

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENDEMİK *DIPLOTAENIA BINGOLENSIS* BİTKİSİNİN
ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MEHMET ERDOĞAN

KİMYA ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi İBRAHİM HALİL GEÇİBESLER

BİNGÖL-2018

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***DİPLOTAENIA BİNGOLENSIS* M. ÖZTÜRK, A. DURAN AND
BEHÇET TAKSONUNUN ANTIOKSİDAN AKTİVİTESİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mehmet ERDOĞAN

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Bu teztarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile kabul edilmiştir.

**Dr. Öğr. Üyesi
Hüseyin AKŞİT
Jüri Başkanı**

**Dr. Öğr. Üyesi
Sinan BAYINDIR
Üye**

**Dr. Öğr. Üyesi
İbrahim Halil GEÇİBESLER
Üye**

Yukarıdaki sonucu onaylarım

**Doç. Dr. Zafer ŞİAR
Enstitü Müdürü**

BİNGÖL-2018

ÖNSÖZ

Hem lisans hem de yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü bilgi ve birikimini benden esirgemeyen hep bir yol gösterici olan, azmi ve çabasını hep takdir ettiğim ve örnek aldığım, insani ve ahlaki değerleri ile örnek edindiğim yanında çalışmaktan onur duyduğum, tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi İbrahim Halil GEÇİBESLER'e derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Bu çalışmada gerçekleştirilen; bitki örneklerinin ekstraksiyonu, test numunelerinin hazırlanması, fraksiyonlandırma, ayırma, saflaştırma işlemlerinin yapıldığı Bingöl Üniversitesi Kimya Bölümü Organik Kimya Araştırma Laboratuvar çalışanlarına ve özellikle araştırma görevlisi Faruk DİŞLİ'ye HPLC-TOF/MS ve GC-MS çalışmalarının yapıldığı Çankırı Karatekin Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına, bitkisel materyalinin tür teşhisi ve toplanmasında yardımlarını esirgemeyen Bingöl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Lütfi BEHÇET'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim esnasında her türlü hoşgörü ve desteği benden esirgemeyen çok değerli eşim Yasemin'e çalışma esnasında fazla zaman ayıramadığım biricik oğlum Ali Eymen'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Mehmet ERDOĞAN

Bingöl 2018

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Botanik Kısım.....	2
1.1.1. <i>Diplotaenia bingolensis</i> Taksonun Genel Özellikleri	2
1.2. Tıbbi Aromatik Bitkilerde Kimyasal Çeşitlilik	3
1.2.1. Primer (Birincil) Metabolitler	3
1.2.1.1. Lipitler ve Türevleri.....	4
1.2.1.1.1. Linolenik Yağ Asiti ve Linoleik Yağ Asiti	5
1.2.1.2. Karbonhidratlar	6
1.2.1.3. Aminoasitler, Nonprotein Aminoasitler ve Proteinler.....	7
1.2.1.4. Nükleik Asitler, Nükleotidler ve Nükleozitler.....	7
1.2.2. Sekonder Metabolitler	7
1.2.2.1. Terpenler.....	8
1.2.2.2. Aromatikler.....	9
1.2.2.3. Aminler ve Alkoloitler.....	13
1.3. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar	14
1.4. Rutin	16
1.4.1. Rutin Molekülünün Biyolojik Aktiviteleri	16

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	18
2.1. <i>Diplotaenia bingolensis</i> Taksonu Üzerine Yapılan Fitokimyasal Çalışmalar.	18
2.2. <i>Diplotaenia bingolensis</i> Taksonu Üzerine Yapılan Biyolojik Aktivite Çalışmaları.....	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM	20
3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Reaktifler	20
3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	21
3.3. Kullanılan Kimyasal Çözeltiler ve Hazırlanması	23
3.4. Bitkisel Materyal	24
3.5. İzolatların Hazırlanması.....	24
3.5.1. Ekstraksiyon İşlemi	25
3.5.1.1. İnorganik Çözücü Sistemi ile Reflüks	25
3.5.1.2. Organik Çözücü Sistemi ile Reflüks	25
3.5.2. Fraksiyonlandırma İşlemi.....	26
3.5.3. Kantitatif Sekonder Metabolit Analiz Deneyleri	27
3.5.3.1. Toplam Fenol İçeriğinin Belirlenmesi.....	27
3.5.3.2. Toplam Flavonoit İçeriğinin Belirlenmesi	27
3.5.3.3. Lipofilik Bileşenlerin Belirlenmesi	28
3.5.3.4. Polar Bileşenlerin Belirlenmesi	29
3.5.4. Antioksidan Aktivite Testleri	30
3.5.4.1. DPPH Serbest Radikali Giderme Aktivitesi	30
3.5.4.2. Ferröz İyonları (Fe^{+2}) Şelatlama Aktivitesi	30
3.5.4.3. Toplam İndirgeme Gücü Aktivitesi.....	31
3.5.4.4. ABTS Katyon Radikali Giderme Aktivitesi	31
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	33
4.1. Ekstraksiyon ve Fraksiyonlandırma Verim Bulguları	33
4.2. Toplam Fenol ve Flavonoit Madde Miktarına Ait Bulgular.....	34
4.3. Polar Bileşenlerin Kantitatif Analizine Ait Bulgular.....	36
4.4. Polar Bileşenlere Ait Bulgular.....	40
4.5. Antioksidan Aktivite Testlerine Ait Bulgular.....	43

4.5.1. DPPH Radikali Giderme Aktivitesine Ait Bulgular	43
4.5.2. Toplam İndirgeme Kuvvetine Ait Bulgular	44
4.5.3. Ferröz İyonlarının (Fe^{2+}) Şelatlanmasına Ait Bulgular	45
4.5.4. ABTS Katyon Radikali Giderme Aktivitesine Ait Bulgular.....	45
4.6. İzolatların Etkili Konsantrasyon Değerlerine (EC_{50}) İlişkin Bulgular	46
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	48
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	58

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

µg	: Mikrogram
µM	: Mikromolar
1:1	: Birebir oran
DMSO	: Dimetil sülfoksit
g	: Gram
GC-MS	: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
HPLC-TOF/MS	:Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi-Uçuş Zamanlı/Kütle Spektrometresi
L	: Litre
M	: Molarite
m/z	: Kütle/yük oranı
MeOH	: Metanol
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
nm	: Nanometre
UV-VIS	: Ultraviyole Görünür Bölge Spektroskopisi
v/v	: Hacimsel oran
RT	: Alıkonma süresi
BHA	: Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	: Bütillenmiş hidroksitoluen
TCA	: Trikloroasetik asit
DPPH	: 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil radikali
DPPH-H	: İndirgenmiş 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil
ABTS	: 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit radikali
Troloks	: 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit
GAE	: Gallik asit ekivalent
QE	: Kersetin ekivalenti

FCR	: Folin-Ciocalteu reaktifi
(AH) _n	: Antioksidan
A _{Kontrol}	: Kontrol numunesinin absorbansı
A _{Numune}	: Numune absorbansı
µm	: Mikrometre
ALT	: Alanin Aminotransferaz
AST	: Aminotransferaz
°C	: Santigrat Derece
DCM	: Diklorometan
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
GSH	: Glutatyon
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
mg	: Mili Gram
mL	: Mili Litre
NAD	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADP	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
nm	: Nanometre
Q3G	: Kersetin-3-Glukozid
RNA	: Ribo Nükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksiyen Türleri
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
UV	: Ultra Violet
H ₂ O-Hex	: Su- hekzan fraksiyonu
H ₂ O-DCM	: Su- diklorometan fraksiyonu
H ₂ O-EtOAc	: Su- etil asetat fraksiyonu
H ₂ O-But	: Su- bütanol fraksiyonu
MeOH:DCM	: Metanol:diklorometan
MeOH:DCM-H	: Metanol:diklorometan- hekzan fraksiyonu

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	<i>Diplotaenia bingolensis</i> arazi görüntüsü (a) ve herbaryum örneği (b) ...	3
Şekil 1.2.	Bitkilerde bulunan bazı doğal hidrokarbonlar	4
Şekil 1.3.	Bitkilerde bulunan poliasetilenlere örnekler	5
Şekil 1.4.	Bitkilerde bulunan fonksiyonel hidrokarbonlar	5
Şekil 1.5.	Doğal ürünlerde bulunan terpen sınıflarının kimyasal yapıları	8
Şekil 1.6.	Tetrapirel olan klorofil A ve klorofil B'nin kimyasal yapıları	9
Şekil 1.7.	Bitkilerde bulunan basit fenollerin kimyasal yapıları	10
Şekil 1.8.	Bitkilerde bulunan fenil eter bileşiklerinin kimyasal yapıları	10
Şekil 1.9.	Bitkilerde bulunan fenilporopanoit bileşiklerinin kimyasal yapıları	11
Şekil 1.10.	Bitkilerde bulunan flavonoit bileşiklerin ana sınıflarını temsil eden kimyasal yapılar	11
Şekil 1.11.	Bitkilerde bulunan kondense ve hidrolizlenebilir tanenleri temsil eden kimyasal yapılar	12
Şekil 1.12.	Bitkilerde bulunan antrakinonların kimyasal yapıları	13
Şekil 1.13.	Bitkilerde yaygın olarak bulunan aromatik aminlerin kimyasal yapıları	13
Şekil 1.14.	Bitkilerde alkoloit ana sınıfları ve indolizidin sınıfı alkolitlerin kimyasal yapıları	14
Şekil 1.15.	Rutin'nin kimyasal yapısı	16
Şekil 2.1.	<i>D. bingolensis</i> taksonundan analiz edilen bazı sekonder metabolitler ...	18
Şekil 2.2.	<i>D. damavandica</i> türünden izole edilen kumarin türevi bileşikler	19
Şekil 3.1.	<i>D. bingolensis</i> taksonu için uygulanan ekstraksiyon işlem ve basamakları	26
Şekil 3.2.	Toplam fenol ve flavonoit madde analizi için kullanılan UV-VIS spektrometre	28
Şekil 3.3.	Apolar bileşenlerin kantitatif analizi için kullanılan GC-MS spektrometresi	29

Şekil 3.4.	Polar bileşenlerin kantitatif analizinde kullanılan HPLC-TOF/MS spektrometresi	30
Şekil 4.1.	Toplam fenolik miktarının tayini için kullanılan gallik asit ekivalent grafiği	34
Şekil 4.2.	Toplam flavonoit tayini için kersetinin kalibrasyon grafiği	35
Şekil 4.3.	<i>D. bingolensis</i> 'in su izolatından elde edilen alt fraksiyonların HPLC-TOF/MS kromatogramları	38
Şekil 4.4.	<i>D. bingolensis</i> MeOH:DCM izolatından elde edilen alt fraksiyonların HPLC-TOF/MS kromatogramları.	40
Şekil 4.5.	<i>D. bingolensis</i> 'in apolar izolatların GC-MS kromatogramları	43
Şekil 5.1.	Bir antioksidan tarafından DPPH radikalinin giderilmesi	50
Şekil 5.2.	ABTS'nin açık kimyasal yapısı	50

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 4.1.	<i>D. bingolensis</i> 'in toprak üstü kısmının ekstraksiyon, fraksiyonlandırma işleminde kullanılan çözücü miktarları, izolat miktarları ve ekstraksiyon verimleri	33
Tablo 4.2.	Numunelerin içermiş olduğu toplam fenol ve toplam flavonoit madde miktarları	35
Tablo 4.3.	<i>D. bingolensis</i> izolatlarındaki polar bileşenlerin kantitatif dağılımları ($\mu\text{gHB/mgKİ}$)	37
Tablo 4.4.	<i>D. bingolensis</i> 'in apolar bileşenlerinin kantitatif analizi	40
Tablo 4.5.	Numunelerin farklı konsantrasyondaki DPPH radikali giderme aktivitesi	44
Tablo 4.6.	Numunelerin farklı konsantrasyondaki ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) indirgeme gücü aktivitesi	44
Tablo 4.7.	Numunelerin farklı konsantrasyonda ferröz (Fe^{2+}) iyonu şelatlama kapasiteleri	45
Tablo 4.8.	Numunelerin farklı konsantrasyon aralıklarında ABTS katyon radikali giderme aktivitesi	46
Tablo 4.9.	<i>D. bingolensis</i> izolatlarının etkili konsantrasyon değerleri (EC_{50})	47

ENDEMİK *DIPLOTAENIA BİNGOLENSIS* BİTKİSİNİN ANTIOKSİDAN AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Endemik *D. bingolensis* türünün toprak üstü kısımlarının önce inorganik sonra organik çözücü sistemleri ile reflüksü sonucu inorganik ve organik ham izolatları elde edildi. İnorganik ham izolatın hekzan, diklormetan, etilasetat ve butanol ile ardışık fraksiyonlandırılması sonucu H₂O-Hex, H₂O-DCM, H₂O-EtOAc ve H₂O-But izolatları elde edildi. Organik ham izolatın hekzan, diklormetan, etilasetat, butanol ve su ile fraksiyonlandırılması neticesinde ise sırasıyla MeOH:DCM-Hex, MeOH:DCM-DCM, MeOH:DCM-EtOAc, MeOH:DCM-But ve MeOH:DCM-H₂O izolatları elde edildi. Elde edilen her bir izolatın içermiş olduğu toplam fenolik madde ve flavonoit madde miktarları UV-VIS spektrofotometresi ile, apolar bileşenlerin analizi GC-MS spektrometresi ile, polar bileşenlerin kantitatif analiz ise HPLC-TOF/MS spektrofotometresi ile analiz edildi. Ayrıca her bir izolatın biyolojik aktivitesi DPPH radikali giderme aktivitesi, ABTS kation radikali giderme aktivitesi, ferrik iyonları indirgeme kapasitesi ve ferröz iyonlarını şelatlama potansiyelleri gibi farklı antioksidan aktivite testleri ile mukayese edildi. H₂O-DCM (137,08±2,08 µgKE/mgKİ) ve MeOH:DCM-EtOAc (127,08±5,21 µgKE/mgKİ) izolatının flavonoit içeriği açısından, H₂O-DCM (665,83±47,62 µgGAE/mgKİ) ve MeOH:DCM-EtOAc (724,65±43,64 µgGAE/mgKİ) izolatlarının toplam fenol içeriği açısından en zengin izolatlar olduğu analiz edildi. MeOH:DCM-Hex ve MeOH:DCM-DCM izolatlarının linoleik asit (%16,95 ve 11,04) ve linolenik asit (%22,11 ve 18,45) içerdiği tespit edildi. Bütün izolatların rutin ve klorojenik asit açısından zengin olduğu belirlendi. En yüksek DPPH radikali giderme aktivitesi 46,43±1,36 ve 47,58±10,03 µg/mL EC₅₀ değerleri ile H₂O-DCM ve MeOH:DCM-EtOAc izolatlarında görüldü.

Anahtar Kelimeler: *Diplotenia bingolensis*; rutin; linoleik asit; klorojenik asit; DPPH radikali.

INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *BINGOLENSIS* PLANT OF ENDEMIC *DIPLOTAENIA*

ABSTRACT

Inorganic and organic crude isolates were obtained from the aerial parts of the endemic *D. bingolensis* species with refluxing first with inorganic, then with organic solvent systems. H₂O-Hex, H₂O-DCM, H₂O-EtOAc and H₂O-But isolates were obtained by successive fractionation of the inorganic crude isolate with hexane, dichloromethane, ethylacetate and butanol, respectively. Isolates of MeOH:DCM-Hex, MeOH:DCM-DCM, MeOH:DCM-EtOAc, MeOH:DCM-But and MeOH:DCM-H₂O were obtained by fractionation of the organic crude isolate with hexane, dichloromethane, ethyl acetate, butanol and water, respectively. The total amount of phenol and flavonoids contained in each isolate was analyzed by UV-VIS spectrophotometry, analysis of lipophilic components by GC-MS spectrometry, and quantitative analysis of hydrophilic components by HPLC-TOF/MS spectrophotometer. Furthermore, the biological activity of each isolate was compared with different antioxidant activity tests such as DPPH radical scavenging activity, ABTS cation radical scavenging activity, ferric ion reduction capacity and chelating potentials of ferrous ions. (H₂O-DCM (137.08±2.08 µgKE/mgKI) and MeOH:DCM-EtOAc (127.08±5.21 µgKE/mgKI) isolates in terms of flavonoid content, (H₂O-DCM (665.83±47.62 µgGAE/mgKI) and MeOH:DCM-EtOAc (724.65±43.64 µgGAE/mgKI) isolates were the richest isolates in terms of total phenol content. MeOH:DCM-Hex and MeOH:DCM-DCM isolates contained linoleic acid (16.95% and 11.04) and linolenic acid (22.11% and 18.45). It was analyzed that the all isolates were rich in terms of rutin (1.231-47.231 µgHB/mgKI) and chlorogenic acid (0.121-12.122 µgHB/mgKI). H₂O-DCM and MeOH:DCM-EtOAc isolates were showed the highest DPPH radical scavenging activity with 46.43±1.36 and 47.58±10.03 µg/mL EC₅₀ values, respectively.

Keywords: *Diplotenina bingolensis*; rutin; linoleic acid; chlorogenic acid; DPPH radicali.

1.GİRİŞ

Tıbbi ve aromatik bitki kullanımı, insanlığın başlangıcına kadar uzanmaktadır. İnsanoğlu doğada bulabildiği doğal maddeleri; acılarını, hastalıklarını ve yaralarını iyileştirebilecek şekilde kullanmıştır. Önemli hastalıkların tedavisinde devrim yaratan doğal ilaç etken maddelerinin doğal kaynaklardan keşfi her zaman ilgi çekici olmuştur. Etkili ve yeni ilaç geliştirmek için kimyasal çeşitlilik sunan doğa ana kaynak olmaya devam ederken multidisiplinlerin dinamik bir sürece girmesi son derece önemlidir. Günümüzdeki multidisiplin çalışmalar neticesinde bitkisel kaynaklardan birçok faydalı ilacın geliştirilmesinin yanında uçucu yağlar, farmasötik ilaçlar, renklendiriciler, boyalar, kozmetik ürünler ve biyositler gibi sayısız endüstriyel ürünler bitkilerden elde edilmiştir. Endüstriye ham bitkisel materyal temin etmek için bazı tıbbi ve aromatik bitkilerin aktif tarımı yapılırken bazıları ise hala doğal habitatlarından toplanmaktadır (Lubbe ve Verpoorte 2011).

Dünya genelinde tıbbi ve aromatik bitkilerden elde edilen terapötik gibi bileşiklerin biyoaktif bileşenleri ve biyolojik aktivitelerinin araştırılmasına yoğun bir ilgi vardır. Tıbbi bitki terimi çoğunlukla bitkilerin tıbbi özellikleri olduğu ve bu tıbbi bitkilerin biyolojik olarak aktif maddeler içerdiğini, yani sağlıkla ilgili etkilerin bulunduğunu ve “Batı Standartları” tarafından ilaç olarak yararlı oldukları kanıtlanmıştır (Farnsworth ve Solejarto 1991).

Ülkemizin tıbbi ve aromatik bitki çeşitliliği bakımından zenginliği göz önüne alınacak olursa etkili ve katma değeri yüksek doğal ürünlerin birçoğunun keşfedilmediği görülecektir. Bu bağlamda özellikle Güney ve Doğu Anadolu gibi bakir bölgelerde hala yeni bitki taksonları keşfedilmemesi de bu öngörüğü desteklemektedir. Tez çalışmasında 2015 yılında Bingöl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Lütfi BEHÇET ve arkadaşları tarafından yeni bir

takson olarak literatüre kazandırılan *Diplotaenia bingolensis*, M. Öztürk, A. Duran ve Behçet türü çalışma materyali olarak seçilmiştir.

Tez çalışması kapsamında yeni bir takson olarak tanımlanan *D. bingolensis* türünün;

- İçermiş olduğu toplam fenolik ve flavonoit içeriğinin belirlenmesi.
- İhtiva etmiş olduğu uçucu yağ bileşimlerinin analiz edilmesi.
- Fenolik bileşenlerin kimyasal yapılarının kantitatif miktarının belirlenmesi.
- Lipofilik bileşenlerin kantitatif analizleri.
- Biyolojik aktivitesi, DPPH serbest radikal giderme aktivitesi, ABTS katyon radikali giderme aktivitesi, ferrik iyonlarını indirgeme potansiyelleri ve ferröz iyonlarını şelatlama gücü aktivite parametreleri ile değerlendirilmesi.
- İhtiva etmiş olduğu kimyasal içeriğin seçici fraksiyonlandırma işlemine tabi tutularak kantitatif sekonder metabolit profilinin fraksiyon izolatlarına dağılımlarının biyolojik aktivite testlerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

1.1. Botanik Kısım

1.1.1. *Diplotaenia bingolensis* Taksonun Genel Özellikleri

Diplotaenia bingolensis türü diğer *diplotaenia* türleri ile karşılaştırıldığı zaman bazı ayırt edici özelliklere sahiptir. *D. bingolensis* türünün morfolojik özellikleri incelendiği zaman türün 70 cm uzunluğunda köke sahip olduğu, tamamen dik saplı dala sahip, 4-6 ışıklı, ışıkların 5–25 mm uzunluğunda (8–12-ışıklı değil, 2–5 cm uzunluğunda olmadığı); umbellüller 9–16 çiçekli (20–25 çiçekli değil); brakteler 4–5 (7–8 değil); merikarpları 6–9x2,5–4 mm, ovat eliptik (4–5x2 mm değil, elongate); karıklarda vittae 7–10 (2–3 değil); komissural vittae 8–12 (4 değil); komissural tarafta endosperm hafifçe emarginate (düz değil). Gibi kendisine has özelliklere sahiptir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. *Diplotaenia bingolensis* türünün arazi görüntüsü (a) ve herbarium örneği (b) (Behçet 2016)

1.2. Tıbbi Aromatik Bitkilerde Kimyasal Çeşitlilik

Tıbbi aromatik bitkilerin ihtiva etmiş olduğu yeni biyoaktif bileşenleri ortaya çıkarmak, tıbbi bitki araştırmalarının ana ilgi odağındadır. Bitkilerin biyoaktif bileşenleri, bitkilerin iyileştirici özelliklerini belirler. Şifalı bitkilerin içermiş olduğu biyoaktif bileşenleri tek tek bireysel olarak isimlendirip sınıflandırmak oldukça güç bir işlem olduğu için biyoaktif bileşenleri çeşitli kimyasal gruplara dahil ederek ana sınıflar oluşturulabilir.

Bitkiler de ana sınıf olarak primer ve sekonder metabolitler bulunmaktadır. Primer metabolitler sınıfı; karbonhidratlar, yağ asitleri, yağlar, proteinler. Sekonder metabolitler sınıfını ise fenolikler (poliketidler dahil), terpenoitler ve alkaloidler gibi ana bileşik sınıfları oluşturmaktadır (Bruneton 1999; Hansel vd. 1999; Evans 2000).

1.2.1. Primer (Birincil) Metabolitler

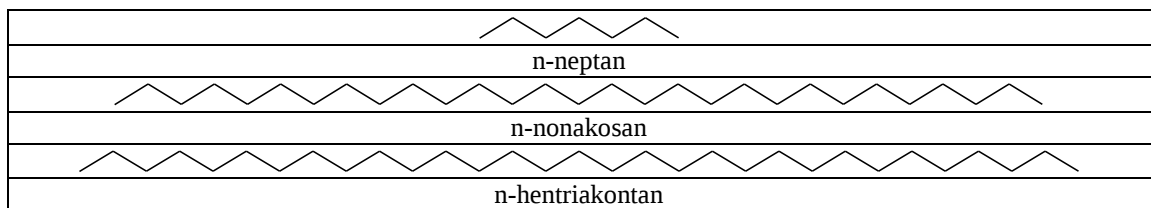
Bitkiler de primer metabolitler ağırlıklı olarak, nükleik asitlerin elemanlarıdır. Bunlar aktif bileşenler olarak nadiren dikkate alınırlar. Bu metabolitlerin canlı biyosentezinde çeşitli rolleri vardır. Bunlar; gen ekspresyonu, DNA transformasyonu, GDO organizmaları vb. yollarla değişime uğrayabildikleri için bitkilerin tanımlanmasında

gittikçe artan bir önemi vardır. Fotosentez ürünleri olan primer metabolitler, klorofillerin yardımıyla sentezlenir. Calvin döngüsünde üretilen karbonhidratlar (D-glukoz, D-fruktoz, vb.) daha ileri biyosentetik döngüler (Szent-Gyögyi - Krebs, Embden-Meyerhoff vd.) için başlangıç maddesi olarak kullanılması sonucu sekonder metabolitler de dahil olmak üzere tüm canlı materyaller de yapı taşları olarak görev yapabilen küçük moleküllerin üretilmesini sağlamaktadır.

1.2.1.1. Lipitler ve Türevleri

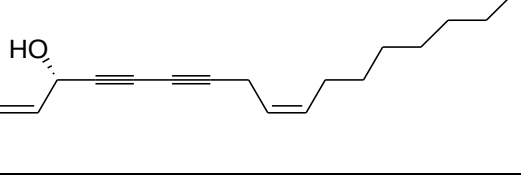
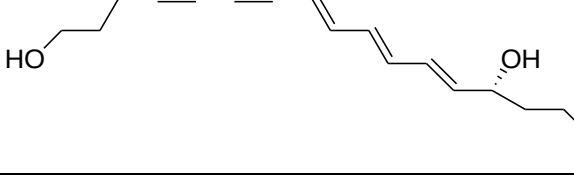
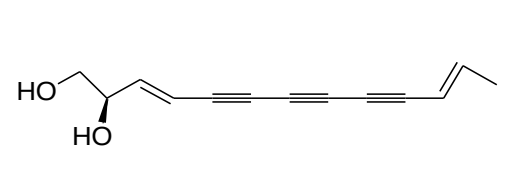
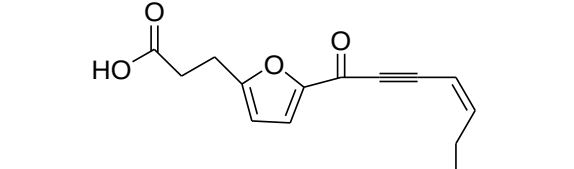
Lipitler suda çözünmeyen organik çözücülerde çözünebilen biyomoleküler olarak tanımlanmaktadır (Bruce 2004). Bu tanımda iki temel kısıtlama ile karşılaşmaktayız. Birincisi apolar yapıdaki hidrokarbonlar bu tanıma uymaktadır, ikincisi yağ asitleri gibi klasik lipitler suda da çözünebilmektedir. Bu kısıtlamalara göre bitkilerde bulunan yağ asitleri ve onların türevlerini ayrı kategorilerde değerlendirmek en doğrusudur.

Bitkilerde bulunan basit hidrokarbonlar diğer organik moleküllere nispeten en az polariteye sahip moleküllerdir. Hidrokarbonlar hidrojen ve karbon içeren basit moleküllerdir. Bazı yapıları düz zincirli alifatik yapılarda bulunabildiği gibi (Şekil 1.2) bazıları da doymuş ve doymamış yağ asitleri formunda da bulunabilmektedir. Asetilen ve nitrillerde olduğu gibi doymamış doğal ürünler ikili ve üçlü bağ içerebilirler.



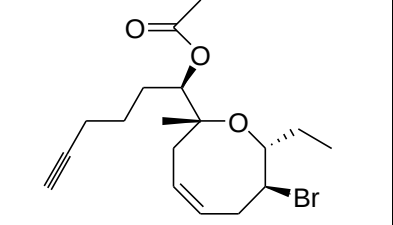
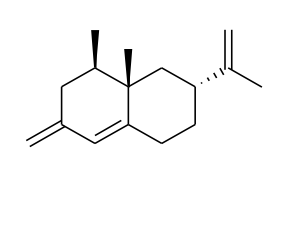
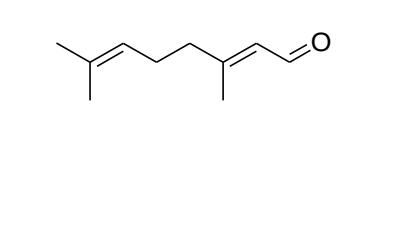
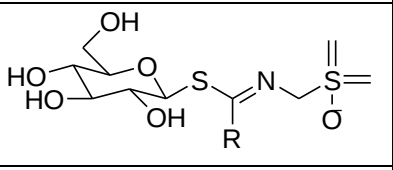
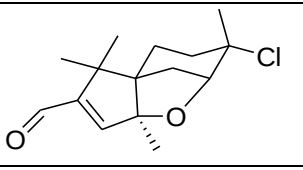
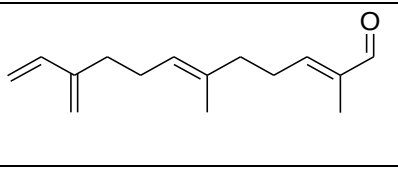
Şekil 1.2. Bitkilerde bulunan bazı doğal hidrokarbonlar

Poliasetilen bileşikler bitkilerde doğal olarak meydana gelen hidrokarbon türevleridir. Bunlar bir veya daha fazla asetilen grupları ile karakterize edilir (Şekil 1.3.) (Wu vd. 2004).

	
Falkarinol	Kikitoksin
	
Safinol	Wyeron asit

Şekil 1.3. Bitkilerde bulunan poliasetilenlere örnekler (Wu vd. 2004)

Bitkilerde bulunan diğer hidrokarbon türleri ise fonksiyonelleşmiş hidrokarbonlardır. Bu türler lipid ve terpenlerin dışında ayrı bir sınıf oluşturan türlerdir (Şekil 1.4). Bu türlere halojen, alkol, sülfür, aldehit, keton ve karboksil gruplarını ihtiva eden hidrokarbonlar dahil edilmektedir (Moshonas 1971; Johnson 2003).

		
Laurensin	Nootkaton	Sitral
		
Glikozinalat	Laurensiyal	β -sinensal

Şekil 1.4. Bitkilerde bulunan fonksiyonel hidrokarbonlar (Moshonas 1971; Johnson 2003)

1.2.1.1.1. Linolenik Yağ Asiti ve Linoleik Yağ Asiti

Yağ asitleri hücresel seviyede hücre membranının fosfolipit tabakasında bulunup hücrede sinyalci molekül görevini üstlenmektedirler (Pariza vd. 2000; Sampath ve Ntambi 2005). Bu

moleküller metabolizmada kan basıncı, kan pıhtılaşması, kan lipit seviyeleri, bağışıklık ve enflamasyon tepkilerini denetlemek gibi önemli görevlere de sahiptirler.

linolenik asitler ve linoleik asitler insan vücudu tarafından sentezlenmedikleri için bunlar dışarıdan hazır gıdalarla alınmak zorundadır ve bunlara elzem mleküllerde denilebilir. Bu yağ asitlerinin tüketimi ile kan kolesterol seviyesinin düştüğü tespit edilmiştir. Bu yağ asitlerinin kan kolesterolü üzerine etkisi iki şekildedir. Bunların ilki kolesterolün kandan ince barsağa salgılanmasını ve safra asitlerine oksidasyonunu hızlandırarak plazma kolesterolünü düşürmek, diğeri ise kolesterol metabolizmasını kolaylaştırıp kolesterolün dokulara taşınmasını hızlandırmaktır (Yazgan ve Aksoy 1981). Bu sebeple linolenik asitlerin yetersiz düzeyde alımı sonucunda kalp krizi riskinin artabileceği tespit edilmiştir (Rose 1990). Ayrıca linolenik yağ asitlerinin kandaki HDL (yüksek yoğunluklu lipoproteinler) miktarının artması üzerine etkili olduğu belirlenmiştir (Simopoulos 1996). İnsanlar tarafından tüketilen linolenik yağ asitleri ile linoleik yağ asitlerinin insan vücudunda belirli bir oranda bulunması önemlidir.

1.2.1.2. Karbonhidratlar

Bitkilerde bulunan karbonhidratlar, monomerler, oligomerler (on adede kadar monomer birimleri) ve aynı veya çeşitli diğr basit şekerlerdeki polimerler olarak bulunur. Monomerlerdeki C atomları sayısı 3 ila 7 arasında olup her bir karbon atomu bir hidroksil grubu taşır. Kalan karbon atomu, karbonil grubunun bir parçasıdır. Karbonil karbonunun özelliğine bağlı olarak aldozlar ve ketozlar olarak sınıflandırılır. Aldoz ve ketozlar asimetrik bileşikler oldukları için moleküldeki karbonil karbonunun Fisher izdüşümlerine bağlı olarak D ve L izomer formlarının oluşmasına olanak sağlarlar. Eğer hidroksil grubu aynı moleküle ait ise ve beş ya da altı üyeli oksijen içeren heterosiklro furanoz ve piranoz şeker yapıları meydana gelir. Bu durumda, karbonil grubunun C atomu asimetrik hale gelir ve oluşan yarı-asetal hidroksil grupları, glikozidik hidroksildir. Bu hidroksil grupları diğr alkolik hidroksil gruplarından kimyasal olarak farklıdır. Glikozidik hidroksiller α ve β optik izomerlerini oluşturabilir. Bu farklılık oligo ve polisakkaritlerin oluşumunda ve ayrıca şeker gruplarının aglikon bir yapıya bağlanmasında önemli role sahiptirler. Bitkilerde bulunan bazı yaygın monosakkaritlere örnek olarak D-glukoz, D-kisiloz, D ve L-arabinoz, D-mannoz, D-galaktoz vb. örenkler verilebilir. Şeker grupları,

steroit, saponin iridoit, flavonoit, triterpen, feniletanoit vb. aglikon formdaki sekonder metabolitlere bağlanarak bu moleküllerin glikozidik formlarının oluşmasını sağlar. Oluşan glikozidik formdaki sekonder metabolitin polaritesini (örneğin çözünürlüğü) ve biyolojik etkinliği önemli oranda değişmektedir. Bitkilerdeki polisakkarit formlar ise emülsiyonlaştırıcılar ve zamklardır (Bishop ve Jennings 1982).

1.2.1.3. Aminoasitler, Nonprotein Aminoasitler ve Proteinler

Bitkilerdeki genetik bilgi hakkında bilgi veren makro moleküler proteinlerdir. Proteinler aminoasitlerin peptit bağları ile kondenzasyonu sonucu meydana gelen bir yapıdır. Aminoasitler yapılarında bir karboksil grubu bir de amino grubu bulundurdıkları için aminoasit olarak isimlendirilmiştir. Bitkilerdeki proteinlerin oluşumu 20 temel aminoasitin biyosentetik yollarla reaksiyona girmesi sonucu oluşmaktadır. Nonprotein aminoasitler de bitkilerde bulunmakta olup bu 20 temel aminoasitin farklı analogları şeklinde bitkilerde bulunabilir (Rosenthal 1977; Pan vd. 1997; Rozan vd. 2001; Mabry 2001).

1.2.1.4. Nükleik Asitler, Nükleotidler ve Nükleozitler

Bitkilerde genetik bilgi havuzunu oluşturan makromoleküller nükleik asitlerdir. Nükleik asitler, deoksiribonükleik asitler ve ribonükleik asitler olmak üzere ikiye ayrılır. Nükleik asitler pirin ve pirimidin bazları, şekerler ve fosfat grubu gibi farklı kimyasal yapıların polimerize kompleks bir yapı oluşturmaları neticesinde meydana gelmişlerdir. Meydana gelen bu yapılar baz, şeker ve fosfat grubunun her üçünü de içeriyorsa bu yapılara nükleotidler, eğer sadece baz ve şeker grupları ihtiva ediyorsa böyle yapılara da nükleozitler denir. Bitkilerde çok sayıda nükleotid ve nükleozit izole edilerek kimyasal yapıları aydınlatılmıştır (Briemann 2006).

1.2.2. Sekonder Metabolitler

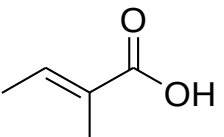
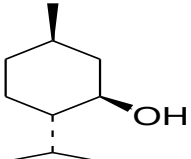
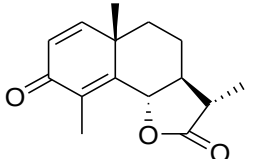
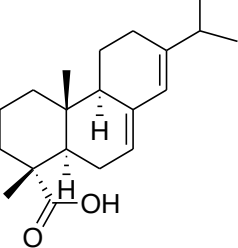
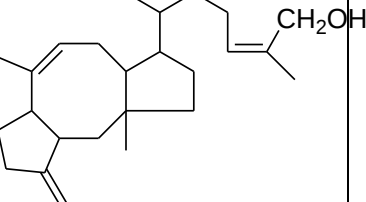
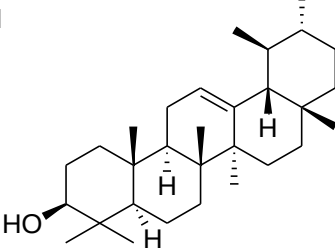
Bitkilerdeki sekonder metabolitler bitkinin büyüme ve gelişmesi sırasında biyotik ve abiyotik stres koşullarında bitkiler tarafından biyosentetik olarak sentezlenen geniş bir doğal ürün yelpazesini oluşturmaktadır. Bitkiler tarafından sentezlenen sekonder metabolit sınıfları terpenoitler, fenolikler, alkaloitler, aromatikler ve aminler gibi ana sınıflara

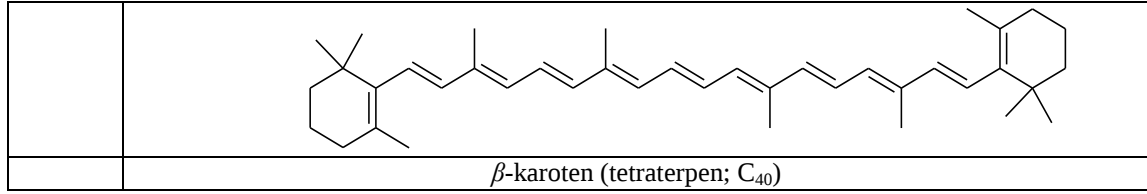
ayrılmaktadır. Bitkilerden çok sayıda ve farklı sınıflarda sekonder metabolit izole edilerek kimyasal yapıları karakterize edilmiştir. Bu sekonder metabolitlerin biyofonksiyonel özellikleride multidisipliner çalışmalarla ortaya konulmuştur.

1.2.2.1. Terpenler

Terpenler deyince akla ilk gelen bitkilerde bulunan ve aroma verici uçucu yağlardır (Turner 1970). Bitkilerde bulunan uçucu yağların analizi 19. yüzyıllarda başlamıştır. Günümüzde bitkilerden elde edilen terpen temelli uçucu yağların ticareti ülkemizde ve dünyada aktif olarak yapılmaktadır. Örneğin gülden elde edilen ve en yüksek koku etkisine sahip gül yağı içeriklerinin temel bileşenleri β -damaskenon, β -ionon, sitronellol, *cis*-rose oksit ve fenetil alkol bileşenleri sayılabilir (Şekil 1.5). Gül yağı eldesi için 4 ton gülden yaklaşık 1 kg gülyağı elde edilmektedir ve bu uçucu yağ karışımında 260 tane bileşen tanımlanmıştır (Kovat 1987; Ohloff 1994).

Terpenlerin kimyasal olarak sınıflandırılması 5 karbonlu izopren birimleri temel alınarak yapılmaktadır. Bitkilerde doğal olarak bulunan terpenler içerdikleri izopren birimlerine göre; hemiterpenler (C_5), monoterpenler (C_{10}), seskiterpenler (C_{15}), diterpenler (C_{20}), sesterterpenler (C_{25}) (nadir olarak bulunurlar), triterpenler (C_{30}) ve Karotenoitler (C_{40}) olarak sınıflara ayrılmaktadır.

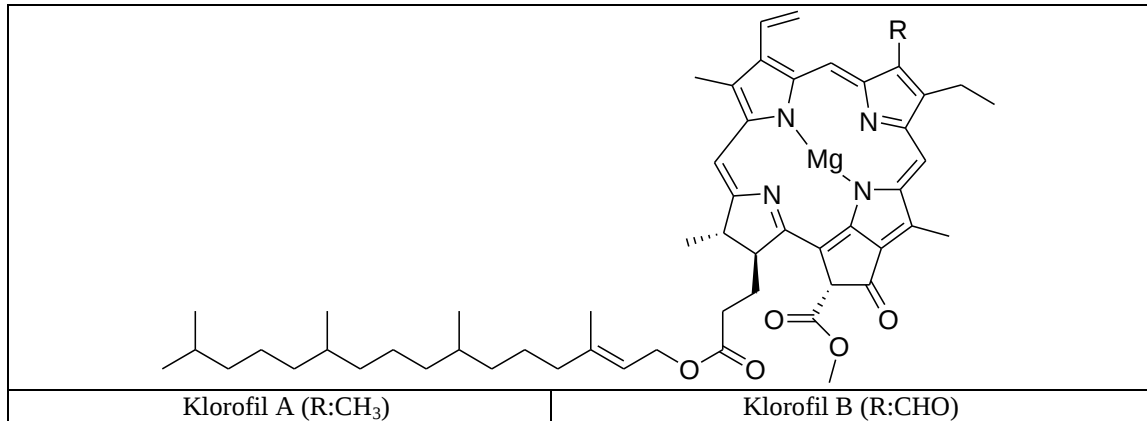
			
İzopren birimi	Tiglik asit (hemiterpen; C_5)	Mentol (monoterpen C_{10})	Santonin (seskiterpen C_{15})
			
	Bietik asit (Diterpen; C_{20})	Seroplastol (sesterterpen; C_{25})	α -amirin (triterpen; C_{30})



Şekil 1.5. Doğal ürünlerde bulunan terpen sınıflarının kimyasal yapıları

1.2.2.2. Aromatikler

Bitkilerdeki aromatik bileşik sınıfı en geniş aileyi oluşturmaktadır. Bitkilerin içermiş oldukları aromatikleri, tetraپیoller ve fenolikler olmak üzere iki ana sınıfa ayırmak mümkündür. Tetraپیoller dört pirol halkasının bir araya gelmesi ile oluşmaktadır. Tetraپیollere en iyi örnek klorofillerdir (Şekil 1.6). Bitki fenolikleri ise basit fenolikler, fenol eterler, fenilpropanoitler, flavonoitler, tanenler ve kinonlar gibi alt gruplara ayırmak mümkündür.



Şekil 1.6. Tetraپیrol olan klorofil A ve klorofil B'nin kimyasal yapıları

Basit fenolik maddeler polifenolik maddelerin monomerleridir. Basit fenollere örnek olarak *p*-hidroksibenzoik asit, protokatuşik asit, vanilik, siringik, salisilik ve gallik asitler verilebilir (Şekil 1.7). Ayrıca bunlara ek olarak hidrokinon, katekol ve orsinol gibi bileşikler de basit fenoliklere örnek olarak verilebilir (Buckingham 2005).

<i>p</i> -hidroksibenzoik asit	Prokateşik asit	Vanilik asit
Siyringik asit	Gallik asit	Salisilik
Hidrokinon	Orsinol	Katekol

Şekil 1.7. Bitkilerde bulunan basit fenollerin kimyasal yapıları (Buckingham 2005)

Fenollerin pek çoğu metoksi grupları ile substiue olduğu zaman fenil eterler meydana gelmektedir (Şekil 1.8). Fenil eterlere örnek olarak aktif kumarin türevleri olan kihellin ve visnagin bileşikler ile trans-anetol (anasona tat ve kokusunu veren madde) ve apiol (maydanoz tohumunun anabileseni) gibi fenil eterler verilebilir (Louli vd. 2004).

Kihellin	Visnagin	Apiol	<i>trans</i> -anetol

Şekil 1.8. Bitkilerde bulunan fenil eter bileşiklerinin kimyasal yapıları (Louli vd. 2004)

Fenilpropanoitler ise bir fenolik halkaya 3 karbonlu bir yan zincirin bağlı olduğu bileşik sınıfını temsil etmektedir (Şekil 1.9). Fenil propanoidlerin en yaygın örnekleri fenilpropenler (eugenol, anetol miristisin), hidroksikumarinler (umbelliferon ve skopoletin) hidroksisinnamik asitler (kafeik ve *p*-kumarik asit) ve lignanlardır.

Kafeik asit	<i>p</i> -kumarik asit	Kumarin
Eugenol	Miristisin	Umbelliferon
		Skopoletin

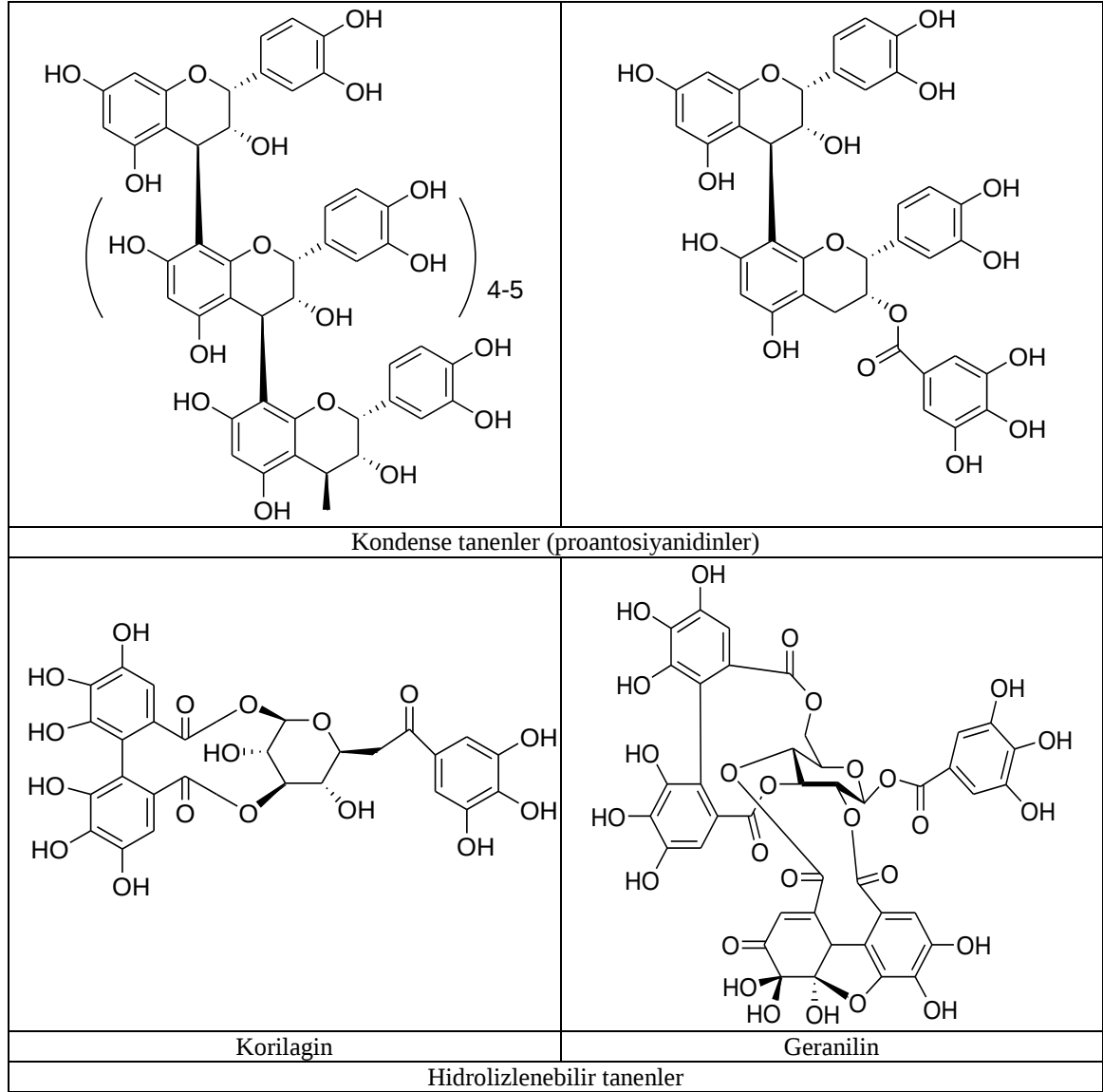
Şekil 1.9. Bitkilerde bulunan fenilporanoit bileşiklerin kimyasal yapıları

Flavonoit bileşiklerinin ana iskeleti iki benzen halkasının bir propen birimi ile ayrılması sonucu oluşur. Flavonoitler genel olarak suda çözünür. Kimyasal açıdan konjuge yapıya sahip olan flavonoitlerin rengi parlaktır. Flavonoitler bitkilerde aglikon halde bulunabildiği gibi glikozidik formda da bulunur. Flavonoitleri kalkonlar (butein, florizin), flavonlar (acetetin), flavonoller (galangin), flavononlar (hesperidin ve diosmin), antosiyaninler ve izoflavonlar (biosanin A, genistein, rotenon, koumestrol) gibi alt sınıflara ayrılmaktadır (Şekil 1.10). Bunlara ek olarak auranlar (sulfuretin), ksantonlar ve kondense tanen (kateşinler ve lökoantosiyanidinler) yapıları da flavonoidlerin yaygın sınıflarındandır (Geissman ve Crout 1969; Rivera-Vargas vd. 1993; Graefe vd. 1999; Budavari 2001; Cushnie vd. 2003; Cornwell vd. 2004; Buckingham 2005).

Kalkon	Flavon	Flavonol
Flavonon	Antosiyanin	İzoflavon

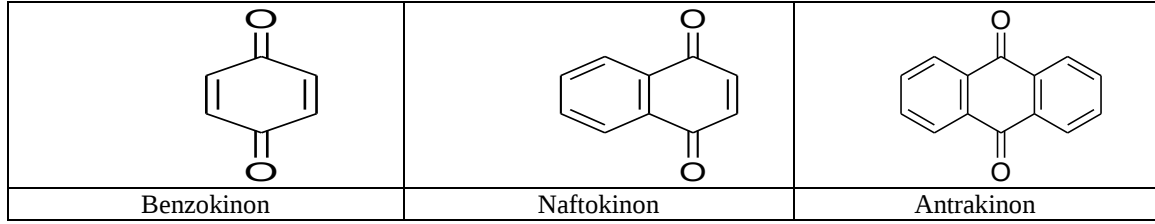
Şekil 1.10. Bitkilerde bulunan flavonoit bileşiklerin ana sınıflarını temsil eden kimyasal yapıları

Tanenler fenolik gruplar açısından zengin, suda çözünebilen oligomerlerdir. Pek çok bitkinin meyve, yaprak ve sap gibi kısımlarında bolca bulunmaktadır. Tanenler kondensetanenler (proantosiyanidinler) ve hidrolizlenebilir tanenler (Şekil 1.11) (korilagin geranilin) olmak üzere ikiye ayrılırlar (Hagerman ve Butler 1989; Buckingham 2005).



Şekil 1.11. Bitkilerde bulunan kondense ve hidrolizlenebilir tanenleri temsil eden kimyasal yapıları (Hagerman ve Butler 1989; Buckingham 2005)

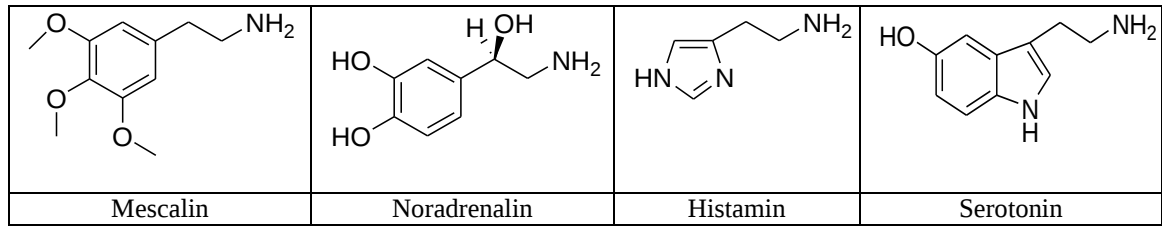
Kinonlar bitkilerde güçlü renk pigmentlerinden sorumlu fenoliklerdir. Kinonlar; benzokinonlar, naftokinonlar ve antrakinonlar olmak üzere üç alt sınıfa ayrılırlar (Şekil 1.12). Kinonlar bitkilerdeki fotosentetik proseslerde elektron taşınmasında da görev alır.



Şekil 1.12. Bitkilerde bulunan antrakininonların kimyasal yapıları

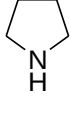
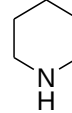
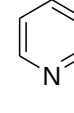
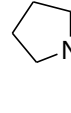
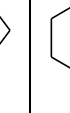
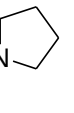
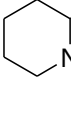
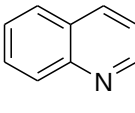
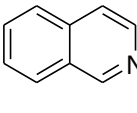
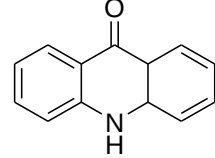
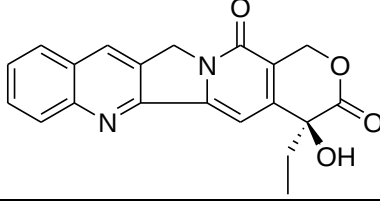
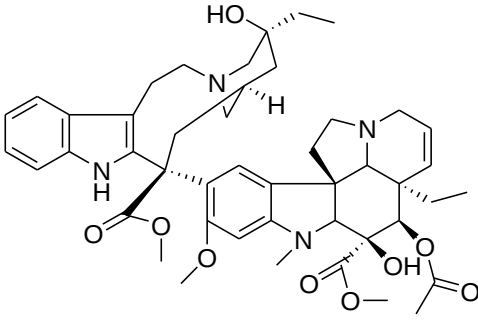
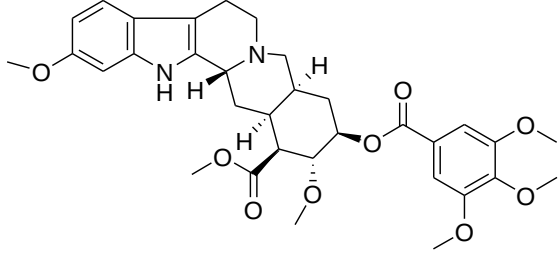
1.2.2.3. Aminler ve Alkoloitler

Bitkilerde bulunan aminler alifatik monoaminler, (metilamin, heksilamin), alifatik poliaminler (putrescin, spermin, spermidin) ve aromatik aminler (mescaline) olmak üzere alt sınıflara ayrılırlar (Şekil 1.13). Ayrıca noradrenalin, histamin ve serotonin gibi aromatik aminlerde bitkilerde yaygın olarak bulunmaktadır (Tabor 1984; Cohen 1998; Brenner 2002).



Şekil 1.13. Bitkilerde yaygın olarak bulunan aromatik aminlerin kimyasal yapıları

Alkoloitler bitkilerde azot içeren bileşikler olup birçok bitki de bulunmaktadır. Bitkilerde bulunan alkoloitler, genel olarak alkalidir ve optikçe aktiftirler. Alkoloitler genel olarak temsil ettikleri halka sistemine göre alt sınıflara ayrılmaktadırlar (Şekil 1.14). Bu sınıflara indolizidin (reserpin, vinblastin), kinolizidin, kinolin (kamptotekin), kinazolin ve akridon temelli halka sistemi içeren sistemlerin oluşturdukları alkoloit alt sınıfları örnek olarak verilebilir (Michael 2003; Michael 2004).

							
Pirolidin	Piperidin	Piridin	Pirrolizidin	İndolizidin	Tropan	Kinolizidin	İndol
							
Kinolin	İzokinolin	Akridon			Kamptotekin		
							
Vinblastin				Reserpin			

Şekil 1.14. Bitkilerde alkaloit ana sınıfları ve indolizidin sınıfı alooitlerin kimyasal yapıları (Michael 2003; Michael 2004)

1.3. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

Serbest radikal kavramı bir veya daha fazla eşleşmemiş elektronu bulunan kararsız ara ürünleri tanımlamaktadır. Atom veya molekül üzerindeki eşleşmemiş elektron kararlı hale geçmek için aşırı derecede reaktivite gösterir. Reaktif oksijen türleri ise bir veya daha fazla sayıda reaktif oksijen içeren türler olarak tanımlanmaktadır. Reaktif oksijen türleri biyolojik molekülleri ve serbest radikalleri oksitleyerek bir oksidan veya peroksidan özellik gösterir. Reaktif oksijen türlerine örnek olarak azot monooksit, süperoksit, alkoksil, peroksit ve hidroksil radikalleri verilebilir. Tanımlardan da anlaşılacağı gibi reaktif oksijen türleri aynı zamanda bir serbest radikal özelliğide taşımaktadır (Kaur vd. 2001). Reaktif oksijen türleri biyolojik sistemlerdeki mikro ve makro biyomolekülleri okside ederek hastalıkların oluşmasına neden olurken, biyolojik sistemlerde hücrel olayların düzenlenmesi ve bazı moleküllerin sentezlenmesi için enerji sağlaması gibi bazı pozitif rollerinin olduğu da unutulmamalıdır (Blake 1995; Halliwell ve Gutteridge 1999).

Antioksidan madde biyomoleküllerin oksidasyonunu ortadan kaldıran maddelerdir. Okside olmuş moleküle bir elektron veya proton aktarımı neticesinde okside olmuş molekülü stabil hale getirmektedir. Bu işlem neticesinde okside olan biyomolekülün, *in vivo* ortamda zincirleme reaksiyon oluşturmaya engellenmektedir (Chu vd. 2000).

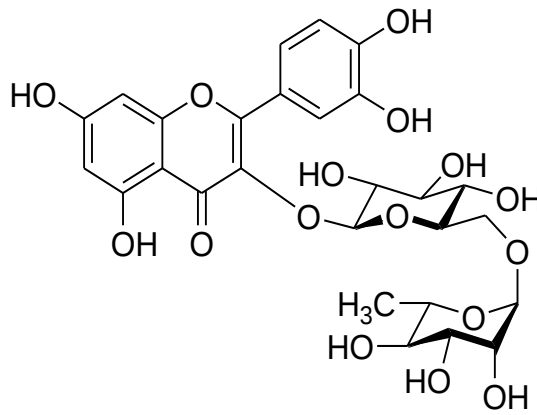
Antioksidan maddeler iki ana gruba ayrılarak sınıflandırılmaktadır. Birinci grup olan endojen kaynaklı antioksidanlar grubudur ki bunlara örnek olarak glutatyon-S-transferaz, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz enzimleri verilebilir; ikinci grup antioksidan grubuna ise C vitamini, E vitamini farklı karotenoidler fenolik asitler ve polifenolik maddelerin pek çoğu bu gruba dahil edilmektedir (Forstrom vd. 1979; Warma vd. 1995; Yalçın 1998).

Reaktif oksijen türleri ve serbest radikaller erken yaşlanma, kanser ve iltihaplı rahatsızlıklar gibi hastalıklara sebep olmaktadır (Tabor 1984; Cohen 1998; Brenner 2002). Antioksidanlar serbest radikal süpürücü olarak davranarak meydana gelecek olan lipid peroksidasyonunu engelleyerek hücre hasarını önlemektedir. Sonuç olarak gıdalarla birlikte alınan antioksidanların hastalık riskini azalttığına inanılmaktadır (Michael 2003; Michael 2004). Hem sentetik hem de doğal antioksidanlar hücrede meydana gelebilecek lipid oto-oksidasyonu engellemektedir (Kaur vd. 2001). Ancak sentetik antioksidanlar ile doğal antioksidanlar kıyaslandığında insan vücudu üzerine doğal antioksidanların yan etkisi daha azdır (Blake 1995; Halliwell ve Gutteridge 1999). Tipik doğal antioksidanlardan olan karotenoid, C vitamini, E vitamini ve polifenoller meyve, sebze ve meşrubat gibi gıdalarda bulunmaktadır (Chu vd. 2000). Doğal antioksidanların sahip olduğu bu kaydadeğer biyoaktiflikleri onların gıda ve tıp endüstrisinde önemli roller üstlenmelerine neden olmaktadır (Forstrom vd. 1979; Warma vd. 1995; Yalçın, 1998). İç kaynaklı metabolik prosesler vasıtası ile çeşitli uyarıcıların eşliğinde organizmada yüksek miktarlarda reaktif oksijen türü meydana getirmektedir. Reaktif oksijen türleri hidrojen peroksit, süperoksit ve hidroksil radikali gibi reaktif moleküllerin pek çoğunu kapsamaktadır. Oluşan serbest radikaller yüksek düzeyde reaktif oksijen türü meydana getirmesi insan hücrelerinde çeşitli patofizyolojik durumun ve hasarların meydana gelmesine neden olabilir (Louli vd. 2004). İnsanlar ve hayvanlar tarafından diyetle alınan doğal antioksidanların hücrelerde oluşan serbest radikalleri inhibe ettiği ve

bu türden maddeler sağlığa takviye olarak ve hastalıkları önlenmesi amaçlı alınması ispatlanmıştır.

1.4. Rutin

Rutin; buğday, çay ve elma gibi bitkilerde bol miktarda bulunan bir flavonoldur. Gıda malzemelerinin avital beslenme bileşenidir (Şekil 1.15). (Guardia 2001). Rutin ismi de rutin içeren ruta bitkisinin gravedenlerinden gelmektedir. (Javed 2012).



Şekil 1.15. Rutin' nin kimyasal yapısı

1.4.1. Rutin Molekülünün Biyolojik Aktivitesi

Rutin molekülü antidepresan, anti-diyabetik, antikanserojen, antioksidan, felç-inme ve gastrik ülser koruması gibi biyolojik aktivite testleri mevcuttur. Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda rutin sinaptik yarıktaki serotonin ve noradrenalinin uyarımını artırarak antidepresan etki ortaya koymuştur (Machado 2008; Deb 2010). Rutinin kullanımı plazma glukozunda bir düşüşe, insülin seviyelerinde yükselmeye, glikojen içeriği ve glikolitik enzimlerin geri kazanılmasına neden olmuştur. (Stanley ve Prince 2006). Rutin bileşeni ALT, AST ve LDH, serum, karaciğer, böbrek ve kalpte streptozosin nedeniyle hepatik ve kardiyak toksisite üzerine koruyucu bir etki gösterdiği tespit edilmiştir (Kamalakkannan 2006). Rutin güçlü bir antioksidandır, oksidatif stresi azaltmakta ve böylece hücrelerin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü korumaktadır. Rutin bileşeninin hem *in vitro* hem de *in vivo* ortamlarda çeşitli kimyasal tepkimeleri vardır.

Bunlar; Reaktif oksijen türlerinin (ROS) yapısını doğrudan bozarak ve bozulan zincir reaksiyonunun ilerlemesini durdurabilmektedir (Hanasaki vd. 1994; Kostic vd. 2015).

Süperoksit dismutaz (SOD) veya katalaz gibi birçok antioksidan enzimin ekspresyonunu ve aktivitesini artırarak hücrel oksidatif savunma sistemlerini düzenleyerek vücudun başlıca antioksidanı olan glutatyonun (GSH) üretimini arttırmaktadır (Mahgoub 2009; Al-Enazi 2014).

Rutin molekülünün kanser hücrelerinin ölümünü tetikleyen çeşitli hücrel yolları ve mekanizmaları ortaya çıkarılmıştır (Patil SL vd. 2012).

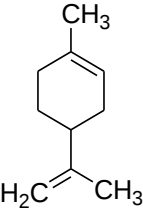
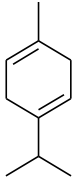
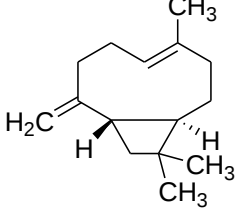
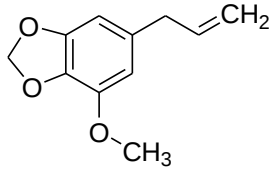
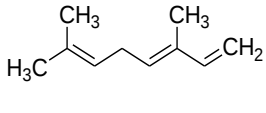
Hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarda Rutin'in lösemi ve kolon kanserine karşı etkinliği gösterilmiştir (Kostic vd. 2015; Nafees vd. 2015).

Rutin bileşeni beyin, meme, prostat, böbrek, akciğer, kolon ve yumurtalık dahil olmak üzere birçok insan tümör hücre hattına karşı anti-proliferatif etki göstermiştir (Araujo vd. 2013; Maeda vd. 2014). Bir araştırma Rutin'in umut verici bir anti-ülser etkisi olduğunu göstermektedir (Jiang vd. 2011).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. *Diplotaenia bingolensis* Taksonu Üzerine Yapılan Fitokimyasal Çalışmalar

D. bingolensis taksonu endemik bir tür olup doğu Anadolu bölgesinde Bingöl ili Şam Dağı ve civarında yeni tanımlanan bir takson olduğu için bu takson üzerine fitokimyasal çalışmalar yok denecek kadar azdır (Şekil 2.1). Geçibesler ve arkadaşları farklı yüksekliklerde (1850m, 1980m, 2100m ve 2200m) doğal habitatlarında yetişen *D. bingolensis* türü üzerine yapılan fitokimyasal tarama çalışması neticesinde türün önemli oranlarda miristisin (%17,85-38,43), karyofillen (%0,20-9,90), γ -terpinen (%6,41-11,29), limonen (%23,72-29,42), ve (E) β -ocimene (%6,38-12,47) içerdiğini rapor etmişlerdir (Gecibesler vd. 2018).

				
Limonen	γ -terpinen	Karyofillen	Miristisin	(E)- β -ocimene

Şekil 2.1. *D. bingolensis* taksonun analiz edilen bazı sekonder metabolitler (Gecibesler vd. 2018)

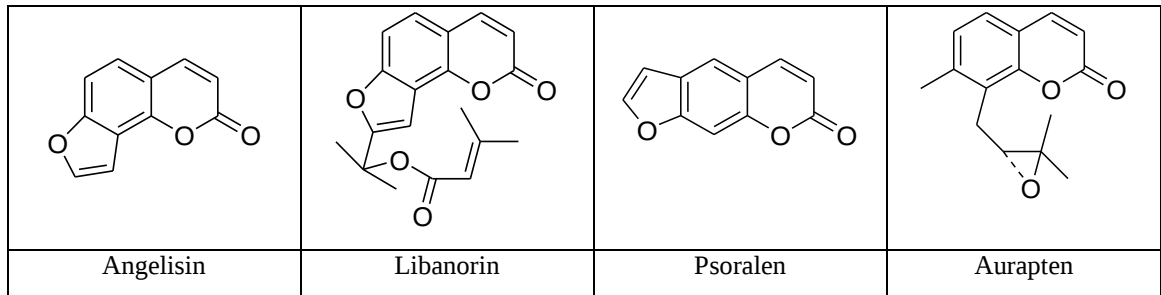
2.2. *Diplotaenia bingolensis* Taksonu Üzerine Yapılan Biyolojik Aktivite Çalışmaları

D. bingolensis türü üzerine literatürde gerçekleştirilen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Fakat genel olarak *Diplotaenia* cinslerinin farklı türleri üzerine yapılan biyolojik aktivite çalışmaları hakkında aşağıdaki örnekler verilebilir.

Eftekhari ve arkadaşları İran’da yetişen *D. damavandica* türünün yaprak, kök ve tohumlarından elde edilen uçucu yağların antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. Yapılan biyolojik aktivite sonucuna göre yaprak kısımlarından elde edilen uçucu yağ en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi göstermiştir (Eftekhari vd. 2005).

Yousefzadi ve arkadaşları tarafından aynı şekilde İran’da yetişen *D. damavandica* türünün yaprak ve kök kısımlarının metanol, hekzan, etilasetat ve su gibi farklı çözücü izolatları üzerine antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri araştırılmıştır. Gerçekleştirilen çalışmada kök ve yaprak izolatları hem antibakteriyel hem antifungal aktivite gösterirken, su izolatları antifungal aktivite sergilemediği görülmüştür (Yousefzadi vd. 2011).

Sardari ve arkadaşları İran’da yetişen yerli *D. damavandica* türünün toprak üstü kısımlarından angelisin, libanorin, psoralen ve aurapten olmak üzere 4 kumarin türevi bileşiği (Şekil 2.2) biyolojik aktivite yönlendirmeli izolasyon çalışması neticesinde izole ederek bu bileşiklerin antifungal aktivitelerini araştırmışlardır.



Şekil 2.2. *D. damavandica* türünün izole edilen kumarin türevi bileşikler (Yousefzadi vd. 2011)

Test edilen bu dört kumarin türevi bileşik içerisinde angelisin bileşiği en yüksek antifungal aktivite göstermiştir (Sardari vd. 2000).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada, bitki örneklerinin ekstraksiyonu, test numunelerinin hazırlanması, fraksiyonlandırma işlemleri ve antioksidan aktivite testleri Bingöl Üniversitesi Kimya Bölümü Organik Kimya Araştırma Laboratuvarında yapıldı. İzolatların kantitatif sekonder metabolit analizleri ise Çankırı Karatekin Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Reaktifler

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler şunlardır:

Sigma Aldrich; 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), Gallik asit, Kersetin, Bütillenmiş hidroksi toluen (BHT), Troloks, destile su, Ferrozin (3-(2-piridil) 5,6-bis(4-fenil-sülfonik asit) 1,2,4-triazin), 2,2 Azino-bis(3-etilbenzenothiazoline 6-sülfonikasit (ABTS), Potasyum persülfat ($K_2S_2O_8$), Demir (II) klorür ($FeCl_2$), potasyumferrisiyanür [$K_3Fe(CN)_6$], Etanol (C_2H_5OH), Metanol (CH_3OH), Demir (III) klorür ($FeCl_3$), Etilen DiaminTetra Asetik Asit (EDTA). Merck; Trikloroasetik asit (TCA), Hidrojen peroksit (H_2O_2), fosforik asit (H_3PO_4), Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR), alümiyum klorür ($AlCl_3$), Sodyum hidroksit (NaOH), sodyum nitrit ($NaNO_2$), sodyum karbonat (Na_2CO_3), disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), Bütilhidroksianisol (BHT).

3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

^{13}C -NMR	: Agilent 125 MHz Spektrometre
^1H -NMR	: Agilent 600 MHz Spektrometre
Buzdolabı	: 4°C, Arçelik
Dairesel sallayıcı	: Gerhardt
Değişik cam malzemeler	: Farklı markalarda
Derin dondurucu	: -86°C, Hettich/ Nuaire
Desikatör	: Bitki özütleme işlemi için
Dispenser	: Isopenser
Döner buharlaştırıcı	: IKA
Erime Noktası	: Elektrotermal 9100
Etüv	: Memmert100-80
FT/IR	: Perkin-Elmer
GC-MS	: Agilent
Hassas terazi	: Precisa/Denver
Hazır İTK plakaları	: Silica gel 60 F ₂₅₄
HPLC-TOF/MS	: Perkin-Elmer
Isıtmalı su banyosu	: Wise Clean
İnkubator CO ₂ Water-jacketed	: Nuaire US Autoflow
Laboratuvar tipi öğütücü	: 400W
Manyetik karıştırıcı	: IKA
Mikrobiyolojik emniyet kabini	: Bilser
Otomatik pipetler	: Rainin
pH metre	: Hanna
Saf su cihazı	: GFL 2004

Santrifüj	: Hettich Universal 320
Steril kabin	: Esco class II type A2
Ultrasonik banyo	: Wise Clean WUC-D06H
UV lambası	: Camag
UV-VIS Spektroskopisi	: Shimadzu/Jasco V650
Vakum pompası	: KNF 810 model
Vorteks	: IKA MS3 Basic

3.3. Kullanılan Kimyasal Çözeltilerin Hazırlanması

Toplam Fenol İçeriği Tayini İle İlgili Çözeltiler

%20'lik sodyum karbonat çözeltisi: 0,5 g Na_2CO_3 bir miktar destile suda çözülüp toplam hacim destile suyla 25 mL'ye tamamlandı. Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR): ticari olarak satın alındığı şekilde kullanıldı.

Toplam Flavanoit İçeriği Tayini İle İlgili Çözeltiler

%5'lik sodyum nitrit çözeltisi: 0,5 g NaNO_2 destile suda çözüldü ve toplam hacim destile suyla 10 mL'ye tamamlandı. %10'luk alümiyum klorit çözeltisi: 1 g AlCl_3 bir miktar destile suda çözüldü ve hacim destile suyla 10 mL'ye tamamlandı. Standart kersetin çözeltisi: 5 mg kersetin 5 mL metanolde çözüldü. 2 g NaOH destile suda çözüldü ve toplam hacim destile suyla 50 mL'ye tamamlandı.

DPPH Serbest Radikalleri Giderme Aktivitesi Tayini İle İlgili Çözeltiler

0,1 mM'lık DPPH çözeltisinin hazırlanması: 4 mg DPPH ile 100 mL etanol veya metanol içinde karıştırılarak tamamen çözüldü ve daha sonra alümiyum folyo ile sarılmış tüpte 450 rpm'de manyetik karıştırıcıya konulur ve bir saat karışması beklenir.

Ferröz iyonları (Fe^{+2}) Şelatlama Aktivitesi Tayini İle İlgili Çözeltiler

FeCl_2 (2 mM) çözeltisinin hazırlanması: 0,02 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ alınarak 50 mL suda tamamen çözülünceye kadar vortekslendi. Ferrozin (5 mM) çözeltisinin hazırlanması: 0,0615 g ferrozin 25 mL suda tamamen çözülünceye kadar vortekslendi.

Toplam İndirgeme Kuvveti Tayini İle İlgili Çözeltiler

%1'lik potasyum ferrisiyanür [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] çözeltisinin hazırlanması: 1 g [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] 100 mL destile suda çözünene kadar kuvvetli bir şekilde karıştırıldı. 0,2 M'lık fosfat tamponunun hazırlanması (pH: 6,6): 7,2 g NaH_2PO_4 destile suda çözülüp pH metre

kullanılarak pH'sı 6,6'ya fosforik asit ile ayarlandı ve toplam hacim destile suyla 200 mL'ye tamamlandı. %10'luk triklorasetik asit (TCA) çözeltisinin hazırlanması: 10 g TCA destile suda çözülüp toplam hacmi 100 mL'ye destile suyla tamamlandı. %0,1'lik demir klorür (FeCl_3) çözeltisinin hazırlanması: 165 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ destile suda çözüldü ve toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

ABTS Katyon Radikali Giderme Aktivitesi Tayini İle İlgili Çözeltiler

Fosfat Tamponu: 0,1 M Na_2HPO_4 (disodyum hidrojen fosfat) çözeltisi hazırlanarak toplam pH 7,4'e ayarlandı. 2 mM ABTS 100 ml hazırlandı (Çözücü olarak fosfat tamponu kullanıldı). 2,45 mM potasyum persülfat 100 mL hazırlandı. (Çözücü olarak fosfat tamponu kullanıldı).

3.4. Bitkisel Materyal

Doğu Anadolu bölgesinde Bingöl ili Şam Dağı ve çevresinde yetişen *D. bingolensis* taksonu farklı yüksekliklerde doğal habitatlarından 2015 yılı temmuz ayı boyunca belli aralıklarla arazi çalışmaları neticesinde toplanmıştır. Araziden toplanan taksonun tür teşhisinin yapılması için herbaryum numuneleri hazırlandı. Bingöl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Lütfi BEHÇET tarafından herbaryuma kabul edilen taksona, 8115b kodlaması ile herbaryum numarası verildi. Araziden toplanan bitkisel materyal laboratuvara getirilerek içermiş olduğu fitokimyasal denatüre etmeyecek koşullarda kuruması sağlandı. Kuruyan bitkisel materyal labortauvar tipi değirmen kullanılarak tanecik boyutu küçültülerek amber renkli cam kavonazlara alındı.

3.5. İzolatların Hazırlanması

D. bingolensis izolatlarının hazırlanması organik ve inorganik çözücü sistemleri kullanıldı. Bitkisel materyal önce inorganik çözücü olan su ile ekstrakte edilmiştir. Daha sonra kalan posa organik çözücü sistemleri ile ekstrakte edildi. Elde edilen organik ve inorganik ham kuru ekstratlar organik çözücüler ile artan polarite ile ardışık fraksiyonlandırma işlemine tabi tutuldu.

3.5.1. Ekstraksiyon İşlemi

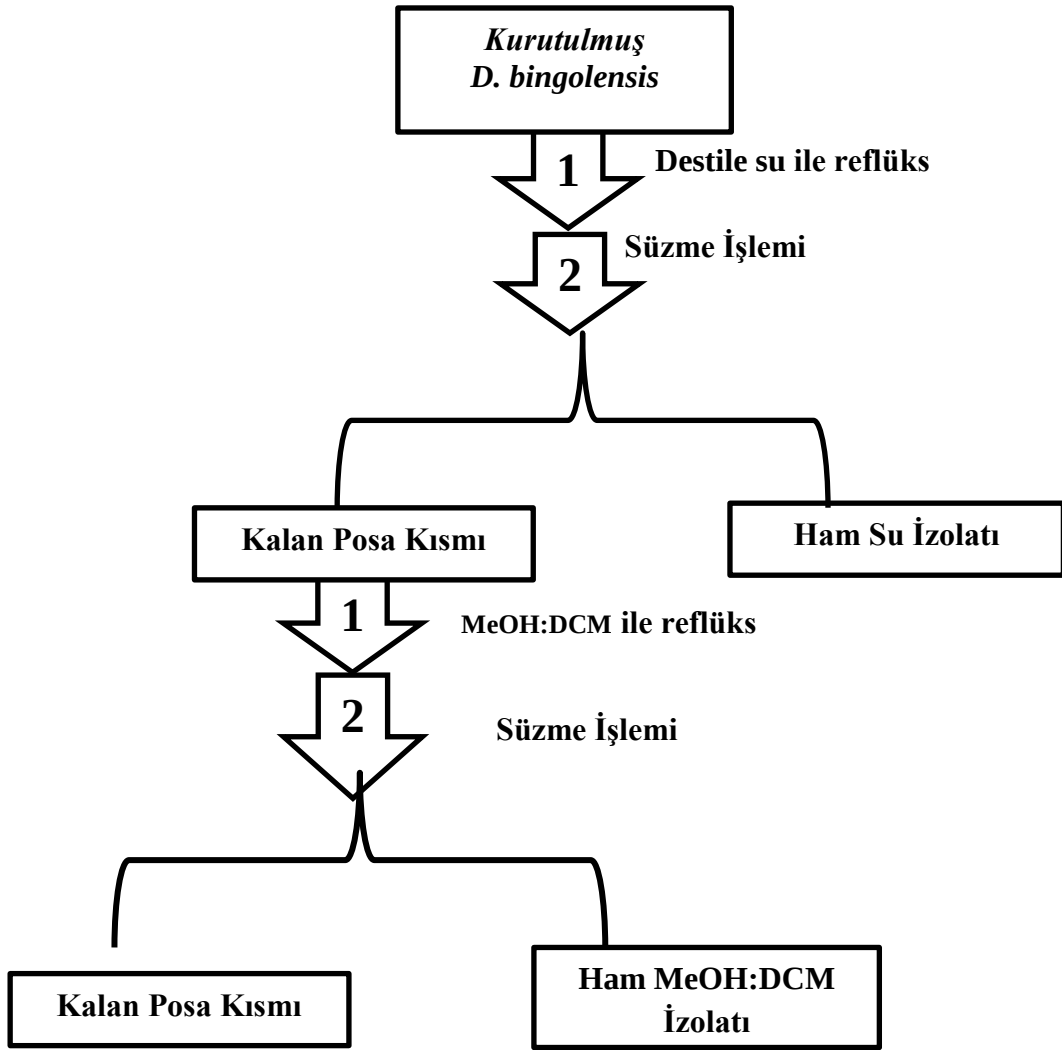
Ekstraksiyon işlemi için hem organik çözücüler hemde inorganik çözücülerle reflüks yöntemine göre ekstrakte edildi.

3.5.1.1. İnorganik Çözücü Sistemi ile Reflüks

D. bingolensis izolatlarını hazırlamak için 5 L kapasiteli balonlar kullanıldı. Her bir balon içerisine kuru bitkisel materyalden ilave edildi ve üzeri destile su ile tamamlandı. Elde edilen karışım için reflüks işlemine suya madde geçişi bitinceye kadar devam edildi. Süzme işlemi ile çözücü ve posa kısımları ayrıldı. Elde edilen sulu ekstratların ihtiva ettiği su liyofilize edildi ve kuru ekstratlar elde edildi.

3.5.1.2. Organik Çözücü Sistemi ile Reflüks

İnorganik çözücü sistemi ile reflüks işleminden kalan bitkisel materyalin posa kısmına organik çözücü sistemi MeOH:DCM sistemi ilave edilerek reflüks işlemi yapıldı. Reflüks işlemine çözücü sistemine madde geçişi bitinceye kadar devam edildi. Elde edilen çözücü ihtiva eden ekstre soğutulduktan sonra süzülerek posa kısmı ekstre kısmından ayrıldı. Elde edilen ekstratların ihtiva etmiş olduğu çözücü sistemi alçak basınç altında 40°C’de döner buharlaştırıcı yardımı ile uzaklaştırıldı. Kuru ham MeOH:DCM izolatu elde edildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *D. bingolensis* taksonu için uygulanan ekstraksiyon işlem basamakları

3.5.2. Fraksiyonlandırma İşlemi

Organik ve inorganik çözümler kullanılarak elde edilen kuru ham su izolatı ve kuru MeOH:DCM izolatlarının ayrı beherler içerisinde destile su içerisinde çözünmesi sağlandı. Çözünme işlemin ardından çözücü ihtiva eden izolatlar ayırma hunisine alındı. Ayırma hunisindeki izolat içerisinde en düşük polariteye sahip hekzan çözücüsü ile hekzanda çözünebilir sekonder metabolitlerin çekilmesi sağlandı. İkinci polarite sırasındaki diklorometan çözücüsü ile kalan izolata aynı işlemler uygulandı. Geriye kalan izolat bir üst polaritedeki organik çözücü olan etilasetat ile ekstrakte edilerek etilasetat fazına geçen sekonder metabolitler toplandı. Son olarak geride kalan izolata butanol ilave

ederek en polar sekonder metabolitleri çekme işlemi gerçekleştirildi. Her bir ekstraksiyon işleminde sekonder metabolitlerin inorganik fazdan organik faza geçme işlemi son buluncaya kadar tekrarlandı. Elde edilen izolatların her birisi kendi polarite sınıfına göre gruplandırılarak birleştirildi. İzolatlar içerisindeki çözücüler döner buharlaştırıcı kullanılarak 40°C'yi geçmeyen sıcaklıkta çözücüler uzaklaştırıldı. Ham su izolatu ve fraksiyonlandırma işleminde kullanılan hekzan, diklormetan, etilasetat ve butanol çözücü sistemleri ile elde edilen kuru izolatlara sırası ile H₂O-Hex, H₂O-DCM, H₂O- EtOAc ve H₂O-But kodlamaları yapıldı. Aynı şekilde ham MeOH:DCM izolatının hekzan, diklorometan, etilasetat, butanol ve su çözücüler ile fraksiyonlandırılması sonucu elde edilen izolatlara MeOH:DCM-Hex, MeOH:DCM-DCM, MeOH:DCM-EtOAc ve MeOH:DCM-But kodlamaları yapıldı.

3.5.3. Kantitatif Sekonder Metabolit Analizi Deneyeleri

3.5.3.1. Toplam Fenol İçeriğinin Belirlenmesi

Ekstraktlarda bulunan toplam fenolik bileşik miktarı FCR ile belirlendi (Singleton vd. 1999). Çalışmada standart olarak gallik asit kullanıldı. İstenilen konsantrasyonlarda kuru izolat ekstraktları alındı alınan bu konsantrasyonların üzerine sırasıyla 500 µL FCR konulur (sıvı halde cam şişede). 3 dk sonra 1,5 mL Na₂CO₃ (sodyum karbonat) konularak vortekslendi. Testler üç tekrarlı yürütüldü. 2 saat karanlık ortamda bekletildikten sonra 760 nm'de okundu. Standart grafik denkleminde µg/mL gallik asit ekivalenti olarak hesaplandı.

3.5.3.2. Toplam Flavonoit İçeriğinin Belirlenmesi

Kuru izolat ekstraktlarında bulunan toplam flavonoit miktarı Park ve arkadaşlarının yapmış olduğu metoda göre belirlendi (Park vd. 1997). Çalışmada standart olarak kersetin kullanıldı. Standart eğri çizmek için; 20-120 µg/mL konsantrasyon aralıklarında kersetin çözeltileri hazırlandı. Standart antioksidan maddelerin ve kuru izolatların hazırlanan çözeltilerinden istenilen konsantrasyonlarda alındı ve üzeri destile su ile 1 mL'ye tamamlandı. Üzerine 300 µL %5'lik sodyum nitrit çözeltisi eklenerek vortekslendi ve 6 dk bekletildi. Daha sonra 300 µL %10'luk alüminyum klorit çözeltisi eklendi ve

vortekslendi 6 dk bekletildi son olarak 2 mL hazırlanmış sodyum hidroksit konuldu. Karışıma 240 μ L destile su ilave edilip iyice karıştırıldı ve karışım 510 nm’de UV’de ölçüldü (Şekil 3.2). Testler üç tekrarlı yürütüldü. Toplam flavonoit miktarı standart grafik denkleminde μ g/mL kersetin ekivalent olarak hesaplandı.



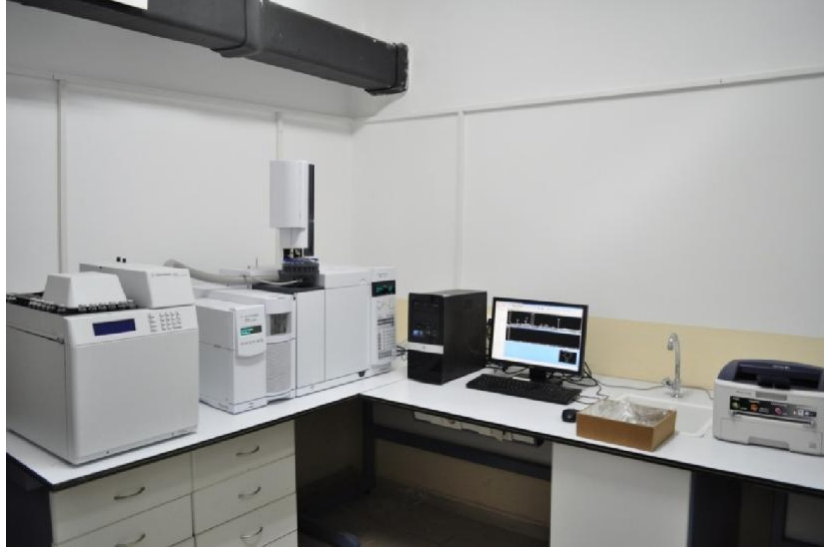
Şekil 3.2. Toplam fenol ve flavonoit madde analizi için kullanılan UV-VIS spektrometre

3.5.3.3. Lipofilik Bileşenlerin Belirlenmesi

Hekzan ve diklormetan izolatları içerisindeki lipofilik bileşenlerin analizi için izolatlar esterleştirme işlemi uygulandı. Esterifikasyon işlemi için metanol içerisinde 1 M’lik KOH çözeltisi hazırlandı. Deney tüplerine her bir izolatdan 50 mg alındı ve 5 mL hekzan içerisinde çözüldü. Oluşan çözelti üzerine hazırlanan alkali çözeltiden 3 mL alınarak vortekslendi. Şiddetli karıştırma işlemi sonrasında üst fazlar alınarak 0,45 μ m gözenekli filtreden süzülerek viallere alındı.

Lipofilik bileşenlerin GC-MS spektrometresi ile analizi için Agilent 5975 C MSD-7890-GC marka cihaz kullanıldı (Şekil 3.3). Kolon olarak HP-5MS %5 PMS (Phenyl Methyl Silican) 30mx250 μ m x 0,25 μ m ebatlarında kolon kullanıldı. Taşıyıcı gaz olarak helyum gazı kullanıldı. Numunelerin enjeksiyon hacmi 1 μ L; split oranı 25:1; sıcaklık 250 $^{\circ}$ C; FID dedektör voltajı 1.176471kV ve analiz süresi 61 dakika olarak ayarlandı. Sıcaklık

programı ise 0. dakikada başlangıç sıcaklığı 120°C’de ayarlanarak bu sıcaklıkta 4 dk sabit tutuldu. 27 dakika boyunca dakikada 3°C’lik artış ile 200°C’ye getirildi. 10 dakika boyunca 200°C’de sabit tutuldu. 5 dakika boyunca dakikada 15°C’lik sıcaklık artışı ile sıcaklık 280°C’ye getirildi. Son olarak 15 dakika boyunca bu sıcaklıkta sabit tutularak program sonlandırıldı.



Şekil 3.3. Lipofilik bileşenlerin kantitatif analizi için kullanılan GC-MS spektrometresi

3.5.3.4. Polar Bileşenlerin Belirlenmesi

Numunelerin ihtiva etmiş olduğu polar bileşenlerin kantitatif analizi Agilent HPLC-TOF/MS 6210 serisi spektrometre kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 3.4). Kolon olarak ZORBAX SB-C18 (4,6mmx250mmx5µm) özelliklerinde kolon kullanıldı. Moleküler iyon dedeksiyonları ise TOF/MS dedektörü ile yapıldı. Numunelerin enjeksiyon hacmi 5 µL; kromatografik ayırım için hareketli faz olarak %1’lik formik asit (A) ve asetonitril (B) kullanıldı. Gradient programı için hareketli fazın kolondan akış hızı dakikada 0,6 mL olacak şekilde ayarlandı. Hareketli fazlar için gradient programı ise 0-1 dak 90:10; A: B; 1-20 dak 50:50; A: B; 20-23 dak 20:80; A: B; 23-30 dak 90:10; A: B olarak ayarlandı.



Şekil 3.4. Hidrofilik bileşenlerin kantitatif analizinde kullanılan HPLC-TOF/MS spektrometresi

3.5.4. Antioksidan Aktivite Testleri

3.5.4.1. DPPH Serbest Radikalleri Giderme Aktivitesi Tayini

DPPH serbest radikal giderme Blois metoduna (Blois 1958) göre yapıldı. Kuru izolat konsantrasyonları 5–240 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ arasında alındı üzerine destile su ile 1 mL olacak şekilde tamamlandı. Hazırlanan 1 mL’lik çözelti üzerine DPPH çözeltisinden 1 mL eklendi ve çözelti 2 mL’ye tamamlandı. Kontrol grupları hazırlanırken de 3 adet kontrol için tüp hazırlandı her tüpe 1 mL etanol ve 1 mL DPPH çözeltisi eklendi ve vortekslendi 30 dk karanlık ortamda bekletildi ve daha sonra 517 nm dalga boyu aralığında ölçüldü.

DPPH radikal giderme aktivitesi aşağıdaki formül yardımı ile hesaplandı:

$$\text{DPPH Radikal Giderme Aktivitesi (\%)} = [(A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Numune}}) / A_{\text{Kontrol}}] \times 100$$

A_{Kontrol} : Kontrolün absorbens değeri

A_{Numune} : Örnek veya standardın absorbens değeri

3.5.4.2. Ferröz iyonları (Fe^{+2}) şelatlama aktivitesi tayini

Bitki izolatları ve standart antioksidan maddelerin metal şelatama aktivitesi Dinis ve arkadaşlarının belirledikleri metoda göre yapıldı (Dinis vd. 1994). Kuru izolat konsantrasyonları 56,8–454,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ arasında alınarak üzerine destile su ile 2 mL ye tamamlandı. Üzerine 2,4 mL destile su daha ilave ederek seyreltildi. 200 μL FeCl_2

eklenerek vortekslenerek 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. En son olarak 400 µL ferrozin eklenip iyice karıştırıldı 10 dk daha oda sıcaklığında bekletildikten sonra karışımın absorbansı köre karşı 562 nm’de ölçüldü. Standart antioksidan madde olarak EDTA kullanıldı. Testler üç tekrarlı yürütüldü. Numunelerin konsantrasyon artışına karşı, bitki izolatlarının ya da standart antioksidan maddenin metal şelatlama aktivitesinin yüksekliğini gösterir.

Metal-Şelat aktivitesi aşağıdaki formülle hesaplandı:

$$\% \text{ Aktivite: } [(A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Numune}}) / A_{\text{Kontrol}}] \times 100$$

A_{Kontrol} : 562 nm’de kontrolün absorbansı

A_{Numune} : 562 nm’de ekstraktın ya da standardın absorbansı

3.5.4.3. Toplam İndirgeme Kuvveti Tayini

Toplam indirgeme kuvveti tayini Oyaizu metoduna göre yapıldı (Oyaizu 1986). Kuru izolatın konsantrasyonları 10-240 µg/µL arasında alındı üzerine destile su ile 1 mL’ye tamamlandı sırasıyla tüplere 2,5 mL fosfat tamponu, 2,5 mL potasyumhegzasiyanoferrat (III) çözeltisi eklendi 20 dk 50°C de etüvde bekletildi. Ardından tüplere TCA çözeltisi eklenerek karışım vortekslendi. Çözeltinin üst fazından 2.5 mL alındı ve boş tüplere aktarıldı sırasıyla üzerine 2,5 mL destile su ve 0.5 mL FeCl₃ çözeltisi ilave edildikten sonra 10 dk bekletildi. Kör için destile su kullanılıp UV cihazında 700 nm dalga boyu aralığında okundu. Kontrol gruplarında kuru izolat yerine destile su kullanıldı. Standart antioksidan madde olarak BHA kullanıldı. Testler üç tekrarlı yürütüldü.

3.5.4.4. ABTS Katyon Radikali Giderme Aktivitesi

ABTS giderme aktivitesi Re ve arkadaşlarının (Re vd. 1999) yaptığı çalışmaya göre belirlendi. 1 mL destile suda 7,4 mM ABTS çözöldü. Üzerine K₂S₂O₈ den 1 mL ilave edilerek karıştırıldı. Hazırlanan çözelti alüminyum folyo ile sarılmış şişede 12-18 saat boyunca birbirine karıştırılarak karanlık ortamda bekletildi. Karışım absorbansı 1200 olacak şekilde fosfat tamponu ile seyreltilti. Kuru izolatlar 10–240 µg/µL arasında alınarak üzerine destile su ile 1 mL’ye tamamlandı (Ör: 10 µL madde 990 µL fosfat

tamponu olacak şekilde). K r olarak fosfat tamponu kullanıldı ve maddelerin üzeri fosfat tamponu ile tamamlandı. 734 nm dalga boyunda ölçümler yapıldı. Standart antioksidan madde olarak troloks kullanıldı. Testler iki tekrarlı yürütüldü.

ABTS radikal giderme aktivitesi (%) aşağıdaki formül yardımıyla hesaplandı:

$$\text{ABTS radikal giderme aktivitesi (\%)} = [(A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Numune}}) / A_{\text{Kontrol}}] \times 100$$

A_{Kontrol} : Kontrolün absorbands değeri

A_{Numune} :  rnek ve standardın absorbands değeri

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Ekstraksiyon ve Fraksiyonlandırma Verimi Bulguları

D. bingolensis toprak üstü kısmının 2,362 kg'lık kısmının organik ve inorganik çözücü sistemleri ile ekstraksiyon ve fraksiyonlandırma işlemine tabi tutulması işlemlerinde kullanılan çözücü miktarları, elde edilen izolat miktarları ve bu izolatlara ilişkin verim bulguları tabloda verilmiştir. Toprak üstü kısmının su ile reflüks işlemi neticesinde 85,01 g kuru su izolatu elde edilmiştir. Kalan posa kısmının MeOH:DCM sistemi ile reflüks edilmesi neticesinde 54,19 g kuru MeOH:DCM izolatu elde edildi tablo 4.1'de görüldüğü gibi, toplamda %5,89 ekstraksiyon verimi ile 139,2 g kuru organik ve inorganik izolat elde edildi.

Ekstraksiyon verimi aşağıdaki formülle hesaplandı.

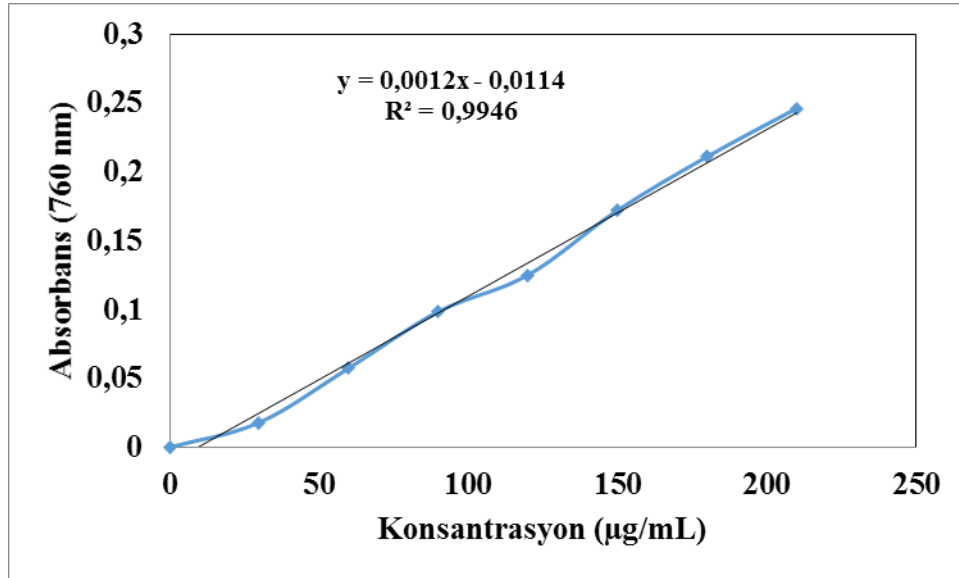
$$\% \text{ Ekstraksiyon verimi} = \frac{\text{Elde Edilen Ham Ekstrakt(g)}}{\text{Kullanılan Bitki Örneği}} \times 100 =$$

Tablo 4.1. *D. bingolensis* toprak üstü kısmının ekstraksiyon, fraksiyonlandırma işleminde kullanılan çözücü miktarları, izolat miktarları ve ekstraksiyon verimleri

Numuneler	Çözücü miktarları	Kuru izolat miktarları (g)	Ekstraksiyon verimi (%)
H ₂ O-Hex	Hekzan (12 L)	6,67	7,84
H ₂ O-DCM	Diklormetan (13,8L)	5,82	6,84
H ₂ O-EtOAc	Etil asetat (17,6 L)	9,42	11,08
H ₂ O-But	Bütanol (21,5 L)	63,10	74,22
MeOH:DCM-Hex	Hekzan (14,5 L)	13,40	24,72
MeOH:DCM-DCM	Diklormetan (18,6 L)	15,37	28,36
MeOH:DCM-EtOAc	Etil asetat (4,5 L)	0,79	1,457
MeOH:DCM-But	Bütanol (12,7 L)	10,42	19,22
MeOH:DCM-H ₂ O	Su	14,21	26,22

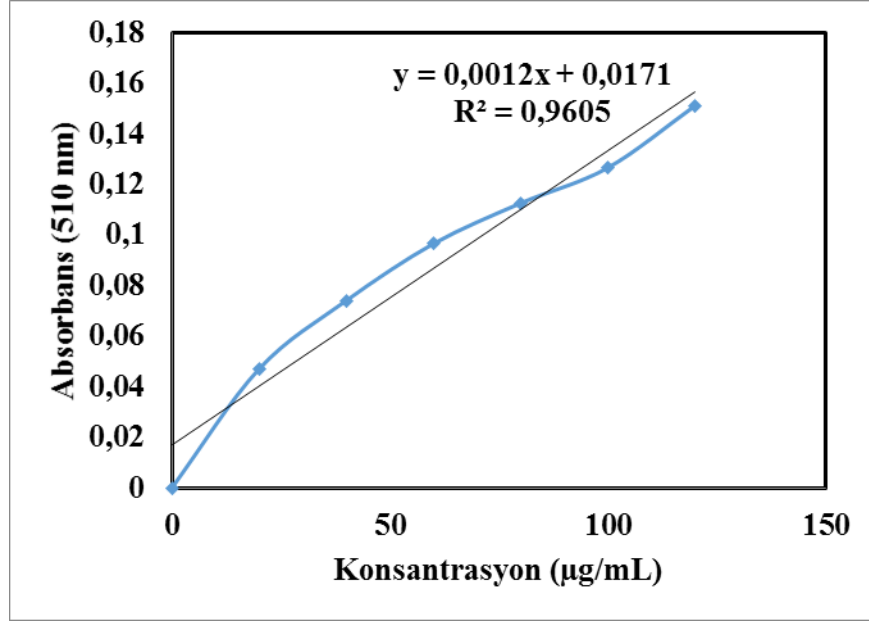
4.2. Toplam Fenol ve Flavonoit Madde Miktarına İlişkin Bulgular

Numuneler içerisindeki toplam fenolik madde tayini için fenolik madde olan gallik asit standardı ile kalibrasyon grafiği oluşturuldu. Numunelerin içermiş olduğu toplam fenolik madde miktarı miligram kuru izolat (mgKİ) içerisinde bulunan mikrogram gallik asit ekivalent (μgGAE) olarak ($\mu\text{gGAE}/\text{mgKİ}$) verilmiştir (Şekil 4.1). Gallik asit ekivalenti grafiğinden elde edilen doğru denklemi ($\text{Absorbans}_{(760\text{nm})}=0,0012(\mu\text{gGAE}/\text{mgKİ})-0,0114$) kullanılarak numuneler içerisindeki toplam fenol miktarı kantitatif olarak analiz edildi.



Şekil 4.1. Toplam fenolik miktarının tayini için kullanılan gallik asit ekivalent grafiği

Numuneler içerisindeki toplam flavonoit madde miktarı analizi için flavonoit standardı olan kersetin kullanıldı. Her bir numunenin içermiş olduğu toplam flavonoit madde miktarı miligram kuru izolat (mgKİ) içerisinde bulunan mikrogram kersetin eş değeri (μgKE) olarak ($\mu\text{gKE}/\text{mgKİ}$) verilmiştir. Numuneler içerisindeki toplam flavonoit madde miktarının analizi için kalibrasyon grafiğinden elde edilen doğru denklemi ($\text{Absorbans}_{(510\text{nm})}=0,0012(\mu\text{gKE}/\text{mgKİ})+0,0171$) kullanıldı (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Toplam flavonoit miktarı tayini için kersetinin kalibrasyon grafiği

D. bingolensis izolatlarının içermiş olduğu toplam fenolik ve flavonoit madde miktarı tablo 4.2 de verilmiştir. Organik ve inorganik izolatların polarite sırasına göre organik çözücüler ile fraksiyonlandırarak elde edilen izolatların toplam fenolik madde miktarının H₂O-DCM (665,83±47,62 µgGAE/mgKİ) ve MeOH:DCM-EtOAc (724,65±43,64 µgGAE/mgKİ) izolatlarına geçtiği, H₂O-Hex izolatına ise fenolik madde geçmediği tespit edildi.

Tablo 4.2. Numunelerin içermiş olduğu toplam fenol ve flavonoit madde miktarları

	Toplam fenol içeriği (µgGAE/mgKİ)	Toplam flavonoit içeriği (µgKE/mgKİ)
H ₂ O-Hex	-	53,75±6,25
H ₂ O-DCM	665,83±47,62	137,08±2,08
H ₂ O-EtOAc	385,28±20,78	101,67±0,00
H ₂ O-But	382,50±18,00	49,58±2,08
MeOH:DCM-Hex	443,40±12,99	-
MeOH:DCM-DCM	327,31±13,09	106,94±6,94
MeOH:DCM-EtOAc	724,65±43,64	127,08±5,21
MeOH:DCM-But	436,46±30,66	80,20±5,20
MeOH:DCM-H ₂ O	110,07±4,91	64,58±0,00

İzolatlar içerisinde toplam flavonoit madde içeriği açısından en zengin izolatın H₂O-DCM izolatı (137,08±2,08 µgKE/mgKİ) iken, MeOH:DCM-Hex izolatında flavonoit maddenin geçmediği analiz edildi.

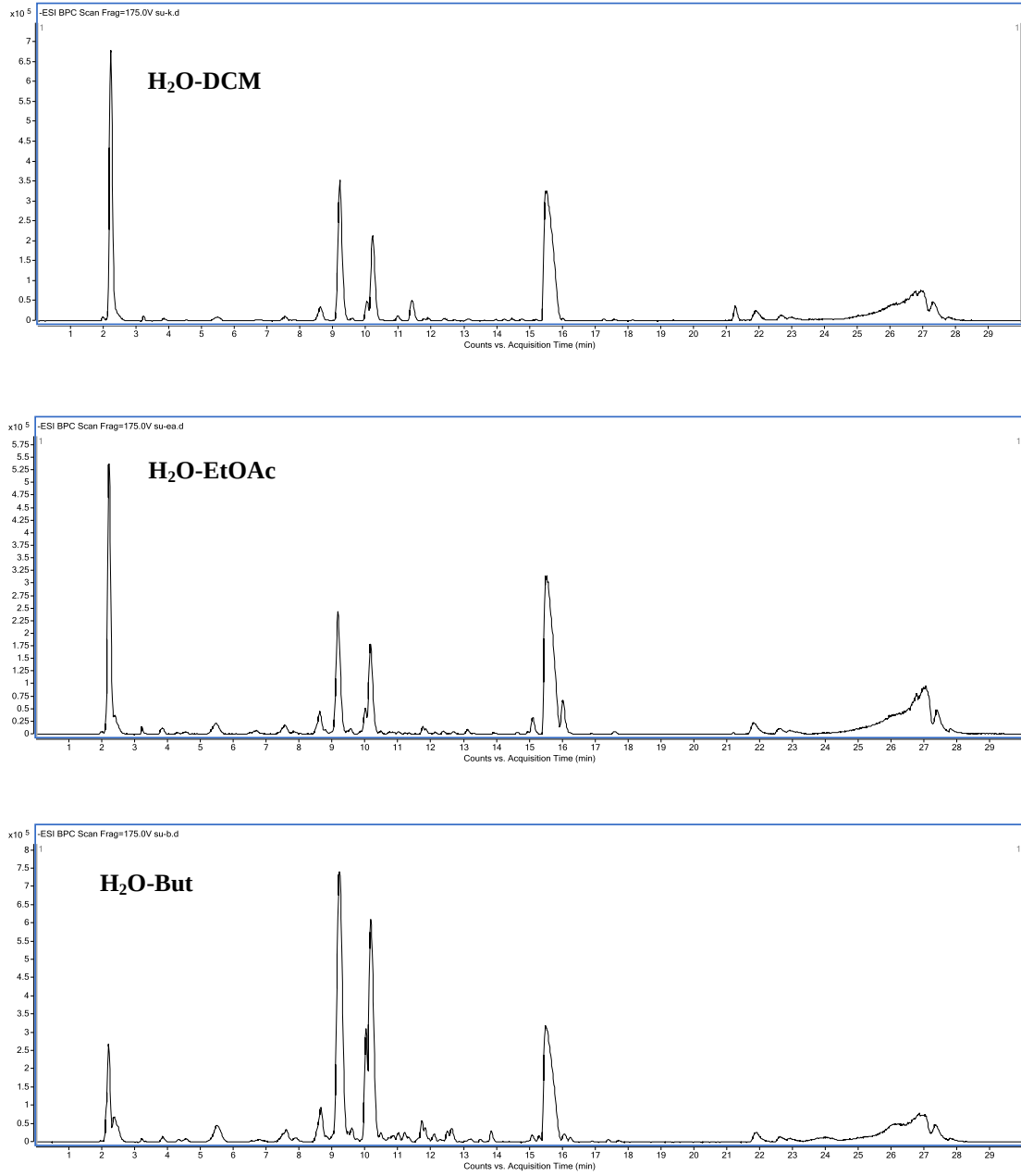
4.3. Polar Bileşenlerin Kantitatif Analizine Ait Bulgular

D. bingolensis izolatlarının ihtiva etmiş olduğu polar bileşenler HPLC-TOF/MS spektrometresi ile 26 tane polar bileşen kantitatif olarak analiz edildi. izolatlar içerisindeki polar bileşen miktarı miligram kuru izolat (mgKİ) içerisinde bulunan mikrogram polar bileşen (µgPB) olarak analiz edildi. İzolatlar içerisinde özellikle bir flavon glikozit olan rutin bileşeni genel olarak tüm izolatlarda ana bileşen olarak öne çıktığı görüldü. İzolatlar ihtiva etmiş olduğu rutin miktarı 1,231-47.231 µgPB/mgKİ aralığında değiştiği görüldü. Rutin bileşeni açısından en zengin izolatın H₂O-But izolatı olduğu tespit edildi. İzolatların ihtiva etmiş olduğu ikinci ana bileşenin ise klorojenik asit olarak olduğu ortaya çıktı. Klorojenik asitin ise izolatlar içerisinde 0,121-12,122 µgPB/mgKİ aralığında olduğu görüldü. Klorojenik asit açısından en zengin izolat ise aynı şekilde H₂O-But izolatında olduğu görüldü. Aynı şekilde H₂O-But izolatlarında fumarik asit (9,443 µgPB/mgKİ) en zengin bileşen olarak ortaya çıktı. Bu ana bileşenlere ek olarak 4-hidroksibenzaldehit bileşeni 0,681 µgPB/mgKİ MeOH:DCM-EtOAc izolatında, ellagik asit 0,014 µgPB/mgKİ H₂O-But izolatında, apigetrin 0,965 µgPB/mgKİ H₂O-But izolatında, neohesperidin 0,339 H₂O-But izolatında tespit edildi. Tablo 4.3 incelendiği zaman morin, gentisik asit, 4-hidroksibenzoik asit, klorojenik asit ve rutin bileşenleri tüm izolatlarda kantitatif olarak analiz edildi. MeOH:DCM-EtOAc izolatı kafeik asit (2,555 µgPB/mgKİ) ve vanilik asiti (3,435 µgPB/mgKİ) diğer izolatlara göre fazla içerdiği tespit edildi.

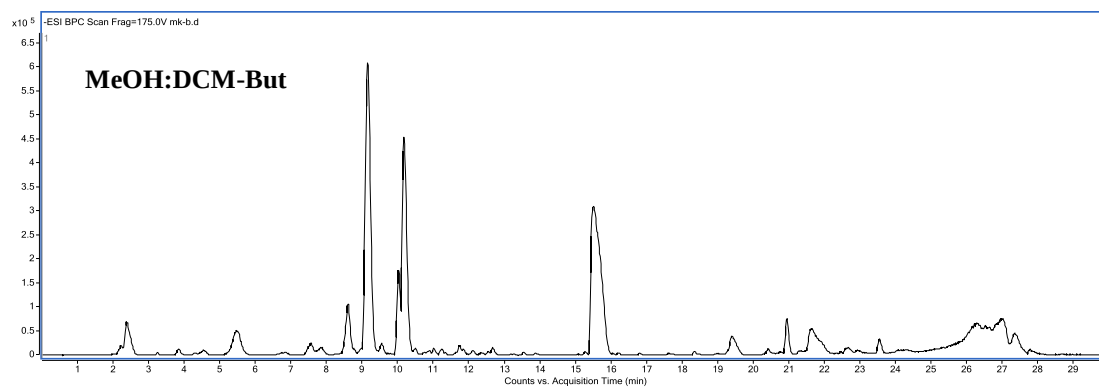
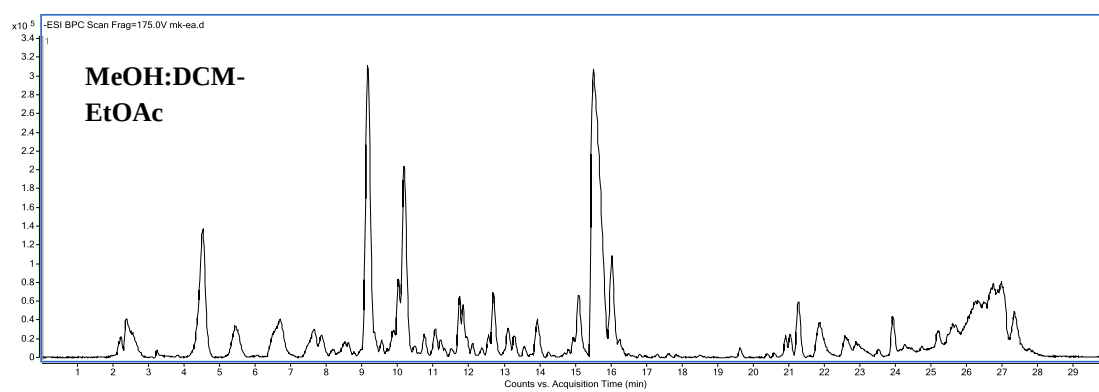
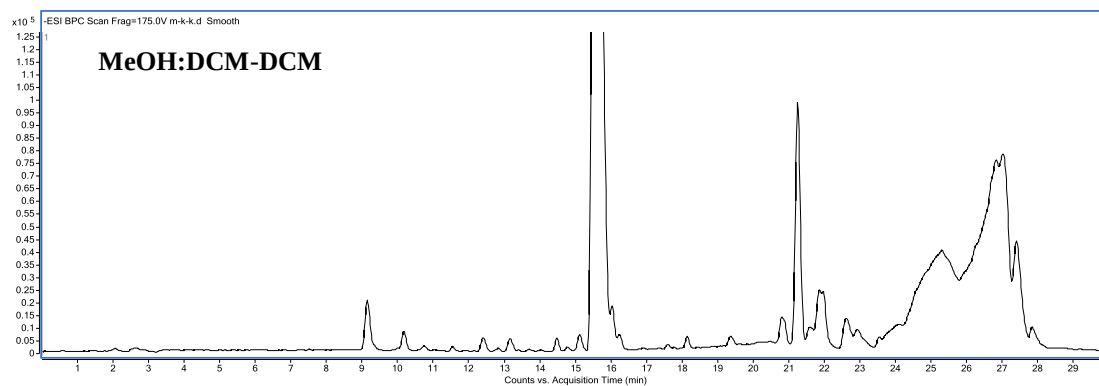
Tablo 4.3. *D. bingolensis* izolatlarındaki polar bileşenlerin kantitatif dağılımları (µgPB/mgKİ)

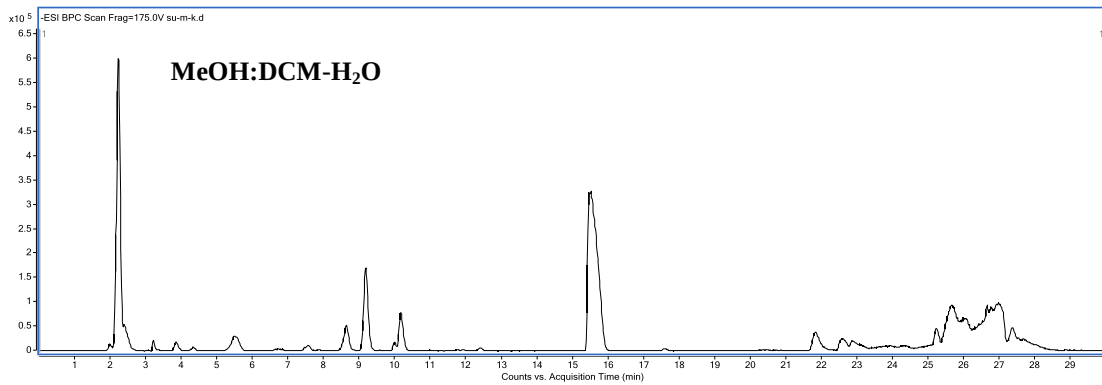
	Polar Bileşenler	RT	H ₂ O-DCM	H ₂ O-EtOAc	H ₂ O-But	MeOH:DCM-DCM	MeOH:DCM-EtOAc	MeOH:DCM-But	MeOH:H:D CM-H ₂ O
1	Gallik asit	2,40					0,019		
2	Fumarik asit	3,26	0,438	0,285	9,443		0,225	0,316	8,144
3	Gentisik asit	4,55	0,455	0,737	1,209	0,142	17,917	1,336	0,168
4	Klorojenik asit	5,49	2,431	4,926	10,666	0,121	7,592	12,122	6,982
5	4-hidroksibenzoik asit	7,02	0,410	2,315	2,181	0,034	13,716	0,579	0,067
6	Prokateşik asit	7,15		0,339	0,330		0,373	0,330	0,329
7	Kafeik asit	7,66	0,064	0,237	0,904		2,555	0,061	
8	Vanillik asit	7,88	0,156	0,300	0,358		3,435	0,243	0,154
9	Siyringik asit	8,08		0,366	0,394		0,490	0,360	0,362
10	Rutin	9,25	17,878	12,372	47,231	1,231	16,583	35,074	8,568
11	4-hidroksibenzaldehit	9,38	-				0,681		
12	Polidatin	9,65		0,082			1,487		
13	Ellagik asit	9,70			0,014				
14	Scutellarin	9,75						0,634	0,261
15	Kersetin-3-β-D-glukozit	9,76			0,699		0,582	0,248	
16	Naringin	10,50	0,022	0,021	0,075		0,098	0,107	0,005
17	Diosmin	10,60	0,786	0,713	0,866		0,847	0,958	0,666
18	Hesperidin	10,74		0,004	0,578		0,047	0,360	
19	Apigetrin	10,87					0,965		
20	Neohesperidin	11,04			0,339				
21	Morin	12,97	0,283	0,319	0,274	0,237	1,279	0,316	0,238
22	Salisilik asit	13,10					0,316		
23	Kersetin	13,97					0,792		
24	Sinamik asit	15,10	0,183		0,192		0,177		0,224
25	Kaempferol	15,92					0,124		
26	Galangin	20,30	0,020			1,069	0,314		

D. bingolensis'in su ve MeOH:DCM ham izolatlarından fraksiyonlandırma neticesinde elde edilen alt fraksiyonlara ait HPLC-TOF/MS (yüksek performanslı sıvı kromatografi-uçuş zamanlı kütle spektrometresi) kromatogramları Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.3. *D. bingolensis* su izolatından elde edilen alt fraksiyonların HPLC-TOF/MS kromatogramları





Şekil 4.4. *D. bingolensis*in MeOH:DCM izolatından elde edilen alt fraksiyonların HPLC-TOF/MS kromatogramları

4.4. Apolar Bileşenlere İlişkin Bulgular

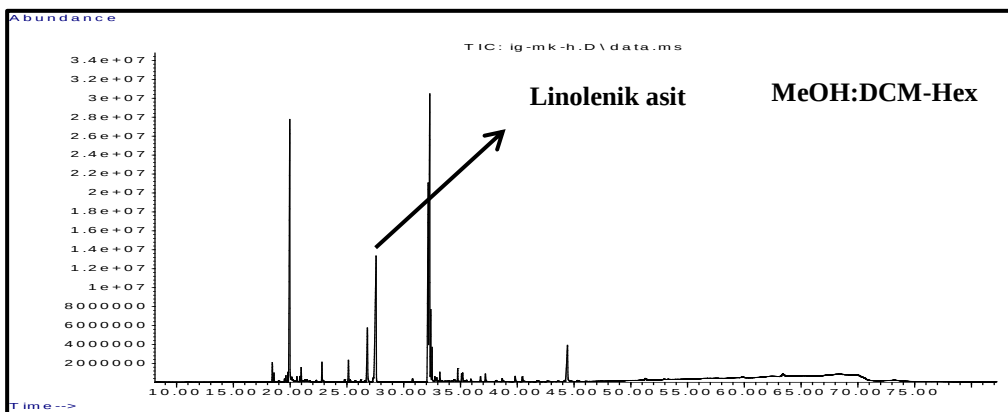
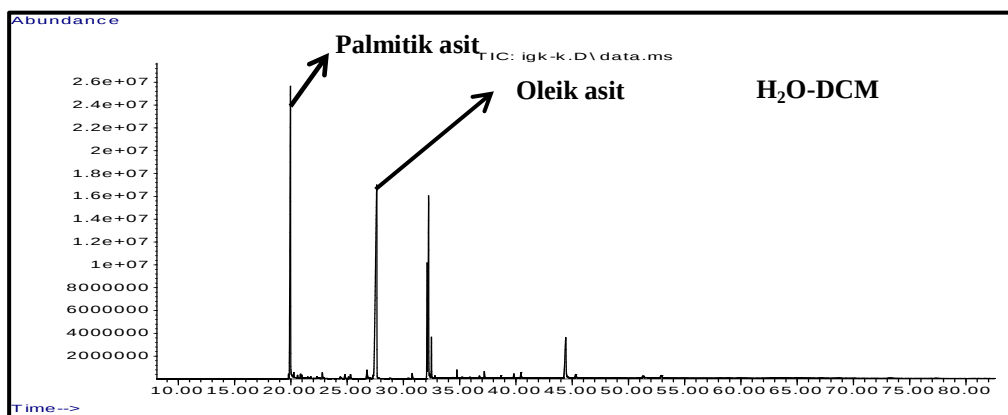
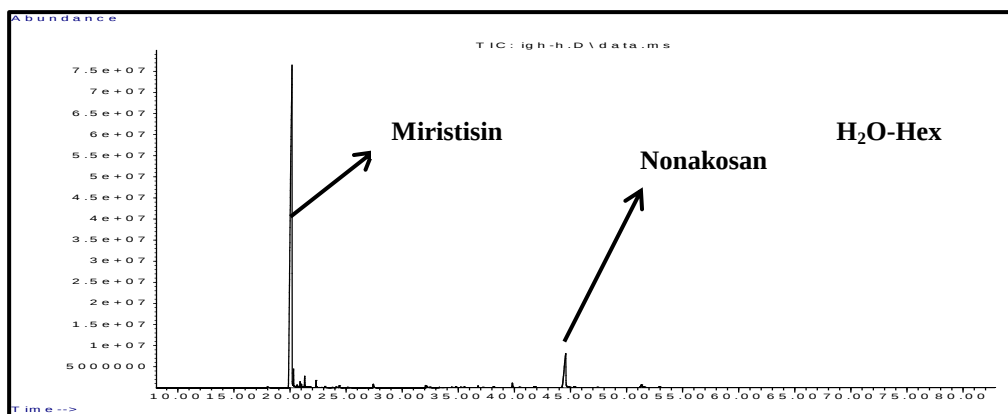
D. bingolensis'in organik ve inorganik ham izolatlarından fraksiyonlandırılan apolar izolatlar içerisindeki 50 apolar bileşenin kantitatif analizi GC-MS (Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi) spektrometresi ile yapıldı (Tablo 4.4). H₂O-Hex, H₂O-DCM, MeOH:DCM-Hex ve MeOH:DCM-DCM alt fraksiyonlarının ana bileşenleri palmitik asit (%16,63-37,83), linoleik asit (%11,04-16,95), linolenik asit (%18,45-22,11), miristisin (%3,75-86,31) ve nonakosan (%4,65-20,64) bileşenleri tespit edildi. Bu ana bileşenlere ek olarak miristik asit (%1,11) MeOH:DCM-Hex izolatında, behenik asit (%1,33), serotik asit (%2,78), montanik asit (%2,96) MeOH:DCM-DCM izolatında, oleik asit ise (%7,17) H₂O-DCM izolatında tespit edilmiştir.

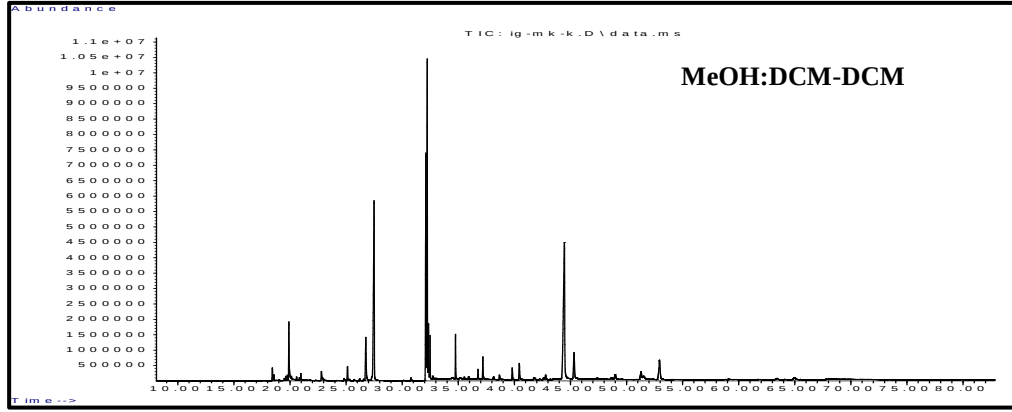
Tablo 4.4. *D. bingolensis*'in apolar bileşenlerinin kantitatif analizi

No	RT	İzomer	Bileşik Adı	Miktar (%)			
				H ₂ O-Hex	H ₂ O - DCM	MeOH:D CM-Hex	MeOH:DC M-DCM
Doymuş Yağ Asitleri							
1	19,79	C ₁₂ :0	Laurik asit		0,16	0,32	0,22
2	22,80	C ₁₄ :0	Miristik asit		0,47	1,11	0,88
3	24,80	C ₁₅ :0	Pentadeklik asit		0,40	0,24	
4	27,63	C ₁₆ :0	Palmitik asit	0,45	37,83	16,63	17,74
5	30,78	C ₁₇ :0	Margarik asit		0,48	0,28	0,26
6	32,50	C ₁₈ :0	Stearik asit		1,92	1,36	1,8
7	34,76	C ₂₀ :0	Araşidik asit		0,40	0,54	

8	35,92	C ₂₁ :0	Henerokosanoik asit			0,16	0,19
9	37,20	C ₂₂ :0	Behenik asit		0,47	0,47	1,29
10	38,68	C ₂₃ :0	Trikosilik asit		0,25	0,24	0,26
11	40,45	C ₂₄ :0	Lignoserik asit		0,60	0,44	1,33
12	42,62	C ₂₅ :0	Pentakosilik asit				0,23
13	45,32	C ₂₆ :0	Serotik asit		0,52		2,78
14	52,94	C ₂₈ :0	Montanik asit		0,59		2,96
15	64,98	C ₃₀ :0	Melissik asit				0,53
Ara Toplam				0,45	44,08	21,79	30,47
Tekli Doymamış Yağ Asitleri							
16	26,76		Palmitoleikasit		0,95		
17	32,18	C ₁₈ :1	Oleik asit	0,18	7,17		
Ara Toplam				0,18	8,13		
Çoklu Doymamış Yağ Asitleri							
18	32,11	C ₁₈ :2	Linoleik asit	0,15	13,11	16,95	11,04
19	32,29	C ₁₈ :3	Linolenik asit			22,11	18,45
20	32,82	C ₁₈ :2	7,10-Oktadekadienoik asit			0,19	1,83
21	32,92	C ₁₆ :3	7,10,13-Hekzadekatrienoik asit			0,20	3,74
Ara Toplam				0,15	13,11	39,45	35,06
Diğer Bileşenler							
22	18,43		Karyofillen			1,06	0,67
23	18,58		α -Bergamoten			0,45	0,29
24	19,50		β -Selinen			0,17	0,12
25	19,62		α -Selinen			0,32	0,2
26	20,17		Miristisin	86,31	25,84	19,3	3,75
27	20,31		Elemisin	1,36	0,35		
28	20,59		Diepisedren-1-oksit			0,21	0,14
29	20,90		Spathulenol	0,36	0,24	0,28	0,15
30	21,02		Karyofillen oksit	0,22	0,17	0,72	0,34
31	22,32		Apiolin	0,57			
32	23,12		Leden oksit	0,11	0,16		
33	24,41		Trisiklo[5.2.2.0(1,6)]undekan-3-ol, 2-metilen-6,8,8-trimetil	0,17			
34	25,13		3,7,11,15-Tetrametil-2-hekzadeken-1-ol			1,54	0,87
35	25,29		Hekzahidrofarnesil aseton		0,35	0,18	
36	26,80		7,10,13-Hekzadekatrienoikasit, metil ester			4,87	
37	27,31		Metil palmitelaidat				0,29
38	32,35		1,3,12-Nonadekatrien-5,14-diol		0,36		
39	32,38		Fitol			2,78	2,67
40	35,10		Butil 9,12-oktadekadienoat			0,42	
41	35,19		Butil 9,12,15-oktadekatrienoat			0,47	
42	36,76		Heptakosan			0,28	0,55
43	36,77		Pentakosan	0,13			
44	39,82		Oktakosan	0,43	0,38	0,39	0,82
45	42,79		Etanol, 2-(9-				0,50

			oktadekeniloksi)				
46	44,57		Nonakosan	9,03	6,54	4,65	20,64
47	48,98		3-Oktadeken-1-ol acetat				0,76
48	51,34		Tetratriakontan	0,53			1,07
49	51,51		Oktakosanol				0,63
50	63,41		β -Sitosterol			0,68	
Ara Toplam				99,22	34,38	38,77	34,46
Genel Toplam				100,00	99,70	100,00	99,99





Şekil 4.5. *D. bingolensis* apolar izolatların GC-MS kromatogramları

4.5. Antioksidan Aktivite Testlerine İlişkin Bulgular

4.5.1. DPPH Radikali Giderme Aktivitesine İlişkin Bulgular

D. bingolensis izolatlarının DPPH radikali giderme aktiviteleri 40, 80, 160 ve 200 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarda referans antioksidan BHA ile kıyaslandı. İzolatlar artan konsantrasyonlarda kaydadeğer DPPH radikali giderme aktivitesi gösterdi. İzolatlar en düşük konsantrasyon olan 40 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonda $\text{H}_2\text{O-DCM}$ %68,53 $\pm$ 3,63 aktivite yüzdesi ile en yüksek DPPH radikali giderme aktivitesini gösterdi. Bu aktivite değeri aynı konsantrasyonda 79,80 $\pm$ 1.25 bir aktivite gösteren BHA ile kıyaslandığında $\text{H}_2\text{O-DM}$ izolatının önemli oranda DPPH radikali giderme aktivitesi gösterdiği söylenebilir. Aynı konsantrasyonda en düşük aktivite ise %13,58 $\pm$ 2,95 aktivite değeri ile MeOH:DCM-DCM izolatı gösterdi. $\text{H}_2\text{O-Hex}$ ve MeOH:DCM-Hex izolatları ise DPPH radikali giderme aktivitesi göstermedi.

Tablo 4.5. Numunelerin farklı konsantrasyondaki DPPH radikali giderme aktivitesi

	40 µg/mL	80 µg/mL	160 µg/mL	200 µg/mL
H ₂ O-Hex	0	0	0	0
H ₂ O-But	42,85±3,90	78,71±0,51	83,53±0,74	84,27±1,18
H ₂ O-DCM	68,53±3,63	81,05±1,79	80,17±0,77	81,56±0,69
H ₂ O-EtOAc	44,84±1,64	82,18±2,08	85,93±0,44	85,80±0,60
MeOH:DCM-Hex	0	0	0	0
MeOH:DCM-DCM	13,58±2,95	25,04±4,58	31,34±2,92	45,59±3,99
MeOH:DCM-EtOAc	63,31±5,17	78,84±2,22	77,89±1,27	80,31±4,05
MeOH:DCM-But	50,30±2,21	70,34±3,69	71,78±3,83	77,86±3,90
MeOH:DCM-H ₂ O	37,78±0,91	71,17±2,12	74,30±0,61	78,08±3,16
BHA	79,80±1,25	81,26±0,74	82,94±2,05	81,25±0,74

4.5.2. Toplam İndirgeme Kuvveti Tayinine İlişkin Bulgular

İzolatların ferrik iyonlarını indirgeme potansiyelleri 10, 20, 40, 80, 120 ve 240 µg/mL’lik konsantrasyonlarda test edildi. Ferrik iyonlarının indirgenme kabiliyetleri 700 nm’de artan konsantrasyonla absorbans değerindeki artış ferrik iyonlarının indirgendiğinin göstergesi olarak kabul edilmektedir. İzolatlar konsantrasyon artışına bağlı olarak ferrik iyonlarını indirgeme kabiliyeti sergiledi. Genel olarak H₂O-DCM, H₂O-EtOAc ve MeOH:DCM-EtOAc izolatları önemli oranda ferrik iyonlarını indirgemişlerdir. En zayıf indirgenme kabiliyetlerini ise H₂O-Hex ve MeOH:DCM-Hex izolatları sergilemişlerdir.

Tablo 4.6. Numunelerin farklı konsantrasyondaki ferrik iyonlarını (Fe³⁺) indirgeme gücü aktivitesi

	10 µg/mL	20 µg/mL	40 µg/mL	80 µg/mL	120 µg/mL	240 µg/mL
H ₂ O-Hex	0,204±0,003	0,207±0,005	0,209±0,000	0,211±0,001	0,220±0,001	0,239±0,001
H ₂ O-DCM	0,213±0,001	0,230±0,000	0,262±0,001	0,267±0,004	0,328±0,008	0,456±0,008
H ₂ O-EtOAc	0,209±0,002	0,221±0,002	0,236±0,007	0,272±0,006	0,303±0,005	0,406±0,005
H ₂ O-But	0,215±0,002	0,224±0,010	0,228±0,004	0,269±0,005	0,286±0,001	0,377±0,001
MeOH:DCM-Hex	0,174±0,007	0,171±0,004	0,177±0,001	0,189±0,002	0,201±0,001	0,213±0,001
MeOH:DCM-DCM	0,166±0,001	0,174±0,006	0,186±0,007	0,207±0,005	0,222±0,002	0,274±0,002
MeOH:DCM-EtOAc	0,204±0,004	0,217±0,001	0,217±0,002	0,283±0,005	0,336±0,004	0,498±0,004

MeOH:DCM-But	0,197±0,002	0,198±0,008	0,206±0,005	0,245±0,004	0,271±0,002	0,378±0,002
MeOH:DCM-H₂O	0,176±0,003	0,183±0,002	0,183±0,001	0,214±0,001	0,237±0,005	0,300±0,005
BHA	0,248±0,002	0,341±0,003	0,324±0,006	0,633±0,011	0,853±0,012	1,329±0,022

4.5.3. Ferröz iyonları (Fe⁺²) Şelatlama Aktivitesi Tayinine İlişkin Bulgular

Numunelerin ferröz iyonlarını şelatlama kabiliyetleri 170,4, 227,2, 340,9 ve 454,4 µg/mL konsantrasyonlarda test edildi. Numunelerin ferröz iyonları şelatlama kabiliyetleri 454,4 µg/mL’lik konsantrasyonda %30,12±0,83-53,12±1,81 aralığında şelatlama aktivitesi göstermişlerdir (Tablo 4.7). Belirtilen konsantrasyonlarda en yüksek şelatlama aktivitesini MeOH:DCM-H₂O izolatu (%53,12±1,81) gösterirken en düşük şelatlama aktivitesini ise H₂O-DCM izolatu (%30,12±0,83) gösterdi.

Tablo 4.7. Numunelerin farklı konsantrasyonda ferröz (Fe²⁺) iyonu şelatlama kapasiteleri

	170,4 µg/mL	227,2 µg/mL	340,9 µg/mL	454,4 µg/mL
H₂O-Hex	11,18±1,16	21,53±2,74	33,40±8,71	49,49±7,96
H₂O-DCM	8,87±2,09	9,16±2,52	20,64±4,03	30,12±0,83
H₂O-EtOAc	10,32±5,82	18,61±10,02	39,30±4,28	32,67±2,45
H₂O-But	2,73±0,38	6,39±1,45	15,36±2,62	30,72±0,68
MeOH:DCM-Hex	36,52±5,32	41,41±8,08	45,45±7,58	54,37±4,46
MeOH:DCM-DCM	25,91±6,61	36,15±2,04	36,69±2,77	41,62±2,49
MeOH:DCM-EtOAc	14,21±1,21	18,48±3,96	17,16±1,95	31,78±1,38
MeOH:DCM-But	14,81±4,78	24,21±4,07	29,45±3,60	47,12±3,36
MeOH:DCM-H₂O	6,73±3,09	16,33±4,78	31,23±2,17	53,12±1,81
EDTA	44,77±0,88	66,60±4,50	95,31±0,15	95,45±0,06

4.5.4. ABTS Katyon Radikali Giderme Aktivitesine İlişkin Bulgular

İzolatların ABTS katyon radikali giderme aktiviteleri 10, 20, 40, 80, 120 ve 240 µg/mL konsantrasyonlarda gerçekleşti. ABTS katyon radikali giderme aktivitesinde apolar fraksiyonlardan H₂O-Hex, MeOH:DCM-Hex ve MeOH:DCM-DCM izolatlarında artan konsantrasyon ile kademeli bir şekilde artış gösterirken, H₂O-EtOAc, H₂O-But, MeOH:DCM-EtOAc, MeOH:DCM-H₂O ve MeOH:DCM-But gibi polar izolatlar 10 ve 20 µg/mL’lik konsantrasyonlardan sonra ortamdaki ABTS radikallerini yok ettikleri

görüldü (Tablo 4.8). İzolatların 10 µg/mL’lik konsantrasyonda ABTS katyon radikali giderme aktivitesi büyükten küçüğe doğru H₂O-DCM>MD-EtOAc>MeOH:DCM-But>H₂O-But>H₂O-EtOAc>MeOH:DCM-H₂O>MeOH:DCM-DCM>H₂O-Hex>MeOH:DCM-Hex şeklinde olduğu görüldü.

Tablo 4.8. Numunelerin farklı konsantrasyon aralıklarında ABTS katyon radikali giderme aktivitesi

	10 µg/mL	20 µg/mL	40 µg/mL	80 µg/mL	120 µg/mL	240 µg/mL
H₂O-Hex	12,32±6,10	13,68±3,57	27,79±2,67	37,26±13,99	58,53±2,67	100,00±0,00
H₂O-DCM	81,93±1,98	100,00±0,00	100,00±0,00	100,00±0,00	100,00±0,00	100,00±0,00
H₂O-EtOAc	54,04±0,42	92,83±2,42	99,79±0,28	100±0,00	100±0,00	100±0,00
H₂O-But	60,30±0,80	95,27±0,53	100±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00
MeOH:DCM-Hex	6,00±2,55	10,09±1,07	14,86±2,42	34,00±2,55	34,76±2,55	56,38±1,34
MeOH:DCM-DCM	20,67±1,40	41,75±0,84	72,56±6,18	96,42±0,28	89,26±10,12	98,01±1,12
MeOH:DCM-EtOAc	65,76±4,88	100±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00
MeOH:DCM-But	61,83±3,20	95,66±0,55	100±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00
MeOH:DCM-H₂O	31,28±1,20	100±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00

4.6. İzolatların Etkili Konsantrasyon Değerlerine (EC₅₀) İlişkin Bulgular

D. bingolensis izolatlarının farklı antioksidan aktivite testlerini konsantrasyona bağlı çalışmamızın amacı her bir izolatın etkili konsantrasyon değerlerini belirlemektir. Bu amaca yönelik her bir izolatın antioksidan aktivite parametresine özgü etkili konsantrasyon değerleri (EC₅₀) hesaplandı. EC₅₀ değeri, DPPH radikali ve ABTS katyon radikali için ortamdaki radikal türlerini %50 oranında inhibe eden konsantrasyonu ifade etmektedir. Ferröz iyonlarını şelatlama testinde ise ortamdaki ferröz iyonlarını %50 oranında şelatlayan izolat konsantrasyonunu ifade etmektedir. Ferrik iyonlarını indirgeme gücü testinde ise 700 nm’deki absorpsiyon değerini 0,5’e indiren konsantrasyonu ifade etmektedir. EC₅₀ değeri en küçük olan numunenin biyolojik aktivitesi en yüksektir. Bu bağlamda her bir izolatın EC₅₀ değerleri hesaplandı (Tablo 4.9). DPPH radikali giderme testinde en aktif izolat 46,43±1,36 µg/mL’lik EC₅₀ değeri ile H₂O-DCM izolatı iken, en inaktif izolatın ise 205,94±16,62 µg/mL EC₅₀ değeri ile MeOH:DCM-DCM izolatı olduğu belirlendi. İzolatların ferrik iyonlarını indirgemedi en etkili izolat 228,875±0,81 µg/mL EC₅₀ değeri ile MeOH:DCM-EtOAc izolatı iken, indirgeme kabiliyeti en zayıf

izolatın $747,533 \pm 2,66$ $\mu\text{g/mL}$ EC_{50} değeri ile MeOH:DCM-Hex izolatu olduğu belirlendi. Numunelerin ferröz iyonlarını şelatlama potansiyelleri EC_{50} değerleri açısından karşılaştırıldığında en iyi şelatlama potansiyeline sahip izolatın $365,35 \pm 44,45$ $\mu\text{g/mL}$ EC_{50} değeri ile MeOH:DCM-Hex izolatu olduğu görüldü. ABTS katyon radikali giderme aktivitesi için $\text{H}_2\text{O-EtOAc}$, $\text{H}_2\text{O-But}$, MeOH:DCM-EtOAc, MeOH:DCM-But ve MeOH:DCM- H_2O polar izolatları en düşük konsantrasyonda ABTS radikallerini yok ettikleri için bunların EC_{50} değeri düşük çıkmıştır.

Tablo 4.9. *D. bingolensis* izolatlarının etkili konsantrasyon değerleri (EC_{50})

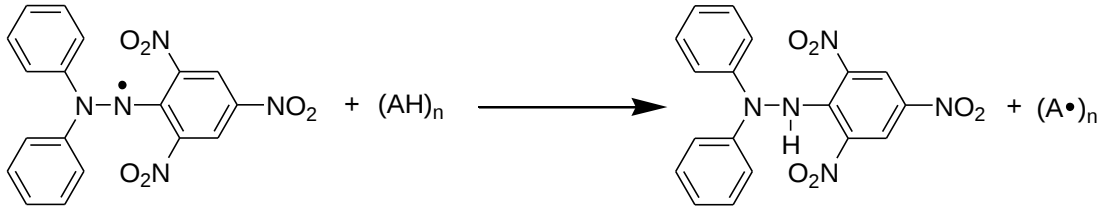
	EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			
	DPPH	İndirgeme aktivitesi	Şelatlama Gücü aktivitesi	ABTS
H₂O-Hex		$702 \pm 1,80$	$486,15 \pm 28,29$	$108,84 \pm 3,48$
H₂O-DCM	$46,43 \pm 1,36$	$292,555 \pm 1,19$	$591,17 \pm 35,09$	<45
H₂O-EtOAc	$59,49 \pm 1,67$	$348,03 \pm 3,09$	$825,32 \pm 36,34$	<45
H₂O-But	$54,53 \pm 5,22$	$255,46 \pm 10,36$	$786,47 \pm 28,92$	<45
MeOH:DCM-Hex		$747,53 \pm 2,66$	$365,35 \pm 44,45$	$194,06 \pm 1,58$
MeOH:DCM-DCM	$205,94 \pm 16,62$	$472,66 \pm 2,50$	$488,78 \pm 9,53$	$45,23 \pm 0,90$
MeOH:DCM-EtOAc	$47,58 \pm 10,03$	$228,87 \pm 0,81$	$784,14 \pm 8,94$	<45
MeOH:DCM-But	$72,25 \pm 1,68$	$333,42 \pm 1,53$	$510,74 \pm 29,82$	<45
MeOH:DCM-H₂O	$77,92 \pm 0,98$	$469,62 \pm 0,50$	$481,88 \pm 16,37$	<45
BHA	$44,14 \pm 1,63$	$66,49 \pm 1,53$		
TROLOX				$61,19 \pm 2,28$
EDTA			$188,70 \pm 3,07$	

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bingöl’de doğal habitatlarında yetişen endemik *D. bingolensis* türü üzerine yapılan kimyasal kompozisyon ve biyolojik aktivitesini değerlendiren çalışma literatürde çok azdır (Gecibesler vd. 2018). Bu bağlamda tez çalışması kapsamında bu endemik türün toprak üstü kısımlarında bulunan sekonder metabolit profilini ve biyolojik aktifliğini ortaya çıkarabilmek için türün toprak üstü kısımları önce destile su ile reflüks edildi. Bu işlemi seçme nedenimiz yöre insanı genellikle bitkileri suda kaynatmak sureti ile tükettikleri için su içerisine geçen biyoaktif içerikleri kantitatif olarak belirleyip bunların biyolojik aktiviteye ne tür bir etkiye sahip olduğunu belirleyebilmek içindir. Su ile reflüks yapıldıktan sonra kalan posa kısmı organik çözücü sistemi ile reflüks yapılarak suya geçmeyen sekonder metabolitlerin organik çözücü sistemine geçmesini sağlamaktı. Çünkü su bitkiler içerisindeki sekonder metabolitlerin hepsini çekme kabiliyetine sahip iyi bir çözücü değildir. Bu işlem ile organik karakteri fazla olan sekonder metabolitlerin organik çözücü sistemine geçmeleri sağlandı. Her iki reflüks sistemi ile elde edilen ham izolatların kaba ayırımını yapmak için ham izolatlar polarite özelliğine göre apolar organik çözücülerden başlanmak sureti ile polar çözücüler kullanılarak ardışık fraksiyonlandırma işlemine tabi tutulmuş ve alt fraksiyon izolatları (H₂O-Hex, H₂O-DCM, H₂O-EtOAc, H₂O-But, MeOH:DCM-Hex, MeOH:DCM-DCM, MeOH:DCM-EtOAc, MeOH:DCM-But ve MeOH:DCM-H₂O) elde edildi. Elde edilen apolar fraksiyonlar (H₂O-Hex, H₂O-DCM, MeOH:DCM-Hex ve MeOH:DCM-DCM) içerisindeki lipofilik bileşenleri GC-MS ile analiz edildi. *D. bingolensis*’in apolar izolatlarının analiz sonucuna göre özellikle su ile reflüks edildikten sonra hekzan ve diklormetan çözücülerini ile fraksiyonlandırılarak elde edilen H₂O-Hex ve H₂O-DCM izolatlarında önemli miktarda miristisin bileşeni (%25,84-86,31) geçtiği, palmitik asitin ise %37,83 oranında seçici olarak H₂O-DCM izolatına geçebileceği görüldü. Aynı şekilde doymamış yağ asitlerinden olan oleik asitin %7,17 oranında H₂O-DCM izolatına seçici olarak geçtiği gözlemlendi. Diğer taraftan MeOH:DCM ham izolatından hekzan ve

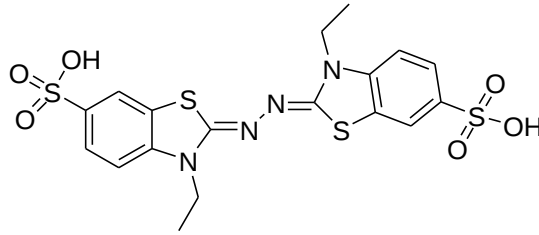
diklormetan çözücülerini ile fraksiyonlandırılması neticesinde elde edilen MeOH:DCM-Hex ve MeOH:DCM-DCM izolatlarında seçici olarak linoleik asit (%16,95 ve 11,04) ve linolenik asit (%22,11 ve 18,45) geçtiği görüldü. Fraksiyonlandırılan izolatlar içerisinde en yüksek flavonoit içeriğe sahip izolatların MeOH:DCM-EtOAc ($127,08 \pm 5,21$ $\mu\text{gKE/mgKİ}$) ve H₂O-DCM ($137,08 \pm 2,08$ $\mu\text{gKE/mgKİ}$) olduğu tespit edildi. Aynı şekilde toplam fenol içerik yönünden H₂O-DCM ($665,83 \pm 47,62$ $\mu\text{gGAE/mgKİ}$) ve MeOH:DCM-EtOAc ($724,65 \pm 43,64$ $\mu\text{gGAE/mgKİ}$) izolatları en yüksek fenol içeriğe sahip olduğu görüldü. Polar bileşen açısından *D. bingolensis* türünün özellikle rutin açısından zengin olduğu görüldü. Fakat *D. bingolensis* türünün ham izolatından sadece rutin izole edilmek istenir ise butanol ile fraksiyonlandırılarak önemli oranlarda rutin elde edilebilir. İzolatlar içerisinde ikinci ana bileşenin klorojenik asit olduğu tespit edildi. Aynı şekilde klorojenik asit, önemli miktarlarda butanol fazına çekilebilmektedir. İzolatların antioksidan aktiviteleri, farklı antioksidan test mekanizmaları tarafından değerlendirilerek etkinlikleri ortaya konulmuştur. Bunlar DPPH ve ABTS radikal giderme aktiviteleri, Toplam indirgeme kuvveti tayini, Ferröz iyonları (Fe^{+2}) şelatlama aktivitesi tayini gibi antioksidan analiz testleri kullanıldı. Bu metotlar hem yüksek duyarlılığa sahip olmaları hem de çok sayıda nümunenin analizinde kullanılır olmaları yönünden çokça tercih edilen testlerdir (Awika vd. 2003). DPPH ve ABTS radikali giderme testleri hızlı, basit, seçici ve tekrarlanabilir olmalarından dolayı antioksidan aktivite testlerinde tercih edilmektedir; özellikle yiyecek, içecek ve bitkisel ekstraktların antioksidan kapasitelerini belirlemek için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Özçelik vd. 2003).

DPPH uzun ömürlü ve azot merkezli bir radikal olduğundan radikal giderme aktivitelerini belirlemek için en sık kullanılan metotlardan biridir (Özçelik vd. 2003). Bu metotta antioksidan maddeler DPPH radikallerini, sarı renkli difenil-pikrilhidrazine indirgeyerek hidrojen veren guruplara sahip antioksidan maddelerin varlığını belirlemektir. Dolayısıyla DPPH radikalindeki azalma 517 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülen değere karşılık gelmektedir. Ortamda bulunan radikal giderici antioksidan veya antiradikal türlerin (AH)_n varlığında DPPH radikali (Şekil 5.1) indirgenmiş DPPH-H formuna dönüşmektedir (Gülçin 2002).



Şekil 5.1. Bir antioksidan tarafından DPPH radikalının giderilmesi

DPPH serbest radikal giderme aktivitesi gibi ABTS katyon radikali giderme aktivitesi de sulu karışım ve içeceklerin ekstraktlarının veya saf maddelerin radikal giderme aktivitelerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Şekil 5.2) (Miller vd. 1996; Gülçin 2006).



Şekil 5.2. ABTS'nin açık kimyasal yapısı

ABTS katyon radikali metodunun esası oluşturulan ABTS katyonunun 734 nm de maksimum absorbanş göstermesi esasına dayanır.

ABTS radikali DPPH radikallerinden daha reaktiftirler ve bir H atom transferini erektiren DPPH ile reaksiyonları farklıdır. ABTS radikalleri bir elektron transferidir (Kaviarasan vd. 2007).

Deneysel veriler sonucunda DPPH radiakli giderme tepkimesinde H₂O-DCM izolatu ve MeOH:DCM-EtOAc izolatları en aktif izolatlar olarak ortaya çıkmıştır. Bu sonuç izolatların toplam fenol ve toplam flavonoit içerik açısından zengin bir izolat olmalarıda ayrıca desteklemektedir. ABTS katyon radikali giderme testinde en düşük konsantasyonlarda bile bu izolatların ortamdaki ABTS radikallerini yok ettiği görülmüştür.

Antioksidanlar indirgeyici özellik göstererek ve bir maddeyi yükseltgeyerek indirgenme reaksiyonu olarak tanımlanan redoks reaksiyonlarında, redüktantlarla oksidanların stabilizasyonu şeklinde olabilir. Bir bileşiği veya ham ekstraktın indirgeme kapasitelerini $\text{Fe}[(\text{CN})_6]^{+3}$ 'nin $\text{Fe}[(\text{CN})_6]^{+2}$ iyonlarıyla ölçülebilir. Bundan dolayı bir bileşiğin indirgeme kapasitesi, antioksidan aktivitesinin önemli bir göstergesidir (Benzie ve Strain 1996). Bu bigilere dayanarak deneysel veriler sonucunda ferrik iyonlarını indirgeme gücü testinde MeOH:DCM-EtOAc izolatlarının en yüksek indirgeme gücü sergilendiği görülmüştür.

Ferröz (Fe^{+2}) iyonu gibi iyonik türler de, organizmada ROS üretimini kolaylaştırdığı için, demir şelatlama kapasitesi oldukça önemlidir. Metal iyonları şelatlama aktivitesi metallerin katalizlediği oksidasyon reaksiyonlarını engellemek veya geciktirmek için sıklıkla kullanılan önemli bir antioksidan metottur. Demir minareli organizmalar için esansiyel bir mineraldir fakat aşırısı hücre hasarına sebep olabilir. Geçiş metalleri arasında demir yüksek aktivitesinden dolayı lipitleri oksitleyen en önemli oksitleyici metal olarak bilinir. Metal iyonları arasında ferröz iyonları (Fe^{+2}), bilinen en önemli reaktiftir (Halliwell ve Gutteridge 1984; Miller 1996; Gülçin 2007).

Sonuç olarak yapılan tez çalışması ile endemik *D. bingolensis* taksonunun içermiş olduğu sekonder metabolit profili ortaya konularak bunların kaba ayrımı yapılarak bu izolatların antioksidan aktivite testlerine verdikleri cevaplar araştırılmıştır. Araştırma sonucunda inorganik ve organik çözücü sistemleri ile elde edilen ham izolatlar içerisindeki hedef sekonder metabolitler istenilen oranlarda izole edilerek tıp, farmakoloji, kozmetik ve diğer sağlık uygulamalarında kullanıma sunulabilir olmasıdır.

KAYNAKLAR

Arnao, Cano A, Acosta M (2001). The Hydrophilic and Lipophilic Contribution to Total Antioxidant Activity. *Food Chemistry* 73: 239-244

Awika JM, Rooney LW, Wu X, Prior RL and Cisneros-Zevallos L, (2003) Screening methods to measure antioxidant activity of Sorghum (*Sorghum bicolor*) and Sorghum product. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 6657–6662

Aditya Ganeshpurkar, Ajay K. Saluja: (2017). The pharmacological potential of rutin. *Saudi Pharmaceutical Journal* 25: 149-164

Al-Enazi MM (2014) Protective Effects of Combined Therapy of Rutin with Silymarin on Experimentally-Induced Diabetic Neuropathy in Rats. *Pharmacology & Pharmacy* 170-178

Boss PK, Davies C, Robinson SP (1996) Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes. *Plant Mol Bio* 32(3): 565-569

Budavari S (2001) *The Merck Index*. 13th ed. Merck & Co, Whitehouse Station, New Jersey 27-35

Bruneton J (1999) *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes medicinales*. 3rd Edn, Technique et documentation Lavoisier, Paris 48-57

Blake D and Winyard PG (1995) *Immunopharmacology of Free Radical Species*, Academic Press, San Diego 67-83

Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 26: 1199–1200

Brenner ED (2002) Drugs in the plant *Cell* 109: 680–681

Buckingham J (2005) *Dictionary of Natural Products on CD-ROM v 13:1* Chapman&Hall/CRC Press, Boca Raton Florida 84-98

Briellmann HL, Kaufman PB, Duke JA, Cseke LJ, Warber SL&Kirakosyan A (2006) *Natural products from plants*. United States of America 40-41

Cornwell TW, Cohick and Raskin I (2004) Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry* 65: 995–1016

- Cushnie TP, Hamilton VE and Lamb AJ (2003) Assessment of the antibacterial activity of selected, Microbiol Res. 158: 281-9
- Cohen SS (1998) A Guide to the Polyamines. Oxford University Press, New York 79-96
- Chu YH, Chang CL and Hsu HF (2000) Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity Sci, Food Agric 80: 561-566
- Chattopadhyay R (1993) Hypoglycemic effect of *Ocimum sanctum* leaf in normal and streptozotocin diabetic rats. Indian J, Exp, Biol 31: 891–893
- Dinis TCP, Madeira VMC, Almeida LM (1994) Action of phenolic derivates (acetoaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. Archives of Biochemistry And Biophysics 315: 161–169
- Deb P, Sharma S, Hassan KM (2010) Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: an overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. Pathophysiology 17: 197–218
- De Araujo ME et al (2013) Enzymatic de-glycosylation of rutin improves its antioxidant and antiproliferative activities. Food Chem
- Farnsworth NR and Solejarto DD (1991) ‘Global importance of medicinal plants’ In O, Akerele V, Heywood and Syngé (eds) H ‘Conservation of medicinal plants’ Cambridge University Press, Cambridge UK 1991
- Forstrom JW, Stults FH and Tappel AL (1979) Rat liver cytosolic glutathione peroxidase: reactivity with linoleic acid hydroperoxide and cumene hydroperoxide, Archives of Biochemistry and Biophysics 193: 51–55
- Geissman TA and Crout DHG (1969) Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism. Freeman- Cooper, San Francisco, California
- Gülçin İ (2002) Isırgan otunun (*Urtica dioica*) antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, oksidatif enzimlerinin karakterizasyonu ve bazı *in vivo* etkilerinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü 114
- Gülçin İ, Mshvildadze V, Gepdiremen A, Elias R (2006) Screening of antioxidant and antiradical activity of monodesmosides and crude extract from *Leontice smirnowii* Tuber, Phytomedicine 13: 343–351
- Gülçin İ, Köksal E, Elmastas M, Aboul-Enein HY (2007) Determination of *in vitro* antioxidant and radical scavenging activity of *Verbascum oreophilum* C. KOCH var. *joannis*. Research Journal of Biological Sciences 2: 372–382
- Graefe EU, Derendorf H and Veit M (1999) Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol quercetin in humans. Int J Clin Pharmacol Ther 37: 219–233

Guardia T, Rotelli AE, Juarez AO, Pelzer LE (2001) Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Farmacologia* 56: 683–687

Gecibesler IH, Demirtas I&Behcet L (2018) Influence of Altitude on Chemical Variability of Volatile Profile for Endemic *Diplotaenia bingolensis* *Chemistry of Natural Compounds* 54: 579-580

Halliwell B and Gutteridge JMC (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine* OU, Press, Oxford

Halliwell B, Gutteridge JMC (1984) Oxygen toxicology, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal* 219: 1–4

Hagerman AE and Butler LG (1989) Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin *Chem Ecol J* 15: 1795–1810

Heywood, Vernon Hilton et al (2007) "Flowering plant families of the world."

Hanasaki Y et al (1994) The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med*

Johnson IT (2003) Glucosinolates in the human diet. Bioavailability and implications for health. *Phytochem Rev* 1: 183–188

Javed H, Khan MM, Ahmad A, Vaibhav K, Ahmad ME, Khan A, Ashafaq M, Islam F, Siddiqui MS, Safhi MM, Islam F (2012) Rutin prevents cognitive impairments by ameliorating oxidative stress and neuroinflammation in rat model of sporadic dementia of Alzheimer type. *Neuroscience* 17: 340–352

Jiang Y et al (2011) Wolfberry Water Soluble Phytochemicals Down-Regulate ER Stress Biomarkers and Modulate Multiple Signaling Pathways Leading To Inhibition of Proliferation and Induction of Apoptosis in Jurkat Cells *J Nutr Food Sci*

Kaur C and Kapoor HC (2001) Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health, *Int J, Food Sci, Tech* 36: 703-725

Kaviarasan S, Naik GH, Gangabthagirathi R, Anuradha CV, Priyadarsinin KI (2007) In vitro studies on antiradical and antioxidant activities of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seeds. *Food Chemistry* 103: 31–37

Kovat E (1987) Composition of essential oils part 7. Bulgarian oil of rose (*Rosa damascena* Mill) *JChromatogr A* 406: 185–222

Kumar S, Pandey AK (2013) Chemistry and Biological Activities of Flavonoids An Overview, *Bio of Plants* 6: 34

- Kamalakkannan N, Stanely Mainzen Prince P (2006) The influence of rutin on the extracellular matrix in streptozotocin-induced diabetic rat kidney *Pharm J, Pharmacol* 58: 1091–1098
- Kostic DA et al (2015) Xanthine oxidase Isolation, assays of activity and inhibition. *Journal of Chemistry*
- Louli V, Folas G, Voutsas E and Magoulas K (2004) Extraction of parsley seed oil by supercritical CO₂ *J Supercrit Fluids* 30: 163–174
- Lubbe, Andrea and Robert Verpoorte (2011) Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. *Industrial crops and products* 34: 785–801
- Lescanich CO and Noble RC (1997) Manipulation of the n-3 polyunsaturated fatty acid composition of eggs and ve meat. *World's Poultry Science Journal* 53
- Mabry TJ (2001) Selected topics from forty years of natural products research: betalains to flavonoids, antiviral proteins, and neurotoxic nonprotein amino acids *Nat Prod J* 64: 1596–1604
- Michael J (2004) Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids. *Nat Prod Rep* 21: 650–668
- Michael JP (2003) Indolizidine and quinolizidine alkaloids. *Nat Prod Rep* 20: 458–475
- Miller DD (1996) *Mineral Food Chemistry*, Fennema OR, Dekker: New York 618–649
- Moshonas MG (1971) Analysis of carbonyl flavor constituents from grapefruit oil. *J Agric Food Chem* 19
- Machado DG, Bettio LE, Cunha MP, Santos AR, Pizzolatti MG, Brighente IM, Rodrigues AL (2008) Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *Eur J Pharmacol* 587 (1–3): 163–168
- Maeda J et al (2014) Natural and glucosyl flavonoids inhibit poly(ADP-ribose) polymerase activity and induce synthetic lethality in BRCA mutant cells. *Oncol Rep*
- Nafees S et al (2015) Rutin ameliorates cyclophosphamide induced oxidative stress and inflammation in Wistar rats: role of NFκB/MAPK pathway. *Chem Biol Interact*
- Ohloff G (1994) *Scent and Fragrances. The Fascination of Odors and Their Chemical Perspectives*. Springer- Verlag, Berlin
- Oyaizu M (1986) Studies on product of Browning Reaction Prepared from Glucose Amine, *Japanese Journal of Nutrition* 44: 307–315

- Özcelik B, Lee JH, Min DB (2003) Effects of light, oxygen and pH on the 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method to evaluate antioxidants. *Journal of Food Science* 68: 487–490
- Pan M, Mabry TJ, Beale JM, Mamiya BM (1997) Nonprotein amino acids from *Cycas revoluta*. *Phytochemistry* 45: 517–519
- Park YK, Koo MH, Ikegaki M, Contado JL (1997) Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Arquivos de Biologia e Tecnologia* 40: 97–106
- Stanley P, Mainzen Prince, Kamalakkannan N (2006) Rutin improves glucose homeostasis in streptozotocin diabetic tissues by altering glycolytic and gluconeogenic enzymes. *J. Biochem. Mol. Toxicol* 20: 96-102
- Patil SL et al (2012) Radiomodulatory role of Rutin and Quercetin in Swiss Albino mice exposed to the whole body gamma radiation. *Indian J Nucl Med*
- Pariza MW, Park Y, Cook ME (2000) Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 223: 8-13
- 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: 1231–1237
- Rosenthal GA (1977) The biological effects and mode of action of L-canavanine, a structural analogue of L-arginine. *Q Rev Biol* 52: 155–178
- Rozan P, Kuo YH and Lambein F (2001) Amino acids in seeds and seedlings of the genus *Lens*. *Phytochemistry* 58: 281–289
- Rivera-Vargas LI, Schmitthenner AF and Graham TL (1993) Soybean flavonoid effects on and metabolism by *Phytophthora sojae*. *Phytochemistry* 32: 851–857
- Rose G, (1990) Dietary ve human health. In: *Reducing fat in meat animals*. Edited by J. D. Wood ve Fisher AV, Bristol UK 469
- Slinkard K ve Singleton VL (1977) Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture* 28: 49-55
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods of Enzymology* 299: 152–178
- Simopoulos D (1996) Omega-3 flaxseed bridges on nutrition gap. *Pilgrim's Pride eggs plus*. Dallas. USA

Sampath H, Ntambi JM (2005) Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Annu. Rev. Nutr* 25: 317-340

Turner A (1970) Terpenoids and steroids. *Annu Rep on the Prog of Chem, Sect B: Org Chem* 66: 389–411

Tabor CW and Tabor H (1984) Polyamines. *Annu Rev Biochem* 53: 749–790

Wu LW, Chiang YM, Chuang HC, Wang SY, Yang GW, Chen YH, Lai LY and Shyur LF

Yen GC, Chen HY (1995) Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 27–32

Yazgan O, Aksoy E (1981) Metabolizma Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi ders notları 236

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Mehmet ERDOĞAN
Doğum Tarihi ve Yeri	22.11.1988 IĞDIR
Medeni Hali	Evli
Yabancı Dili	İngilizce - kürtçe
Telefon	0426 214 29 87
GSM	0507 180 66 80
e- mail	et-in@hotmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Bingöl Üniversitesi	2014 -
Lisans	Bingöl Üniversitesi	2009 - 2013
Lise	Iğdır Çok Programlı Lisesi	2002 - 2006
İlk ve Ortaöğretim	Hoşhaber ilköğretim Okulu	1994 - 2002

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Yaptığı İş
2015- halen çalışıyor	Özel Bingöl Hürriyet Fen- Anadolu Lisesi	Kimya Öğretmeni

