

Quercus infectoria Meyvesinin Farklı Çözücüler ile Ekstrelerinin Hazırlanması, Fenolik Bileşiklerin Kantitatif Analizi ve Antioksidan Aktivitenin Araştırılması

Preparation of Extracts from *Quercus infectoria* gall with Different Solvents, Quantitative Analysis of Phenolic Compounds, and Investigation of Antioxidant Activity

Sevgi Edebali¹, Duygu Mısırlı¹, Merve Soy², Mahfuz Elmastaş^{1*}

¹University of Health Sciences Türkiye, Hamidiye Faculty of Pharmacy, İstanbul, Türkiye

²University of Health Sciences Türkiye, Hamidiye Institute of Health Sciences, Department of Pharmacognosy, İstanbul, Türkiye

ÖZET

Bu çalışmada *Quercus infectoria* gall meyvelerinin farklı çözücüler ile elde edilen ekstrelerinin kantitatif olarak fenolik bileşik içeriğinin belirlenmesi ve antioksidan aktivitenin araştırılması amaçlanmıştır. Kantitatif analiz C6 ters faz kolon kullanılarak Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile yapıldı. Antioksidan aktivite analizleri DPPH^{*}, ABTS^{**} ve CUPRAC in vitro testleri ile gerçekleştirildi. Etanol ekstresinde 23,44 mg/g ekstre konsantrasyonda sinamik asit, metanol ekstresinde 8,47 mg/g ekstre konsantrasyonda gallik asit, hekzan sonrası metanol ekstresinde de 8,83 mg/g ekstre konsantrasyonda gallik asit tespit edildi. Epikateşin ve rutin de tayin edilen diğer fenolik bileşiklerdir. DPPH^{*} radikal giderme aktivitesinde elde edilen IC₅₀ değerleri için Trolox, etanol, metanol ve hekzan sonrası metanol ekstrelerinde sırasıyla 4,29; 5,28; 2,96; 2,85 µg/mL olarak belirlendi. Hekzan ekstresinde DPPH^{*} radikal giderme aktivitesi bulunmamıştır. ABTS^{**} katyon radikal giderme aktivitesinde elde edilen IC₅₀ değerleri Trolox, etanol, metanol, hekzan sonrası metanol ve hekzan ekstrelerinde sırasıyla 3,33; 1,04; 1,72; 1,95 ve 13,21 µg/mL olarak bulunmuştur. CUPRAC indirgeme gücü mmol TE/g ekstre cinsinden hesaplanmıştır. Etanol, metanol ve hekzan sonrası metanol ekstrelerinde bulunan değerler sırasıyla 0,86; 0,44 ve 0,68'dir. Hekzan ekstresinde ise aktivite bulunmamıştır. *Quercus infectoria* gall meyvelerinin gallik asit, epikateşin, sinamik asit gibi fenolik bileşiklere sahip olduğu analiz edildi. Yapılan antioksidan analizlerinde bazı ekstrelerin standarda göre ve aynı familyadan olan farklı türlerine göre daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Quercus infectoria*, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi, fenolik bileşik, antioksidan aktivite

ABSTRACT

In this study, it was aimed to quantitatively determine the phenolic compound content of the extracts of *Quercus infectoria* gall fruits obtained with different solvents and to investigate the antioxidant capacity of the extracts. Quantitative analysis was conducted by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using a C6 reverse phase column. Antioxidant activity analyses were performed with DPPH^{*}, ABTS^{**} and CUPRAC in vitro tests. Cinnamic acid was detected at 23.44 mg/g extract concentration in the ethanol extract, gallic acid was detected at 8.47 mg/g extract concentration in the methanol extract, and gallic acid was detected at 8.83 mg/g extract concentration in the methanol extract after hexane. Epicatechin and rutin are other phenolic compounds that have also been determined. The IC₅₀ values for DPPH^{*} radical scavenging activity was obtained in Trolox, methanol, ethanol, methanol extracts after hexane 4.29, 5.28, 2.96, and 2.85 µg/mL, respectively. No DPPH^{*} radical scavenging activity was found in the hexane extract. IC₅₀ values were obtained for ABTS^{**} cation radical scavenging activity in Trolox, ethanol, methanol, post hexane methanol, and hexane extract 3.33, 1.04, 1.72, it was found to be 1.95 and 13.21 µg/mL, respectively. CUPRAC reducing power was calculated in mmol TE/g extract. The values were found in methanol, ethanol, methanol after hexane as 0.86, 0.44, and 0.68, respectively. No activity was found in the hexane extract. It was determined that *Quercus infectoria* gall fruits contain phenolic compounds such as gallic acid, epicatechin and cinnamic acid. In the antioxidant analyses, it was determined that some extracts showed higher antioxidant activity than the standards and different plant species from the same family.

Keywords: *Quercus infectoria*, High Performance Liquid Chromatography, phenolic compound, antioxidant activity

*Correspondence: mahfuz.elmastas@sbu.edu.tr

ORCID ID: 0000-0002-1502-1141

Received: 22.07.2024
Accepted: 10.10.2024

GİRİŞ VE AMAÇ

Quercus infectoria Fagaceae ailesine ait ağırlıklı olarak Yunanistan, Türkiye, Suriye ve İran'da doğal olarak yayılış göstermektedir (Umachigi vd., 2008). *Q. infectoria* meyveleri gal olarak da bilinir ve küresel yapıda, 1-2,5 cm arasında ve boğumlu bir yüzeye sahip, mavimsi yeşil, zeytin yeşili veya beyaz-kahverengi renktedir. *Quercus infectoria* bitkisinin farmakolojik özelliklerinin içeriğindeki fitokimyasallardan kaynaklandığı bildirilmiştir (Vermani vd., 2010). Meyvelerin farmakolojik olarak, antimikrobiyal, antidiyabetik, antiviral, lokal anestetik, antipiretik, antiparkinson, antienflamatuvar, yara iyileştirme ve antioksidan özellikleri daha önce yapılan çalışmalarda görülmüştür (Dardmah ve Farahpour, 2021). Ayrıca, antitümör etkisi olan tanen (%60-70), antivenom aktivitesi olan polifenoller, antioksidan aktivitesi olan gallik asit, metil gallat ve ellagik asit içerir. Tanenler genellikle 500 ya da 3000 dalton arasında değişen moleküler ağırlığa sahip, suda çözünen ve proteinleri çöktürme yeteneğine sahip polifenolik bileşikler olarak tanımlanır (Vaara, 1992).

Cynips galleae-tinctoria adlı bir mazi arısının meşe ağacının tomurcuklarına bıraktığı yumurtalardan çıkan kurtların salgılarıyla tomurcukların deforme olması sonucunda patolojik bir ürün olan gal oluşur. Gal, genellikle küremsi şekilli ve pürüzlü bir yüzeye sahip olup, içerdikleri bileşenler arasında gallik tanen, gallik asit, ellagik asit, nişasta, şeker ve kalsiyum oksalat bulunur. Mazi meşesi galleri, ilaç sanayisinde tannik asit elde etmek için kullanılır ve veterinerlikte ishal kesici ilaçların yapımında kullanılabilir. Ayrıca, boya, deri ve kumaş boyama gibi endüstriyel alanlarda da kullanımı mevcuttur.

Hindistan'da, *Q. infectoria* meyveleri çaylardan beri hem kırsal hem de kentsel alanlarda kaynatılarak veya demlenerek boğaz ağrısı ve kronik ishal için kullanılmaktadır (Dhiman, 2006). Malezya'da doğumdan sonra uterus duvarının elastikiyetini geri kazanması için kadınlar arasında diğer otlar ile içecek olarak tedavi amaçlı tüketilir (Rina vd., 2011). Toz, kaynatma, infüzyon ve merhem şeklinde kullanımı mevcuttur. *Q. infectoria* bitkisinin kanamayı durdurucu özelliği olduğu ve bu özelliğinden dolayı hemoroid, anal fistül, çatlamış meme uçları için de kullanıldığı rapor edilmiştir (Elham vd., 2021). Şişmiş

varisler için sıcak çay olarak ya da dışarıdan sıcak şekilde uygulanarak da kullanıldığı bildirilmiştir (Khare, 2004). Daha önce yapılan bir çalışmada *Q. infectoria* meyvelerinin yanık yarası enfeksiyonu üzerine de antimikrobiyal etkisi olduğu belirtilmiştir (Mengeloğlu vd., 2011). Türkiye'de *Q. infectoria* gall bitkisi genel olarak ishal tedavisinde ve kanamayı durdurmak için kullanılmaktadır. *Q. infectoria* gall antibakteriyel ve antimikrobiyal etkisi, bu veriler de dahil olmak üzere yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Baytop, 1999).

Quercus infectoria gall Olivier bitkisinin farklı çözücüler ile (etanol ve etil asetat fraksiyonu) elde edilen ekstrelerinin metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) suşlarına karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Chusri ve Voravuthikunchai, 2011). Ayrıca, daha önce yapılan çalışmalarda *Q. infectoria*'nın toz edilmesiyle elde edilen ekstrelerin, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* ve *Enterococcus faecalis* bakterileri üzerindeki etkisi araştırılmış ve sonuçlar ticari antibiyotiklerle karşılaştırıldığında ekstrelerin iyi bir antimikrobiyal etki gösterdiği rapor edilmiştir (Leela, Satirapipathkul, 2011). *Q. infectoria* ekstresinin oral patojen bakterilerden *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, üzerine etkisi araştırılmış ve oral patojenleri önlemede etkili bir fitoteröpatik ajan olduğu ve antibakteriyel aktivitesi belirtilmiştir (Basri vd., 2012).

Quercus infectoria gall bitkisinin halk arasında tedavi amaçlı kullanımına devam ediliyor olması yapılan çalışmalarda bildirilmektedir (Baytop, 1999). Farmakolojik etkilere sahip doğal kaynaklardan elde edilecek ürün/ürünlerin daha etkili ve düşük yan etki potansiyeli oluşturduğuna yönelik araştırmalar yapılmaktadır. *Q. infectoria* bitkisi ile ilgili birçok biyolojik aktivite ve bazı çalışmalarda da kimyasal içerik analizleri yapıldığı, yapılan literatür araştırmalarında görülmüştür (Kendir ve Güvenç, 2010). Farmakolojik aktivite göstermesinde etkili bileşiklerin saptanması son derece önem arz etmektedir. Elde edilecek bulgular ile ülkemizde doğal olarak yayılış

gösteren ve ekonomik olarak katma değeri olmayan bu bitki meyvesinin ilaç hammaddesi olarak kullanılabilirliği ortaya konulacağı öngörülmektedir. Bu nedenle, bu çalışmada *Q. infectoria* bitkisinin metanol, etanol ve hekzan ekstralarının içerdiği bireysel fenolik bileşiklerin analizleri yapılarak, farmakolojik ve biyolojik aktiviteden sorumlu bileşiğin hangisi olabileceği araştırılacak ve elde edilen kantitatif analiz sonuçları yorumlanacaktır. Ayrıca antioksidan aktivitesi araştırılacak ve bu aktiviteyi göstermesinde etkili olan bileşikler değerlendirilecektir.

MATERYAL VE METOT

Bitki Materyali

Quercus infectoria gall Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Eczacılık Fakültesi öğrencisi Sevgi Edebalı tarafından Siirt'ten getirilerek temin edildi. Bitki ile ilgili tür teşhisi Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Ahmet İlçim tarafından yapılmıştır.

Ekstrelerin Hazırlanması

Quercus infectoria gall laboratuvar tipi öğütücü ile toz edildikten sonra ekstralar aşağıda verildiği gibi hazırlandı. Metanol, etanol, asetonitril, formik asit, gallik asit, epikateşin, sinnamik asit, 4-Hidroksibenzoik asit, rutin, kuersetin, klorojenik asit, kafeik asit, ferulik asit, kikorik asit, *p*-kumarik asit, vanilik asit, apigenin 7-glikozit, salisilik asit ve naringenin kimyasal maddeler HPLC saflıkta (Sigma-Aldrich, Almanya) kullanıldı.

Metanol ekstresi için; 20 g öğütülmüş bitki materyali cam balona alınarak üzerine 500 mL metanol ilave edildi. Ağzı gevşek bir şekilde kapatılarak oda sıcaklığında iki saat orbital çalkalayıcı ile karıştırıldıktan sonra çözücü kısmı başka bir kaba alınarak posa üzerine tekrar aynı miktarda metanol ilave edilerek işlem tekrarlandı. Bu işleme renk berraklaşmaya kadar devam edildi. Daha sonra çözücü döner buharlaştırıcı ile düşük basınç altında uzaklaştırılarak metanol ekstresi elde edildi.

Etanol ekstresi için; 20 g öğütülmüş bitki materyali cam balona alınarak üzerine 500 mL etanol:su (80:20) ilave edildi. Ağzı gevşek bir şekilde kapatılarak oda

sıcaklığında iki saat orbital çalkalayıcı ile karıştırıldıktan sonra çözücü kısmı başka bir kaba alınarak posa üzerine tekrar aynı miktarda etanol:su (80:20) ilave edilerek işlem tekrarlandı. Bu işleme renk berraklaşmaya kadar devam edildi. Daha sonra etanol döner buharlaştırıcı ile düşük basınç altında uzaklaştırıldı. En son kalan sulu kısım liyofilizatör ile uzaklaştırılarak etanolik ekstre elde edildi.

Hekzan ekstresi için; 20 g öğütülmüş bitki materyali cam balona alınarak üzerine 500 mL hekzan ilave edildi. Ağzı gevşek bir şekilde kapatılarak oda sıcaklığında iki saat orbital çalkalayıcı ile karıştırıldıktan sonra çözücü kısmı başka bir kaba alınarak posa üzerine tekrar aynı miktarda hekzan ilave edilerek işlem tekrarlandı. Bu işleme renk berraklaşmaya kadar devam edildi. Daha sonra çözücü döner buharlaştırıcı ile düşük basınç altında uzaklaştırılarak hekzan ekstresi elde edildi.

Hekzan sonrası metanol ekstresi için; 20 g öğütülmüş bitki materyali cam balona alınarak üzerine 500 mL hekzan ilave edildi. Ağzı gevşek bir şekilde kapatılarak oda sıcaklığında iki saat orbital çalkalayıcı ile karıştırıldıktan sonra çözücü kısmı başka bir kaba alındı. Kalan posa üzerine 500 mL metanol ilave edilerek ağzı gevşek bir şekilde kapatıldı ve tekrar oda sıcaklığında iki saat orbital çalkalayıcı ile karıştırıldıktan sonra çözücü kısmı başka bir kaba alındı. Daha sonra çözücü döner buharlaştırıcı ile düşük basınç altında uzaklaştırılarak hekzan sonrası metanol ekstresi elde edildi.

Fenolik Bileşiklerin Kantitatif Analizi

Fenolik bileşiklerin belirlenmesinde HPLC yöntemi (High Performance Liquid Chromatography, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) kullanılmıştır. Analizler Sağlık Bilimleri Üniversitesi Fitoterapi Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada fenolik bileşiklerin kantitatif tayini için Shimadzu Nexera-i LC-2040C 3D Plus marka HPLC cihazı kullanılmıştır. Dedektör olarak fotodiyot dizisi dedektörü (SPD-M10A vp Photo Diode Array dedektör), kolon olarak Fenilheksil 3 µm, 4,6 mm x 150 mm (GL Sciences InterSustain, Japonya) C6 ters faz kolonu kullanıldı. Pompa (LC-10AD vp), gaz giderici (DGU-14A) ve otomatik enjeksiyon (SIL- 10AD vp) sistemine sahiptir. Mobil faz olarak asetonitril (Mobil faz B) ve su (%0.1 formik asit) (Mobil faz A) kullanıldı.

Gradyent olarak uygulanan pompa programı Tablo 1’de verilmiştir. Analiz esnasında kolon sıcaklığı 30°C olarak ayarlandı. Mobil faz akış hızı dakikada 1 mL olarak uygulandı.

Her ekstre ve standart için 1000 mg/mL stok çözeltiler hazırlandı. Ana stoklardan çeşitli konsantrasyonlarda olacak biçimde hazırlanan standart fenolik bileşiklerin alıkonma zamanları belirlendi. Alıkonma zamanları belirlendikten sonra fenolik madde miktarına karşı pik alanı olacak şekilde kalibrasyon grafikleri çizildi (Ataseven vd., 2021). Standart olarak

15 farklı fenolik bileşik kullanıldı; gallik asit, epikateşin, sinnamik asit, 4-Hidroksibenzoik asit, rutin, kuersetin, klorojenik asit, kafeik asit, ferulik asit, kikorik asit, *p*-kumarik asit, vanilik asit, apigenin 7-glikozit, salisilik asit ve naringenin. Her bir fenolik bileşik maksimum absorpsiyon değerine göre incelendi. Analiz süresi boyunca bütün standartlar -18°C’de saklandı. Ekstrelerde bu 15 fenolik bileşiklerin taraması yapılarak mevcut olanların kantitatif olarak hesaplamalar mg/g ekstre şeklinde yapıldı ve sonuçlar bu konsantrasyon birimi şeklinde verilmiştir.

Tablo 1. Fenolik bileşik analizinde kullanılan gradyent pompa programı

| Süre (dakika) | Mobil Faz B (%) | Mobil Faz A (%) |
|---------------|-----------------|-----------------|
| 0.01 | 5 | 95 |
| 7 | 9,5 | 90,5 |
| 20 | 17 | 83 |
| 35 | 40 | 60 |
| 40 | 0 | 100 |
| 40.01 | Bitiş | |

Antioksidan Aktivite Analizleri

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH^{*}) Radikal Giderme Aktivitesi

1 mM serbest bir radikal olan 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil radikali (DPPH^{*}) çözeltilisini hazırlamak için 9,35 mg DPPH^{*} etanolde çözülünceye kadar manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Toplam hacim 250 mL’ye tamamlandı. Standart hazırlamak için Trolox 2 mg/mL etanol ile balon jode hazırlandı. Bu stok çözeltiden seri dilüsyon ile 120, 80, 60, 40, 30 µg/mL’lik standartlar hazırlandı. Farklı konsantrasyonlarda (0,05; 0,025; 0,01; 0,005 mg/mL) örnekler hazırlanarak deneye geçildi.

Bir kuyucuğa 200 µL etanol (negatif kontrol) ve bir kuyucuğa 200 µL DPPH^{*} (pozitif kontrol) konuldu. Kalan kuyucuklara 10 µL standart ve örnekler eklendi ve üzerlerine 190 µL DPPH^{*} radikali ilave edildi. 30 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra 517 nm’de negatif kontrole karşı okundu (Brand-Williams vd., 1995). Sonuçlar yüzde aktivite şeklinde radikal giderme aktiviteleri hesaplandıktan sonra, radikalın yüzde elli (IC₅₀) inhibisyonunu sağlayan konsantrasyon hesaplanarak verilmiştir. Farklı

konsantrasyonlarda (50; 25; 10; 5; 3; 1 µg/mL) ekstrelerin DPPH^{*} giderme aktiviteleri yüzde olarak hesaplandıktan sonra elde edilen konsantrasyon-yüzde aktivite lineer grafik denklemi kullanılarak IC₅₀ değerleri µg/mL olarak hesaplandı. Yüzde inhibisyonlar aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$\text{DPPH}^* \text{ radikali giderme aktivitesi: } ((A_0 - A_1) / A_0) \times 100$$

A₀: Kontrol DPPH^{*} absorpsiyonu

A₁: Standardın (Trolox) veya ekstrelerin absorpsiyonu

2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit (ABTS^{**}) Katyon Radikali Giderme Aktivitesi

ABTS^{**} hazırlamak için 3,84 mg tartıldı ve 1000 mL suyla tamamlandı (7 mM). Potasyum persülfat çözeltisi hazırlamak için 55,91 mg tartıldı ve 1000 mL suyla tamamlandı (245 mM). Potasyum persülfatı 2,45 mM yapmak için 5,05 µL fosfat tamponu ve 500 µL ABTS^{**} karıştırıldı. Koyu mavi karışım elde edildi. 12-16 saat karanlıkta inkübe edildikten sonra oluşan karışım ABTS^{**} çözeltisidir. Sonra ABTS^{**} çözeltisinden 10 µL, sudan 550 µL su alınarak hazırlanan seyreltik çözeltinin absorpsiyon değerinin yaklaşık 0.700 (0.65-0.75) olması sağlandı. İstenilen aralıkta absorpsiyon

değerine ulaşınca gerekli hacimde katlanarak seyreltik ABTS** çözeltisi hazırlandı. Standart hazırlamak için önceden hazırlanan 2 mg/mL Trolox çözeltisinden seri dilüsyon ile 120, 80, 60, 40, 30 µg/mL'lik standartlar hazırlandı. Farklı konsantrasyonlarda (0,05; 0,025; 0,01; 0,005 mg/mL) örnekler hazırlanarak deneye geçildi. Bir kuyucuğa 10 µL etanol ve 190 µL su konuldu (negatif kontrol). Bir kuyucuğa 200 µL ABTS** konuldu (pozitif kontrol). Geri kalanlara 10 µL standart ve örnekler eklendi ve üzerlerine 190 µL ABTS** çözeltisi ilave edildi. 5 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra 734 nm'de negatif kontrole karşı okundu (Re vd., 1999). Sonuçlar yüzde aktivite şeklinde radikal giderme aktiviteleri hesaplandıktan sonra, radikalın yüzde elli (IC₅₀) inhibisyonunu sağlayan konsantrasyon hesaplanarak verilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda (50; 25; 10; 5; 3; 1 µg/mL) ekstrelerin ABTS** giderme aktiviteleri yüzde olarak hesaplandıktan sonra elde edilen konsantrasyon-yüzde aktivite lineer grafik denklemi kullanılarak IC₅₀ değerleri µg/mL olarak hesaplandı. Yüzde inhibisyonlar aşağıdaki formül ile hesaplandı.

ABTS** radikali giderme aktivitesi: $((A_0 - A_1) / A_0) \times 100$

A₀: Kontrol ABTS** absorbansı

A₁: Standardın (Trolox) veya ekstrelerin absorbansı

Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC)

CuCl₂.2H₂O hazırlamak için 33,63 mg tartıldı ve 25 mL suyla balon jodede tamamlandı. Neokuproini hazırlamak için 39 mg tartıldı ve 25 mL suyla balon jodede tamamlandı. Tampon çözelti hazırlamak için amonyum asetat 1,93 g tartıldı ve 25 mL suyla balon jodede tamamlandı (pH:7 olmalı). Standart hazırlamak için önceden hazırlanmış Trolox 8 mM'lık çözeltiden 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3 mM olmak üzere farklı konsantrasyonlarda standartlar hazırlandı. Ekstrelerin konsantrasyonları 0,05 mg/mL olarak hazırlandı. Bir kuyucuğa 50 µL CuCl₂, 50 µL Neokuproin, 50 µL

tampon çözelti ve 100 µL su eklendi (negatif kontrol). Geriye kalan kuyucuklara aynı sırayla 50 µL CuCl₂, 50 µL Neokuproin, 50 µL tampon çözelti eklendi. 37 derecede 15 dakika inkübe edildikten sonra 100 µL standart ve örnekler eklendi. 5 dakika inkübe edildikten sonra 450 nm'de negatif kontrole karşı okundu (Özyürek vd., 2011). Trolox'un farklı konsantrasyonları kullanılarak elde edilen kalibrasyon grafik denklemiyle bitki ekstralarının indirgeme gücü kapasiteleri gram ekstre başına mmol Trolox (mmol TE/g ekstre) eşdeğeri olarak hesaplandı.

İstatistiksel Analiz

Dört farklı bitki ekstraksiyonu ve kontrol gruplarıyla 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilen DPPH, ABTS, CUPRAC ve fenolik bileşik verilerinin aritmetik ortalaması ve standart sapmaları Excel'de hesaplandı.

BULGULAR

Fenolik Bileşik Analiz Bulguları

Quercus infectoria gall ekstralarının HPLC-PDA ile analizini gerçekleştirebilmek amacıyla öncelikle hareketli faz sistemi, kolon, kolon sıcaklığı, dedektör dalga boyları ve akış hızı gibi kromatografik parametreler belirlendi. Yöntemin validasyonu yapıldı.

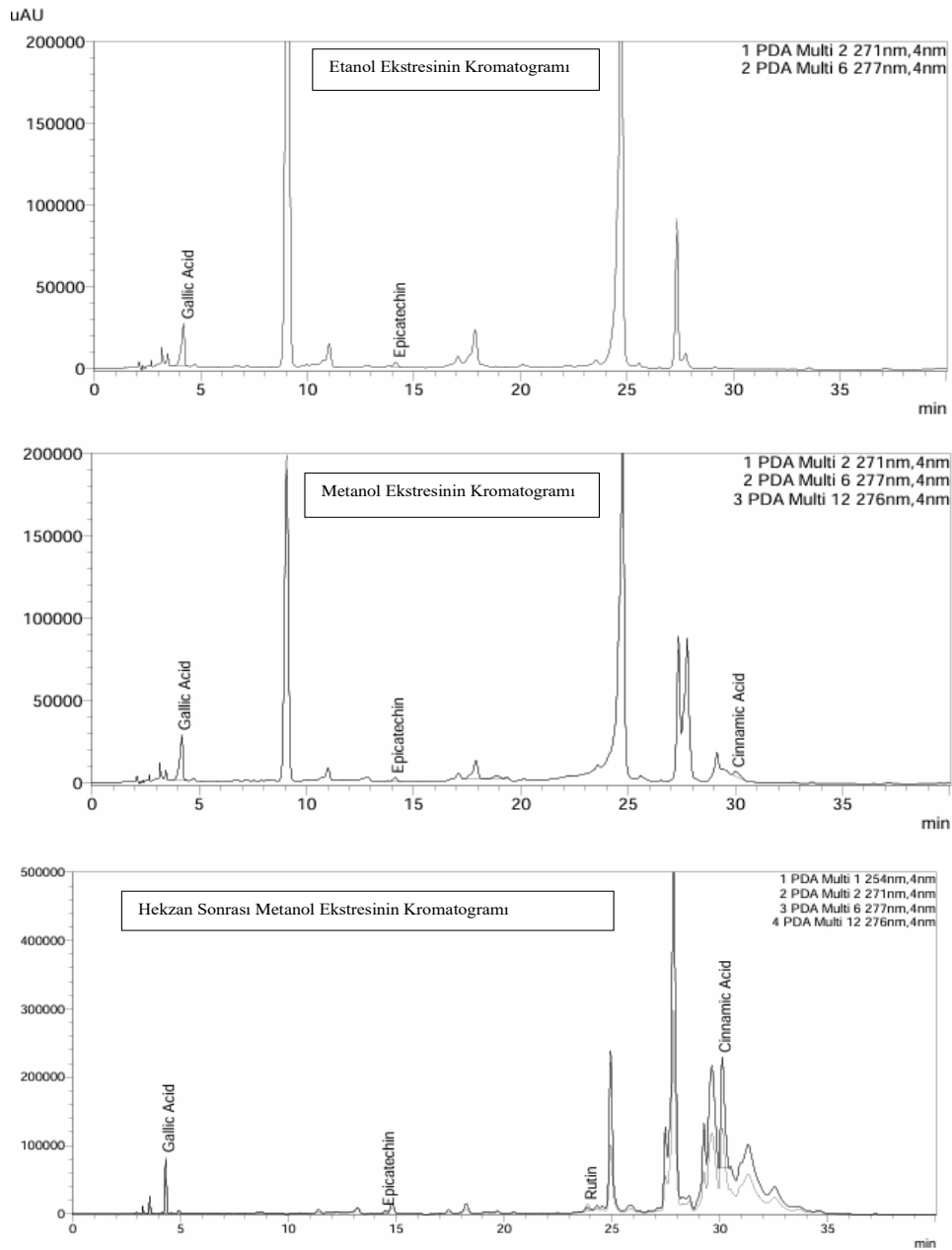
Meyveler toz edildikten sonra hazırlanan ekstralardan HPLC cihazına verilmek üzere örnekler hazırlandı. Etanol, metanol ve hekzan sonrası metanol ekstralarının 1mg/mL olacak şekilde stok çözeltiler HPLC hareketli fazı ile hazırlandı. Hazırlanan örnekler vorteksledi ve her örnekten 10 µL alınarak viallere konuldu. 30°C kolon sıcaklığında 40 dk boyunca analiz edildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 2' de verilmiştir. Her bir ekstreinin HPLC kromatogramı Şekil 1'de verilmiştir.

Tablo 2. Ekstrelerin fenolik bileşik içerikleri

| Ekstreler | Fenolik Bileşikler | Konsantrasyon (mg/g ekstre) | Alıkonma Zamanı (dk) |
|--|--------------------|-----------------------------|----------------------|
| Etanol Ekstresi | Gallik Asit | 13,58 ±1,21 | 4,31 |
| | Epikateşin | 9,01±1,05 | 14,5 |
| | Rutin | 7,18±1,22 | 23,87 |
| | Sinamik Asit | 23,44±2,21 | 30,10 |
| Metanol Ekstresi | Gallik Asit | 8,47±0,89 | 4,17 |
| | Epikateşin | 5,15±0,27 | 14,14 |
| Hekzan Sonrası Metanol Ekstresi | Gallik Asit | 8,83±0,32 | 4,18 |
| | Epikateşin | 3,84±0,13 | 14,13 |
| | Sinamik Asit | 0,67±0,05 | 29,99 |

Her bir ekstrede standart olarak 15 farklı fenolik bileşiklerin taraması yapıldı. Bu bileşikler gallik asit, epikateşin, sinamik asit, 4-Hidroksibenzoik asit, rutin, kuersetin, klorojenik asit, kafeik asit, ferulik asit, kikorik asit, *p*-kumarik asit, vanilik asit, apigenin 7-glikozit, salisilik asit ve naringenindir. Tüm ekstrelerde

gallik asit ve epikateşin bulunurken sinamik asit etanol ve hekzan sonrasında metanol ekstresinde bulundu. Rutin ise sadece etanol ekstresinde tespit edildi. Ekstrelerde bulunan fenolik bileşiklerin miktarları Tablo 2’de verilmiştir.



Şekil 1. Ekstrelerin HPLC analizlerinde elde edilen kromatogramlar

Quercus infectoria gall Etanol ve metanol ekstrlerinde 9. ve 24. dakikalarda en yüksek miktarda pikler bulundu ancak bu bileşiklerin standartları elimizde bulunmadığı için miktarları ve hangi bileşik olduğu belirlenememiştir (Şekil 1.). Benzer şekilde hekzan ekstrinden sonra elde edilen metanol ekstrinde de 25. ve 28. dakikalarda belirlenen piklerin de fenolik bileşik miktarları belirlenememiştir (Şekil 1.).

***Quercus infectoria* gall Ekstrelerinin Antioksidan Aktivite Bulguları**

Antioksidan aktivite analizleri için DPPH[•] radikal giderme aktivite, ABTS^{•+} katyon radikali giderme aktivite ve CUPRAC yöntemleri kullanıldı. DPPH[•] ve ABTS^{•+} deneylerinde IC₅₀ değerleri hesaplandı. IC₅₀ değeri başlangıçtaki serbest radikal miktarının %50'sinin süpürülmesi için gerekli bitki konsantrasyonunu ifade eder ve bu değer ne kadar düşük ise antioksidan aktivite o kadar iyi demektir. Standart olarak kullanılan Trolox ile kıyaslandı. Trolox'un DPPH[•] IC₅₀ değeri için 4,29 µg/mL olarak belirlendi. Elde edilen IC₅₀ değerleri DPPH[•] deneyi için etanol, metanol ve

hekzan sonrası metanol ekstralarında sırasıyla 5,28; 2,96; 2,85 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'dir. Bu durumda metanol ve hekzan sonrası metanol ekstralarının antioksidan aktivitesi standart olarak kullanılan Trolox'a göre daha yüksek radikal aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir (Tablo 3.).

ABTS** katyon radikali giderme aktivitesi ise elde edilen IC_{50} değerleri etanol, metanol ve hekzan sonrası metanol ekstralarında sırasıyla 1,04; 1,72 ve 1,95 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak bulunmuştur. Trolox IC_{50} değeri 3,33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'dir. Bu durumda etanol, metanol ve

hekzan sonrası metanol ekstralarının antioksidan aktivitesi standart olarak kullanılan Trolox'tan daha yüksek bir aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir (Tablo 3.).

CUPRAC deneyinde indirgeme gücü mmol TE/g Ekstre cinsinden hesaplanmıştır. Etanol, metanol ve hekzan sonrası metanol ekstralarında bulunan değerler sırasıyla 0,86; 0,44 ve 0,68 olarak tespit edilmiştir (Tablo 3.).

Tablo 3. Ekstrelerin antioksidan aktivite bulguları

| | DPPH* (IC_{50} $\mu\text{g}/\text{mL}$) | ABTS** (IC_{50} $\mu\text{g}/\text{mL}$) | CUPRAC (mmol TE/g Ekstre) |
|---------------------------------|--|---|-------------------------------------|
| Trolox (Standart) | 4,29±0,23 | 3,33±0,16 | - |
| Etanol ekstresi | 5,28±0,32 | 1,04±0,11 | 0,86±0,12 |
| Metanol ekstresi | 2,96±0,15 | 1,72±0,12 | 0,44±0,08 |
| Hekzan sonrası metanol ekstresi | 2,85±0,18 | 1,95±0,12 | 0,68±0,07 |

SONUÇ VE TARTIŞMA

Quercus infectoria gall bitkisinin farmakolojik özelliklerinin içeriğindeki fitokimyasallardan kaynaklandığı bildirilmiştir (Umachigi vd., 2008). Meyvelerin farmakolojik olarak, antimikrobiyal, antidiyabetik, antiviral, lokal anestetik, antipiretik, antiparkinson, antienflamatuvar, yara iyileştirme ve antioksidan özellikleri daha önce yapılan çalışmalarda görülmüştür (Vermani vd., 2010; Dardmah ve Farahpour, 2021). Daha önce *Q. infectoria* bitkisiyle yapılan bir çalışmada hayvanlardaki yara iyileştirilmesi incelenmiş ve bir grup yaralı hayvana bu bitki verildikten sonra iyileşme hızlanmıştır. Bunun nedeni araştırıldığında vücutta antioksidan enzimler olarak bilinen süperoksit dismutaz ve katalaz enziminde artış gözlemlenmiştir. Yapılan testlerde makrofajların ekstre ile inkübasyonu, hücreleri oksidatif strese karşı korumuş ve antioksidatif etki, tannik asit ve gallik asit gibi polifenollerle ilgili olduğu düşünülmüştür (Kaur vd., 2008). Bu çalışma bizim elde ettiğimiz sonuçları desteklemektedir. Çünkü, çalışmamızda tüm ekstralarda gallik asit ve epikateşin bulunmuştur.

Quercus infectoria gall bitkisi eski zamanlardan beri çeşitli geleneksel kullanımlarla adını duyurmuş ve halk arasında mazı meşesi olarak bilinen bir bitkidir. Bu bitki ile yapılan çalışmalarda bitkinin antibakteriyel, antimikrobiyal, antienflamatuvar, antidiyabetik ve antioksidan gibi farmakolojik etkileri kanıtlanmıştır. Aynı familyaya ait bir başka bitki olan *Q. coccifera* ile antioksidan çalışmalar yapılmış ve DPPH* deneyinde metanol ekstresinin IC_{50} değeri 43.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bulunmuştur. Yaptığımız bu çalışmada *Q. infectoria* DPPH* radikali giderme aktivite sonuçları bu bitki ile ilgili daha önce yapılan çalışmadan daha yüksek bir aktivite tespit edilmiştir (Elham vd., 2021).

Sanayi devrimi sonrası yeme alışkanlıklarının bozulması ve üretimin eski kalitesini kaybetmesiyle insan sağlığı olumsuz yönde etkilenmiştir. Hastalıkların tedavisi amacıyla dünya hükümetlerinin yaptığı harcamalar her geçen gün artmaktadır (Doğuç, 2021). Farmakolojik etkilere sahip doğal kaynaklardan elde edilecek ürün/ürünlerin daha etkili ve düşük yan etki potansiyeli oluşturduğuna yönelik araştırmalar etkili sonuçlar ortaya çıkarmıştır. Antioksidan aktivite de bu farmakolojik etkilerden biridir. Antioksidan analiz yöntemleri içerisinde en yaygın kullanılan

yöntemin DPPH* yöntemi olduğu yapılan literatür çalışmaları sonucunda tespit edilmiştir (Gülcin, 2012). Ancak etkinin farklı yöntemlerle ispatlanması da esastır. Bu nedenle yapılan üç farklı antioksidan aktivite analizlerinde de *Q. infectoria* bitkisinin iyi bir antioksidan ajan olduğu kanıtlanmış olup bu bitkinin ülkemizde geniş bir alanda yayılış göstermesi oldukça değerlidir. Yerli halk çok uzun zamandan beri bu bitkileri gerek etnobotanik özelliklerinden dolayı gerekse de ticari amaçları için toplayıp tüketmişlerdir. Bu bitki ile yapılacak çalışmalarla değerinin keşfedilmesi, bölgeye ekonomik, sosyal ve çevresel yönden pek çok katkı sağlayacaktır.

Özetle bitkilerde bulunan bazı kimyasal yapılar antioksidan aktivite gösterir. Bu kimyasal yapıların başında fenolik bileşikler gelmektedir. Daha önce *Q. infectoria* bitkisiyle yapılan kantitatif analizlerde bitki içeriğinde gallik asit, epikateşin, sinnamik asit vb. kimyasal yapılar saptanmıştır. Yapılan HPLC analiziyle de antioksidan aktiviteden sorumlu bu kimyasal yapılar olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada ekstrelerde yüksek konsantrasyonda bulunduğu halde elimizdeki standartlardan farklı bileşiklerin olduğu görüldü. Bu nedenle de *Q. infectoria* gall içeriğinde bulunan bileşiklerin saflaştırılması ve yapı analizlerinin yapılmasının yanı sıra saflaştırılacak bileşiklerin antioksidan kapasitesinin araştırılması gerekmektedir. İleride gerçekleştirilmesi gereken bu tür projeler ve çalışmalar, doğal ve yeni bileşiklerin keşfedilme potansiyelini artırmakla kalmayıp, literatüre de yeni bilgiler kazandırarak doğal antioksidan bileşiklerin ilgili teknolojik ve sanayi alanlarına hammadde sağlamasına olanak tanıyabilir.

KAYNAKLAR

- Ataseven, S., Misirli, D., Uzar, F., Türkan, N. N., Elmastaş, M. (2021). Determination of phenolic compound composition of water and ethanol extracts of horsetail (*Equisetum arvense*). *Journal of Integrative and Anatolian Medicine*, 2(2), 3-9.
- Basri, D. F., Tan, L. S., Shafiei, Z., Zin, N. M. (2012). In vitro antibacterial activity of galls of *Quercus infectoria* Olivier against oral pathogens. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012(1), 632796.
- Baytop, T. (1999). Geçmişte ve bugün Türkiye’de bitkiler ile tedavi. Nobel Tıp Kitabevi Ltd Şti. İstanbul.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Science and Technology* 28: 25–30.
- Chusri, S., Voravuthikunchai, S. P. (2011). Damage of staphylococcal cytoplasmic membrane by *Quercus infectoria* G. Olivier and its components. *Letters in applied microbiology*, 52(6), 565-572.
- Dardmah, F., Farahpour, M. R. (2021). *Quercus infectoria* gall extract aids wound healing in a streptozocin-induced diabetic mouse model. *Journal of Wound Care*, 30(8), 618-625.
- Dhiman, A. K. (2006). Ayurvedic drug plants. Daya Books.
- Doğuş, E. (2021). Türkiye’de sağlık harcamaları ve çözüm önerisi olarak davranışsal iktisat. *Uluslararası Sağlık Yönetimi ve Stratejileri Araştırma Dergisi*, 7(3), 647-664.
- Elham, A., Arken, M., Kalimanjan, G., Arkin, A., Iminjan, M. (2021). A review of the phytochemical, pharmacological, pharmacokinetic, and toxicological evaluation of *Quercus Infectoria* galls. *Journal of Ethnopharmacology*, 273, 113592.
- Gülcin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of toxicology*, 86, 345-391.
- Kaur, G., Athar, M., Alam, M. S. (2008). *Quercus infectoria* galls possess antioxidant activity and abrogates oxidative stress-induced functional alterations in murine macrophages. *Chemico-Biological Interactions*, 171(3), 272-282.
- Kendir, G., Güvenç, A. (2010). Etnobotanik ve Türkiye’de yapılmış etnobotanik çalışmalara genel bir bakış. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, (1), 49-80.
- Khare, C. P. (Ed.). (2004). Indian herbal remedies: rational Western therapy, ayurvedic, and other traditional usage, *Botany. Springer science & business media*.
- Leela, T., Satirapipathkul, C. (2011). Studies on the antibacterial activity of *Quercus infectoria* galls. In *International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, Singapore (Vol. 2011).
- Mengeloğlu, F. Z., Metin, U., Özdemir, N., Oduncu, M. K. (2011). Mazı meşesi (*Quercus infectoria*) gal tohumlarının antimikrobiyal etkinliği. *Dicle Medical Journal/Dicle Tıp Dergisi*, 38(3).
- Özyürek, M., Güçlü, K., Tütem, E., Başkan, K. S., Erçağ, E., Çelik, S. E., Baki, S., Yıldız, L., Karaman, S., Apak, R. (2011). A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Analytical methods*, 3(11), 2439-2453.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Rina, R., Rafiqzaman, M., Hasmah, A. (2011). Spectrophotometric determination of total phenol and flavanoid content in Manjankani (*Quercus infectoria*) extracts. *Health and the environment journal*, 2(1), 9-13.

19. Umachigi, S. P., Jayaveera, K. N., Kumar, C. A., Kumar, G. S., Kumar, D. K. (2008). Studies on wound healing properties of *Quercus infectoria*. *Tropical journal of Pharmaceutical research*, 7(1), 913-919.
20. Vaara, M. (1992). The outer membrane as the penetration barrier against mupirocin in gram-negative enteric bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 29(2), 221-222.
21. Vermani, A., Navneet, P., Chauhan, A. (2010). Physico-chemical analysis of ash of some medicinal plants growing in Uttarakhand, India. *Nature and Science*, 8(6), 88-91.