



**KONYA'DA YETİŞEN *CENTAUREA PTEROCAULA* TRUATV. 'IN FENOLİK YAPISI VE ANTİOKSİDAN ETKİSİ**

**Yener TEKELİ\*, Mehmet SEZGİN\* M. Aydın ŞANDA\*\***

\*Selçuk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Alâeddin Keykubat Kampüsü, 42075 Selçuklu-Konya

\*\*Selçuk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Alâeddin Keykubat Kampüsü, 42075 Selçuklu-Konya

e-mail: ytekeli@selcuk.edu.tr

Alınış: 08 Şubat 2008, Kabul: 09 Mayıs 2008

**Özet:** Bu çalışmada Konya Tuz Gölü civarından toplanan *Centaurea Pterocaula*'nın antioksidan aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. *Centaurea Pterocaula* 'u yağından uzaklaştırılmak için sokslet apareyi ile petrol eterinde ekstrakte edildi. Sonra materyal %70 lik metanolde tekrar ekstraksiyona tabi tutuldu ve çözücüsünden uzaklaştırıldı. Toplam fenolik madde konsantrasyonu Folin-Ciocalteu metoduna, serbest radikal süpürme etkisi DPPH metoduna göre ve indirgeme gücü ise Oyaizu metoduna göre yapıldı. Bitkinin fenolik yapısı HPLC ile belirlendi. Sonuçlar sentetik antioksidan olan BHT (Butillenmişhidroksitoluen) ve BHA (Butillenmişhidroksianisol) ile kıyaslandı.

**Anahtar Kelime:** Antioksidan, *Centaurea Pterocaula*, DPPH, Folin-Ciocalteu, Oyaizu

**DETERMINATION OF PHENOLIC CONTENT AND ANTIOXIDANT EFFECT OF *CENTAUREA PTEROCAULA* TRUATV. IN KONYA**

**Abstract:** The present study was carried out to determine of *Centaurea Pterocaula* which was collected in region of Konya Tuz Lake. It was extracted with petroleum ether using a soxhleth apparatus for remove it's oil. Then the defatted plant materials were extracted with 70% methanol.and concentrated. Total phenol concentration was determined by Folin-Ciocalteu method, free radical scavenging activities were determined based on DPPH and determined reducing power based on Oyaizu method. The phenolic compound of *C. Pterocaula* was elucidated by HPLC analysis. Results were compared with standard antioxidant compound BHA and BHT.

**Keywords:** Antioxidant, *Centaurea Pterocaula*, DPPH, Folin-Ciocalteu, Oyaizu

## GİRİŞ

İnsanoğlu hayatı boyunca yaşamın beraberinde getirdiği stres vb. zorlukları aşmak, hastalıklardan korunmak için, yaşamak için gerekli olmazsa olmazların yanında, takviye besinler almak durumundadır. Bu tür koruyucu ya da engelleyici bileşikler antioksidan maddeler olarak adlandırılır. Antioksidanlar düşük konsantrasyonlarda bile oksidatif zararları engeleyebilen ya da azaltabilen maddelerdir. Son zamanlarda antioksidanlar, özellikle farmakolojik çalışmalarda oldukça önem kazanmışlardır. (VAYA ve AVİRAM, 2001). Hastalıkların tedavisi üzerine yapılan çalışmalarda, insan diyetindeki antioksidan etkili bileşiklerin oksidatif strese sebebiyet veren reaktif oksijen türleri ve

reaktif azot türlerinin insan vücuduna verdiği zararları önemli ölçüde engelleyebildiği belirtilmiştir (SOONG ve BARLOW , 2004). Özellikle bitki biyolojisinde serbest radikaller ve antioksidan kontrol sistemleri üzerine yapılan araştırmalarda bitkilerin yapısında bulunan polifenolik yapıları maddeler, vitamin, enzim gibi bileşiklerin bu bitkilerin antioksidan etkileri ile doğrudan etkili olduğu yapılan pek çok araştırmalarda belirtilmiştir. (RİMMER, 2006; PROESTOS, SERELİ ve KOMAITİS, 2004; NAWAZ, 2006). Tıbbi bitkiler arasında adı sıkça geçen *Centaurea L.*, *Asteraceae* familyasına ait bir cinstir ve ülkemizde 168 türü vardır. Halk arasında, peygamber çiçeği, zerdali diken, çoban kaldıran, Timur diken gibi isimlerle de anılmaktadır. *Centaurea* türleri halk arasında tek başına veya diğer bitkilerle birlikte antidiyabetik, antidiyareik, antiromatizmal, antienflamatuvar, kolagog, koleretik, dijestif, stomaşik, diüretik, adet söktürücü, astrenjan, hipotansif, antipiretik, sitotoksik, antibakteriyel amaçla kullanılmaktadır (ARİF, KÜPELİ ve ERGUN, 2004). Bu çalışmada *Centaurea* ailesine ait *C. pterocaula* truatv.'un antioksidant etkisi *in vitro* olarak belirlenmiştir. Özellikle bu tür çalışmalarda yaygın olarak bitkinin fenolik madde konsantrasyonu Folin yöntemiyle fenolik yapıları bir bileşiğin standardında tespit edilmektedir. Oksidasyona sebep olan serbest radikalleri ortamdaki süpürme veya etkisiz kılma kapasitesi ise DPPH yöntemiyle belirlenmektedir. Zira DPPH deneysel ortamda serbest radikal olarak bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar bitkinin fenolik yapısının kromatografik olarak aydınlatılmasıyla desteklenmektedir.

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

Shimadzu- 1700 – UV Spektrofotometre, Shimadzu-HPLC (Auto sampler: SIL-10AD vp, Sistem Kontrolör: SCL-10Avp, pompa LC-10ADvp, Degasser: DGU- 14A, Kolon Fırını: CTO-10Avp), DPPH, BHT, BHA, folin reaktifi, metanol, (Sigma-Aldrich), petrol eteri, gallik. (Merck).

### Metot

#### Ekstrelerin hazırlanması

20 g toz drog Soxhlet aparatında önce yağlarından kurtarılmak üzere petrol eteri (40-60°C) ile ekstre edilmiştir. Geride kalan drog, petrol eteri uzaklaştırıldıktan sonra %70'lik metanol ile 40 °C'lik karıştırılmalı su banyosunda 30 dakika süre ile ekstrakte edilmiş ve süzümüştür. Bu işlem üç kez tekrarlanmış, süzüntüler birleştirilmiş ve metanollü kısımlar rotary evaporatörde yoğunlaştırıldıktan sonra geride kalan sulu ekstratler liyofilizatörde kurutulmuştur.

#### Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini

Ekstreler içerisindeki toplam fenol miktarı Folin-Ciocalteu yöntemine (GAMEZ-MEZA vd. 1999) göre yapılmıştır. Standart olarak kullanılan gallik asit ve çalışılan bütün örnekler, %70'lik metanol içinde hazırlanmıştır. 0.5 ml örnek, 2.5 ml Folin Ciocalteu reaktifi (%10'luk, h/h, suda) ve 7.5 ml sodyum karbonat çözeltisi (%20'lik, a/h, suda) deney tüpüne karıştırılarak 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda çözeltilerin absorbansları UV Spektrofotometresi'nde 750 nm'de okunarak toplam fenol miktarları; gallik asitle çizilen kalibrasyon eğrisinden, mg gallik asite eşdeğer olacak şekilde hesaplanmıştır.

### DPPH Üzerinden Serbest Radikal Süpürücü Etki Tayini

Ekstrelerin DPPH üzerindeki serbest radikal süpürücü etkileri Sanchez-Moreno metoduna (WANG ve LEE 1996) göre yapılmıştır. Reaksiyon ortamındaki konsantrasyonu  $4.3 \times 10^{-3}$  mg/ml olacak şekilde hazırlanan örnek çözeltisinden 0.5 ml alınıp  $2 \times 10^{-2}$  g/L konsantrasyonda %70'lik metanol içinde hazırlanmış olan DPPH çözeltisinin 3 ml sine ilave edilmiş ve vortekste 30 saniye karıştırılarak oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda UV Spektrofotometresi'nde 517 nm de absorbanı okunmuştur.  $4.0 \times 10^{-3}$  ve  $2.0 \times 10^{-2}$  g/L konsantrasyon aralığında DPPH standartı kullanılarak hazırlanan aşağıdaki kalibrasyon denklemi kullanılarak reaksiyon ortamındaki DPPH konsantrasyonu (g/L) hesaplanmıştır.

$$A_{517nm} = 0,016(DPPH)t + 0,006 \quad (R^2 = 0.9980)$$

30 dakika sonucunda reaksiyon ortamında kalan DPPH miktarı ise aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır. (IC<sub>50</sub> mg/ml).

$$\% DPPH_{kalan} = (DPPH)_{t=30} / (DPPH)_{t=0} \times 100$$

### İndirgeme Gücü Tayini

İndirgeme aktivitesi Oyaizu (1986) metoduna göre yapıldı. 1 ml bitki ekstraktı, 1 ml fosfat tampon çözeltisi (0,2 M pH=6,6 ) ve 2,5 ml %1 lik potasyum ferrisiyanat ([K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> ) çözeltisi bir deney tüpünde ilave edilir. Kuvvetlice çalkalanır. 50 °C de 30 dakika inkübe edilir. Süre sonunda üzerine 2,5 ml trikloroasetikasit çözeltisi (%10 luk suda) ilave edildikten sonra santrifüjlenir. Çözeltinin üzerinden 2,5 ml alınarak 0,5 ml %0,1 lik FeCl<sub>3</sub> ilave edildikten sonra 700 nm de absorbanı okunur. Tüm işlemler BHT ve BHA için de uygulanır. Konsantrasyon arttıkça artan absorban değeri indirgeme yeteneğini gösterir.

### HPLC ile Fenolik Madde Tayini

Numune Hazırlama: Numuneden 10mg tartılır. 1mL metanolde çözülüp 20 µL'si HPLC' ye enjekte edilir.

### Çalışma şartları;

Kolon : Agilent EclipseXDB-C18 (250x4,60 mm) 5 mikron

Dedektör: DAD dedektör ( $\lambda_{max}=278$ )

Mobil faz : A: %3 asetik asit, B: Metanol,

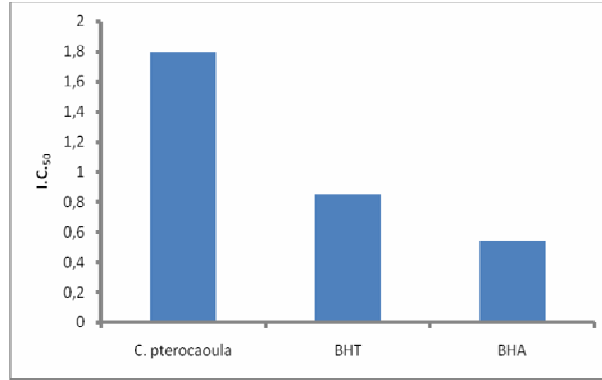
Akış Hızı : 0.8 mL / dakika

Kolon sıcaklığı : 30 °C

Enjeksiyon hacmi: 20 mikrolitre

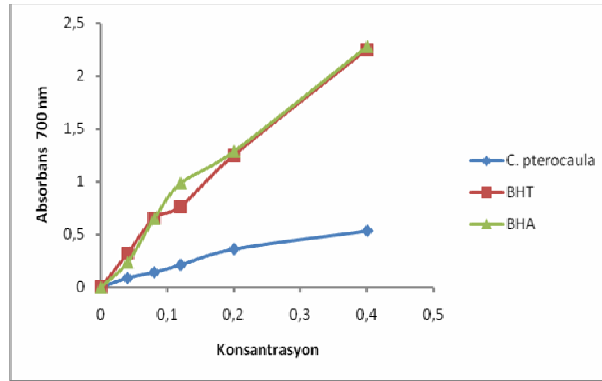
### BULGULAR

Folin-Ciocaltaeu yöntemine göre yaptığımız toplam fenolik yapılı madde konsantrasyonları mg/ml gallik aside esdeğer (GAE) bazda gallik asidin kalibrasyon grafiğinden hesaplandı. Buna göre *C. pterocaula*'nın GAE değeri, 0,465 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Drogların serbest radikal süpürme etkisi DPPH yöntemine göre yapılmıştır. Absorbans değerlerinden hesaplanan IC<sub>50</sub> değerleri Şekil.1. de verilmiştir.



Şekil 1. *C. pterocaoula*, BHA ve BHT'nin I.C.<sub>50</sub> değerleri

Antioksidan indirgeme kapasitesi ölçümü Oyaizu (1986) metoduna göre yapıldı ve Fe<sup>+3</sup>-Fe<sup>+2</sup> değişimi oluşan metal kompleksinin konsantrasyonuna bağlı olarak absorbans değişimleri Şekil.2. de ve buna bağlı hesaplanan FRAP değerleri Tablo.1. de verilmektedir.

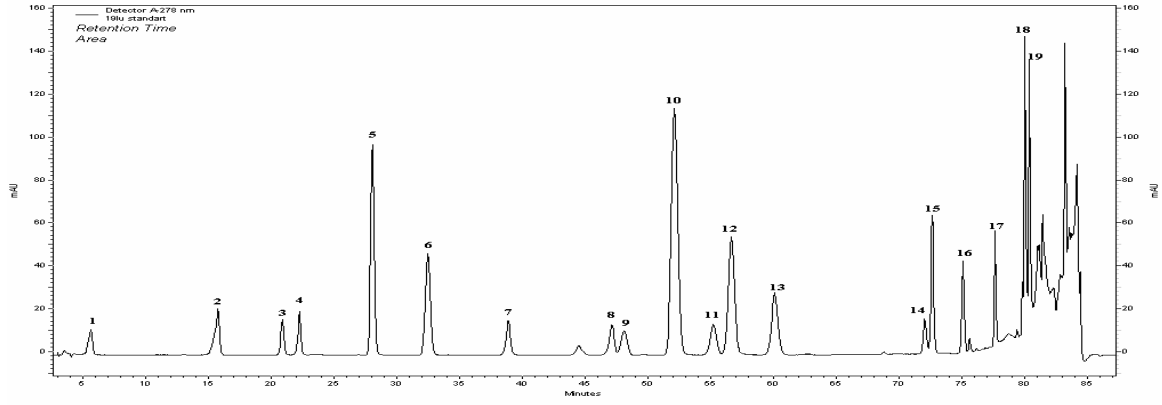


Şekil 2. *C. pterocaoula*, BHA ve BHT'nin konsantrasyona bağlı absorbans değişimleri

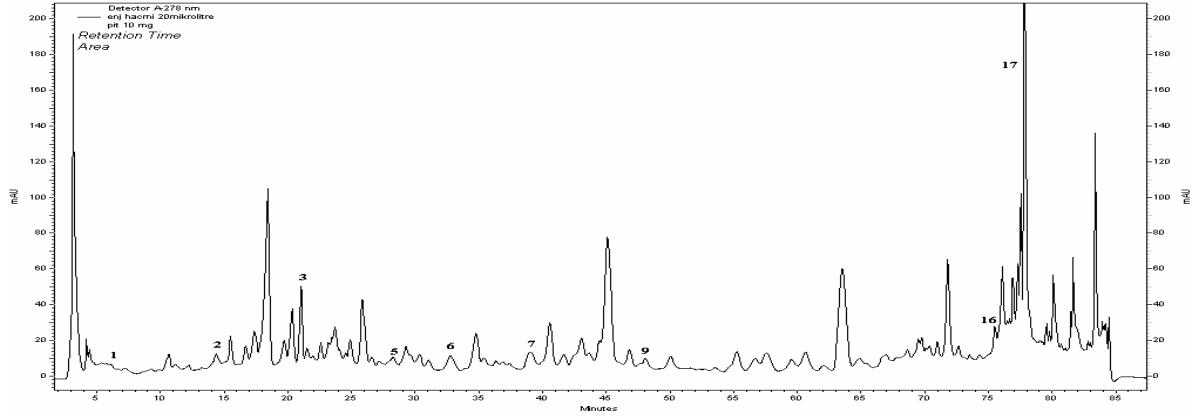
Tablo 1. *C. pterocaoula*, BHA ve BHT'nin FRAP değerleri

	FRAP değeri
BHA	0,0353
BHT	0,0349
<i>C. pterocaoula</i>	0,0083

Bir maddenin fenolik yapısı o maddenin antioksidan etkisinin bir göstergesi olabilir. *C. pterocaoula*'nın fenolik yapısı HPLC ile belirlenmiştir. 19 standarda göre yapılan analizin sonucu Şekil 3. ve Şekil.4. teki gibidir.



**Şekil.3.** Standart kromatogramı: 1: gallic, 2: kateşin, 3: kafeik, 4: epikateşin, 5: p-coumaric, 6: ferulik, 7: vitexin, 8: rutin, 9: naringin, 10: hesperidin, 11: apigenin-glukozit, 12: rosmarinik, 13: eriodictiol, 14: quercetin, 15: naringenin, 16: luteolin, 17: apigenin, 18: karvakrol, 19: acectin.



**Şekil 4.** *C. pterocaula*'nın HPLC kromatogramı

**Tablo 2.** *C. pterocaula*'nın kromatogram sonuçları (%95 güven aralığı ile verilmektedir.)

	µg/g. num.		µg/g. num.		µg/g. num.
Gallik	2.84	Rutin	*	Naringenin	*
Katesin	668.4	Naringin	121.7	Luteolin	211.0
Kafeik	501.8	Hesperidin	*	Apigenin	453.3
Epikatesin	*	Apigenin glukozit	*	Karvakrol	*
p-coumaric	67.18	Rosmarinik	*	Accectin.	*
Ferulik	250.9	Eriodictiol	*		
Vitexin	257.5	Quercetin	*		

\*: tespit edilemedi

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Bir maddenin antioksidan etkisi ortamdaki serbest radikalleri süpürebilmesine bağlıdır. Bileşenlerin ortamdaki serbest radikallerden kaynaklanan sarı-yeşil renkli karışımın renk açılmasına dayanan absorbans değişimleri 517 nm de ölçülür. DPPH metoduna göre yapılan radikal süpürme deneylerinde ölçülen absorbanslara bağlı olarak, DPPH nin kalibrasyon grafiğinden faydalanılarak IC<sub>50</sub> değerleri (ortamdaki serbest radikallerin konsantrasyonunun yarısını inhibe ettiği konsantrasyon) hesaplanmıştır. *C. pterocaula*'nın sentetik antioksidan olan BHA ve BHT ye göre IC<sub>50</sub> değerleri Şekil.1. de verilmiştir. *C. pterocaula*'nın ortamdaki serbest radikalleri süpürme oranı hesaplanan IC<sub>50</sub> değerleri dikkate alındığında (Şekil.1.) BHA ve BHT ye göre daha düşük olduğu görülmektedir. DPPH'nin kalibrasyon eğrisinden hesaplanan IC<sub>50</sub> değerleri dikkate alındığında, IC<sub>50</sub> değeri ne kadar küçükse antioksidan aktivitesi de o kadar fazladır denilebilir. Bunun anlamı aynı miktar serbest radikali en düşük konsantrasyonda süpürebilen maddeler daha kuvvetli aktivite göstermektedir. (POURMORAD HOSSEINIMEHR ve SHAHABIMAJD, 2006). BHA, BHT ve *C. pterocaula*'ya göre ortamdaki serbest radikalleri süpürebilme açısından daha kuvvetlidir. Bitkilerdeki fenolik maddelerin toplam konsantrasyonu hesaplanırken mutlaka bir standart fenolik maddeye göre yapılır. Standart olarak gallik asit kullanıldığında bitkideki toplam fenolik madde konsantrasyonu 0,465 mg/mL GAE olarak hesaplandı. 19 fenolik standarta göre HPLC analizinin sonucuna bakıldığında fenolik açıdan zengin olduğu söylenebilir (Şekil.4.). Bu standartların dışında daha başka fenolik madde de ihtiva edebileceği de unutulmamalıdır. İndirgeme gücü antioksidant etkinin bir göstergesidir. Ortamdaki Fe<sup>+3</sup> iyonlarının Fe<sup>+2</sup> iyonlarına indirgeyebildiği ölçüde, bileşenlerin antioksidan aktiviteleri belirlendi. Bunun için, ortamdaki mavi-yeşil renkli kompleksteki renk açılımının spektrofotometrik olarak 700 nm de absorbans değişimlerinden faydalanıldı. Troloksun kalibrasyon eğrisinden FRAP değerleri hesaplandı. Şekil.2.'ye göre BHA, BHT'ye yakın bir etki gösterse de en fazla indirgen olduğu açıkça bellidir. Troloksa eşdeğer olarak hesaplanan FRAP değerlerine bakıldığında (Tablo.1.) bu açıkça görülmektedir. Alternatif tıbbın giderek değer kazandığı günümüzde bitkilerin faydalı yönlerinin açığa çıkarılması elbette önemli olsa gerek.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP) tarafından 06101048 nolu proje kapsamında finansal olarak desteklenmiş olan doktora tez çalışmasından yapılmıştır.

## KAYNAKLAR

- ARİF R, KÜPELİ R, ERGUN F, 2004, The Biological Activity of *Centaurea L.* Species. G.Ü. Fen Bilimleri Dergisi 17(4): 149-164.
- ÇAKATAY U, KAYALI R, 2006, Serbest Radikal Biyokimyasının Tarihsel Süreçteki Gelişimi Cerrahpaşa tıp dergisi, 37,162-167.
- ÇAVDAR C, SİFİL A, ÇAMSARI T, 1997, Reaktif oksijen partikülleri ve Antioksidan savunma Türk nefroloji ve transplantasyon dergisi, 3-4, 92-95.

- GAMEZ-MEZA, N, NORİEGA-RODRİGUEZ JA, MEDİNA-JUAREZ LA, ORTEGA-GARCİA, J, CAZAREZ-CASANOVA R, ANGULO-GUERRERO O, 1999, Antioxidant activity in soybean oil of extracts from thompson grape bagasse J.A.O.C.S., 76, 1445.
- HUDSON B J F, 1990. Food Antioxidants. Elsevier Applied Science Publishers, New York. Elsevier, New York pp. 253–307.
- MEİR S, KANNER J, AKİRİ B, and HADAS SP, 1995, Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. J. Agric. Food Chem. 43: 1813- 181.
- MURRAY MT. 1996, Encyclopedia of Nutritional Supplements. California, Prima Publishing; 1:320-331.
- NAWAZ H, SHİ J, MİTTAL GS, KAKUDA Y, 2006, Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. Separation and Purification Technology 48: 176–181
- OYAZU M, 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Japanese Journal of Nutrition, 44, 307-315.
- POURMORAD F, HOSSEINIMEHR SJ, SHAHABIMAJD N, 2006, Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants *African Journal of Biotechnology.*, 5 (11), 1142-1145.
- PRATT DE, HUDSON, B J F, 1990. Natural Antioxidant not Exploited Commercially, in Food Antioxidants, 5, 171.
- PROESTOS C, SERELİ D, KOMAİTİS, 2006, Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS, Food Chemistry 95:44–52.
- RIMMER DL, 2006, Free radicals, antioxidants, and soil organic matter recalcitrance Journal of Soil Science 57(2): 91-94.
- SHAHİDİ, F. 2000, Antioxidants in Food and Food Antioxidants. Nahrung, 44,158-163.
- SOONG YY, BARLOW PJ, 2004. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. Food Chemistry 88, 411–417
- TUNALIER Z, ÖZTÜRK N, KOŞAR M, BAŞER KHC, DUMAN H, KIRIMER N, 2002, Bazı sideritis türlerinin antioksidan etki ve fenolik bileşikler yönünden incelenmesi, Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı.
- VAYA J AND AVİRAM M. 2001, Nutritional Antioxidants: Mechanisms of Action, Analyses of Activities and Medical Applications *Curr. Med. Chem. – Imm., Endoc. & Metab. Agents*, 1, 99-117.
- WANG CK, LEE, WH, 1996, Separation, Characteristics, and Biological Activities of Phenolics in Areca Fruit, J.Agric.Food.Chem., 44: 2014-2019
- YANİSHLİEVA NV, POKOMY J, GORDON, M. 2001, Inhibiting Oxidation in Antioxidants in Food: Practical Applications., CRC press LLC and Woodhead Publishing Ltd, 288s, New York, USA.