

CENTAUREA KOTSCHYI VAR. KOTSCHYI 'NİN ANTIOKSİDAN AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Yener TEKELİ¹, Mehmet SEZGİN¹

¹Selçuk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, 42075 Selçuklu-Konya

YAYIN KODU: 2008-08A

Özet

Centaurea türleri antioksidan aktivite açısından oldukça etkili türlerdendir. Bu çalışmada Konya civarından toplanan *Centaurea kotschyi var. kotschyi* Boiss.'in antioksidan aktivitesi in vitro olarak belirlendi. Bitki %70 lik metanolde ekstraksiyona tabi tutuldu ve çözücüsünden uzaklaştırıldı. Toplam fenolik madde konsantrasyonu gallik asit standardında Folin-Ciocalteu metoduna, serbest radikal süpürme etkisi DPPH metoduna göre yapıldı. Sonuçlar sentetik antioksidan olan BHT ve BHA ile kıyaslandı.

Anahtar Kelime: *Centaurea kotschyi var. kotschyi* , antioksidan, Folin-Ciocalteu, DPPH.

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *CENTAUREA KOTSCHYI VAR. KOTSCHYI*

Abstract

Centaurea species are very effective in terms of antioxidant activity. In this study, *Centaurea kotschyi var. kotschyi* Boiss. which was collected in region of Konya was determined antioxidant activity as in vitro. (The plant) Plant was extracted with 70 % methanol and removed from solvent. 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 (test). Results were compared with standard butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT).

Key Words: *Centaurea kotschyi var. kotschyi* , antioxidant, Folin-Ciocalteu, DPPH.

GİRİŞ

Serbest radikal, hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşan, ortaklanmamış bir veya daha fazla tek elektron içeren, kısa ömürlü, kararlı ve çok etkin moleküllerdir. Kolaylıkla elektron alışverişine girebildikleri için bu moleküllere oksidan moleküller veya reaktif oksijen türleri (ROT) de denmektedir [1]. Doğal olarak serbest radikallerin oksijenli solunum yapan organizmalarda meydana gelmesi kaçınılmazdır [2]. Bu radikaller hücredeki diğer moleküllerle kolayca etkileşime girerek oksidatif stres meydana getirirler. Serbest radikaller normal hücre 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 hücre bileşenlerinde 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 [3]. Canlı organizmalar serbest radikallerin etkisinden korunmak için antioksidatif korunma sistemine sahiptirler [4]. 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 [5-7]. Bitkilere renklerini veren de büyük ölçüde bu polifenolik yapıli flavonoidlerdir ve 4000 civarında flavonoid bileşiminin kimyasal yapısı aydınlatılmıştır[8]. Yapılan araştırmalar sonucunda antioksidanların başta kalp-damar hastalıkları olmak üzere daha birçok hastalığın oluşumunun önlenmesinde olumlu etkiler sağladığı tespit edilmiştir [9]. 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 isim-

lerle de anılmaktadır. *Centaurea* türleri halk tababetinde tek başına veya diğer bitkilerle birlikte antidiyabetik, antidiyareik, antiromatizmal, antiinflamatuvar, kolagog, koleretik, dijestif, stomajik, diüretik, adet söktürücü, astrenjan, hipotansif, antipiretik, sitotoksik, antibakteriyel amaçla kullanılmaktadır [10].

MATERYAL VE METOT

Deneylerde spektrofotometrik ölçümler, Shimadzu-1700-UV spektrofotometresi ile ölçüldü. Kullanılan kimyasallardan, DPPH, BHT, BHA, folin reaktifi, metanol, Sigma-Aldrich den , petrol eteri, galik asit, NaCO₃, ise Merck'ten tedarik edilmiştir.

Bitkisel Materyal

Centaurea kotschy var. kotschy Konya Akşehir Sultandağı mevkiinde toplanmış, Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Dr. Tuna UYSAL tarafından teşhis edildikten sonra S.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Herbariumunda muhafaza edilmiştir.

Ekstrelerin (Ekstarkların) hazırlanması : Gölgede kurutulduktan sonra 20 g toz haline getirilmiş bitki Sokslet apareyinde (cihazında) önce yağlarından arındırılmak üzere petrol eteri (40-60 °C) ile ekstrakte edilmiştir. Yağından uzaklaştırılan bitki %70'lik metanol ile 40 °C'lik karıştırmalı su banyosunda 60 dakika süre ile ekstrakte edilmiş ve süzümüştür. Bu işlem üç kez tekrarlanmış, süzüntüler birleştirilmiş ve metanollü kısımlar döner buharlaştırıcıda rotary evaporatörde yoğunlaştırıldıktan sonra ekstreler liyofilizatörde kurutulmuştur. Elde edilen droglar analiz edilmek üzere 44 °C de saklanmıştır.

Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini

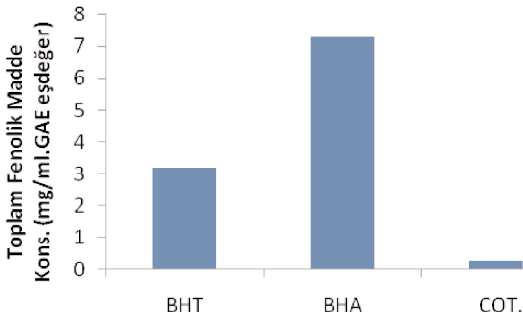
Ekstreler içerisindeki toplam fenol miktarı Folin-Ciocalteu yöntemine [11] göre yapılmıştır. Standart olarak kullanılan galik asit ve çalışılan bütün örnekler, %70'lik metanol (hacimce % 70'lik sulu metanol) içinde hazırlanmıştır. 0.5 ml örnek, 2.5 ml Folin Ciocalteu reaktifi (%10'luk, h/h, suda) ve 7.5 ml sodyum karbonat çözeltisi (%20'lik, a/h, suda) deney tüpüne karıştırılarak 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda çözeltilerin absorbanları 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

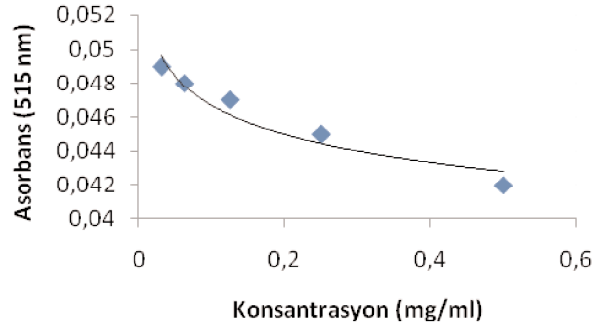
Ekstrelerin 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) üzerindeki serbest radikal süpürücü etkileri Sanchez-Moreno metoduna [12] göre yapılmıştır. Reaksiyon ortamındaki konsantrasyonu 4.3×10^{-3} mg/ml olacak şekilde hazırlanan örnek çözeltisinden 0.5 ml alınıp 2×10^{-2} g/L konsantrasyonda %70'lik metanol içinde hazırlanmış olan DPPH çözeltisinin 3ml (mL)'sine ilave edilmiş ve vortekste 30 saniye karıştırılarak oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda UV Spektrofotometresi'nde 515 nm de absorbansı okunmuştur. 4.0×10^{-3} g/L ve 2.0×10^{-2} g/L konsantrasyon aralığında DPPH standardı kullanılarak hazırlanan (hazırlanarak) ve aşağıdaki kalibrasyon denklemi kullanılarak reaksiyon ortamındaki DPPH konsantrasyonu (g/L) hesaplanmıştır. $A_{517nm} = 0,016(DPPH)_t + 0,006$ ($R^2 = 0.9980$) 30 dakika sonucunda reaksiyon ortamında kalan DPPH miktarı ise aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır. $(IC_{50} \text{ mg/ml}). \% DPPH_{kalan} = (DPPH)_{t=30} / (DPPH)_{t=0} \times 100$

SONUÇLAR

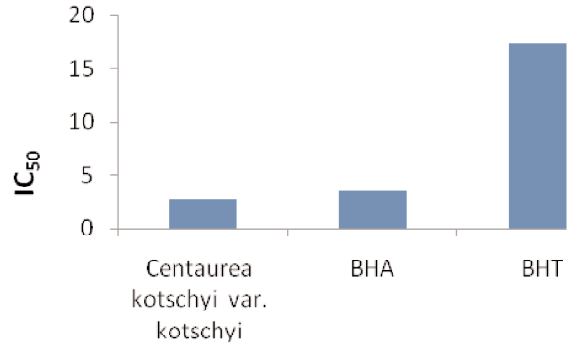


Şekil 1. Toplam fenolik madde konsantrasyonu. (GAE)

Folin-Ciocalteu yöntemine analizlerde göre yapılan toplam fenolik madde konsantrasyonu gallik aside eşdeğer (GAE) olarak hesaplanmıştır. Sentetik antioksidan madde olduğu bilinen BHA (butillenmiş hid



Şekil 2. Konsantrasyona bağlı absorbans değişim grafiği



Şekil 3. Bitkinin ve standartların IC50 değerleri

roksianisol) ve BHT (butillenmiş hidroksitoluen) ye karşı kıyaslanmıştır (Şekil 1).

Ektrelerin serbest radikal süpürme etkileri ise, bir radikal olan DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) in süpürülme miktarının ölçülmesine bağlı olarak, DPPH konsantrasyonundaki azalmalara dolayısıyla çözelti renginin açılmasına bağlı absorbans azalmalarına göre hesaplanmıştır (Şekil 2).

Gallik asidin kalibrasyon grafiği çizilmesiyle ortamdaki serbest radikallerin %50'sinin süpürülme miktarları göz önüne alındığında şekil.3 elde edilir.

TARTIŞMA

Fenolik maddeler doğal antioksidanların en önemli gruplarını oluştururlar [5]. Dolayısıyla bir maddenin antioksidan etki yönünden kuvvetliliği içerdiği fenolik madde miktarına bağlıdır. Bu amaçla Folin-Ciocalteu yöntemiyle yapılan deneyde BHA, BHT ve C.

kotschyi var. kotschyi in toplam fenolik madde içeriği mg/ml gallik asit cinsinden hesaplanmıştır. Bu değerler göre BHA içlerinde en fazla fenolik madde içeren bileşiktir. Dolayısıyla daha fazla antioksidan olduğu düşünülebilir. Üzerinde çalıştığımız *C. kotschyi var. kotschyi*'de ise en az fenolik madde içerdiği yani en az aktif antioksidan olduğu anlaşılır. Ancak serbest radikal süpürme etkisi dikkate alındığında IC50 değeri en az olan *C. kotschyi var. kotschyi*'dir. I.C.50 değerleri ne kadar küçükse antioksidan aktivitesi de o kadar etkilidir [13]. Bunun anlamı aynı miktar serbest radikali en düşük konsantrasyonda süpürebilen maddeler daha kuvvetli aktivite göstermektedir. Dolayısıyla *C. kotschyi var. kotschyi*'nin diğerlerinden daha fazla antioksidan aktivite gösterdiği anlaşılıyor. Fenolik madde konsantrasyonunun düşük olması her zaman daha zayıf antioksidatif etki gösterdiği anlamına gelmez. Zira bitkiler aynı zamanda iyi bir mineral ve vitamin kaynağıdır [14]. Bu vitamin ve mineraller aynı zamanda iyi bir antioksidan etkili maddelerdir [15-18]. Bu değerlendirmeler dikkate alındığında *C. kotschyi var. kotschyi* antioksidan etkili bir madde olarak hem gıda endüstrisinde hem de farmakolojide kullanılabilir.

TEŞEKKÜR

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

KAYNAKLAR

- [1] Çavdar, C., Sifil, A., Çamsarı, T. 1997. Reaktif oksijen partikülleri ve Antioksidan savunma. *Türk nefroloji ve transplantasyon dergisi*, 3(4), 92-95.
- [2] Ulusoy, E. 2005. Türkiye'nin bazı yörelerinden kestane ve çiçek ballarının antioksidan aktiviteleri ve mineral içeriklerinin karşılaştırılması. *Yüksek Lisans Tezi, KATÜ Fen Bilimleri Entitüsü, Trabzon*.
- [3] Çakatay, U., Kayalı, R. 2006. Serbest Radikal Biyokimyasının Tarihsel Süreçteki Gelişimi. *Cerrahpaşa tıp dergisi*, 37, 162-167.

Duman H., Kırimer N. 2002. Bazı sideritis türlerinin antioksidan etki ve fenolik bileşikler yönünden incelenmesi. *Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*. ISBN 975-94077, 2-8

- [5] Yanishlieva, N.V., Pokomy, J., Gordon., M. 2001. Inhibiting Oxidation in Antioxidants in Food: *Practical Applications.*, CRC press LLC and Woodhead Publishing Ltd, New York., 288s,
- [6] Hudson, B.J.F. 1990. Food Antioxidants. Elsevier Applied Science Publishers, New York. Elsevier, New York, 253pp.
- [7] Shahidi, F. 2000, *Antioxidants in Food and Food Antioxidants*. *Nahrung*, 3, 44,158-163.
- [8] Murray, M.T. 1996. Encyclopedia of Nutritional Supplements. *California, Prima Publishing*,320pp
- [9] Pratt, D.E., Hudson, B.J.F. 1990. *Natural Antioxidant not Exploited Commercially, in Food Antioxidants*, 5, 171-192.
- [10] Arif, R., Küpeli, R., Ergun, F. 2004. The Biological Activity of Centaurea L. Species. *G.Ü.Fen Bilimleri Dergisi*. 17(4): 149-164.
- [11] Gamez-Meza, N., Noriega-Rodriguez, J.A., Medina-Juarez, L.A., Ortega-Garcia, 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, 1445-1447
- [12] Wang, C.K., Lee, W.H. 1996. Separation, Characteristics, and Biological Activities of Phenolics in Areca Fruit. *J.Agric.Food.Chem.*, 44, 2014-2019
- [13] Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J., Shahabimajd, N. 2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants, *African J. Biotechnology*, 5(11), 1142- 1145.
- [14] Akinmoladun, A.C., Ibukun, E. O., Afor, E., Akinrinlola, B. L., Onibon, T. R., Akinboboye, A. O., Obuotor, E. M., Farombi, E. O. 2007. Chemical constituents and antioxidant activity of Alstonia boonei *African Journal of Biotechnology*. 6 (10), 1197-1201.
- [15] Satyanarayana, S., Sekhar, J. R., Kumar, K. E., Shanika, L. B., Rajanna, B., Rajanna, S. 2006. Influence of selenium (antioxidant) on gliclazide induced hypoglycaemia/anti hyperglycaemia in normal/alloxan-induced diabetic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry.*, 283 (1-2), 123-127.
- [16] Zuo, X. L., Chen, J. M., Zhou, X., Li, X. Z., Mei, G.Y. 2006. Levels of Selenium, Zinc, Copper, and Antioxidant Enzyme Activity in Patients with Leukemia. *Biological Trace Element Research.*, 114(1-3),41-53.
- [17] Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E. 2004. Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols And Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *J. Agric. Food Chem.* 52, 7970-7981.
- [18] Combs, G. F., Scott, M. L. 1974. Antioxidant effects on selenium and vitamin E function in the chick. *J.of Nutrition*. 104, 1297-1303.