

**CENTAUREA CARDUIFORMIS (PEYGAMBER ÇİÇEĞİ)'İN ANTIOKSİDAN
AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ**

Yener TEKELİ, Mehmet SEZGİN

*Selçuk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Alâeddin Keykubat
Kampüsü, 42075 Selçuklu-Konya
e-mail: ytekeli@selcuk.edu.tr

Alınış: 19 Haziran 2007, Kabul: 24 Ekim 2007

Özet: Bu çalışmada Konya civarından toplanan *Centaurea Carduiformis* DC. subsp. 'u yağından uzaklaştırılmak için sokslet apareyi ile petrol eterinde ekstrakte edildi. Sonra materyal %70 lik metanolde tekrar ekstraksiyona tabi tutuldu ve çözücüsünden uzaklaştırılarak liyofilize edildi. Antioksidan aktivitesi ölçülene kadar +4 °C de karanlıkta muhafaza edildi. Toplam fenolik madde konsantrasyonu gallik asit standardına göre Folin-Ciocalteu metoduna, serbest radikal süpürme etkisi DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikali) metoduna göre ve indirgeme gücü ise Oyaizu metoduna göre yapıldı. Sonuçlar sentetik antioksidan olan BHT (Butillenmiş Hidroksi Toluen)ve BHA (Butillenmiş Hidroksi Anisol) ile kıyaslandı. Sonuçlara bakıldığında antioksidan aktivitesi yönünden sıralama yaparsak BHA >BHT>*C.Carduiformis* şeklinde olduğu görüldü.

Anahtar kelimeler: *Centaurea*, Antioksidan, DPPH, Folin-Ciocalteu

**DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *CENTAUREA
CARDUIFORMIS***

Abstract: In this study, *Centaurea Carduiformis* DC. subsp. which was collected in region of Konya was extracted with petroleum ether using a soxhlet apparatus for remove it's oil. Then the defatted plant materials were extracted with 70% methanol and the extract was then filtered and concentrated in vacuo at 45 °C. Finally, the extract was lyophilized and kept in the dark at +4 °C until tested analyzed for antioxidant activity. Total phenol concentration of the extracts was estimated with Folin-Ciocalteu reagent using gallic acid as standard, free radical scavenging activities were determined based on DPPH and determined reducing power based on Oyaizu method. Results were compared with standard BHA and BHT, As a result, BHA, BHT and plant' antioxidant activities were determined; BHA >BHT>*C.Carduiformis*

Key words: *Centaurea*, Antioxidant, DPPH, Folin-Ciocalteu

GİRİŞ

Serbest radikal, atomik ya da moleküler yapılarda çiftlenmemiş tek elektron bölümlerine verilen isimdir. Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine girebilen bu moleküllere "oksidan moleküller" veya "reaktif oksijen partikülleri" de denmektedir (ÇAVDAR, SİFİL ve ÇAMSARI, 1997). Bu radikaller hücredeki diğer moleküllerle kolayca etkileşime girerek oksidatif stres meydana getirirler. Serbest

radikaller normal hücrel metabolizma sırasında oluşabildiği gibi, çeşitli dış etkenler aracılığı ile de meydana gelebilir. Oksidatif stres, organizmadaki pro-oksidan ve anti-oksidan dengenin bozulması olarak tanımlanmaktadır. Radikaller; lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi temel hücrel bileşenlerde hasara yol açabilme özelliğine sahiptir. Oluşan bu hasarın kanser, yaşa bağlı bağışıklık yetersizliği ve hipertansiyon gibi çeşitli hastalıklar ile ilişkilidir ve biyolojik yaşlanma sürecinde rol oynamaktadır. Günümüzde hemen her hastalığın bir dereceye kadar oksidatif strese bağlı olduğu kabul edilmektedir (ÇAKATAY ve KAYALI 2006). Canlı organizmalar serbest radikallerin etkisinden korunmak için antioksidatif korunma sistemine sahiptirler (TUNALIER vd. 2002). İnsanoğlu hayatı boyunca yaşamın beraberinde getirdiği stres vb. zorlukları aşmak, hastalıklardan korunmak için, yaşamak için gerekli olmazsa olmazların yanında, takviye kuvvetler almak durumundadır. Bu tür koruyucu engelleyici maddelere genellikle son zamanlarda önemi gittikçe artan antioksidan maddeler denir. Çoğunlukla polifenolik yapıda olan antioksidan maddeler neredeyse tüm bitkilerde, meyvelerde, sebzelerde, mikroorganizmalarda, mantarlarda ve hayvansal dokularda bulunmaktadır. Bu antioksidan maddelerin en önemlileri; tokoferoller, flavonoidler, karotenoidler ve askorbik asitdir (YANISHLIEVA, 2001; HUDSON, 1990 ve SHAHIDI, 2000). Bitkilere renklerini veren de büyük ölçüde bu polifenolik yapıları flavonoidlerdir ve 4000 civarında flavonoid bileşiğinin kimyasal yapısı aydınlatılmıştır (MURRAY 1996). Yapılan araştırmalar sonucunda antioksidanların başta kalp-damar hastalıkları olmak üzere daha birçok hastalığın oluşumunun önlenmesinde olumlu etkiler sağladığı tespit edilmiştir (PRATT ve HUDSON, 1990). 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).

MATERYAL VE METOT

Materyal

Deneylerimizde spektrofotometrik ölçümleri, Shimadzu-1700 – UV Spektrofotometresi ile ölçüldü. Kullanılan kimyasallardan, DPPH, BHT, BHA, folin reaktifi, metanol, Sigma-Aldrich den , petrol eteri, gallik asit potasyum ferrisiyanat trikloroasetikasit, NaCO₃, FeCl₃ ise Merck ten tedarik edilmiştir.

Metot

Ekstrelerin hazırlanması : 20 g toz drog Soxhlet aparatında önce yağlarından kurtarılacak 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 ekstreler liyofilizatörde kurutulmuştur.

Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini

Ekstreler içerisindeki toplam fenol miktarı Folin-Ciocaltaeu 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 Ciocaltaeu 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 4.3×10^{-3} mg/ml olacak şekilde hazırlanan örnek çözeltisinden 0.5 ml alınıp 2×10^{-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 absorbansı okunmuştur. 4.0×10^{-3} ve 2.0×10^{-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. (IC₅₀ mg/ml).

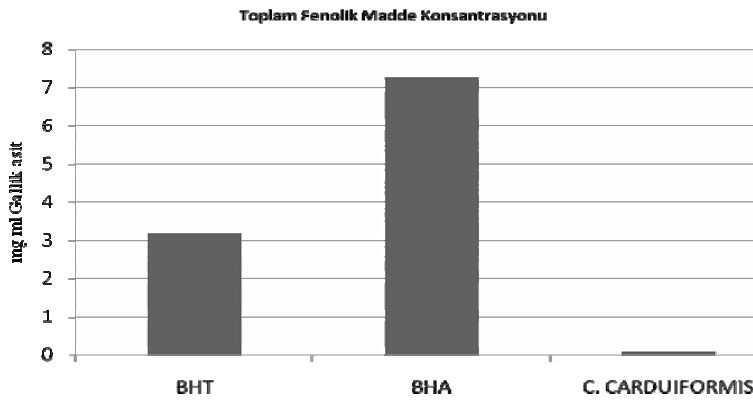
$$\% DPPH_{kalan} = (DPPH)_{t=30} / (DPPH)_{t=0} \times 100$$

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 ($[K_3Fe(CN)_6]$) 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 FeCl₃ ilave edildikten sonra 700 nm de absorbansı okunur. Tüm işlemler BHT ve BHA için de uygulanır. Konsantrasyon arttıkça artan absorbans değeri indirgeme yeteneğini gösterir.

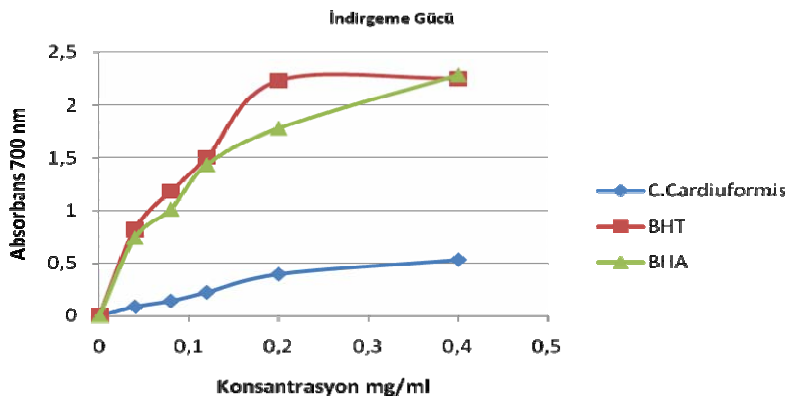
BULGULAR

Folin-Ciocaltaeu yöntemine göre yaptığımız toplam fenolik yapılı madde konsantrasyonları mg/ml gallik aside eşdeğer bazda gallik asidin kalibrasyon grafiğinden hesaplanmış ve sentetik antioksidan olduğu bilinen BHT ve BHA ile kıyaslanmıştır. Elde edilen bulgular Şekil.1. de gösterilmiştir.



Şekil.1. Standartların ve bitki ekstresinin gallik aside eşdeğer toplam fenolik madde konsantrasyonu.

Antioksidan indirgeme kabiliyeti ölçümü Oyaizu (1986) metoduna göre yapıldı ve Fe^{+3} - Fe^{+2} değişimi oluşan metal kompleksinin konsantrasyonuna bağlı olarak absorbans değişimleri Şekil.2. de gösterilmiştir. *C. Carduiiformis* ekstraktının ve BHA, BHT ile kıyaslaması yapılmıştır.

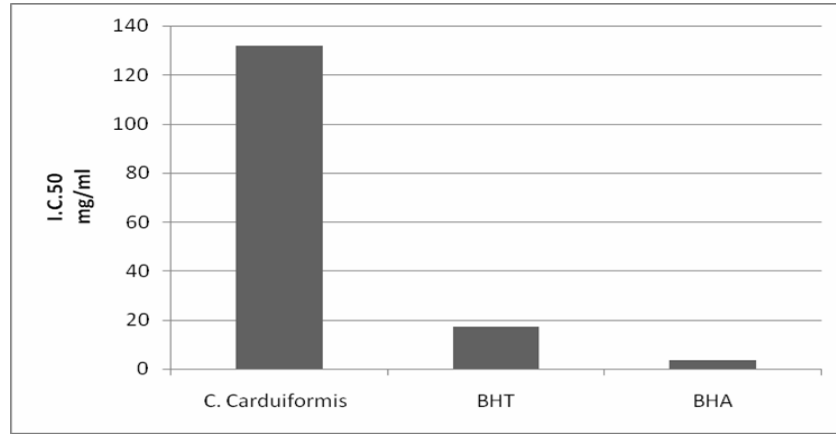


Şekil.2. Fe^{+3} - Fe^{+2} İndirgeme gücü kabiliyeti.

Antioksidan maddeler ortamdaki serbest radikalleri süpürebildiği ölçüde kuvvetlidir. DPPH metoduna göre yapılan radikal süpürme deneylerinde 517 nm de ölçülen absorbanlara bağlı olarak DPPH nin kalibrasyon grafiğinden faydalanılarak I.C.₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen değerler Tablo.1. de gösterilmiş, BHA ve BHT ile kıyaslanması ise Şekil.3. de belirtilmiştir.

Tablo.1. Numunelerin I.C.₅₀ değerleri;

Numune	I.C. ₅₀ mg/ml
<i>C. Carduiiformis</i>	131.88
BHT	17.343
BHA	3.593



Şekil.3. *C.Carduiformis* ve standartların DPPH radikal süpürme miktarları göre kıyaslanması.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Fenolik maddeler doğal antioksidanların en önemli gruplarını oluştururlar (TUNALIER vd. 2002). Dolayısıyla bir maddenin antioksidan etki yönünden kuvvetliliği içerdiği fenolik madde miktarına bağlıdır. Bu amaçla Folin-Ciocaltaeu yöntemiyle yapılan deneyde BHA, BHT ve *C.Carduiformis* in toplam fenolik madde içeriği mg/ml gallik asit cinsinden hesaplanmıştır. Bu değerler göre BHA içlerinde en fazla fenolik madde içeren bileşiktir. Üzerinde çalıştığımız *C.Carduiformis* ise nispeten daha zayıf olmasına rağmen yinede antioksidan aktivite etkisi göstermektedir. Bu kanıya varmak için DPPH yöntemiyle elde edilen sonuçlara baktığımızda ortamdaki serbest radikallerin bir kısmını süpürme yeteneğine sahip olduğunu görüyoruz. I.C.₅₀ değerleri ne kadar küçükse antioksidan aktivitesi de o kadar etkilidir. Bunun anlamı aynı miktar serbest radikali en düşük konsantrasyonda süpürebilen maddeler daha kuvvetli aktivite göstermektedir. Şekil.3. de gösterilen grafikte yine antioksidan aktivite yönünden BHA>BHT> *C.Carduiformis* olduğu görülmektedir. Bileşenlerin indirgeme kapasitesi onun antioksidan yönünden aktivitesini belirleyebilir (MEİR vd.1995). Şekil.2. ye bakıldığında madde konsantrasyonu arttıkça indirgene gücü de absorbanlara bağlı olarak artmaktadır. Bu değerler bakıldığında *C.Carduiformis* in sentetik antioksidanlara oranla daha zayıf antioksidan aktivite göstermektedir. Ancak yinede ortamdaki Fe⁺³ iyonlarını Fe⁺² ye indirgeme gücüne sahip olduğu anlaşılabilir.

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, *Gazi Üniversitesi 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, NORIEGA-RODRIGUEZ JA, MEDINA-JUAREZ LA, ORTEGA-GARCÍA, J, CAZAREZ-CASANOVA R, ANGULO-GUERRERO O, 1999. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76, 1445.
- HUDSON B, 1990. Food Antioxidants. *Elsevier Applied Science Publishers*, New York. Elsevier, New York, pp. 253–307.
- MEIR S, KANNER J, AKIRI B, HADAS SP, 1995. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43, 1813- 181.
- MURRAY MT., 1996. Encyclopedia of Nutritional Supplements. California, *Prima Publishing*, 1, 320-331.
- OYAIZU 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.
- PRATT DE, HUDSON, B, 1990. Natural Antioxidant not Exploited Commercially, in Food Antioxidants, 5, 171.
- SHAHIDI, F. 2000. Antioxidants in Food and Food Antioxidants, *Nahrung*, 44,158-163.
- 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*.
- WANG CK, LEE, WH, 1996. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 2014.
- YANISHLIEVA NV, POKOMY J, GORDON, M. 2001. Inhibiting Oxidation in Antioxidants in Food: Practical Applications., CRC press LLC and Woodhead Publishing Ltd, New York, USA, 288s.