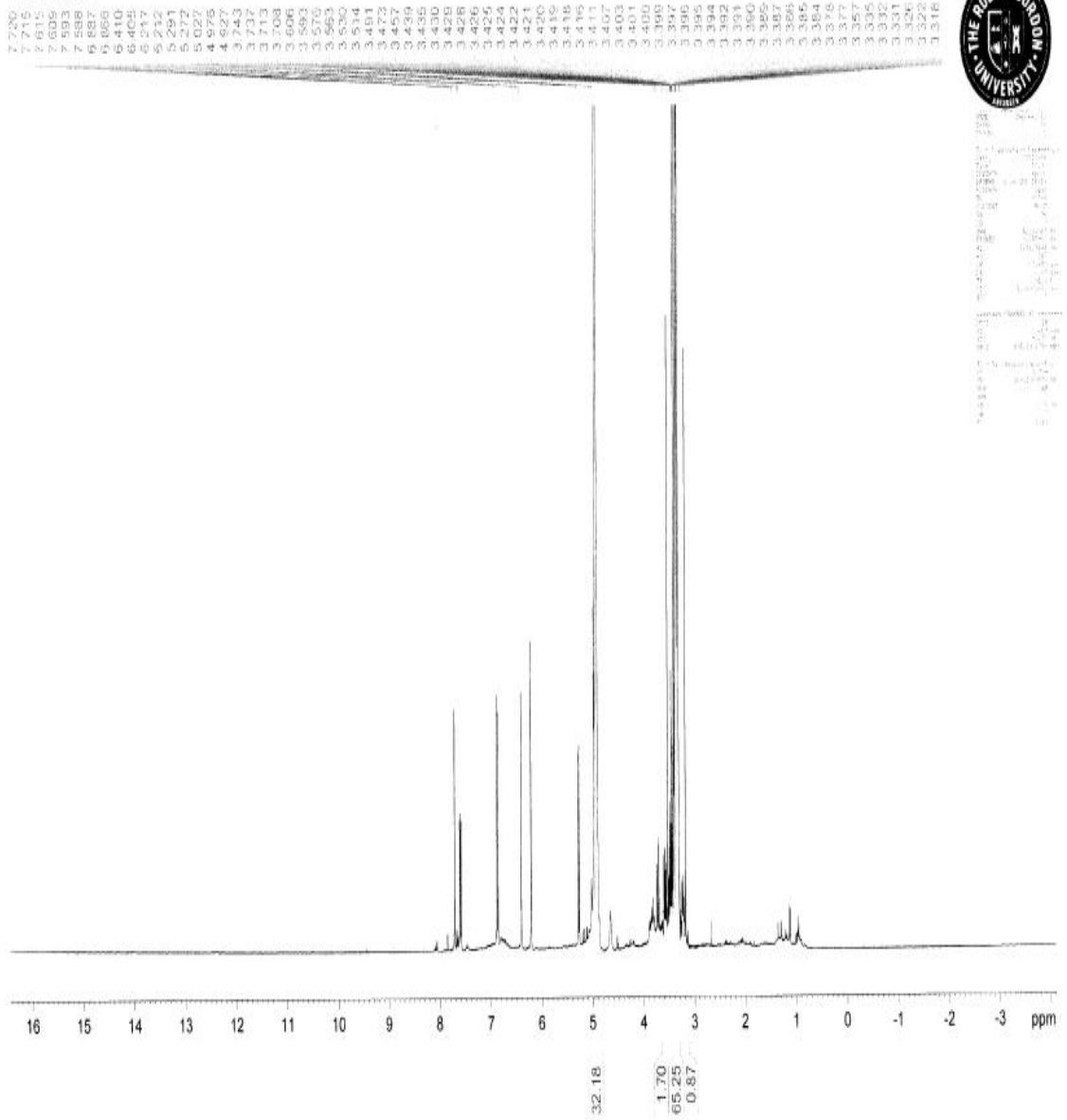


Ek 10. *Humulus lupulus* L. Metanol (kademeli) özütü % 100 metanol SPE ayırımının HPLC-UV'de 29,19. dakikada toplanan ayırımın UV-VIS spektrumu.

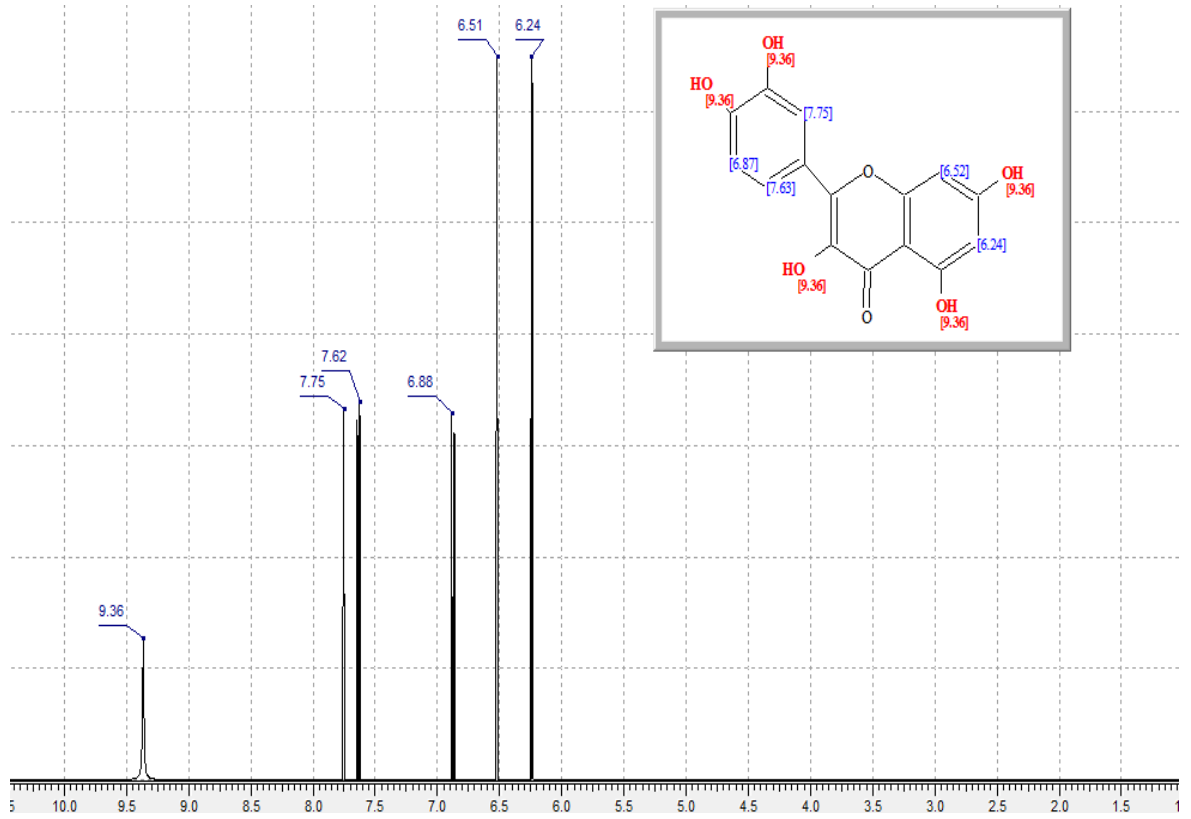


Ek 11. *Humulus lupulus* L. Metanol (kademeli) özütü % 100 metanol SPE ayırımının HPLC-UV'de 30,27. dakikada toplanan ayırımın UV-VIS spektrumu.

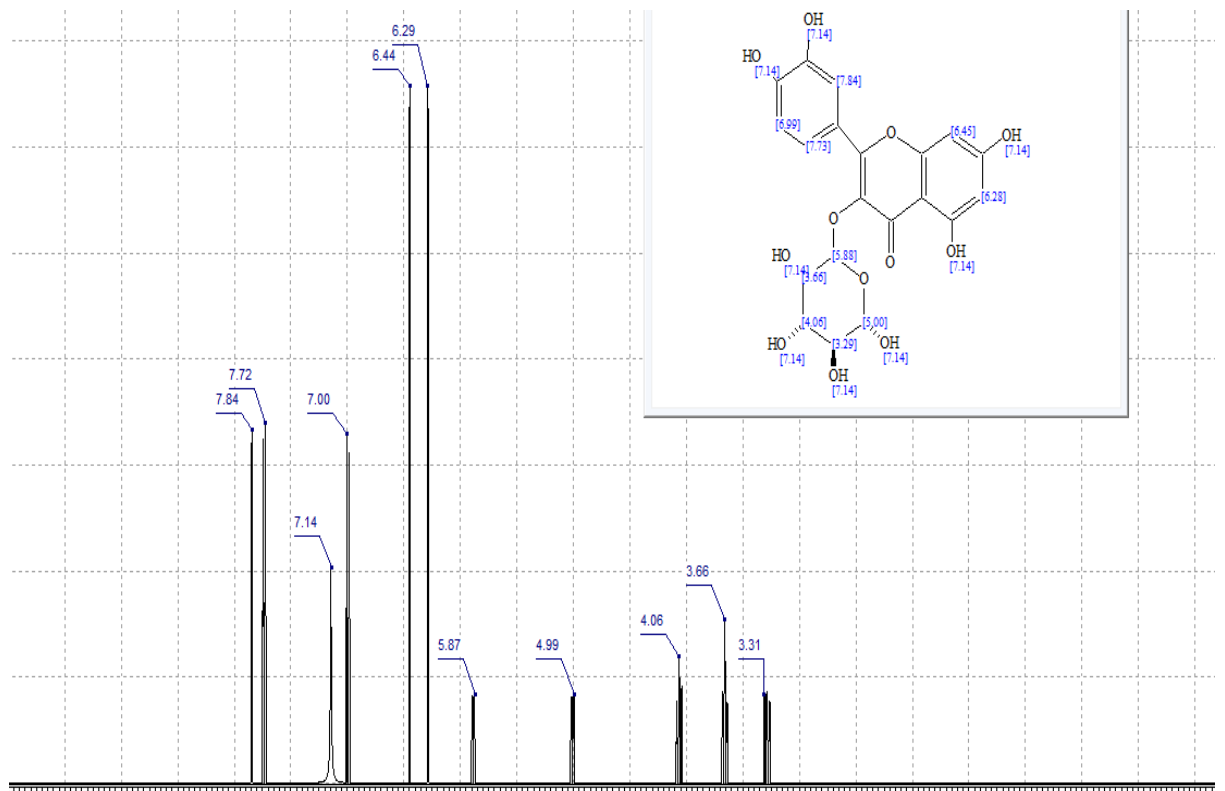
HL\_YK\_C1



Ek 12. Kersetin glukozit bileşigine ait <sup>1</sup>H-NMR spektrumu.

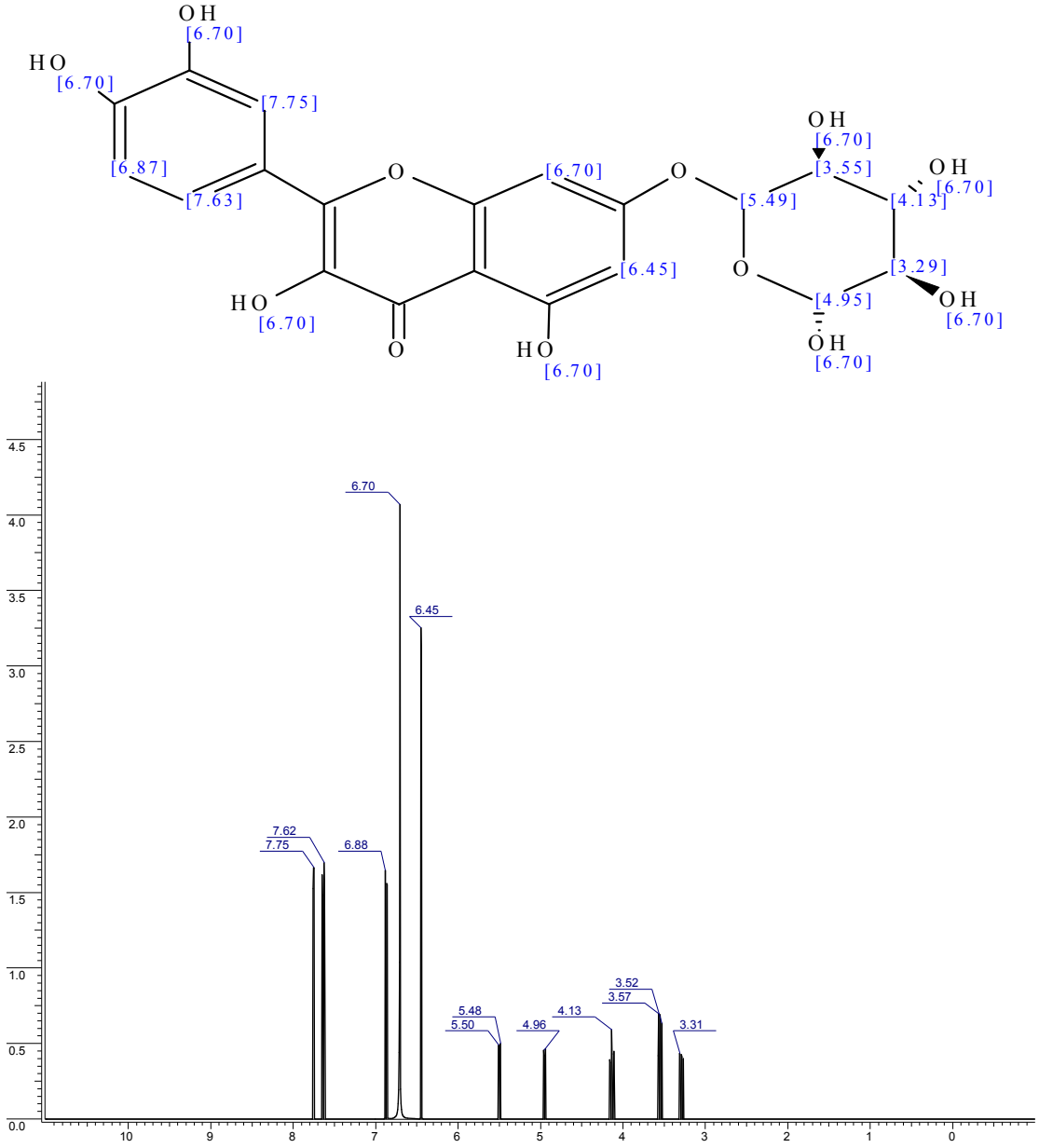


Ek 13. Kersetin için hesaplanan teorik  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu.

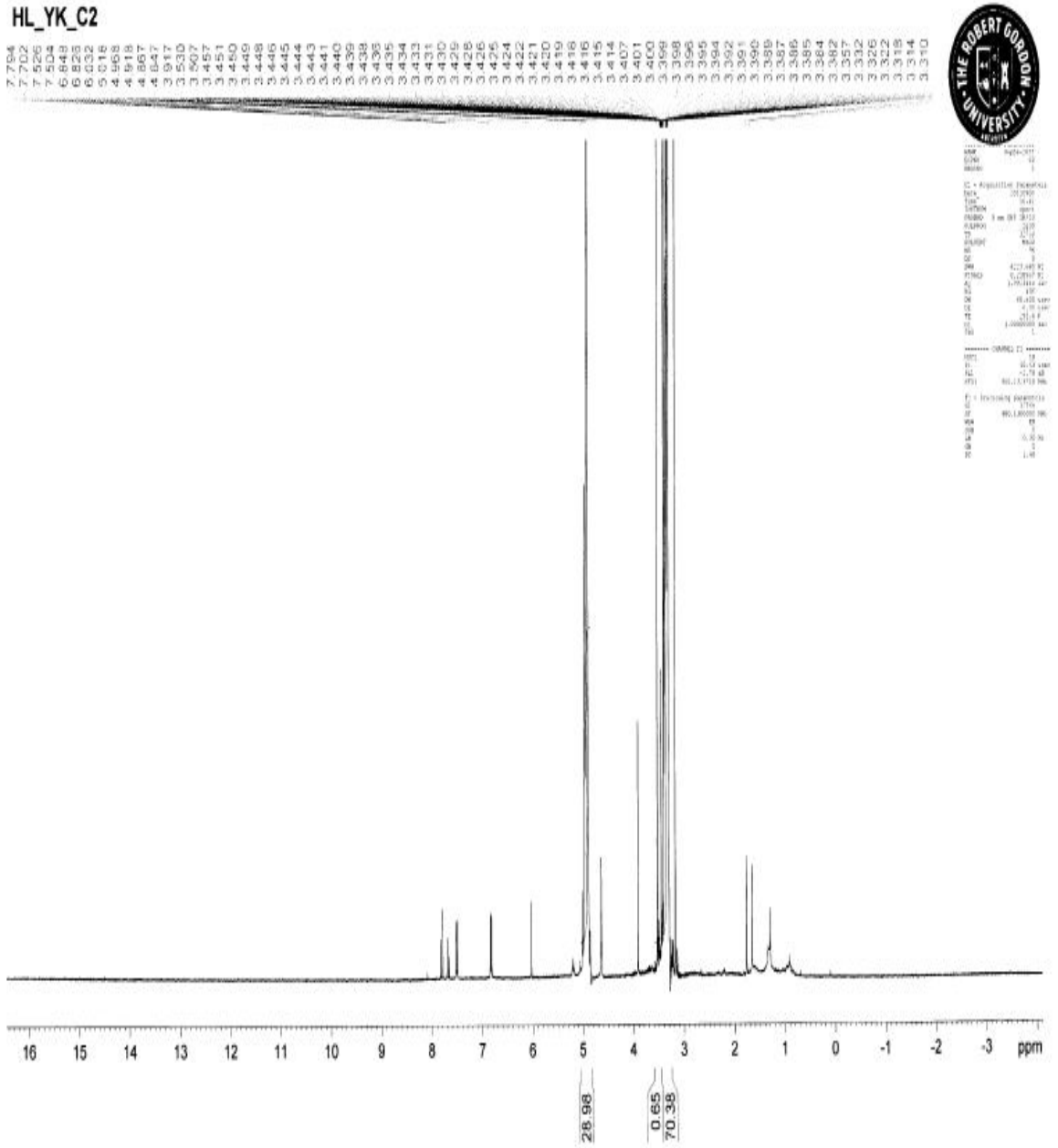


Ek 14. Kersetin-3-O-glukoze için hesaplanan teorik  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu.

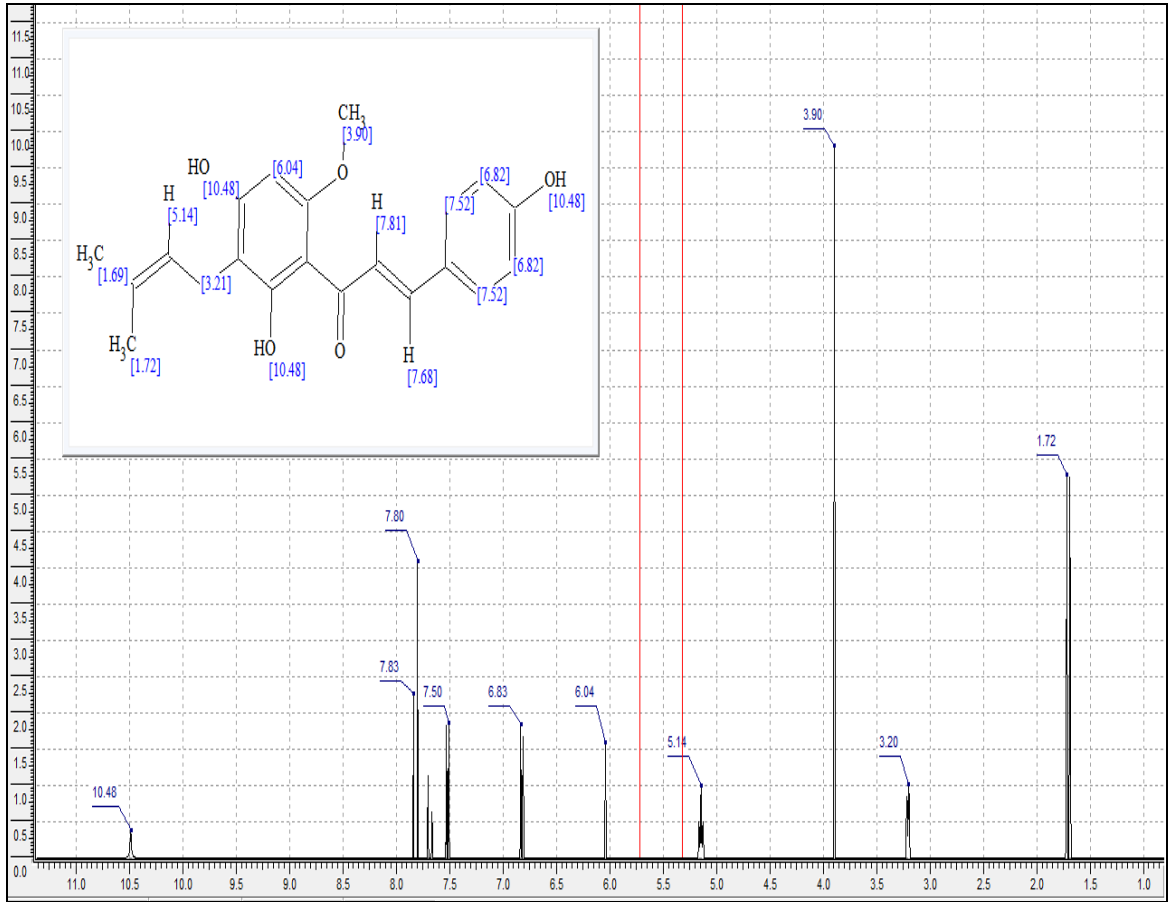




Ek 15. Kersetin-7-O-glukozit için hesaplanan teorik <sup>1</sup>H-NMR spektrumu.

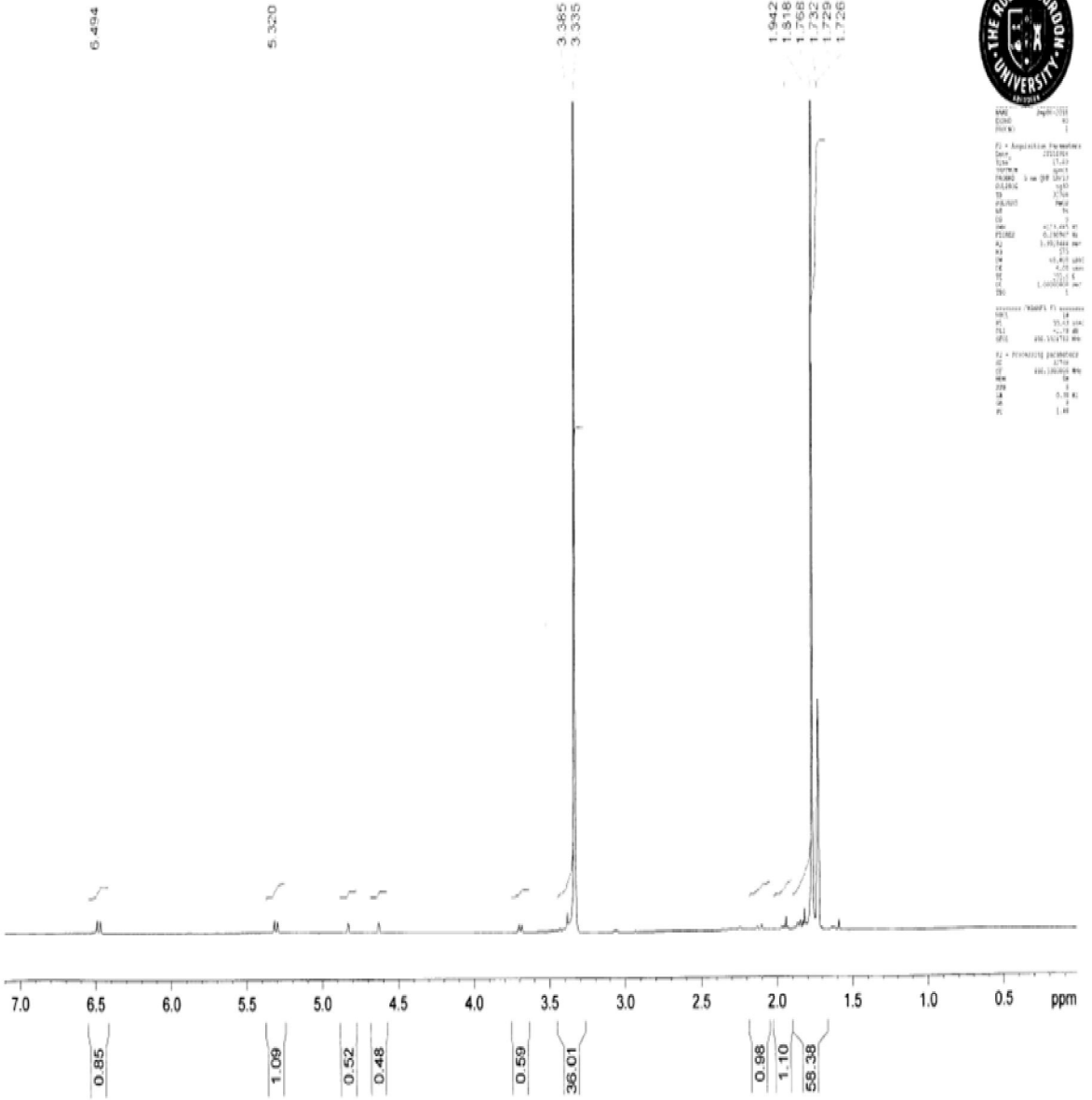


Ek 16. Ksanthohumol türevi  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu.

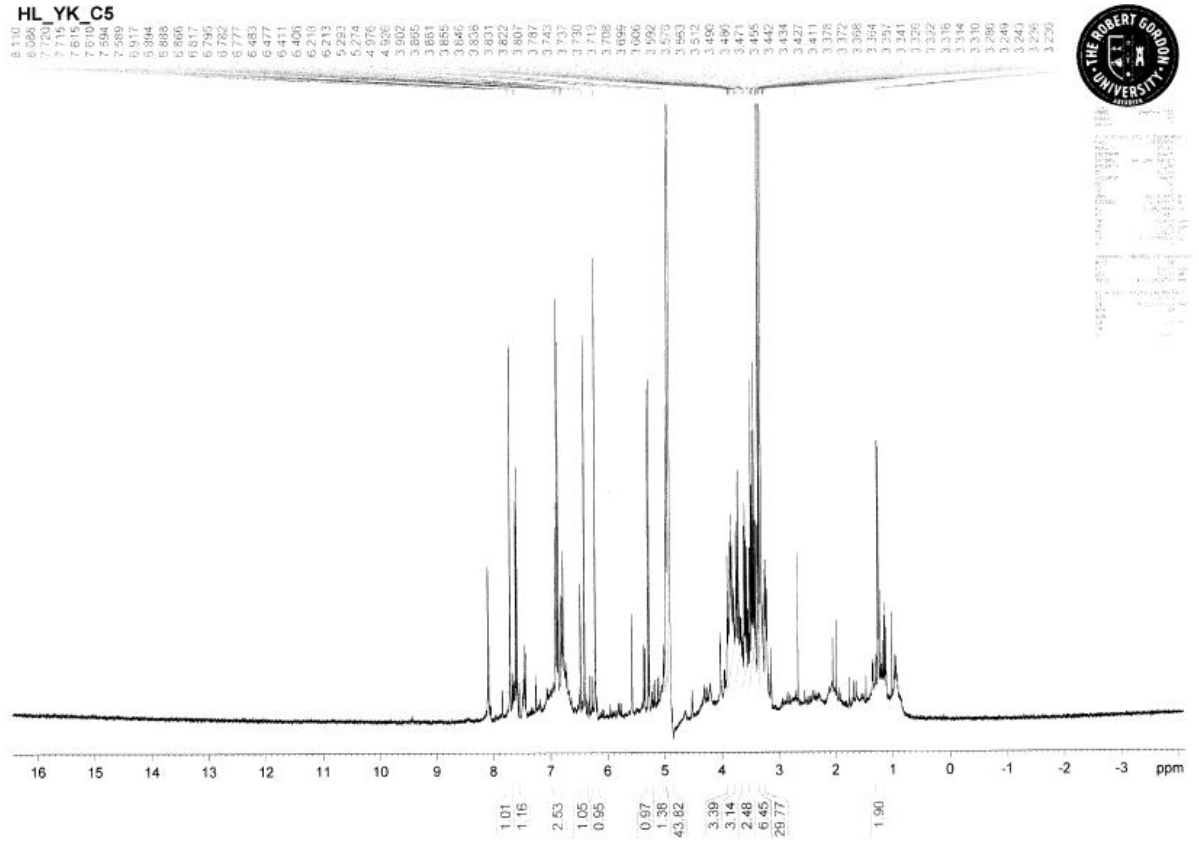


Ek 17. Ksanthohumol türevi için hesaplanan teorik  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu.

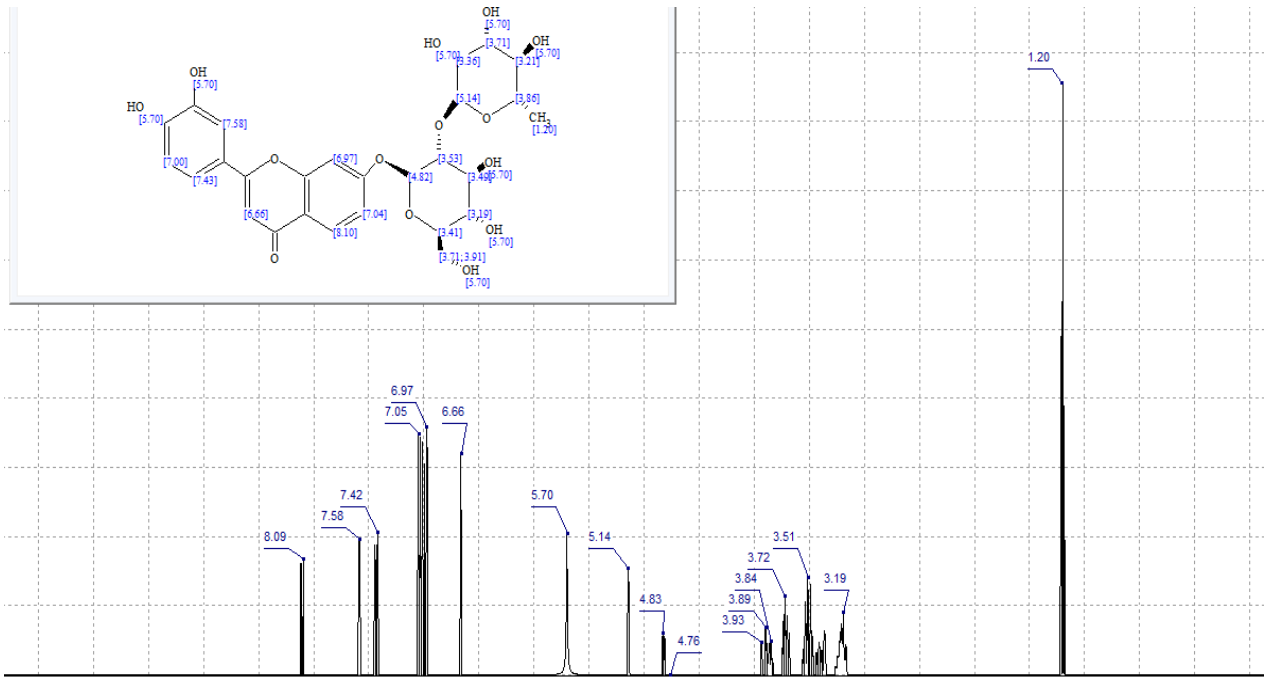
HL\_YK\_C4



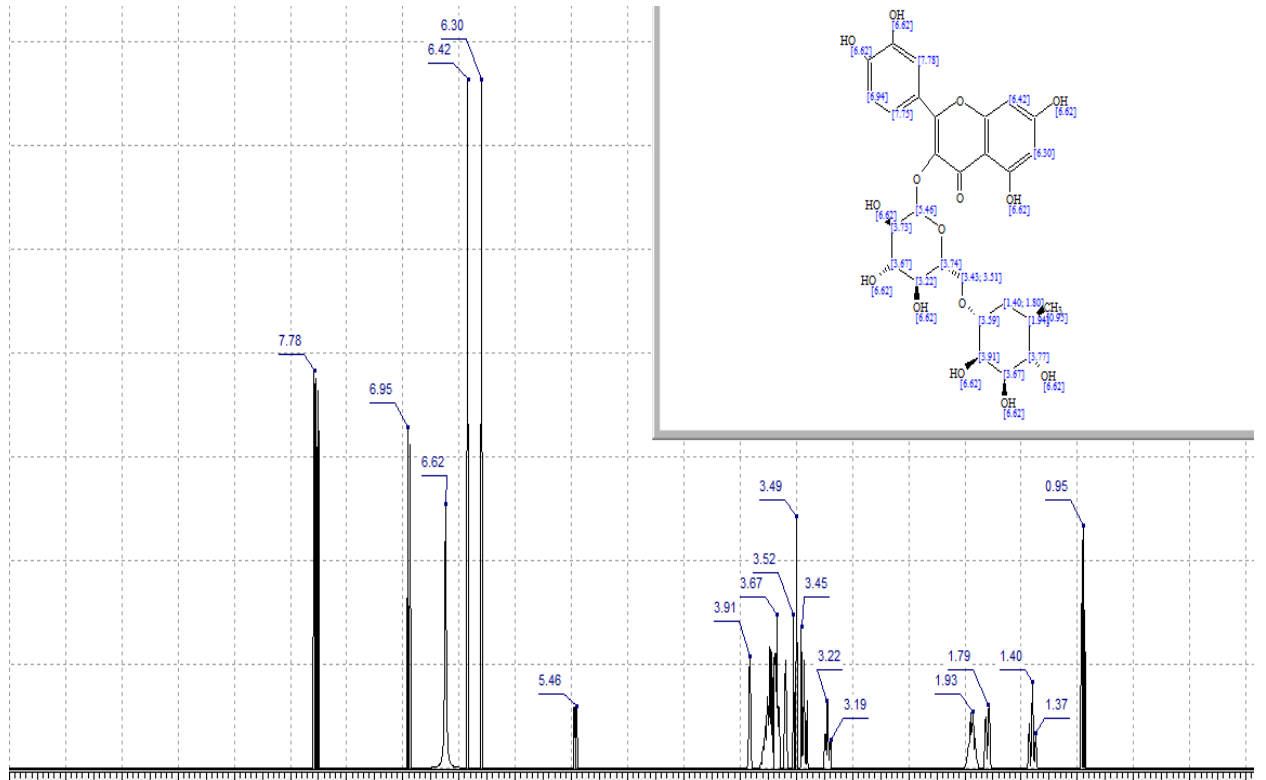
EK 18. 3-Hidroksiflavanon türevi bileşiğine ait  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu.



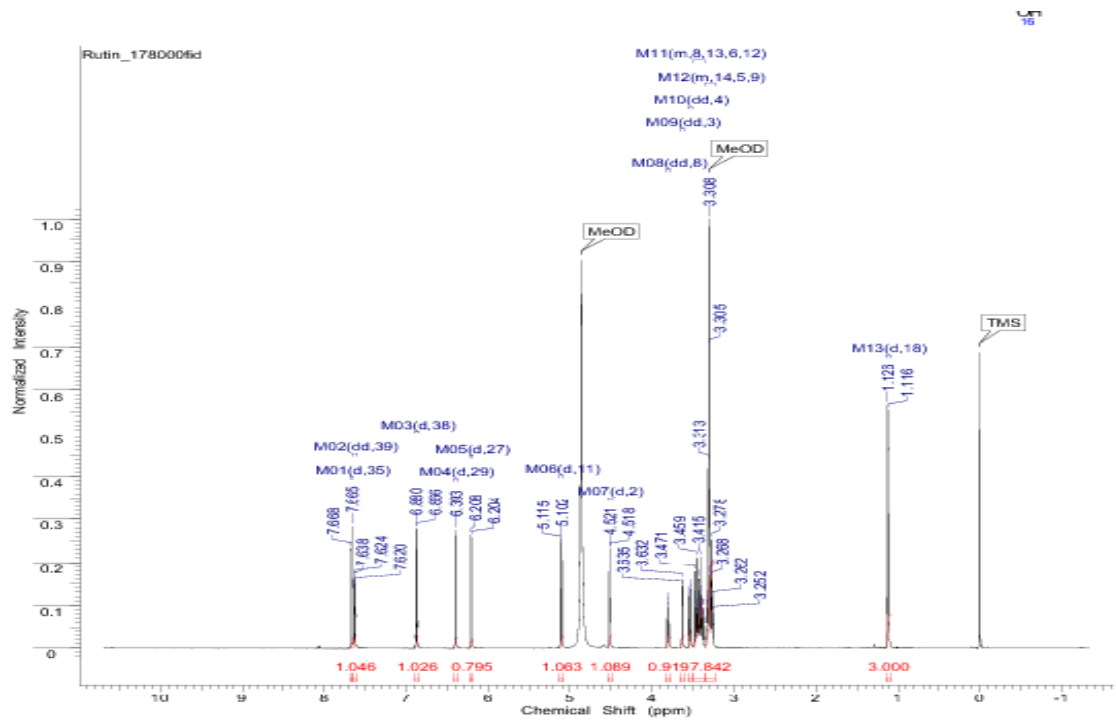
Ek 19. Temel bileşeni rutin olan karışımın  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu.



Ek 20. Rutin bileşiğine C7'de şeker halkası bağlı iken hesaplanan teorik  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu.

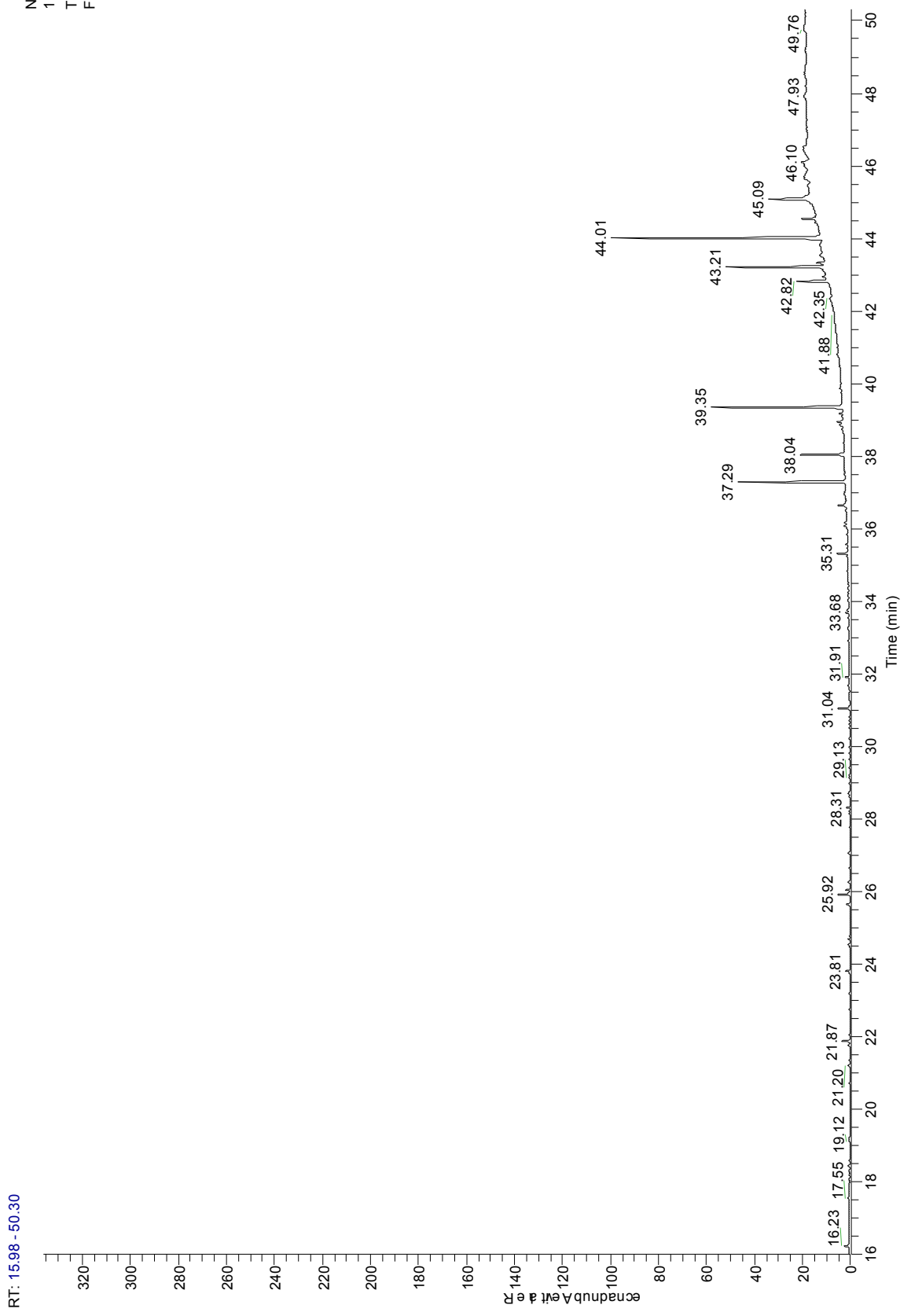


Ek 21. Rutin bileşğine C3'te şeker halkası bağlı iken hesaplanan teorik  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu.



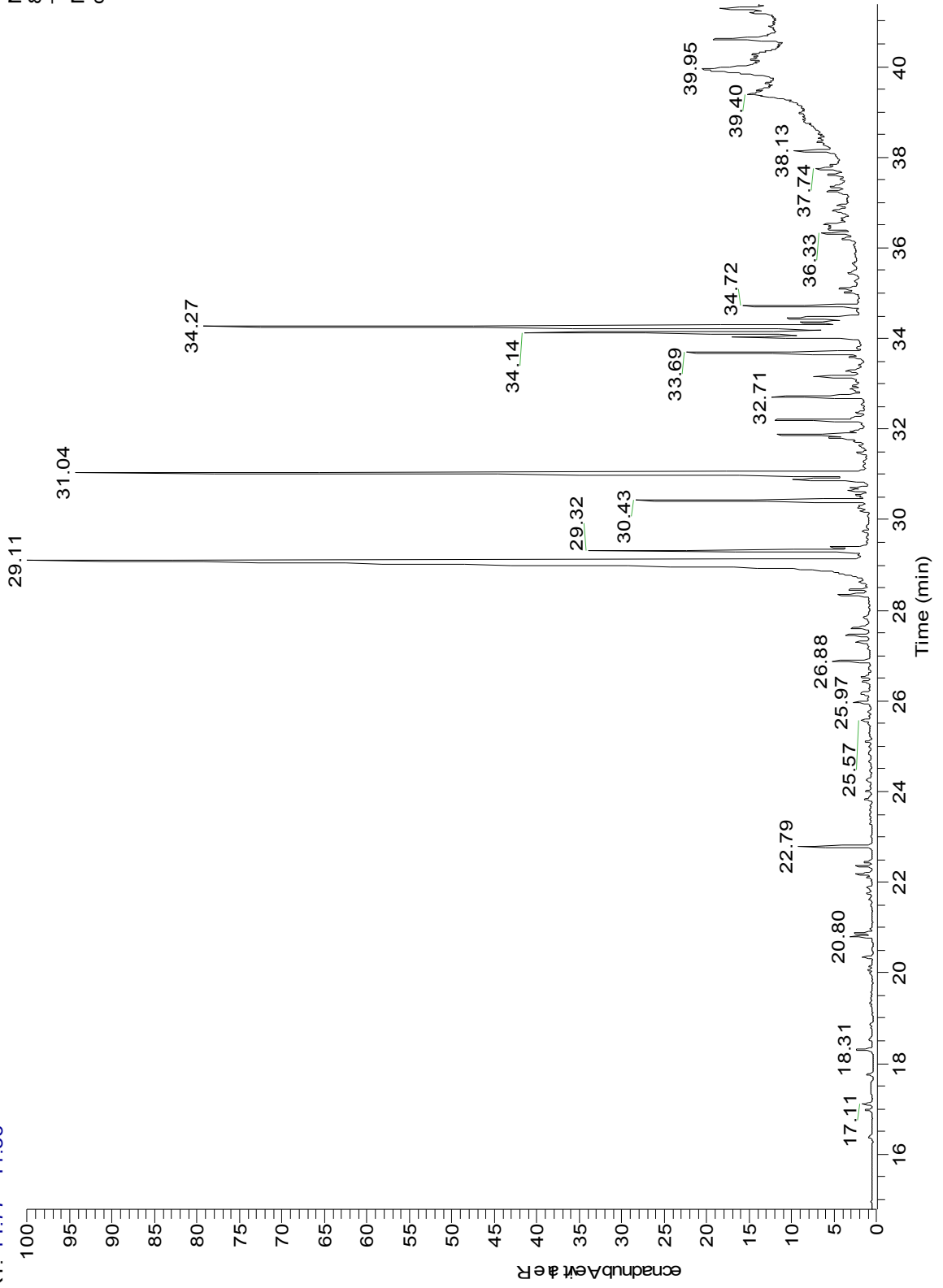
Ek 22. Rutin bileşğine ait  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu.

NL:  
1.44E9  
TIC MS  
F10-4



Ek 23. F10 ayırımı GC-MS kromatogramı

RT: 14.77 - 41.36

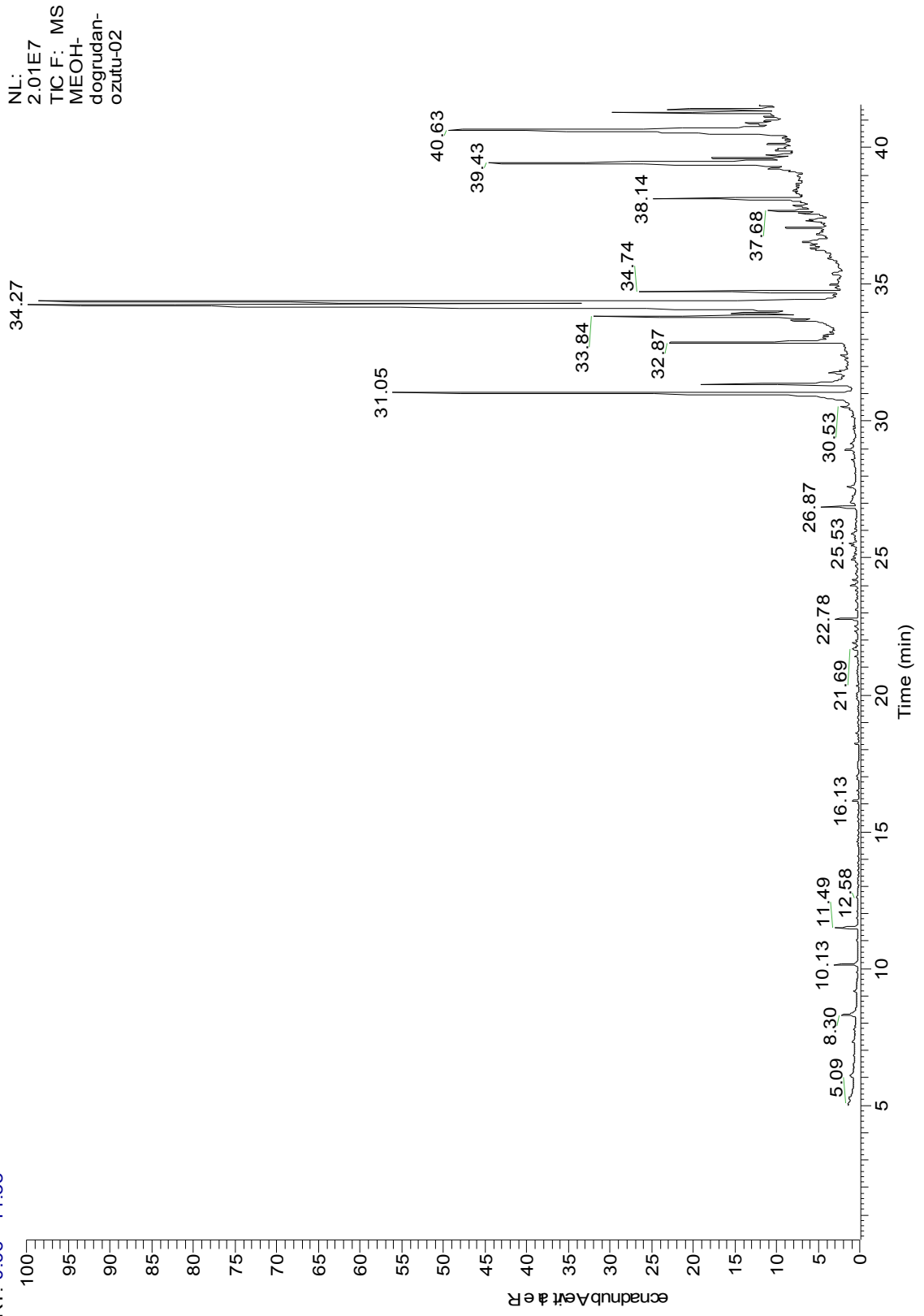


NL: 8.41E6  
TIC F: MS  
MEOH-ozutu-02

Ek 24. Metanol (maserasyon) özütü GC-MS kromatogramı

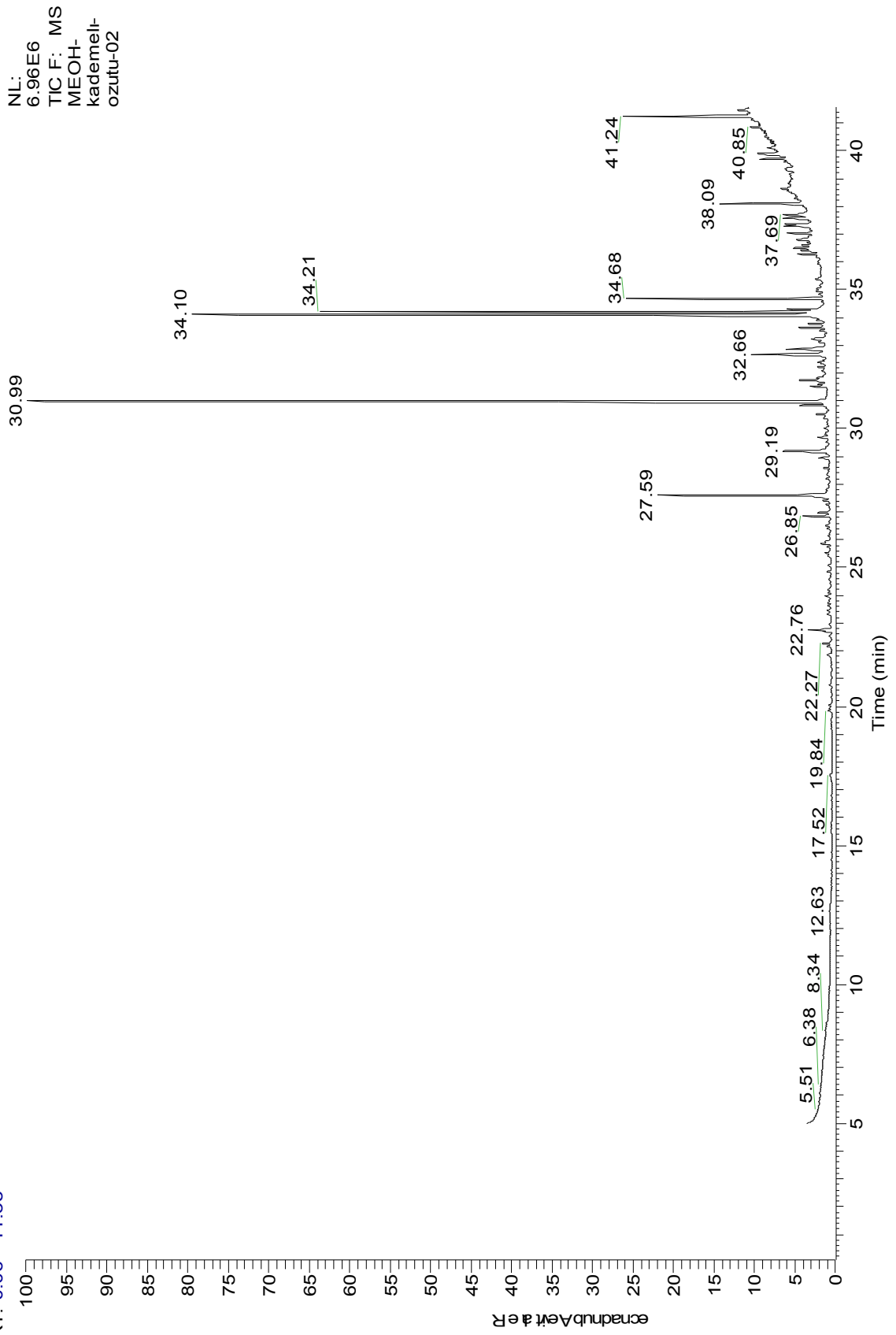


RT: 0.06 - 41.55

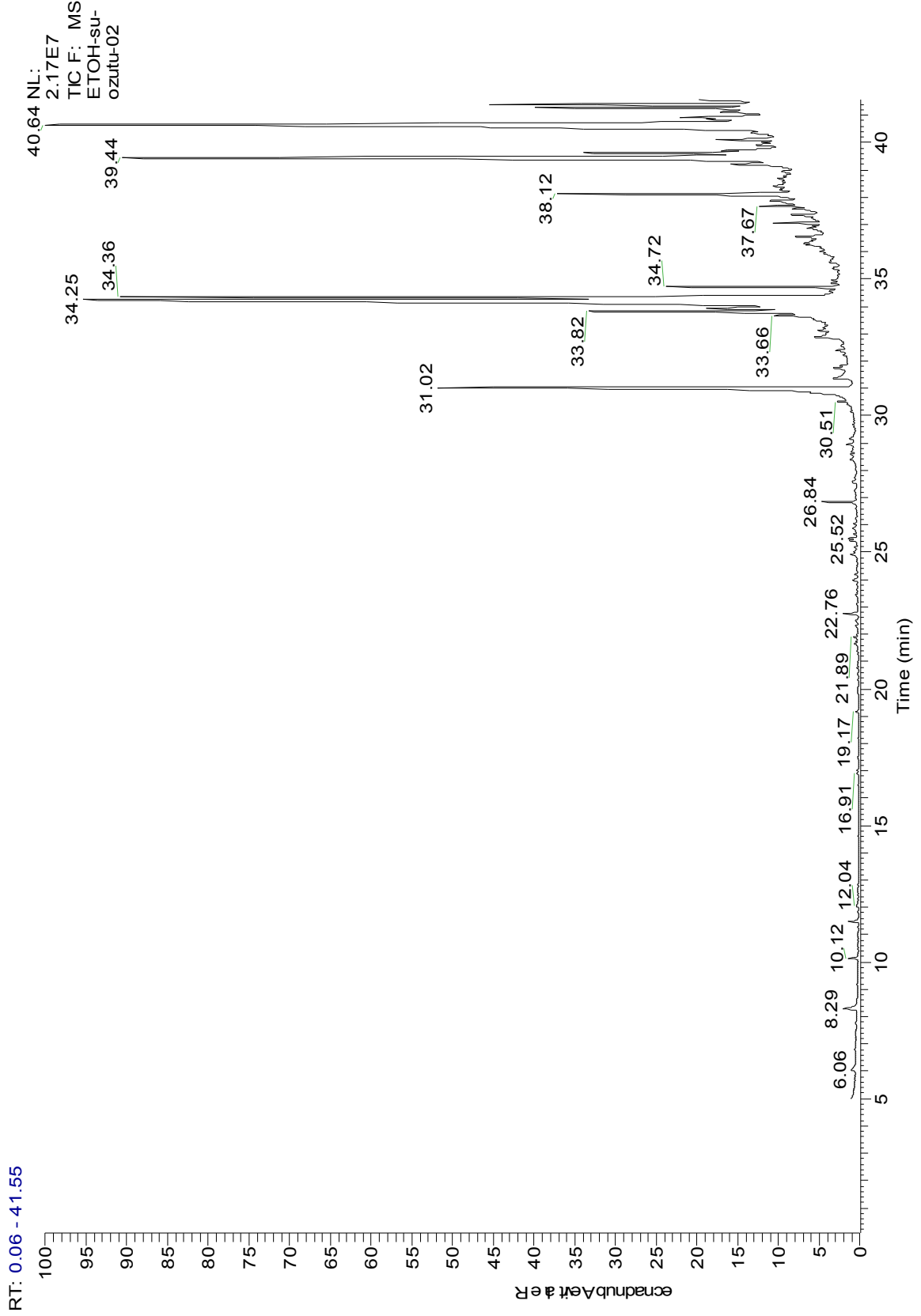


Ek 25. Metanol (dogrudan) ozutu GC-MS kromatogramı

RT: 0.06 - 41.55

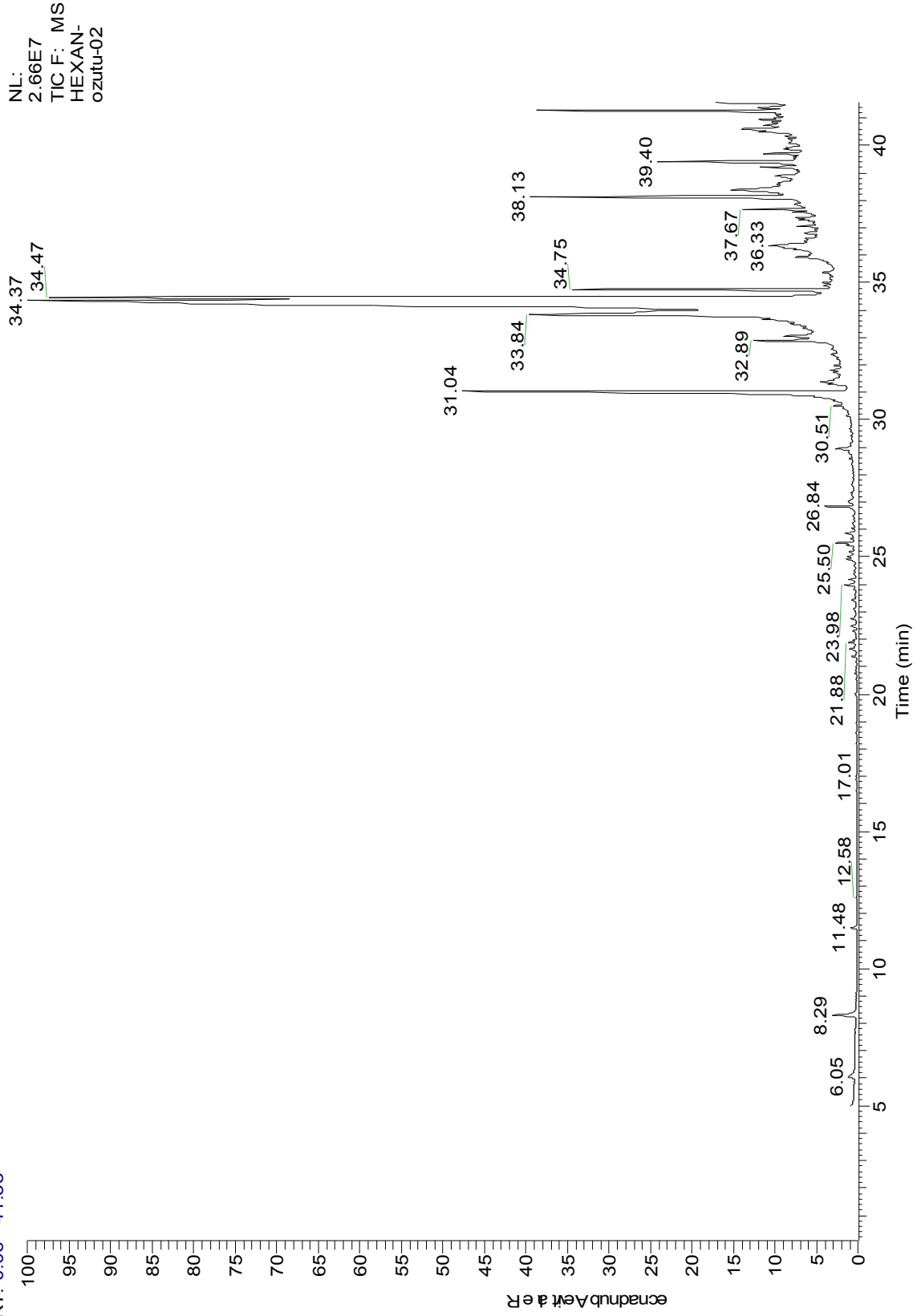


Ek 26. Metanol (kademeli) özütü GC-MS kromatogramı



Ek 27. Etanol-su özütü GC-MS kromatogramı

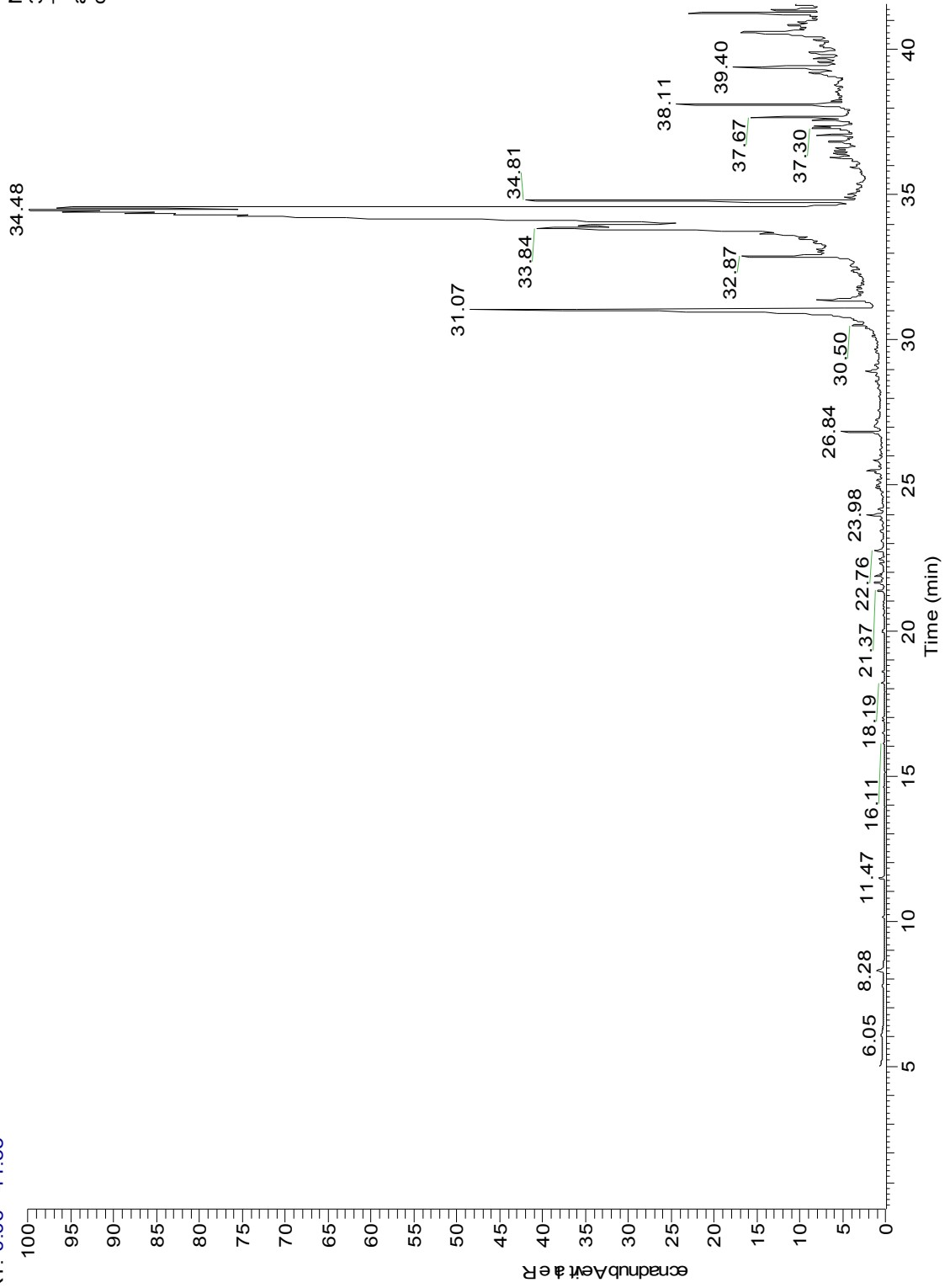
RT: 0.06 - 41.55



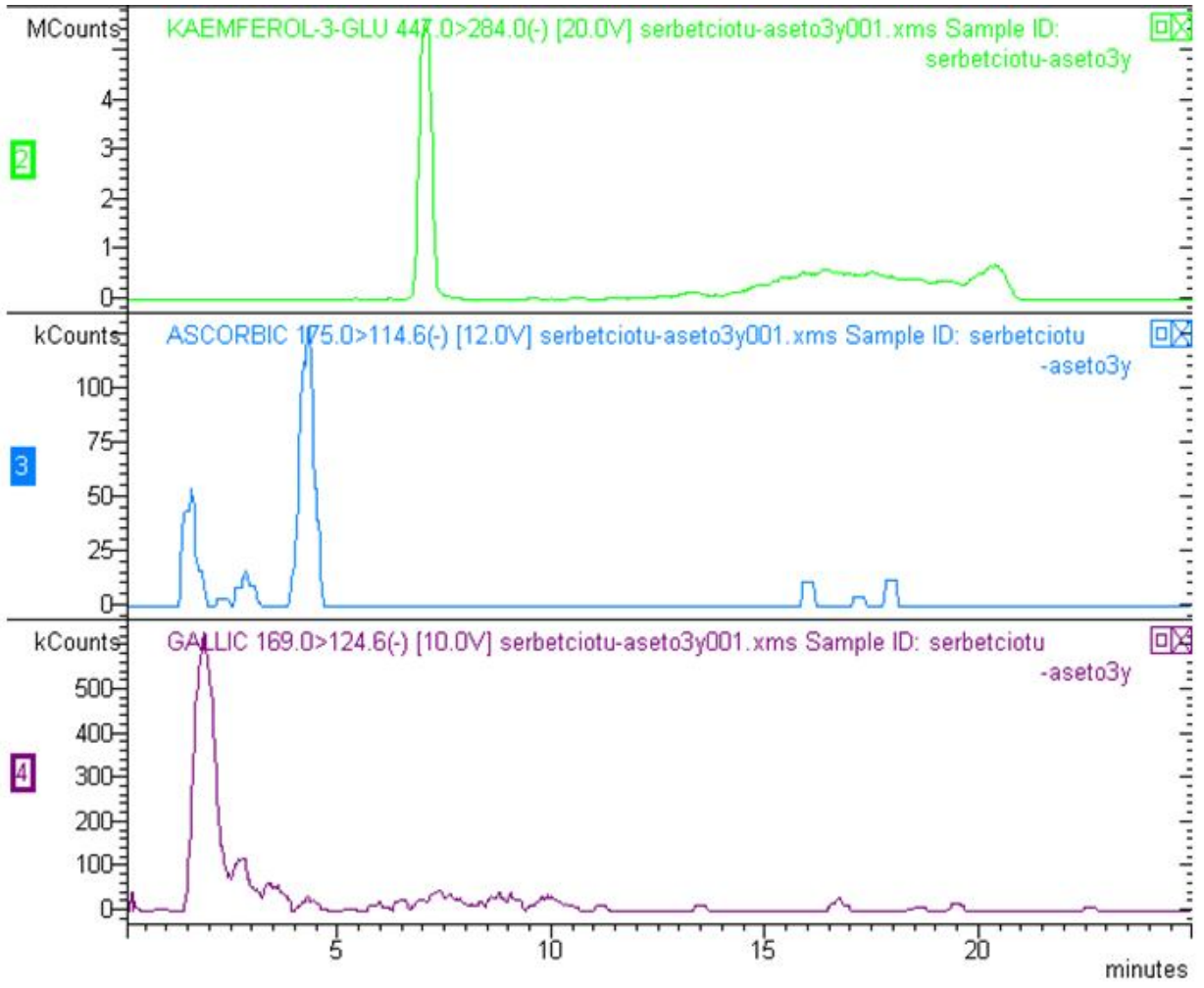
Ek 28. Hekzan özütü GC-MS kromatogramı

RT: 0.06 - 41.55

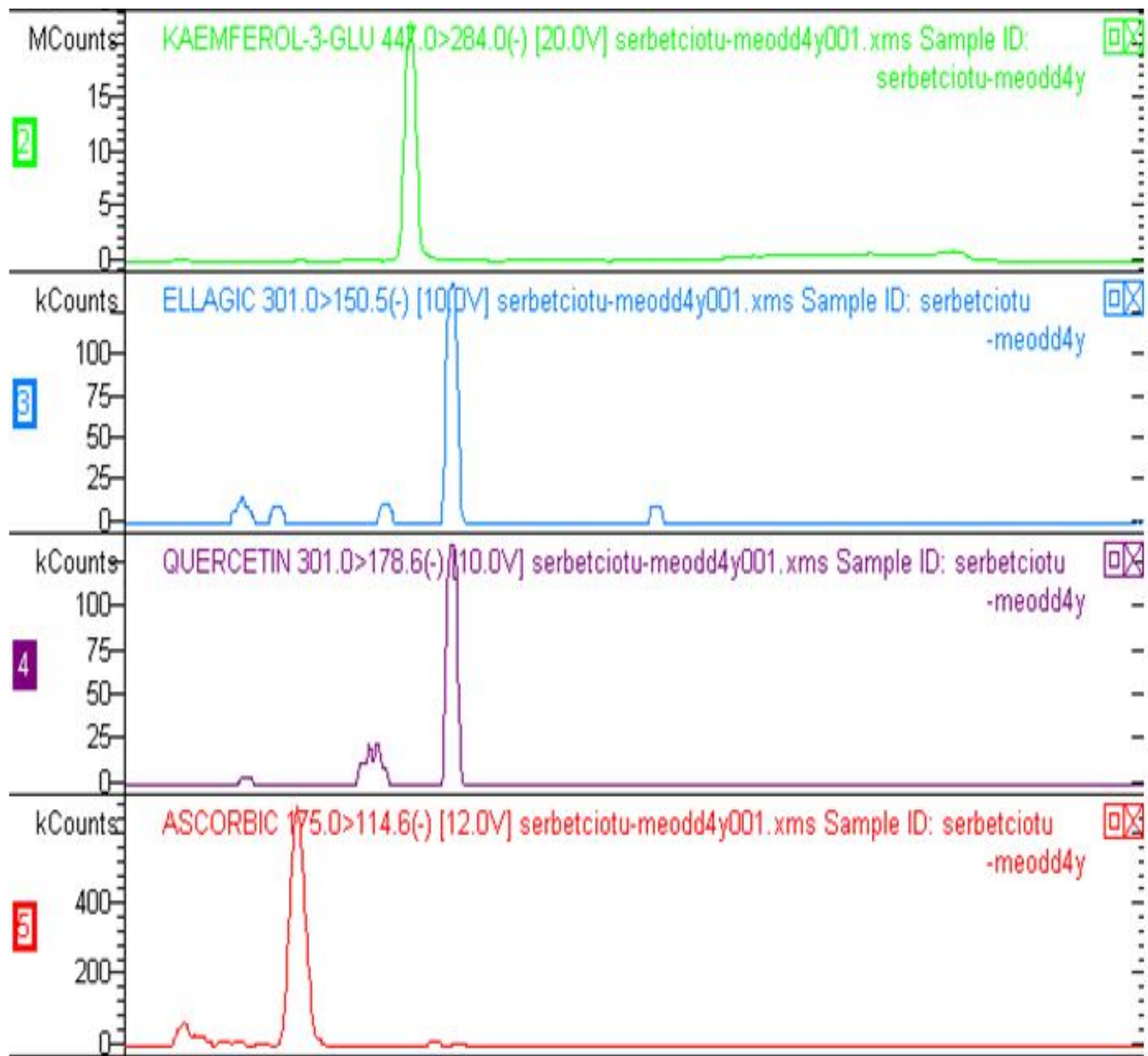
NL:  
3.21E7  
TIC F: MS  
aseton-  
ozutu-02



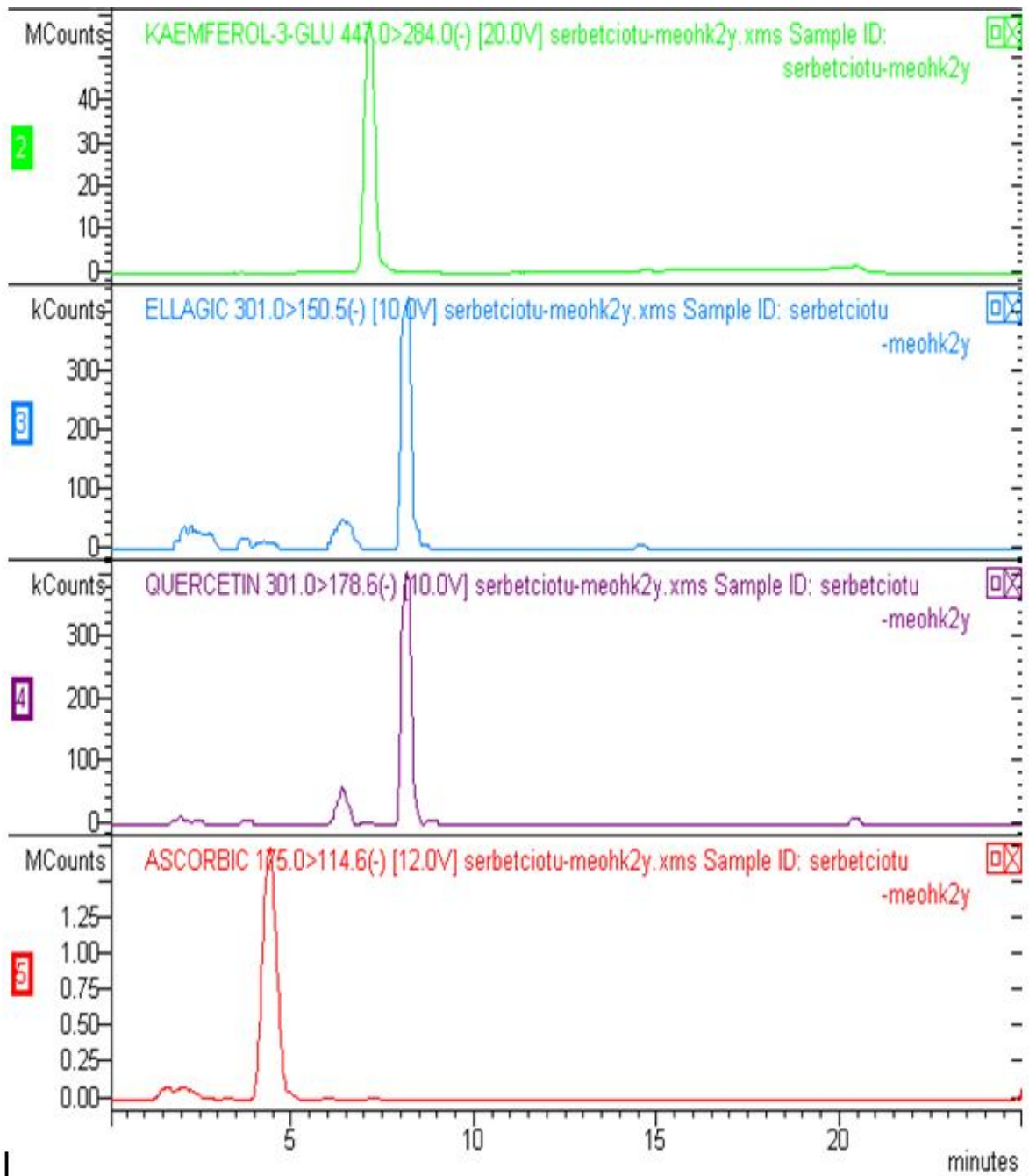
Ek 29. Aseton GC-MS kromatogramı



Ek 30. Aseton özütü LC-MS kromatogramı.

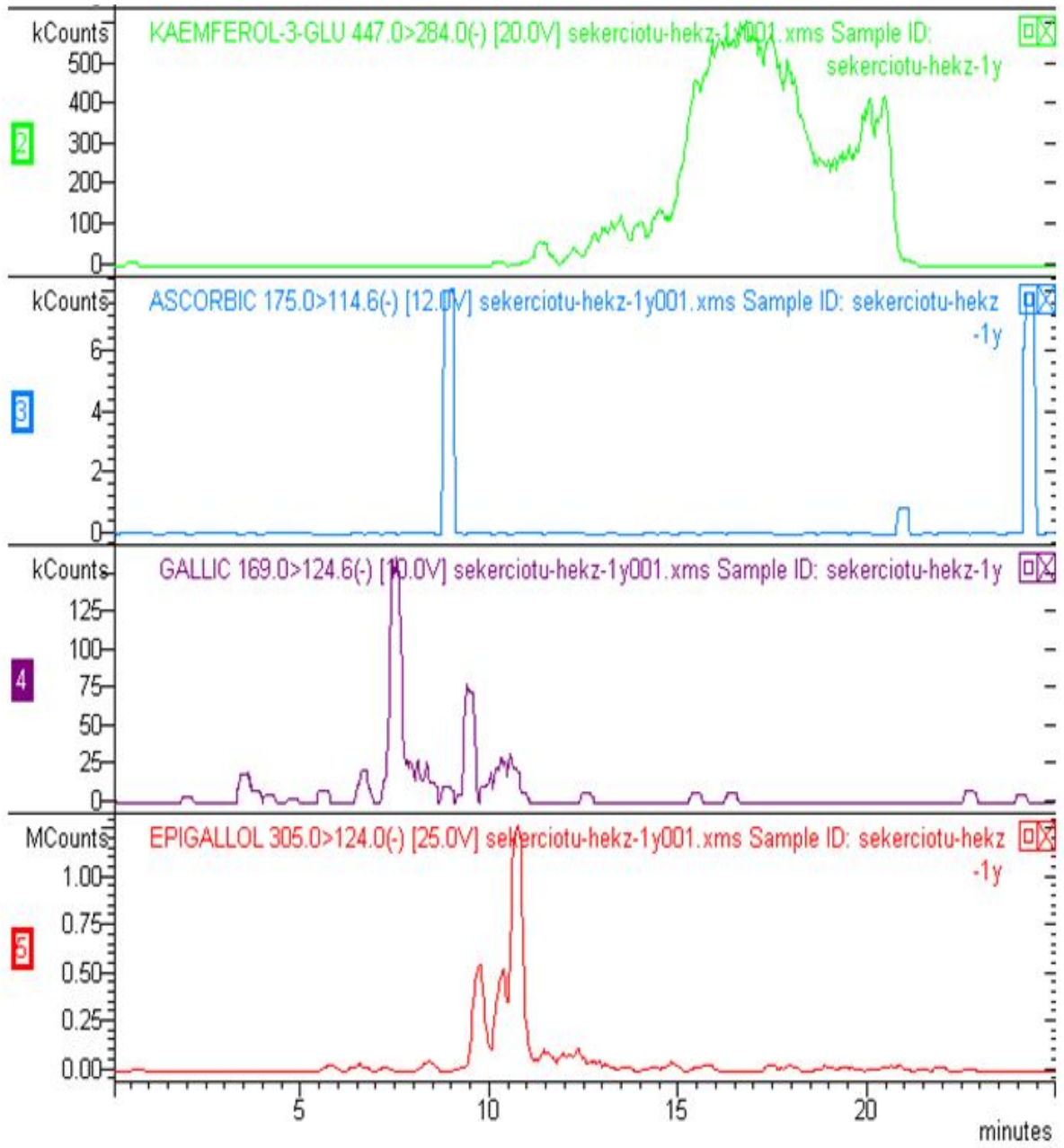


Ek 31. Metanol (doğrudan) özütü LC-MS kromatogramı.

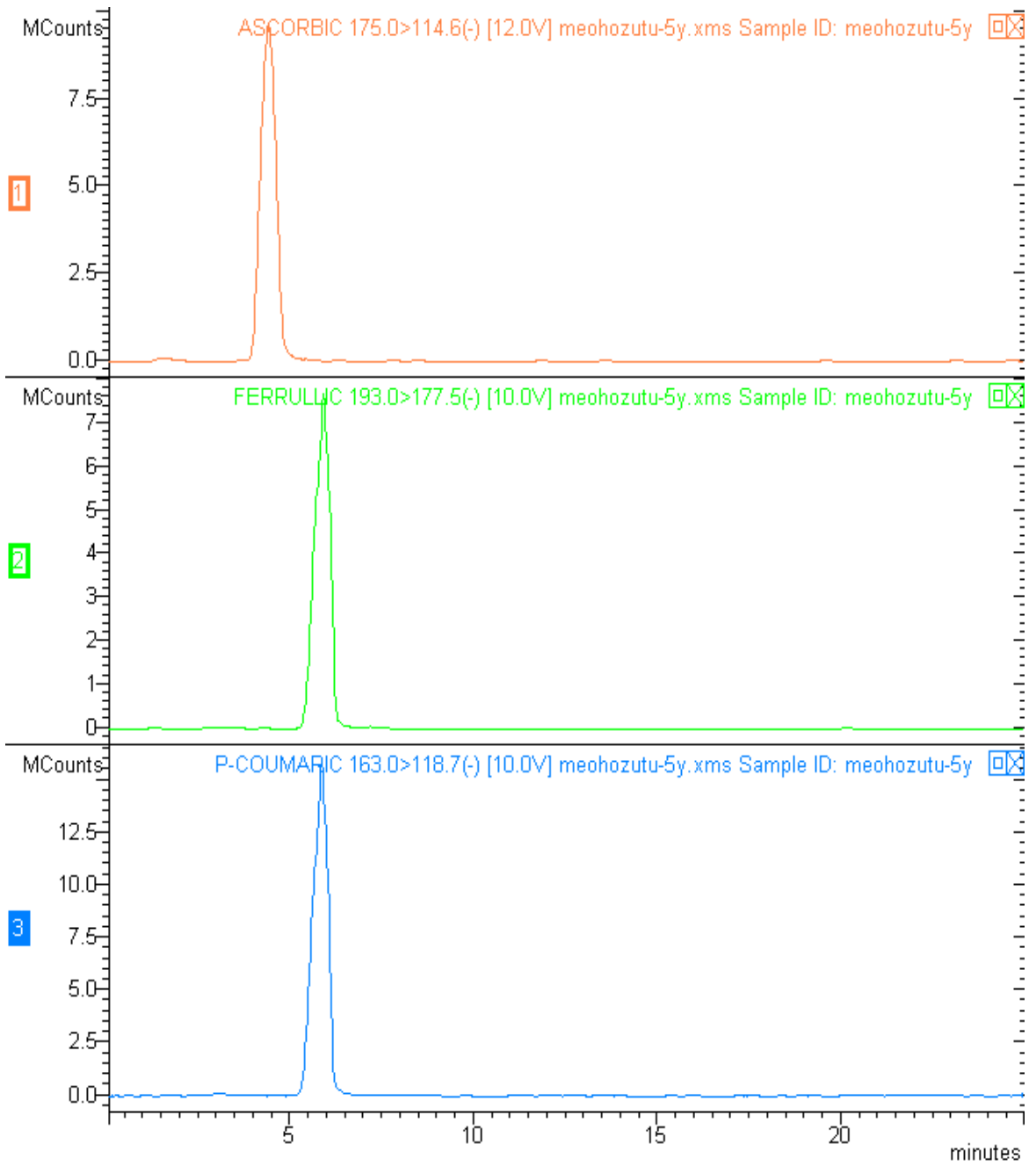


Ek 32. Metanol (kademeli) özütü LC-MS kromatogramı.

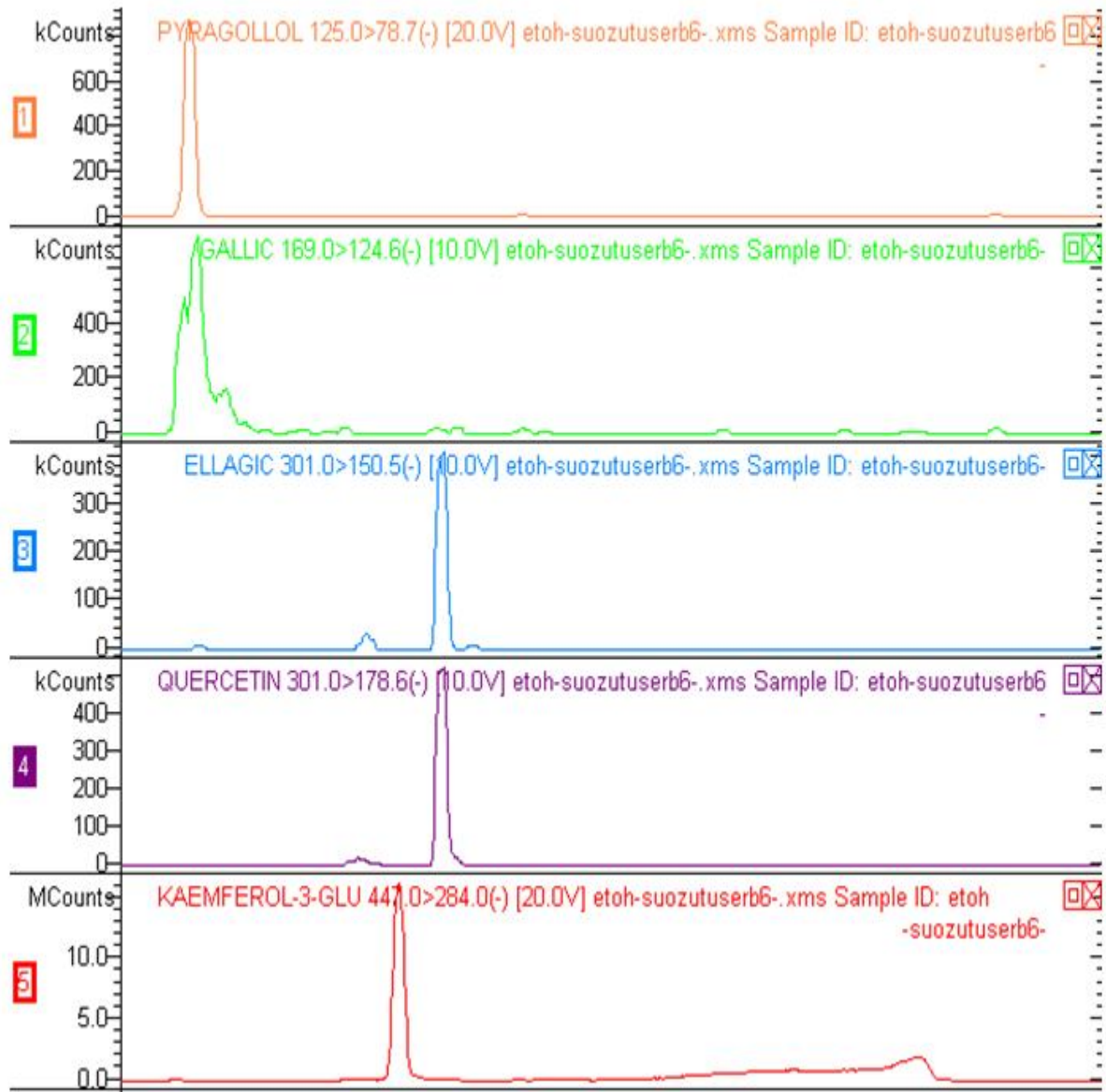




Ek 33. Hekzan özütü LC-MS kromatogramı.



Ek 34. Metanol (maserasyon) özütü LC-MS kromatogramı.



Ek 35. Etanol-su özütü LC-MS kromatogramı.

## ÇİZELGELER

### Sayfa No

Çizelge 1. Flavonoidlerin kolon kromatografisinde kullanılan çözücüleri ve oranları.....	16
Çizelge 2. Preparatif ince tabaka kromatografisinde kullanılan çözücü sistemleri.....	17
Çizelge 3. Proteazlar ve özel kromojenik substratları.....	26
Çizelge 4. Kozalak örneği aktif özütleri ve özütlerden elde edilen miktarları.....	50
Çizelge 5. Kozalak hekzan numunesi 0,01-0,001 mg/mL derişim aralıının % 51 inhibisyonu için hazırlanan örneklerin miktarları.....	52
Çizelge 6. Düşük basınç kromatografisi sonrası elde edilen karışım halindeki katıların miktarları.....	55
Çizelge 7. Farklı özüt derişimlerine uygulanan enzim ve substrat hacimleri.....	58
Çizelge 8. 517 nm de soğurmaları ölçülen özütlerin eşitlik (1.18)'den hesaplanan % inhibisyon değerleri.....	69
Çizelge 9. Ferulik asit derişimleri ve 725 nm'de ölçülen soğurmaları.....	80
Çizelge 10. Şerbetçi otu özütlerinin toplam fenolik bileşen miktarları.....	81
Çizelge 11. Özütlerin CUPRAC yöntemine göre doğru denklemleri, molar soğurmaları ve QREFC (kersetin eşdeğeri flavonoid derişimi) değerleri.....	93
Çizelge 12. Eklenen troloks miktarı ve % inhibisyonları.....	96
Çizelge 13. Hekzan özüt çözeltisi (1 mg/mL)'nden eklenen miktar ve % inhibisyonları..	97
Çizelge 14. Aseton özüt çözeltisi (1 mg/mL)'nden eklenen miktar ve % inhibisyonları....	98
Çizelge 15. Aseton sonrası metanol özüt çözeltisi (1 mg/mL)'nden eklenen miktar ve % inhibisyonları.....	99
Çizelge 16. Metanol (kademeli) özüt çözeltisi (1 mg/mL)'nden eklenen miktar ve % inhibisyonları.....	100
Çizelge 17. Metanol (doğrudan) özüt çözeltisi (1 mg/mL)'nden eklenen miktar ve % inhibisyonları.....	101
Çizelge 18. Etanol-su özüt çözeltisi (1 mg/mL)'nden eklenen miktar ve % inhibisyonları.....	102

Çizelge 19. Şerbetçi otu özütlerinin TEAC değerleri (mM Troloks/g özüt). .....	103
Çizelge 20. Şerbetçi otu özütlerinin TEAC <sub>ABTS</sub> değerleri .....	104
Çizelge 21. Özütlerin FRAP değerleri (mM FeSO <sub>4</sub> /g özüt). .....	106
Çizelge 22. F10-26 ayırımı için uygulanan GC-MS analizi ile tanımlanan bileşikler, alıkonma zamanları ve bölgeleri (%). .....	114
Çizelge 23. Ham özütler için uygulanan GC-MS analizi ile tanımlanan bileşikler. ....	116
Çizelge 24. Ham özütlere uygulanan LC-MS analizlerinden tanımlanan bileşikler ... .	118
Çizelge 25. Örneklerin $\alpha$ -kimotripsin enzimi ile % inhibisyon değerleri. ....	122
Çizelge 26. Örneklerin papain enzimi ile % inhibisyon değerleri .....	123
Çizelge 27. Örneklerin tripsin enzimi ile % inhibisyon değerleri.....	123
Çizelge 28. Örneklerin tirozinaz enzimi ile % inhibisyon değerleri. ....	127
Çizelge 29. Örneklerin $\beta$ -laktamaz enzimi ile % inhibisyon değerleri .....	128

## ŞEKİLLER

### Sayfa No

Şekil 1. Bitki örneğine uygulanan katı-sıvı özütleme işleminin şematik gösterimi. ....	7
Şekil 2. Bitkilerde bol miktarda bulunan flavonoidlerin seçici özütleme yöntemiyle ayrılması.....	8
Şekil 3. Flavonoidlerin temel sınıfları ve biyosentezleri.....	12
Şekil 4. Yüksek antioksidan etkinliği ile flavonoidlerin yapısal özellikleri.....	13
Şekil 5. 3',4'-diOH flavonoidlerin antioksidan etkiye mekanizması ...	14
Şekil 6. Flavonoidlerin Öncü-yükseltgen Özelliği.....	16
Şekil 7. DPPH radikalinin antioksidan etkileşim reaksiyonu.....	20
Şekil 8. ABTS <sup>-</sup> radikalinin antioksidan ile reaksiyonu.....	21
Şekil 9. Antioksidan ile TPTZ kompleksinin oluşması.....	22
Şekil 10. CUPRAC yönteminin kromoforunu oluşturan Bis(2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) bakır(I) kelatı'nın 'Cu(I)-Nc' kimyasal yapısı.....	23
Şekil 11. Temel Enzim Sınıfları .....	25
Şekil 12. Karboksipeptidaz A ve substratı Hippuril-L-fenilalanin arasındaki tepkime....	27
Şekil 13. Kimotripsin ve substratı N-süksinik-fenil- <i>p</i> -nitroanilit arasındaki tepkime .....	27
Şekil 14. Tripsin ve substratı N-benzoil-D-L-arjinin-4-nitroanilit arasındaki tepkime....	27
Şekil 15. L-tirozinin L-DOPA ve türevlerine dönüşüm mekanizması.....	28
Şekil 16. β-laktamaz enziminin amit bağınyı hidroliz tepkimesi... ..	29
Şekil 17. <i>Humulus lupulus</i> L.....	32
Şekil 18. Cannabinaceae familyasının sınıflandırılması.....	33
Şekil 19. Hop β-asitlerinin huluponlara yükseltgenmesi. ....	35
Şekil 20. Hop acı asitlerinin kimyasal yapıları ... ..	36
Şekil 21. Hop bileşenlerinin kimyasal yapıları.....	38
Şekil 22. Hop acı asitlerinin belirgin gruplarının önemli biyolojik özellikleri .....	44

Şekil 23. Bitki örneğinden elde edilen ilk dört özüt.....	48
Şekil 24. Bitki örneğinden elde edilen iki farklı özüt .....	48
Şekil 25. Bitki örneğinden elde edilen etanol-su ve doğrudan metanol özütleri... ..	49
Şekil 26. Seri seyreltmelerin şematik gösterimi.....	51
Şekil 27. VLC ve VLC sonrası elde edilen ayrımların şematik gösterimi... ..	55
Şekil 28. (a) enzim, özüt ve tampon çözeltilerinin 96 kuyucuklu plakaya ekilişi (renksiz), (b) substrat ekledikten sonra, reaksiyon bitiminin ardından gerçekleşen renk değişimi.....	61
Şekil 29. a) Hep3B hücre hattı, b) HT-29 hücre hattı ... ..	63
Şekil 30. Hemositometre... ..	65
Şekil 31. (a,b,c) Canlı hücrelerin 96 kuyucuklu plakaya ekilmesi, (d) örneklerin uygulanması işlemi.....	67
Şekil 32. Şerbetçi otu hekzan özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi. Grafik numune derişimi 517 nm'deki soğurmaya karşı grafiğe geçirilerek elde edilmiştir, aktivite kontrolün soğurmasını (en yüksek soğurma) yarıya düşüren numune derişimi (IC <sub>50</sub> ) olarak ifade edilmiştir (IC <sub>50</sub> = 0,00867 mg/mL) .....	71
Şekil 33. Şerbetçi otu aseton özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi. Grafik numune derişimi 517 nm'deki soğurmaya karşı grafiğe geçirilerek elde edilmiştir, aktivite kontrolün soğurmasını (en yüksek soğurma) yarıya düşüren numune derişimi (IC <sub>50</sub> ) olarak ifade edilmiştir (IC <sub>50</sub> = 0,091 mg/mL) .....	72
Şekil 34. Şerbetçi otu aseton sonrası metanol özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi. Grafik numune derişimi 517 nm'deki soğurmaya karşı grafiğe geçirilerek elde edilmiştir, aktivite kontrolün soğurmasını (en yüksek soğurma) yarıya düşüren numune derişimi (IC <sub>50</sub> ) olarak ifade edilmiştir (IC <sub>50</sub> = 0,0492 mg/mL) .....	73
Şekil 35. Şerbetçi otu metanol (kademeli) özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi. Grafik numune derişimi 517 nm'deki soğurmaya karşı grafiğe geçirilerek elde edilmiştir, aktivite kontrolün soğurmasını (en yüksek soğurma) yarıya düşüren numune derişimi (IC <sub>50</sub> ) olarak ifade edilmiştir (IC <sub>50</sub> = 0,044 mg/mL). .....	74
Şekil 36. Şerbetçi otu metanol (direkt) özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi. Grafik numune derişimi 517 nm'deki soğurmaya karşı grafiğe geçirilerek elde edilmiştir,	

aktivite kontrolün soğurmasını (en yüksek soğurma) yarıya düşüren numune derişimi (IC <sub>50</sub> ) olarak ifade edilmiştir (IC <sub>50</sub> = 0,0093 mg/mL) .....	75
Şekil 37. Şerbetçi otu etanol-su özütünün DPPH• radikali temizleme kapasitesi. Grafik numune derişimi 517 nm'deki soğurmaya karşı grafiğe geçirilerek elde edilmiştir, aktivite kontrolün soğurmasını (en yüksek soğurma) yarıya düşüren numune derişimi (IC <sub>50</sub> ) olarak ifade edilmiştir (IC <sub>50</sub> = 0,0787 mg/mL).....	76
Şekil 38. Kersetin' in DPPH• radikali temizleme kapasitesi. Grafik numune derişimi 517 nm'deki soğurmaya karşı grafiğe geçirilerek elde edilmiştir, aktivite kontrolün soğurmasını (en yüksek soğurma) yarıya düşüren numune derişimi (IC <sub>50</sub> ) olarak ifade edilmiştir (IC <sub>50</sub> = 0,00475 mg/mL). .....	77
Şekil 39. Şerbetçi otu özütleri ve standartın DPPH radikali süpürücü aktiviteleri .....	78
Şekil 40. Özütlerin DPPH yöntemi ile belirlenen IC <sub>50</sub> değerlerinin sütun grafiği .....	79
Şekil 41. Toplam fenolik bileşen tayininde kullanılan Ferulik asit standardı çalışma grafiği .....	80
Şekil 42. Özütlerin fenolik bileşen içeriklerinin (mg ferulik asit/g özüt) sütun grafiği....	81
Şekil 43. CUPRAC tayininde kullanılan Kersetin standardı çalışma grafiği .....	82
Şekil 44. Hekzan özütü ve standart olarak kullanılan kersetinin farklı derişimlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları ... ..	83
Şekil 45. Aseton özütü ve standart olarak kullanılan kersetinin farklı derişimlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları... ..	84
Şekil 46. Aseton sonrası metanol özütü ve standart olarak kullanılan kersetinin farklı derişimlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları ... ..	85
Şekil 47. Metanol (kademeli) özütü ve standart olarak kullanılan kersetinin farklı derişimlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları... ..	86
Şekil 48. Metanol (doğrudan) özütü ve standart olarak kullanılan kersetinin farklı derişimlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları... ..	87
Şekil 49. Etanol-su özütü ve standart olarak kullanılan kersetinin farklı derişimlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları... ..	88
Şekil 50. Etil asetat özütü ve standart olarak kullanılan kersetinin farklı derişimlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları... ..	89



Şekil 51. Metanol (doğrudan), Metanol (kademeli) ve A.S.Metanol özütlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları...	90
Şekil 52. Etanol-su ve Metanol (doğrudan) özütlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları.....	91
Şekil 53. Hekzan ve aseton özütlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları.....	92
Şekil 54. Hekzan ve Metanol (kademeli) özütlerine uygulanan spektrofotometrik CUPRAC yönteminin sonuçları... ..	92
Şekil 55. Özütler ve standardın CUPRAC yöntemi ile verdikleri soğurma grafiklerinin toplu gösterimi... ..	94
Şekil 56. Özütlerin CUPRAC yöntemine göre QREFC (kersetin eşdeğeri flavonoid derişimi) değerleri sütun grafiği.....	95
Şekil 57. TEAC tayininde kullanılan Troloks standardı çalışma grafiği.....	96
Şekil 58. Şerbetçi otu hekzan özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS <sup>+</sup> radikalini süpürme etkisi... ..	97
Şekil 59. Şerbetçi otu aseton özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS <sup>+</sup> radikalini süpürme etkisi... ..	98
Şekil 60. Şerbetçi otu aseton sonrası metanol özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS <sup>+</sup> radikalini süpürme etkisi ... ..	99
Şekil 61. Şerbetçi otu metanol (kademeli) özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS <sup>+</sup> radikalini süpürme etkisi .....	100
Şekil 62. Şerbetçi otu metanol (doğrudan) özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS <sup>+</sup> radikalini süpürme etkisi.....	101
Şekil 63. Şerbetçi otu etanol-su özütünün TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS <sup>+</sup> radikalini süpürme etkisi... ..	102
Şekil 64. Özütlerin % inhibisyon değerlerinin toplu gösterimi... ..	103
Şekil 65. Özütlerin TEAC değerleri (mM Tr/g özüt) sütun grafiği ... ..	105
Şekil 66. Özütlerin TEAC <sub>ABTS</sub> değerleri çubuk grafiği.....	105
Şekil 67. FRAP yönteminde kullanılan FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O standart grafiği.....	106

Şekil 68. Özütlerin FRAP değerleri (mM FeSO <sub>4</sub> /g özüt) sütun grafiği.....	106
Şekil 69. (a) Kersetin-3-O-glukozit, (b) Kersetin-7-O-glukozit, (c) Rutin, (d) Ksantohumol, (e) 3-Hidroksiflavanon yapıları.....	111
Şekil 70. Hekzan:Etilasetat çözücü sisteminde yürütülen lekeler.....	112
Şekil 71. Örneklerin, $\alpha$ -kimotripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği. İnhibitör olarak PMSF kullanılmıştır.....	120
Şekil 72. Örneklerin, tripsin enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	121
Şekil 73. Örneklerin, inhibitör olmadan papain enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	122
Şekil 74. Özüt ve Karboksipeptidaz A aktivitesi ...	124
Şekil 75. Karboksipeptidaz A aktivitesi ...	124
Şekil 76. Enzim miktarı 40 $\mu$ L'den 5 $\mu$ L'ye düşürüldüğünde Karboksipeptidaz A aktivitesi.....	125
Şekil 77. Enzim miktarı 100 $\mu$ L substrat miktarı 50 $\mu$ L'ye düşürüldüğünde Karboksipeptidaz A aktivitesi .....	125
Şekil 78. Reaksiyon sırasında ortama tekrar enzim ilave edildiğinde Karboksipeptidaz A aktivitesi .....	126
Şekil 79. Örneklerin, tirozinaz enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği .....	126
Şekil 80. Örneklerin, $\beta$ -laktamaz (penisilinaz) enzimi ile verdiği reaksiyon grafiği.....	128
Şekil 81. Hep3B hücrelerine uygulanan hekzan özütü farklı dozları için 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında MTT denemesi ile 570 nm'de okunan soğurma değerleri.....	131
Şekil 82. HT29 hücrelerine uygulanan hekzan özütü farklı dozları için 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında MTT denemesi ile 570 nm'de okunan soğurma değerleri.....	131
Şekil 83. Hep3B hücrelerine uygulanan aseton özütü farklı dozları için 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında MTT denemesi ile 570 nm'de okunan soğurma değerleri .....	132
Şekil 84. HT29 hücrelerine uygulanan aseton özütü farklı dozları için 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında MTT denemesi ile 570 nm'de okunan soğurma değerleri .....	132
Şekil 85. Hep3B hücrelerine uygulanan aseton sonrası metanol özütü farklı dozları için 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında MTT denemesi ile 570 nm'de okunan soğurma değerleri .....	133

Şekil 86. HT29 hücrelerine uygulanan aseton sonrası metanol özütü farklı dozları için 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında MTT denemesi ile 570 nm’de okunan soğurma değerleri.....	133
Şekil 87. Hep3B hücrelerine uygulanan metanol (kademeli) özütü farklı dozları için 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında MTT denemesi ile 570 nm’de okunan soğurma değerleri .....	134
Şekil 88. HT29 hücrelerine uygulanan metanol (kademeli) özütü farklı dozları için 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında MTT denemesi ile 570 nm’de okunan soğurma değerleri... ..	134
Şekil 89. Hep3B hücrelerine uygulanan metanol (doğrudan) özütü farklı dozları için 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında MTT denemesi ile 570 nm’de okunan soğurma değerleri.....	135
Şekil 90. HT29 hücrelerine uygulanan metanol (doğrudan) özütü farklı dozları için 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında MTT denemesi ile 570 nm’de okunan soğurma değerleri... ..	135
Şekil 91. Hep3B hücrelerine uygulanan etanol-su özütü farklı dozları için 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında MTT denemesi ile 570 nm’de okunan soğurma değerleri .....	136
Şekil 92. HT29 hücrelerine uygulanan etanol-su özütü farklı dozları için 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında MTT denemesi ile 570 nm’de okunan soğurma değerleri .....	136

## **ÖZGEÇMİŞ**

### **KİŞİSEL BİLGİLER**

Adı Soyadı : Ferah CÖMERT

Doğum Yeri : Bandırma

Doğum Tarihi : 25/05/1984

### **EĞİTİM DURUMU**

Önlisans Öğrenimi : Kocaeli Üniversitesi, Fermentasyon Bölümü (2003-2005).

Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Kimya Bölümü (2006-2009).

Yüksek Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enst., Fen-Edebiyat Fak., Kimya Bölümü Organik Kimya A.B.D. (2009-2012).

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

### **BİLİMSEL FAALİYETLERİ**

**Uluslararası kongre, sempozyum, panel gibi bilimsel toplantılarda sunulmuş, programda yer alan özet metin olarak yayınlanan bildiri ya da poster veya gösteri**

F. Cömert, M. Ay, S. D. Sarker, Investigation Of Antioxidant Components From Humulus Lupulus L. (Şerbetçi Otu) Extracts, 1st International Symposium on Secondary Metabolites Chemical, Biological and Biotechnological Properties, September 12-15, 2011 / Denizli, Turkey, P52.

Mehmet Ay, Ayhan Çelik, Ferah Cömert, Melek Yavaşoğlu, Gülten Yetiş, Synthesis of Some Prodrug Candidates for Nitroreductase Based Cancer Therapy. Ankara Uni. Faculty of Pharmacy, 26-29 June 2012, Ankara, Turkey.

### **Bildirisiz Katılınan Uluslararası Toplantılar**

“Workshop on Antioxidant Measurement Assay Methods”, 21 Nisan 2010, İstanbul Üniversitesi Beyazıt Yerleşkesi, İstanbul-TÜRKİYE; Methods of Measurement and Evaluation of Natural Antioxidant Capacity/Activity, IUPAC Project Mid-Term Meeting.

Tez içi yurtdışı çalışması; Prof. Satyajit D. Sarker danışmanlığında antioksidan aktivite çalışmaları ve kromatografik işlemlerin bir kısmının yürütülmesi. Wolverhampton Üniversitesi, İngiltere (Mart-Haziran, 2012).

### **Katıldığı Çalıştaylar**

- Y.İ.B.O. Öğretmenleri (Bilim ve Tekn.-Fizik, Kimya, Biyoloji-ve Matematik) Proje Danışmanlık Eğitim Çalıştayı YİBO-4(Çalıştay 2010-2)01-08 Şubat 2010(TÜSSİDE-Gebze)TÜBİTAK-BİDEB-Teknisyen.
- Y.İ.B.O. Öğretmenleri (Bilim ve Tekn.-Fizik, Kimya, Biyoloji-ve Matematik) Proje Danışmanlık Eğitim Çalıştayı YİBO-3(Çalıştay 2010-1)24- 31 Ekim 2010(TÜSSİDE-Gebze)TÜBİTAK-BİDEB- Teknisyen.
- Kimya Lisans Öğrencileri (Kimya, Kimya Öğretmenleri ve Kimya Mühendisleri) Proje Danışmanlık Eğitim Çalıştayı Kimya-1 (Workshop 2010) 03-11.07.2010 (Çanakkale)TÜBİTAK-BİDEB-Teknisyen.

### **STAJ DENEYİMİ**

- Bandırma Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Temmuz, 2009.
- Çanakkale Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ağustos, 2008.
- Çanakkale Tarım ve Köyişleri Müdürlüğü, Bitki, Toprak ve Su Analizleri Laboratuvarı, Temmuz, 2008.
- Kocaeli Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Haziran, 2005.
- DEPA İlaç Aktif Hammaddeleri, Fermantasyon Laboratuvarı. Kocaeli-Türkiye, Haziran-Temmuz, 2004.

### **İLETİŞİM**

e-posta adresi: frhcmrt@hotmail.com