



## **Tort (*Anchusa azurea* Miller var. *azurea*) Bitkisindeki A, E, C Vitaminleri, Malondialdehit ve Glutasyon Miktarlarının Araştırılması**

Ebru Çöteli

*Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Elazığ*

*ebru\_coteli@hotmail.com*

### **Özet**

Bu çalışmada, *A. azurea* Miller var. *azurea* bitkisinin yapraklarındaki A vitamini, E vitamini, C vitamini, malondialdehit (MDA), indirgenmiş glutasyon (GSH), yükseltgenmiş glutasyon (GSSG) miktarları Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile belirlendi. *A. azurea* Miller var. *azurea* bitkisinin yapraklarındaki A, E, C vitamini, MDA, GSH, GSSG miktarları sırası ile  $0.76 \pm 0.09$  µg/g;  $0.096 \pm 0.015$  µg/g;  $30.88 \pm 6.22$  µg/g;  $255.54 \pm 26.65$  µg/g;  $4705.77 \pm 478.55$  µg/g;  $3.21 \pm 1.74$  µg/g olduğu belirlendi. Sonuç olarak elde edilen bulgulardan; *A. azurea* Miller var. *azurea* bitkisinin içerdiği Glutasyon (GSH, GSSG) ve C vitamini miktarları açısından iyi bir kaynak olduğu belirlenmiştir. Bu özelliklerinden dolayı halk arasında Tort (*A. azurea* Miller var. *azurea*) olarak bilinen ve yemeği yapılan bu bitkinin, antioksidan bir bitki olduğu ve bu bitkinin halk arasında tüketiminin yararlı olabileceği düşünülmektedir.

*Anahtar Kelimeler:* Tort (*A. azurea* Miller var. *azurea*), A, E, C vitaminleri, MDA, glutasyon.

### **Investigation of Amounts of Vitamins A, E, C, Malondialdehyde and Glutathione in Plant *A. azurea* Miller var. *Azurea***

#### **Abstract**

In this study, the amounts of vitamin A, vitamin E, vitamin C, malondialdehyde (MDA), reduced form glutathione (GSH), oxidized form glutathione (GSSG) in leaves of which have been *A. azurea* Miller var. *azurea* sample were determined by using High Performance Liquid Chromatography. The amount of vitamin A, vitamin E, vitamin C, MDA,

GSH, GSSG in leaves of *A. azurea* Miller var. *azurea* were obtained to be  $0.76 \pm 0.09$   $\mu\text{g/g}$ ;  $0.096 \pm 0.015$   $\mu\text{g/g}$ ;  $30.88 \pm 6.22$   $\mu\text{g/g}$ ;  $255.54 \pm 26.65$   $\mu\text{g/g}$ ;  $4705.77 \pm 478.55$   $\mu\text{g/g}$ ;  $3.21 \pm 1.74$   $\mu\text{g/g}$  respectively. As a result of the findings; *A. azurea* Miller var. *Azurea* plants contained in the Glutathione (GSH, GSSG) and in terms of the amount of vitamin C was determined to be a good source. Due to the characteristics of *A. azurea* Miller var. *azurea* plants that is known as ‘Tort’ among the people and made same kinds of local meals and its antioxidant integrident, it is thought that the consumption of this plant would be useful.

**Keywords:** *A. azurea* Miller var. *azurea*, vitamins (A, E, C), MDA, glutathione.

## Giriş

İnsanlar doğada yetişen bitkileri özellikle gıda, boya, süs bitkisi ve halk ilacı olarak yıllarca kullanmaktadırlar. Özellikle Anadolu insanı bitkileri, gıda ve tıbbi amaç için kullanmıştır [1]. Özellikle *Anchusa L.* türleri Türk halk hekimliğinde yara iyileştirici ve diüretik maddeler olarak kullanılmaktadır [2, 3]. Ayrıca *A. azurea* Miller var. *Azurea*’nın anti-inflammatory aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir [4]. *A. azurea* Miller var. *azurea*’nın köklerinden fenolik bileşiklerin izolasyonu yapılmıştır [5]. Halk arasında ballık otu veya sığır dili olarak da bilinmektedir. Yaprak, çiçek ve kök olmak üzere üç bölümü de kullanılmaktadır. Bitkinin tamamı idrar artırıcı ve temizleyicisi olarak kullanılmaktadır. Köklerinden kırmızı boya elde edildiği, yaprak ve çiçeklerinin de egzama tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir [6]. Ayrıca *A. azurea* Miller var. *azurea*’nın yaprakları ezilerek yapılan karışımın yılan sokmasına karşı panzehir olarak kullanıldığı bildirilmiştir [7].

*A. azurea* Miller var. *azurea*, bitkisi ile ilgili yapılan literatür taramasında; bitkideki A, E, C vitaminleri, MDA ve glutatyon miktarları ile ilgili yeterli miktarda araştırma bulunamamıştır. Bu çalışmada *A. azurea* Miller var. *azurea* bitkisinin yapraklarındaki A, E, C vitaminleri, MDA ve glutatyon miktarları belirlenerek, halk arasında genelde Tort olarak adlandırılan ve gıda olarak bolca tüketilen bu bitki hakkında literatür bilgisine katkıda bulunmak amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

Bu çalışmada Elazığ ilinde yetişmiş ve halk arasında Tort (*A. azurea* Miller var. *azurea*) olarak adlandırılan bitkinin yaprakları kullanıldı. Bitkinin tür teşhisi Fırat Üniversitesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim dalında yapıldı. Ayrıca çalışmada kullanılan tüm kimyasallar Merck firmasından temin edildi ve çalışmaların hepsinde bidistile su kullanıldı.

### **Bitki Örneğindeki MDA, GSH, GSSG ve C Vitamini Miktarlarının Belirlenmesi**

Yaprakları ince doğranmış tort bitkisi örneğinden yaklaşık 0.2 gram tartılarak polietilen tüplere alındı. Her bir tüp üzerine 1 mL 0.5 M HClO<sub>4</sub> ilave edilerek karıştırıldı. İyice vortekslendi. Daha sonra bu örneklere 9 mL saf su ilave edilerek tekrar karıştırıldı ve 4500 rpm de 10 dakika santrifüjlenip asıltı partiküller çöktürüldü. Örneklerdeki MDA miktarlarını belirlemek üzere santrifüjlenen süzüntünün üst kısmından 20 µL alınarak HPLC'ye enjekte edildi. HPLC'de Inertsil ODS-4 (5 µm, 4.6×150 mm) kolonunda mobil fazı 30 mmol KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve metanol karışımı (%65-%35, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ile pH=4) olan ve akış hızı 0.4 ml/dk'ya ayarlanarak 254 nm'de MDA tayin edildi [8]. GSH ve GSSG miktarlarını belirlemek için; santrifüjlenen süzüntünün üst kısmından 20 µL alınarak HPLC'ye enjekte edildi. HPLC'de SUPELCO Analytical EXSIL 100-5 ODS (5 µm, 25 cm x 4.6 mm) kolonu ve hareketli faz olarak da çözücüsü % 0.1 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> olan 50 mM'luk NaClO<sub>4</sub> çözeltisi kullanıldı. Hareketli fazın akış hızı: 0.7 mL/dk ayarlanarak 215 nm'de GSH ve GSSG tayin edildi [9]. Bitki örneğindeki C vitamini miktarının tayini için; yine santrifüjlenmiş süzüntünün üst kısmından 20 µl alınarak HPLC'ye enjekte edildi. HPLC'de hareketli faz: 3.7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH:4, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ile) Akış hızı: 0.7 mL/dk ve Dalgaboyu: 245 nm'de Inertsil ODS-4 (5 µm, 4.6×150 mm) kullanılarak C vitamini tayin edildi [10].

### **Bitki Örneğindeki A, E Vitamini Miktarlarının Belirlenmesi**

Yaprakları ince doğranmış tort bitkisi örneğinden yaklaşık 0.8'şer gram tartılarak polietilen tüplere alındı. Her bir tüp üzerine 5 mL etil alkol ilave edilerek vortekslendi. Daha sonra bu karışım 3500 devirde 3 dakika santrifüj edildi. Ardından örnekler üzerine 1 mL n-hekzan ilave edilerek çalkalandı. Böylece A, E vitamini n-hekzan fazına ekstrakte edilmiş oldu. Bu ekstraksiyon işleminin iki kez tekrarı ile elde edilen n-hekzan ekstraktları birleştirilip azot gazı altında kuruyuncaya kadar buharlaştırılarak uzaklaştırıldı. Tüpteki kalıntı 200 µL metanolle çözülerek HPLC'de analize hazır hale getirildi. A ve E vitamini tayinlerinde Supelcosil LC-18 kolonu (25 cm x 4.6 mm x 5.0 µm ) ve metanol: su (98:2 v/v) karışımından oluşmuş mobil faz kullanıldı. Mobil fazın akış hızı 1 mL/dk olarak ayarlandı. E vitamini 296 nm, A vitamini 326 nm'de tayin edildi [11-13].

### **Bulgular**

HPLC ile yapılan analizlerde; alınan kromatogramların pik alanı ve pik yüksekliği madde derişi ile doğru orantılıdır. Hesaplamalar kromatogramların pik alanları ya da pik

yüksekliklerine göre yapılabilir. Bu çalışmada pik yüksekliklerine göre hesaplama yapılmıştır. Her bir parametreye ait çalışma grafiğinin doğru denklemi, regresyon katsayısı ve çalışma aralığı Tablo 1’de verilmiştir.

**Tablo 1.** Parametrelere ait çalışma grafiklerinin doğru denklemleri ve regresyon katsayıları ile çalışma aralıkları

Parametreler	Doğru denklemi ve Regresyon katsayıları	Çalışma aralıkları
A Vitamini	$y = 0.2247x + 0.0453$ $R^2 = 0.9995$	0.1-3.0
E Vitamini	$y = 0.0196x + 0.0648$ $R^2 = 0.9991$	0.3-60
C Vitamini	$y = 2.9893x + 0.0025$ $R^2 = 0.9989$	0.2-4.0
Malondialdehit (MDA)	$y = 0.3945x + 0.1760$ $R^2 = 0.9903$	0.1-1.5
İndirgenmiş Glutatyon (GSH)	$y = 0.3041x - 0.1777$ $R^2 = 0.9935$	1.0-30
Yükseltgenmiş Glutatyon (GSSG)	$y = 0.1136x - 0.0398$ $R^2 = 0.999$	1.0-40

**Tablo 2.** Tort bitkisinin A, E, C vitamini, MDA, GSH ve GSSG miktarları

Parametreler	Bitki yaprağı ( $\mu\text{g/g}$ )
A vitamini	$0.76 \pm 0.09$
E vitamini	$0.096 \pm 0.015$
C vitamini	$30.88 \pm 6.22$
MDA	$255.54 \pm 26.65$
İndirgenmiş Glutatyon (GSH)	$4705.77 \pm 478.55$
Yükseltgenmiş Glutatyon (GSSG)	$3.21 \pm 1.74$

Analizler üç örnek halinde paralel yürütülerek, verilerin aritmetik ortalamaları ile standart sapmaları hesaplanmıştır.

## Sonuç ve Tartışma

Metabolizmada serbest radikaller ile antioksidan savunma sistemleri arasında bir denge vardır. Bu dengenin serbest radikaller yönünde bozulması oksidatif stres olarak tanımlanır. Bu stres lipitler, proteinler, karbonhidratlar ve DNA gibi biyolojik moleküllerde oksidatif hasarlara yol açar [14-16].

Karotenoidlerin, lipit peroksidasyonunda ortaya çıkan radikalleri önleme ve aktif oksijen türlerini durdurma gibi fonksiyonları vardır [17]. Yarpuz bitkisinin (*Mentha pulegium* L.) yapraklarındaki A vitamini miktarının incelendiği çalışmada, vitamin miktarının  $0.38 \pm 0.08$  µg/g olduğu bildirilmiştir [18]. Işgın (*Rheum ribes* L.) bitkisindeki A vitamini miktarının incelendiği çalışmada [19] ise, bitki çeşidindeki A vitamini miktarlarının ( $0.255 \pm 0.019$  –  $0.363 \pm 0.015$  µg/g) arasında değiştiği bildirilmiştir. Çalışmamızda Tort (*A.azurea* Miller var. *azurea*) bitkisinin yapraklarındaki A vitamini miktarının ( $0.76 \pm 0.09$  µg/g) olduğu Tablo 2’de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre tort bitkisinin, hem yarpuz bitkisi hem de ışgın bitkisine göre A vitamini miktarı bakımından daha zengin olduğu sonucuna varılmıştır.

E vitamini, lipit peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandıran ve diğer antioksidanlarla beraber kanserin yayılmasını ve tümörün gelişmesini önleyen antioksidan bir vitamindir [20, 21]. Bulgularımızda Tort (*A.azurea* Miller var. *azurea*) bitkisinin yapraklarındaki E vitamini miktarı ( $0.096 \pm 0.015$  µg/g) olarak belirlenmiştir (Tablo 2). Yarpuz bitkisinin yaprağındaki E vitamini miktarının ( $12.46 \pm 1.82$  µg/g) olduğu bildirilmiştir [18]. Ayrıca Kenger (*Gundelia Tournefortii*) bitkisinde yapılan bir çalışmada, bitkinin  $0.35 \pm 0.09$  µg/g E vitamini içerdiği tesbit edilmiştir [13]. Bu sonuçlara göre Tort (*A. azurea* Miller var. *azurea*) bitkisinin, yarpuz bitkisi ve kenger bitkisine göre düşük miktarda E vitamini içerdiği görülmektedir.

C vitamini (Askorbik asit); metabolizmada safra asitlerinin sentezi, demirin emilimi, lipit hidroperoksitlerin oluşumunun engellenmesi gibi birçok önemli görevlerde yer almaktadır. Ayrıca insan plazmasında ve hücre zarında bulunup, zarı geçebilen ve singlet oksijen temizleyicisi olan bir vitamindir [17, 22]. Bulgularımızda C vitamini miktarının ( $30.88 \pm 6.22$  µg/g) olduğu belirlenmiştir. Celak bitkisindeki C vitamini miktarının incelendiği bir çalışmada, vitamin miktarının  $14.25 \pm 2.25$  µg/g kadar olduğu bildirilmiştir [23]. Kenger bitkisinin incelendiği çalışmada [13] ise, bitkinin  $19.72 \pm 2.16$  µg/g C vitamini içerdiği tesbit edilmiştir. Buna göre Tort bitkisinin C vitamini miktarının, hem celak bitkisi hem de kenger bitkisinden daha fazla miktarda olduğu tesbit edilmiştir.

Metabolizmada oluşan serbest radikaller, membranların yapısındaki doymamış yağ asitlerine etki ederek lipid peroksidasyonuna neden olurlar. Lipit peroksitlerin parçalanması sonucunda MDA (Malondialdehit) denilen reaktif karbon bileşikleri meydana gelir [24, 25]. Bitkilerde stresin öncelikli etkilerinden biri olarak gösterilen lipid peroksidasyonun son ürünlerinden biri olan malondialdehit (MDA) analizleriyle stresin membranlardaki etkileri gösterilmektedir [26]. Bulgularımızda Tort (*A. azurea* Miller var. *azurea*) bitkisinin yapraklarındaki MDA miktarının ( $255.54 \pm 26.65 \mu\text{g/g}$ ) olduğu (Tablo 2) görülmektedir. Yarpuz bitkisinin yapraklarındaki MDA miktarının incelendiği çalışmada [18], MDA miktarının  $17.43 \pm 1.57 \mu\text{g/g}$  olduğu bildirilmiştir. Buna göre tort bitkisinin MDA miktarının yarpuz bitkisindeki MDA miktarından fazla olduğu belirlenmiştir. Tort bitkisindeki MDA miktarının yüksek olması, bitkinin stres altında olduğunun göstergesi olabilir.

Glutasyon, hücrenin oksido-redüksiyon dengesini sürdüren önemli bir indirgeyici ajan olup, hücreyi oksidanların zararlı etkilerine karşı koruyan antioksidan bir moleküldür [27, 28]. Ayrıca proteinlerdeki -SH gruplarının korunması, amino asitlerin transportu, protein ve DNA sentezi ve bazı reaksiyonlarda koenzim olarak görev yapar [29]. Bulgularımızda Tort (*A. azurea* Miller var. *azurea*) bitkisinin yapraklarındaki GSH miktarının ( $4705.77 \pm 478.55 \mu\text{g/g}$ ) olduğu (Tablo 2) görülmektedir. Çiriş otunun incelendiği çalışmada GSH ve GSSG miktarlarının sırası ile  $148.02 \pm 9.22 \mu\text{g/g}$ ;  $41.43 \pm 4.14 \mu\text{g/g}$  olduğu [30], yarpuz bitkisinin yapraklarındaki GSH ve GSSG miktarının  $185.71 \pm 10.61 \mu\text{g/g}$  ve  $280.48 \pm 24.58 \mu\text{g/g}$  olduğu [18] ve aspir bitkisinin yaprağındaki GSH ve GSSG miktarının ise;  $1203.37 \pm 81.02 \mu\text{g/g}$ ;  $358.23 \pm 53.67 \mu\text{g/g}$  olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir [31]. Bulgularımızdan Tort (*A. azurea* Miller var. *azurea*) bitkisinin yapraklarındaki glutasyon miktarının, çiriş otu, yarpuz ve aspir bitkisindeki glutasyon miktarlarından çok fazla olduğu belirlendi. Glutasyon bitkilerde oksidatif strese karşı en önemli bir metabolit olup, neredeyse bitkilerin bütün hücre kısımlarında bulunmaktadır [32, 33].

Sonuç olarak; Tort bitkisinin C vitamini ile Glutasyon miktarları bakımından zengin ve antioksidan özellikte bir bitki olduğu söylenebilir. Bu bitkinin yapısında bulunan biyoaktif bileşiklerin aydınlatılmasıyla, bu bitkinin daha iyi tanınacağı ve literatür bilgisine katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

## Kaynaklar

[1] A. Güner, N. Özhatay, T. Ekim, K. H. C. Başer, *Edinb. Univ. Press*, 2000, **11**.

- [2] E. Yeşilada, G. Honda, E. Sezik, M. Tabata, F. Tetsuro, T. Tanaka, Y. Takeda, Y. Takaishi, *J Ethnopharmacol*, 1995, **46**, 133-152.
- [3] G. Honda, E. Yeşilada, M. Tabata, E. Sezik, T. Fujita, Y. Takeda, Y. Takaishi, T. Tanaka, *J Ethnopharmacol*, 1996, **53**, 75-87.
- [4] A. Kuruuzum-Uz, H. Suleyman, E. Cadirci, Z. Guvenalp, L. O. Demirezer, *Z Naturforsch*, 2012, **67 (7-8)**, 360-366.
- [5] A. Kuruüzüm-Uz, Z. Güvenalp, C. Kazaz, L. Ö. Demirezer, *Azurea, Turk J Pharm Sci*, 2013, **10 (2)**, 177-184.
- [6] L. Deniz, A. Serteser, M. Kargioğlu, *AKÜ Fen Bilimleri Dergisi*, 2011, 57-72.
- [7] İ. Ü. Yapıcı, H. Hoşgören, Ö. Saya, *Dicle Üniversitesi Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi Dergisi*, 2009, **12**, 191-196.
- [8] F. Karatas, M. Karatepe, A. Baysar, *Anal Biochem*, 2002, **311**, 76-79.
- [9] P. Dawes, E. Dawes, SGE Chromatography Products Catalog, 2000, pp. 182.
- [10] B. Tavazzi, G. Lazzarino, D. Di-Pierro, B. Giardina, *Free Radical Biology & Medicine*, 1992, **13**, 75-78.
- [11] K. W. Miller, N. A. Lorr, C. S. Yang, *Analytical Biochemistry*, 1984, **138**, 340-345.
- [12] Supelco Chromatography Products for Analysis & Purification (2005-2006) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Export Department Eschenstraße Taufkirchen, Germany, s. 169.
- [13] Ö. Karaaslan, E. Çöteli, F. Karataş, *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2014, **7 (2)**, 159-168.
- [14] E. Y. Sözmen, *Yaşlanma biyokimyası*, In: Onat T., Emerk K., Sözmen E. Y., İnsan biyokimyası, Ankara, Palme Yayıncılık, 2002, 665-674.
- [15] C. C. Cross, B. Halliwell, E. T. Borish, W. A. Pryor, B. N. Ames, R. L. Saul, J. M. McCord, D. Harman, *Ann Intern Med*, 1987, **107**, 526-545.
- [16] O. Chappey, C. Dosoquet, M. P. Wautier, *Eur Clin Invest*, 1997, **27**, 97-108.

- [17] E. P. Nikolai, V. L. Tatyana, A. K. Tatyana, P. K. Lowell, *Free Rad. Bio. Med.*, 2001, **31** (3), 398-404.
- [18] E. Çöteli, Y. Erden, F. Karataş, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2013, **17** (2), 4-10.
- [19] Ö. Munzuroğlu, F. Karataş, N. Gür, *Turk J Biol*, 2000, **24**, 397-404.
- [20] J. Nordberg, E. S. J. Arner, *Free Radical Biology and Medicine*, 2001, **31** (11), 1287-1317.
- [21] A. Aydın, A. Sayal, A. Işimer, *Serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemi*, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Basımevi No: 20, Ankara, 2001, s. 75.
- [22] K. Kılınç, *Biyokimya Dergisi*, 1985, **10**, 60-89.
- [23] H. Tuncer, F. Karataş, *e-Journal of New World Sciences Academy*, 2012, **7** (3), 115-121.
- [24] M. J. Gonzalez, J. R. Miranda-Massari, E. M. Mora, A. Guzman, N. H. Riordan, H. D. Riordan, J. J. Casciari, J. A. Jackson, A. Roman-Franco, *Integrative Cancer Therapies*, 2005, **4**, 32-44.
- [25] K. H. Cheesman, T. F. Slater, *Br Med Bull*, 1993, **49**, 481-493.
- [26] D. M. Hodges, J. M. DeLong, C. F. Forney, R. K. Prange, *Planta*, 1999, **207**, 604-611.
- [27] J. B. Mitchell, A. Russol, *Br J Cancer*, 1987, **55**, 96-104.
- [28] M. Compoti, *Com Biochem Phys*, 1987, **88**, 177-180.
- [29] D. M. Ziegler, *Ann Rew Biochem*, 1985, **54**, 305-329.
- [30] F. Karataş, İ. Bektaş, A. Birişik, Z. Aydın, A. Kurtul, *SDU Journal of Science (E-Journal)*, 2011, **6** (1), 35-39.
- [31] F. A. Özdemir, F. Aymelek, F. Karataş, *Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2011, **23** (2), 71-76.
- [32] A. Jimenez, J. A. Hernandez, G. Pastori, L. A. Del Rio, F. Sevilla, *Plant Physiology*, 1998, **118**, 1327-1335.
- [33] T. Rausch, A. Wachter, *Trends Plant Sci*, 2005, **10**, 503-509.