



# T.C.
# İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
# ECZACILIK FAKÜLTESİ

## BİTİRME TEZİ

**BAZI *PARENTUCELLIA* TÜRLERİNİN ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN ÖLÇÜLMESİ**

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**FATİH GÜNEY**
**0701140056**

**DANIŞMAN**
**Araş.Gör.Dr. Gözde HASBAL ÇELİKOK**

**Mayıs 2020**

**İSTANBUL**

# ÖNSÖZ

Tez danışmanım Araş.Gör. Dr. Gözde Hasbal Çelikok'a tüm yardımları ve rehberliği için, her zaman bana destek olan aileme ve ablam Ayşe Güney'e teşekkür ederim.

Ayrıca her zaman yanımda olan değerli arkadaşım Özgür Öztürk'e teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ..... II
IÇINDEKILER ..... III
SEMBOLLER / KISALTMALAR LISTESI ..... IV
ÖZET ..... V
ABSTRACT ..... VI
1. GIRIŞ ..... 1
2. GENEL KISIMLAR ..... 2
2.1. Serbest Radikaller ..... 2
2.2. Oksidatif Stres ..... 3
2.3. Antioksidanlar ..... 4
*2.4. Parentucellia* ..... 8
3. MATERYAL VE YÖNTEM ..... 11
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ..... 11
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler ..... 11
3.3. Bitki Materyali ..... 12
3.4. Kullanılan Yöntemler ..... 12
3.4.1. Metanol Ekstresinin Hazırlanması ..... 12
3.4.2. Antioksidan Aktivite Deneyleri ..... 14
3.4.3. DPPH Radikal (DPPH$^{\bullet}$) Giderme Aktivitesi Tayini ..... 16
3.5. İstatiksel Değerlendirme ..... 17
4. BULGULAR ..... 18
4.1. Ekstrelerin Total Fenolik ve Flavonoid Bileşik Miktarları ..... 18
4.2. Ekstrelerin DPPH Radikal (DPPH$^{\bullet}$) Giderme Aktivitesi ..... 19
5. TARTIŞMA VE SONUÇ ..... 21
EKLER ..... 22
KAYNAKLAR ..... 23
ÖZGEÇMİŞ ..... 25

## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

| | |
|---|---|
| **DPPH** | 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil |
| **$DPPH^{\bullet}$** | DPPH Radikali |
| **ROS** | Reaktif Oksijen Türleri |
| **$H_2O_2$** | Hidrojen Peroksit |
| **$HO^{\bullet}$** | Hidroksil Radikali |
| **SOD** | Süperoksit Dismutaz |
| **$O_2^{\bullet-}$** | Süperoksit Radikali |
| **PEG** | Polietilen Glikol |
| **$ROO^{\bullet}$** | Peroksil Radikali |

# ÖZET

GÜNEY, F. (2020). Bazı *Parantucellia* Türlerinin Antioksidan Aktivitelerinin Ölçülmesi. İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı. Bitirme Tezi. İstanbul.

Bu çalışmada, *Parentucellia latifolia* subsp. *latifolia* ve *Parentucellia latifolia* subsp. *albiflora* türlerinin antioksidan aktivitesi üzerine etkisini incelemek amacıyla, total fenolik bileşik miktarları, total flavonoid bileşik miktarları ve DPPH (2,2- difenil-1-pikrilhidrazil) radikali giderme aktiviteleri tayin edilmiştir. Bu amaçla, bitki türlerinden Soxhlet aparatı kullanılarak metanol ekstreleri hazırlandı. Metanol ekstrelerinin total fenolik bileşik miktarları, "mg gallik asid ekivalanları/g ekstre" olarak ve total flavonoid bileşik miktarları "mg kateşin ekivalanları/g ekstre" olarak ifade edildi. Sonuçlar incelendiğinde, iki ekstrenin birbirine benzer miktarda total fenolik bileşik miktarına sahip olduğu görüldü. Bununla birlikte, *P. latifolia* subsp. *albiflora* türünden elde edilen metanol ekstresinin total flavonoid bileşik miktarı bakımından *P. latifolia* subsp. *latifolia* metanol ekstresine göre daha zengin olduğu bulundu. Ekstrelerin, $DPPH^{\bullet}$ giderme aktiviteleri "$EC_{50\ DPPH}$ değeri" olarak ifade edildi. Düşük $EC_{50}$ değerinin yüksek antioksidan aktiviteyi gösterdiği göz önünde bulundurularak, ekstrelerin benzer etkide $DPPH^{\bullet}$ giderici antioksidan etkiye sahip olduğu bulundu. Sonuçlar, kontrol ile karşılaştırıldığında ise, ekstrelerin kersetinden daha düşük $EC_{50\ DPPH}$ değerlerine sahip oldukları görüldü. Sonuç olarak, bu çalışmada yapılan *in vitro* deneyler ile *Parentucellia latifolia*'nın iki alt türünün birbirine benzer miktarda total fenolik/flavonoid bileşik madde içerdiği ve antioksidan aktiviteye sahip oldukları gösterildi. Yapılacak ileri analizler ile bitki türünün oksidatif strese karşı koruyucu bir antioksidan olarak kullanılabileceği sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** *Parentucellia*, Antioksidan Aktivite.

## ABSTRACT

FATİH, G. (2020). Measurement of Antioxidant Activities of Some *Parantucellia* Species. Istanbul University, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry. Final Thesis. Istanbul.

In this study, in order to investigate the antioxidant activity of *Parentucellia latifolia* subsp. *latifolia* and *Parentucellia latifolia* subsp. *albiflora*, the total phenolic compound amounts, total flavonoid compound amounts and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrilhydrazyl) radical scavenging activities of the species were determined. For this purpose, methanol extracts were prepared using Soxhlet apparatus from plant species. Total phenolic contents of the methanol extracts were expressed as mg gallic acid equivalents/g extract and total flavonoid contents were expressed as mg catechin equivalents/g extract. As a result, it was seen that the two extracts had similar amounts of total phenolic compound. Additionaly, the methanol extract from *P. latifolia* subsp. *albiflora* was found to be richer in total flavonoid compounds than the methanol extract from *P. latifolia* subsp. *latifolia*. The $DPPH^{\bullet}$ scavenging activities of the extracts were expressed as $EC_{50}$ DPPH value. Considering that a low $EC_{50}$ value shows high antioxidant activity, it was found that the extracts had similar $DPPH^{\bullet}$ scavenging effect. When the results were compared with the control, it was seen that the extracts had lower $EC_{50}$ DPPH values than that of quercetin. In conclusion, *in vitro* experiments performed in this study showed that two subtypes of *Parentucellia latifolia* contain similar amounts of total phenolic/flavonoid compounds and have similar antioxidant activity. It was concluded that the plant species can be used as a protective antioxidant against oxidative stress by further analysis.



**Keywords:** *Parentucellia*, Antioxidant Activity

# 1. GİRİŞ

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) artan seviyesi, DNA, lipidler ve proteinler gibi insan makromoleküllerine zararlıdır, bu da mutasyonlara ve karsinojeneze yol açar. Hücresel ROS'ların düzenlenmesi, hücresel homeostazı korumak için hayati öneme sahiptir (Özcan ve diğ., 2015).

Oksidatif stres, hücresel metabolizma sırasında oluşan hidroksil radikali ($HO^{\bullet}$), süperoksit radikali ($O_2^{\bullet}$) ve hidrojen peroksit ($H_2O_2$) gibi ROS'ların artışı ile onları detoksifiye eden, antioksidanların yetersizliği sonucu oksidatif dengenin bozulması olarak tanımlanır (Özcan ve diğ., 2015). Diabetes mellitus, kanser, romatoid artrit, serebrovasküler ve kardiyovasküler hastalıklar, kronik inflamasyon, yaşlanma ve diğer dejeneratif hastalıklar gibi bazı önemli bozukluklarla ilişkilidir (Çaylak, 2011).

Bitkiler, ROS'ların yıkıcı etkilerini engelleyebilen yan etkisi olmayan doğal antioksidan kaynaklarıdır. Son yıllarda, farmasötik endüstrilerinde daha güçlü yeni ilaçlar için bitki araştırmalarına ilgi artmaktadır. Bununla birlikte, bitkilerin yalnızca az bir kısmı kimyasal olarak incelenmiştir ve bunlarında çok daha küçük bir kısmı farmakolojik taramaya tabi tutulmuştur. Günümüzde, bazı bitkilerin terapötik etkileri konusunda araştırma bulunmamasına rağmen, düşük maliyetleri ve daha az olumsuz etkileri nedeniyle tamamlayıcı ve alternatif ilaçlar olarak daha kabul edilebilir hale gelmektedir (Bussway ve diğ., 2002).

*Parentucellia* (Orobanchaceae) cinsi, rasemler veya sivri benzeri şekilde düzenlenmiş, sapsız ve genellikle zıt üst yaprakları ve çiçekleri olan yıllık bitkilerden oluşur. Dört tür Batı Avrupa, Akdeniz, Orta ve Avrupa'da dağılmaktadır (Fuhrman ve diğ., 1997).

Bu çalışmada, iki *Parentucellia* türünün total fenolik ve total flavonoid bileşik miktarları belirlenmiş ve $DPPH^{\bullet}$ giderme aktivitesi incelenmesi amaçlanmaktadır.

# 2. GENEL KISIMLAR

## 2.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller dış orbitalinde bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektron taşıyan, yüksek enerjili atom veya moleküller olarak tanımlanmaktadır. Serbest radikaller eşlenmemiş elektron bulundurduklarından dolayı diğer maddelerle kolaylıkla reaksiyona girebilirler (Karabulut ve Gülay, 2016).

Serbest radikaller normal metabolik süreçte devamlı olarak üretilirler fakat üretim hızları bazı yangısal veya diğer hastalık şartlarında artar. Normal olarak vücut, ROS'lara karşı bir savunma mekanizması tarafından korunur. ROS'ların birikimi oksidatif strese neden olur ve lipid peroksidasyonunu başlatır (Altıner, 2018). Serbest radikaller aerobik metabolizma esnasında üretilirek, lipit peroksidasyonu, protein ve DNA hasarı ile birlikte hücrelerin ölümüne neden olmaktadır. Ayrıca, oksidatif strese bağlı olarak insanlarda Alzheimer, Parkinson, romatoid artirit, Diabetes mellitus gibi rahatsızlıklar meydana getirdikleri de bilinmektedir (Çaylak, 2011).

Serbest radikallerin insan ve hayvan vücudunda artmasına bağlı olarak meydana gelen hücre hasarları mide-bağırsak hastalıklarından infertiliteye, kardiyovasküler hastalıklardan solunum ve boşaltım sistemi bozukluklarına kadar birçok hastalığa neden olurlar. Serbest radikallerin düzeyi ile ilişkili olan bu hastalıkların önlenmesi için oksidan maddelerin antioksidan sistem ile dengede olması sağlanmalıdır (Karabulut ve Gülay, 2016).

Serbest radikaller başlıca, moleküler oksijenin normal metabolizma basamaklarında indirgenmesi ile açığa çıkan hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipid peroksit radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahiplerdir (Altıner, 2018).

Oksijenden oluşan başlıca ROS türleri; (Çetin ve diğ., 2011)

- Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$),
- Hidrojen peroksit radikali ($H_2O_2$),
- Hidroksil radikali ($HO^{\bullet}$) ,
- Nitrik oksit radikali ($NO^{\bullet}$),
- Hipokloröz asit radikali ($HOCl^{\bullet}$),

- Singlet oksijen radikali ($O_2^{\bullet}$),
- Alkil radikali ($R^{\bullet}$),
- Peroksil radikali ($ROO^{\bullet}$),
- Organik peroksit radikali ($RCOO^{\bullet}$),
- Perhidroksil radikali ($HO_2^{\bullet}$)
- Alkoksil radikali ($RO^{\bullet}$)'dir.

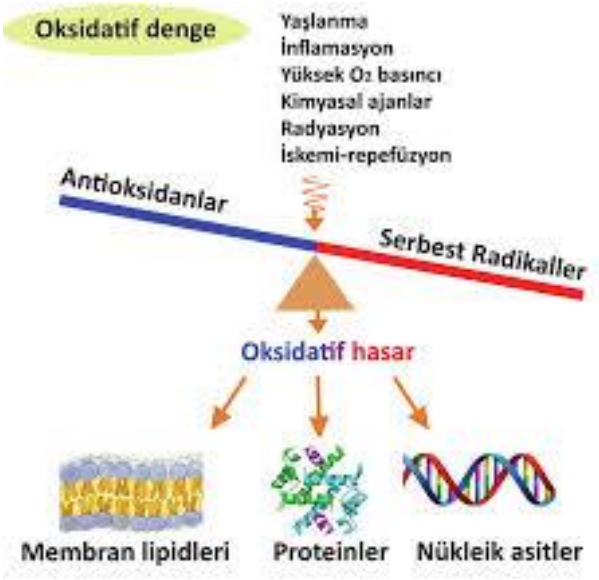
Radikaller etkiler direkt ve indirekt etkililer olmak üzere ikiye ayrılır. Direkt etkiler, önemli lipidler ile makromoleküllere verilen peroksidatif hasarı kapsar. İndirekt olarak, ROS metabolitleri tarafından hücresel membranlar ve bileşenlerde teşvik edilen değişimler metabolik geçitleri değiştirebilir, bu durum da fizyolojiyi değiştirir ve muhtemelen patoloji ile sonuçlanır. Son derece reaktif olan $HO^{\bullet}$, lipidlere, proteinlere, polisakkaritlere, DNA ve diğer makromoleküllere saldırır (Miller ve diğ., 1993). Okside moleküller, zincir reaksiyona neden olacak şekilde diğer moleküllerden elektronları soyutlarlar. Eğer bu reaksiyon kontrol altına alınmazsa membran geçirgenliğini, enzim fonksiyonunu ve hatta kas kasılmasını etkileyebilen yoğun doku hasarına neden olabilir. ROS'lar, normal metabolik işlemlerin kaçınılmaz ürünleridir ve daima zararlı değillerdir (Miller ve diğ., 1993).

Serbest radikallerin yüksek reaktivitelerine bağlı olarak direkt olarak ölçülmeleri zordur. Serbest radikallerin hedefi hücre membran fosfolipidleridir. Oksidatif hasarın belirlenmesinde lipid peroksidasyon parametrelerinden yararlanılır (Özcan ve diğ., 2015)

## 2.2. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, oksidasyon ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin oksidasyon lehine bozulmasıdır. Çoğunlukla artmış serbest radikal üretiminin sonucu olarak gelişir. Bunun yanında antioksidan savunma sisteminin zayıflaması veya her iki durumun ortaklaşa etkisiyle de oluşabilir (Sies, 1991).

Oksidatif stres, hücresel toksisiteye yol açan bir dizi patofizyolojik sürecin tetiklenmesine sebep olur. Serbest radikaller kısa ömürlü, reaktif moleküller olup, normal metabolik süreçler ve/veya çeşitli dış faktörlerin etkisiyle oluşurlar. Serbest radikaller organizma için fagositozda rol almak gibi faydalı işlevleri yanında, aşırı miktarda bulunduklarında lipitler ve glikoproteinler gibi hücresel yapılar üzerine toksik etkiler oluştururlar (Beckman ve Ames, 1998; McCormick ve diğ., 2000).




**Şekil 2.1: Oksidatif denge** (Özcan ve diğ., 2015)

Hastalıklarla ilişkili olarak oksidanlar başlıca üç yolla birikirler:

1. Normal hücre içi işlevler esnasında aşırı ve uygunsuz oluşumları veya dokuları koruyucu antioksidan sistemlerde yetersizlikler,

2. Lokal olarak inflamatuvar hücrelerden salınım,

3. Yabancı maddelere sekonder oksidan oluşumu (İlaçlar, inhale edilen gazlar vs.)

(Yıldırmak, 1998)

## 2.3. Antioksidanlar

Antioksidanlar; oksidanlara hedef olan biyolojik yapıların oksidasyon hızlarını nispeten düşük konsantrasyonlarda anlamlı derecede engelleyen maddelerdir. Tüm hayvansal ve bitkisel organizmalar serbest radikallerin etkilerini önlemek için endojen antioksidan sistemlere sahiptirler. Endojen antioksidanlar enzimatik olan ve olmayan diye iki kısma ayrılabilir. Ekzojen ve endojen antioksidan türleri ve etki mekanizmaları Tablo 2.1 ve 2.2'de gösterilmiştir (Özcan ve diğ., 2015).

**Tablo 2.1: Ekzojen antioksidanlar**

| ANTİOKSİDAN | ETKİ MEKANİZMASI |
|---|---|
| Askorbik asit | $OH^{\bullet}$ temizler |
| Beta-karoten | Yağda çözünür radikaller ile singlet oksijeni temizler. |
| Vitamin E | Yağda çözünür, zincir kırıcı etki gösterir. |

**Tablo 2.2: Endojen antioksidanlar**

| **Enzim olmayanlar** | |
|---|---|
| Albümin | Bakır ve Hemoglobin grubu bağlar.<br>HOCl'u ortamdan temizler. |
| Seruloplazmim | Bakır iyonlarını bağlar, $H_2O_2$'i kullanarak bakırın reoksidasyonunu sağlar. |
| Transferrin | Ferrik haldeki demir iyonlarını ($Fe^{3+}$) bağlar. |
| Laktoferrin | Ferrik haldeki demir iyonlarını ($Fe^{3+}$) düşük pH değerlerinde bağlar. |
| Haptoglobin | Hemoglobini bağlar. |
| Hemopeksin | Hem grubunu bağlar. |
| Bilirübin | $ROO^{\bullet}$ temizler. |
| Glikoz | $HO^{\bullet}$ temizler. |
| Ürat | Radikalleri temizler ve metalleri bağlar. |
| Melatonin | $HO^{\bullet}$ temizler. |
| Mukus | $HO^{\bullet}$ temizler. |

| **Enzim yapıda olanlar** | |
|---|---|
| | $O_2^{\bullet-}$ temizler |
| Süperoksit dismutaz (SOD) | $O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ |
| Katalaz (CAT) | $H_2O_2$ (yüksek konsantrasyonda ise) ortamdan uzaklaştırır<br>$2H_2O_2 + O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ |
| Glutatyon peroksidaz (GPx) | $H_2O_2$ (düşük konsantrasyonda ise) ortamdan uzaklaştırır<br>$H_2O_2$+2 GSH → GSSG+$2H_2O$ |
| Sitokrom oksidaz | Oksijenin suya indirgenmesi sırasında aktif oksijenin ortama salınımını engelleyerek ROS oluşumunu engeller. |

Fenolik bileşikler ve flavonoidlerin en aktif antioksidanlardan olduğu belirtilmiştir. Bu bileşikler fenilalaninden, daha az sayıdaki bazı bitkilerde ise tirozinden fenilalanin liaz ve tirozin liaz etkisiyle oluşur. İlerleyen reaksiyonlar sonucu asidik ortamda flavonoidler ve isoflavonoidler meydana gelir (Eberhardt ve diğ., 2000; Bushway ve diğ., 2002).

Polifenoller, izoloflavonlar ve flavonoidler fitokimyasallar içinde antioksidan etkinliği en güçlü mikrokimyasallardır. Bu özellikleri nedeniyle, fizyolojik oksidasyonun rutin tahribatına karşı LDL oksidasyonunu inhibe ederek hücreleri korurlar. Aynı zamanda başta polifenoller olmak üzere, izoflavonlar ve flavonoidler, steroidlerin metabolik profilini ve p450 substratlarını değişime uğratıcı etki gösterdikleri belirlenmişti (Fuhrman ve diğ., 1997).

### *2.4. Parentucellia*

*Parentucellia* (Orobanchaceae) cinsi, rasem ve başak benzeri düzenlenmiş tek yıllık bitkilerden oluşur. Dört tür, batı Avrupa, Akdeniz, Orta ve Güneybatı Asya'da yetişmektedir. Morfolojik olarak *P. latifolia* subsp. *latifolia* mor corollası ve nispeten kalın sapı ile *P. latifolia* subsp. *flaviflora* türünden ayrılabilir (Llorent-Martínez ve diğ., 2019).

Bu zamana kadar *Parentucellia* cinsi üzerinde az sayıda fitokimyasal analiz çalışması yapılmıştır. Bianco ve diğ. (1985) yaptıkları çalışma ile, *Parentucellia viscosa*'dan iridoid glikozitlerini izole etmişlerdir. Yapılan sınırlı sayıda çalışmalar kapsamında *P. latifolia* türünün terpenoidler ve malonik asit türevleri, loganin gibi iridoid glikozitleri, rutin ve luteolin gibi flavonoidler, aukubin ve katalpol içerdiği bildirilmiştir (Urones ve diğ., 1989; Urones ve diğ., 1990; De Urbina ve diğ., 1994; Llorent-Martínez ve diğ., 2019).



**Şekil 2.2: *Parentucellia latifolia* subsp. *Latifolia***

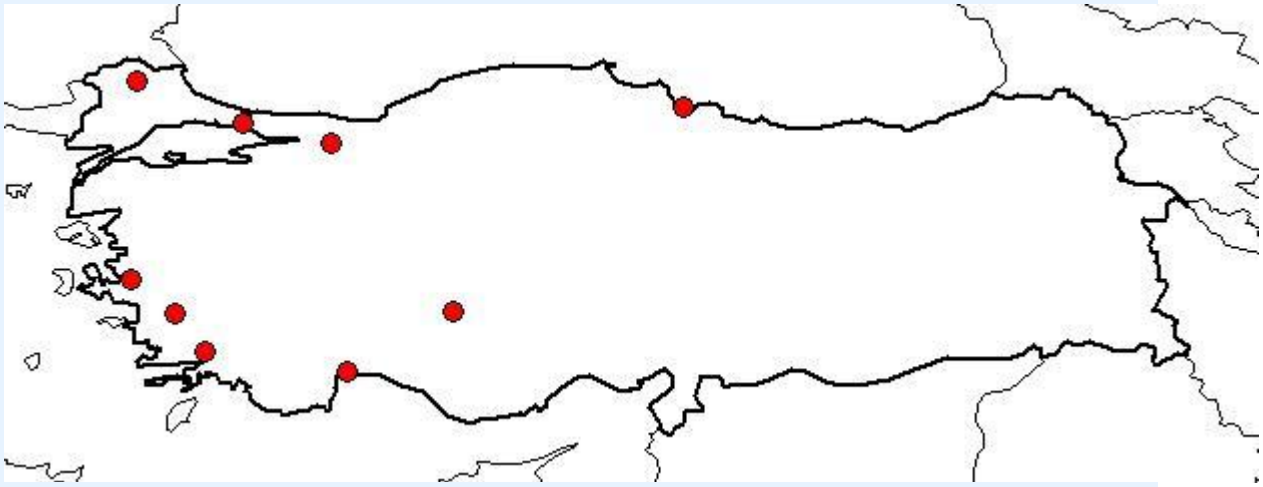
*Parentucellia latifolia* bitkisinin taksonomik sınıflandırılması Şekil 2.3'de, türe ait genel bilgiler Tablo 2.4'de ve bitki türünün Türkiye coğrafyasındaki dağılımı Şekil 2.4'te gösterilmiştir.

**Tablo 2.3: *Parentucellia* bitkisinin taksonomik sınıflandırılması** (Anonim 1)

| **Taksonomik Hiyerarşi** |
|---|
| Kingdom *Plantae* |
| Subkingdom *Tracheobionta* |
| Division *Magnoliophyta* |
| Class *Magnoliopsida* |
| Subclass *Asteridae* |
| Order *Scrophulariales* |
| Family *Scrophulariaceae* |
| Genus *Parentucellia* |
| Species *Parentucellia latifolia* (L.) CARUEL |

**Tablo 2.4: Türe ait genel bilgiler** (Anonim 1)

| **Genel Tür Bilgileri** | |
|---|---|
| **Ömür** | : Tek yıllık |
| **Yapı** | : Ot |
| **Hayat Formu** | : Terofit |
| **Çiçeklenme** | : 4-6 |
| **Habitat** | : Kayalık kireçtaşı ve volkanik yamaçlar, çimenlik, ormanlar, tahıl tarlası |
| **Yükseklik** | : 0-1400 |
| **Endemik** | : Endemik değil |
| **Element** | : Akdeniz |
| **Türkiye dağılımı** | : Trakya, Dış Anadolu |
| **Genel Dağılımı** | : Kuzey Batı Afrika, Güney Avrupa, Kıbrıs, Kafkasya, İran |



***Parentucellia* türünün dağılış gösterdiği iller;**

İSTANBUL, ANTALYA, AYDIN, İZMİR, KIRKLARELİ, KONYA, MUĞLA, SAKARYA, SAMSUN

**Şekil 2.3: Türe ait Türkiye coğrafyasındaki dağılım** (Anonim 1)

# 3. MATERYAL VE YÖNTEM

## 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bitki ekstresinin hazırlanmasında metanol (Merck 106008) kullanıldı. Bitki esktresinin çözülmesinde dimetilsülfoksit (DMSO, Sigma D8418) kullanıldı.

Ekstrenin total fenolik bileşiklerinin miktar tayininde sodyum karbonat ($Na_2CO_3$; Merck 106398) ve Folin Ciocalteu ayıracı (Sigma-Aldrich F9252) kullanıldı. Standart eğri elde edilmesinde gallik asid (3,4,5-hidroksibenzoik asid; Sigma G7384) kullanıldı.

Ekstrenin total flavonoid miktar tayininde, sodyum nitrit ($NaNO_2$; Merck 106544), aluminyum klorür ($AlCl_3.6H_2O$; Merck 101083), sodyum hidroksit (NaOH; Merck 106462) ve standart eğri elde edilmesinde kateşin (Fluka 22110) kullanıldı.

Ekstrenin DPPH$^{\bullet}$ giderme aktivitesi tayininde 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH; Sigma D9132) ve metanol (Merck 106008) kullanıldı. Pozitif kontrol olarak kersetin (3,3',4'-5,6-pentahidroksiflavon; Fluka 83370), kersetinin çözülmesi için de absolü etanol (Riedel 32221) kullanıldı.

## 3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Buzdolabı (Arçelik)

Değirmen (IKA)

Derin dondurucu (-20$^{o}$C) (Bosch)

Distile su cihazı (Elga)

ELISA mikro-plaka okuyucu (EonBiotek)

Etüv (Heraeus)

Otomatik pipetler (Eppendorf)

Rotaevaporatör (BUCHI R 210)

Soxhlet aparatı

Ultrasonik banyo (Elma S 10)

Vorteks (Velpscientifica)

### 3.3. Bitki Materyali

Çalışmamızda kullanılan *Parentucellia latifolia* (L.) Caruel subsp. *latifolia* ve *Parentucellia latifolia* (L.) Carvel subsp. *albiflora* türleri 2014 yılında Bilecik ilinden İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. Mine Koçyiğit tarafından toplandı ve teşhis edildi (Şekil 3.1). Teşhis edilen bitki örnekleri İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu (ISTE)'na kayıtlıdır.



**Şekil 3.1: *Parentucellia latifolia* subsp. *latifolia***

### 3.4. Kullanılan Yöntemler

#### 3.4.1. Metanol Ekstresinin Hazırlanması

Kurutulmuş *Parentucellia* türleri değirmenden geçirilerek toz haline getirildi. 20 g toz bitki yaklaşık 150 mL metanol ile Soxhlet ekstraktörünün sifon kolundaki çözücü renksiz oluncaya kadar yaklaşık 10 saat reflüks edildi. Elde edilen karışımlar rota evaporatöre konularak methanol ekstrelerden uzaklaştırıldı (Şekil 3.2 ve 3.3). Elde edilen ekstreler daha sonra kullanılmak üzere ufak cam kaplara konularak içersindeki methanol tamamen uçurulduktan sonra -20°C'de saklandı (Hasbal ve diğ., 2015).

*Parentucellia latifolia* subsp. *latifolia* türünden 4,13 g, *Parentucellia latifolia* subsp. *albiflora* türünden ise 3,54 g ekstre elde edildi.



**Şekil 3.2: Soxhlet ekstraksiyonu** (Anonim 2)



**Şekil 3.3: Rota evaporatör ile metanolün uzaklaştırılması**

### 3.4.2. Antioksidan Aktivite Deneyleri

#### 3.4.2.1. Total Fenolik Bileşik Miktarı Tayini

*Parentucellia* türlerinden elde edilen metanol ekstrelerinin total fenolik bileşik miktarı Slinkard ve Singleton (1977)'un metodunda bazı değişiklikler yapılarak, Folin-Ciocalteu ayıracı ile kolorimetrik olarak tayin edildi (Hasbal ve diğ., 2017).

**Kullanılan Çözeltiler**

- % 2'lik $Na_2CO_3$: 2 g $Na_2CO_3$distile su ile çözülüp 100 mL'ye tamamlandı.

**Deneyin Yapılışı**

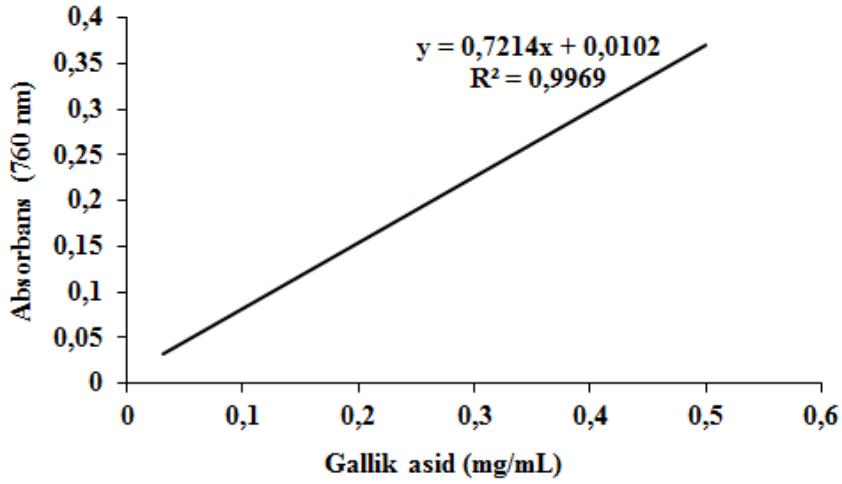
Eppendorf tüplerine tartılan metanol ekstreleri 40 mg/mL olacak şekilde DMSO ile ultrasonik banyoda 20 saniye tutularak çözüldü. DMSO ile uygun oranlarda seyreltilerek elde edilen çözeltilere deney uygulandı.

Kuyucuklara 5 µL ekstre/gallik asid konularak üzerine 225 µL distile su ilave edildi. 5 µL 2 N Folin-Ciocalteu ayıracı eklendi ve 3 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kuyucuklara 15 µL %2'lik $Na_2CO_3$ çözeltisinden ilave edildi. Mikro-plaka 2 saat karanlıkta bekletildikten sonra meydana gelen mavi rengin absorbansı, distile su içeren köre karşı, 760 nm'de ELISA mikro-plaka okuyucuda ölçüldü.

Sonuçlar gallik asid standart eğri denklemi kullanılarak "mg gallik asid ekivalanları/g ekstre" olarak ifade edildi. Deneyler 3 kez tekrarlandı. Elde edilen sonuçların aritmetik ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı.

#### 3.4.2.2. GallikAsid Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi

Gallik asid standart eğri denkleminin elde edilmesi için önce gallik asidin 5 mg/mL'lik stok çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltinin distile su ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,0625 mg/mL ve 0,03125 mg/mL olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere Folin-Ciocalteau deneyi uygulandı. Deney 10 kez tekrarlandı ve bulunan değerlerin aritmetik ortalamaları alındı ve gallik asid standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi (Şekil 3.4).




**Şekil 3.4: Gallik asid standart eğrisi ve regresyon denklemi**

### 3.4.2.3. Total Flavonoid Miktar Tayini

*Parentucellia* türlerinden elde edilen methanol ekstrelerinin total flavonoid miktarları Kim ve arkadaşları (2003) tarafından tanımlanan alüminyum klorür kolorimetrik ölçümde bazı değişiklikler yapılarak tayin edildi (Hasbal ve diğ., 2017).

**Kullanılan Çözeltiler**

- % 5'lik $NaNO_2$: 5 g $NaNO_2$ distile su ile çözülerek hacim 100 mL'ye tamamlandı.
- % 10'luk $AlCl_3$: 10 g $AlCl_3$ distile su ile çözülerek hacim 100 mL'ye tamamlandı.
- 1 M NaOH: 4 g NaOH distile su ile çözülerek hacim 100 mL'ye tamamlandı.

**Deneyin Yapılışı**

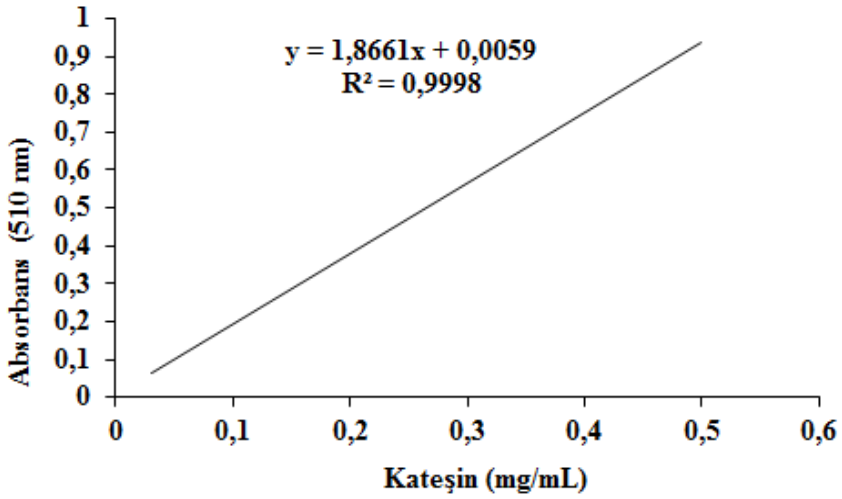
Eppendorf tüplerine tartılan metanol ekstresi 40 mg/mL olacak şekilde DMSO ile ultrasonik banyoda 20 saniye tutularak çözüldü. DMSO ile seyreltilen çözeltilerle deney yapıldı.

Kuyucuklara 25 µL ekstre/kateşin konularak üzerine 125 µL distile su eklendi. 7,5 µL % 5'lik $NaNO_2$ ilave edildikten 6 dakika sonra 15 µL %10'luk $AlCl_3$ ilave edildi. Karışım 5 dakika inkübe edildikten sonra kuyucuklara 50 µL 1 M NaOH ve 27,5 µL distile su ilave edildi. Oluşan rengin absorbansı 510 nm'de ayıraç körüne (distile su) karşı ölçüldü.

Sonuçlar kateşin standart eğri denklemi kullanılarak "mg kateşin ekivalanları/g ekstre" olarak ifade edildi. Deneyler 3 kez tekrarlandı ve aritmetik ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı.

### 3.4.2.4. Kateşin Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi

Kateşinin 2,5 mg/mL'lik stok çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltinin distile su ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,0625 mg/mL ve 0,03125 mg/mL olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere alüminyum klorür metodu uygulandı. Deney 5 kez tekrarlandı. Elde edilen sonuçların aritmetik ortalamaları alındı ve bu değerlerden kateşin standart eğrisi çizilerek regresyon denklemi elde edildi (Şekil 3.5).




**Şekil 3.5: Kateşin standart eğrisi ve regresyon denklemi**

### 3.4.3. DPPH Radikal (DPPH•) Giderme Aktivitesi Tayini

*Parentucellia* türlerinden elde edilen methanol ekstrelerinin DPPH• giderme aktiviteleri Brand-Williams ve diğerleri (1995) tarafından geliştirilen metotta bazı değişiklikler yapılarak tayin edildi (Hasbal ve diğ., 2015).

**Kullanılan Çözeltiler**

- 1 mM DPPH• Stok Çözeltisi: 0,0059 g DPPH• metanolde çözüldü. Hacim 15 mL'ye metanol ile tamamlandı.

- 0,1 mM DPPH• Çalışma Çözeltisi: 1 mM DPPH• stok çözeltisi 10 kez seyreltilerek çalışma çözeltisi elde edildi.
- 5 mg/mL Kersetin Stok Çözeltisi: 0,005 g kersetin tartılarak 1 mL absolu etanolde çözüldü.

**Deneyin Yapılışı**

Eppendorf tüplerine tartılan metanol ekstresi 40 mg/mL olacak şekilde DMSO ile ultrasonik banyoda 20 saniye tutularak çözüldü. Ekstreler seyreltilerek farklı ekstre konsantrasyonlarına deney uygulandı.

10 µL ekstre üzerine 240 µL 0,1 mM DPPH• çalışma çözeltisi eklenerek karıştırıldıktan sonra 30 dakika karanlıkta bekletildi. Absorbanslar ELISA mikro-plaka okuyucuda 517 nm'de köre (metanol) karşı okundu. Pozitif kontrolde ekstrenin yerine standart olarak kersetin, negatif kontrolde ise çözücü kullanıldı. Deney üç kez tekrarlandı ve sonuçların aritmetik ortalamaları alındı. DPPH• giderme aktivitesi % inhibisyon olarak aşağıdaki denkleme göre hesaplandı.

$$\text{DPPH radikal giderme aktivitesi (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Ekstrenin 517 nm'deki absorbansı}}{\text{Kontrolün 517 nm'deki absorbansı}}\right) \times 100$$

Hesaplanan % inhibisyon değerlerinden $EC_{50}$ (%50 DPPH• giderilmesini sağlayan ekstre veya standart konsantrasyonu) değerleri Microsoft Office Excel Programı kullanılarak hesaplandı. $EC_{50}$ değerlerini hesaplamak için absise örnek konsantrasyonu, ordinata % DPPH• giderme aktivitesi verilerinin uygulanması ile çizilen lineer eğrinin regresyon denklemi elde edildi.

### 3.5. İstatiksel Değerlendirme

Yapılan deneyler üçer kez tekrarlandı ve elde edilen veriler ortalama ± standart sapma olarak verildi. Test edilen maddelerin arasındaki farkın istatistiksel olarak değerlendirilmesinde, Microsoft Office Excel Programı kullanılarak, Student's t testinden yararlanıldı. Anlamlılık sınırı olarak $p < 0,05$ kabul edildi.

# 4. BULGULAR

Bu çalışmada *Parentucellia latifolia* türünün iki alt türü kullanılarak elde edilen metanol ekstrelerinin total fenolik bileşik miktarları, total flavonoid bileşik miktarları ve DPPH$^{\bullet}$ giderici etkileri ölçülerek antioksidan aktivitesi incelenmiştir.

## 4.1. Ekstrelerin Total Fenolik ve Flavonoid Bileşik Miktarları

Metanol ekstrelerinin total fenolik bileşik miktarları, "mg gallik asid ekivalanları/g ekstre" olarak ve total flavonoid bileşik miktarları "mg kateşin ekivalanları/g ekstre" olarak hesaplandı. Sonuçlar Tablo 4.1 ve Şekil 4.1'de gösterildi.

**Tablo 4.1: Ekstrelerin total fenolik ve flavonoid bileşik miktarları**

| | **Total Fenol (mg GAE/g)** | **Total Flavonoid (mg CE/g)** |
|---|---|---|
| ***P. latifolia* subsp. *latifolia*** | $35,60 \pm 1,92^{a}$ | $24,84 \pm 0,64^{a}$ |
| ***P. latifolia* subsp. *albiflora*** | $39,17 \pm 1,90^{a}$ | $29,52 \pm 0,55^{b}$ |

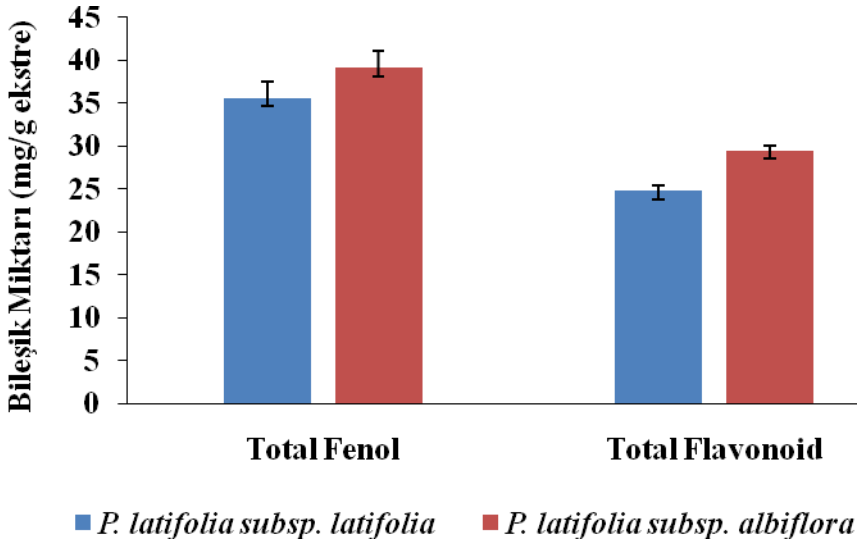
Veriler ortalama ± standart sapma olarak verildi.

Aynı sütun içindeki farklı harfler verilerin anlamlı olarak farklı olduklarını göstermektedir ($p < 0,05$).

GAE: gallik asid ekivalanları

CE: kateşin ekivalanları

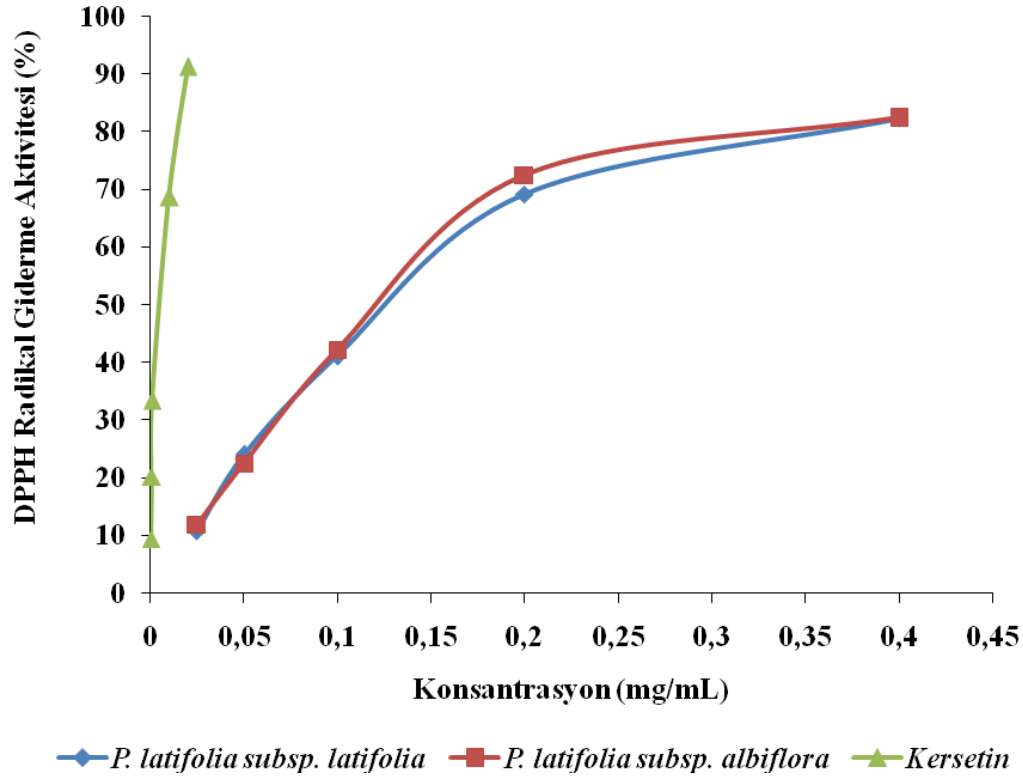
Sonuçlar incelendiğinde, iki ekstrenin birbirine benzer miktarda total fenolik miktarına sahip olduğu görüldü ($p > 0,05$, Tablo 4.1, Şekil 4.1). Bununla birlikte, *P. latifolia* subsp. *albiflora* türünden elde edilen metanol ekstresinin total flavonoid bileşik miktarları bakımından *P. latifolia* subsp. *latifolia* metanol ekstresine göre daha zengin olduğu bulundu ($p < 0,05$).




**Şekil 4.1: Ekstrelerin total fenolik ve flavonoid bileşik miktarları**

### 4.2. Ekstrelerin DPPH Radikal (DPPH•) Giderme Aktivitesi

Metanol ekstrelerinin konsantrasyona bağlı DPPH• giderme aktiviteleri % olarak Şekil 4.2'de gösterildi.




**Şekil 4.2: Ekstrelerin ve pozitif kontrolün DPPH• giderme aktiviteleri**

Elde edilen yüzde inhbisyon değerlerinden $EC_{50\ DPPH}$ değerleri hesaplandı (Tablo 4.2).

**Tablo 4.2: Ekstrelerin ve pozitif kontrolün DPPH• giderme aktiviteleri**

| | **$EC_{50\ DPPH}$ (mg/mL)** |
|---|---|
| ***P. latifolia* subsp. *latifolia*** | 0,1368 ± 0,0012[a] |
| ***P. latifolia* subsp. *albiflora*** | 0,1310 ± 0,0042[a] |
| **Kersetin** | 0,0062 ± 0,0001[b] |

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verildi.

Aynı sütun içindeki farklı harfler verilerin anlamlı olarak farklı olduklarını göstermektedir ($p < 0,05$).

$EC_{50\ DPPH}$: %50 DPPH• giderilmesini sağlayan ekstre veya standart konsantrasyonu

$EC_{50\ DPPH}$ değerleri hesaplanırken ekstrelerin/standardın deney ortamındaki final konsantrasyonu kullanılmıştır.

Düşük $EC_{50}$ değerinin yüksek antioksidan aktiviteyi gösterdiği göz önünde bulundurularak, ekstrelerin benzer etkide DPPH• giderici antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulundu ($p > 0,05$). Sonuçlar kontrol ile karşılaştırıldığında ise, ekstrelerin kersestinden daha düşük $EC_{50\ DPPH}$ değerlerine sahip oldukları görüldü ($p < 0,05$).

# 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, *Parentucellia latifolia* subsp. *latifolia* ve *Parentucellia latifolia* subsp. *albiflora* türlerinden metanol ekstreleri hazırlanarak ekstrelerin total fenolik ve total flavonoid bileşik miktarları ve DPPH• giderme aktiviteleri belirlenerek bitki türlerinin antioksidan aktiviteleri incelenmiştir.

Llorent-Martínez ve diğ., (2019) yaptıkları çalışmada, Konya'dan topladıkları *Parentucellia latifolia* (L.) Caruel subsp. *latifolia* türünün antioksidan aktivitesini ve fitokimyasal içeriğini incelemişlerdir. Bu sebeple, maserasyon yöntemi ile metanol, etil asetat ve su ekstreleri hazırlanmıştır. Bu ekstrelerin total fenolik ve flavonoid bileşikleri ve ayrıca DPPH• giderici aktiviteleri belirlenmiştir. Yapılan çalışmanın sonuçları incelendiğinde, su ekstresinin (25,07 mg GAE/g) en yüksek total fenolik içerik miktarına sahip olduğu bulunmuştur. Metanol ekstresinin total fenolik miktarı 22,63 mg GAE/g, etil asetat ekstresinin total fenolik bileşik miktarının ise 20,47 mg GAE/g olduğu bildirilmiştir. Metanol ekstresinin total fenolik bileşik miktarı bizim çalışmamızın sonuçları (35,60 ± 1,92 mg GAE/g) ile karşılaştırıldığında, bizim sonuçlarımızın daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu farklılık ekstraksiyon yöntemlerinin farklı olması ile açıklanabilir. Bitkinin içeriğindeki fenolik maddelerden zengin bir ekstre hazırlamak için, maserasyon yöntemi yerine Soxhlet aparatı ile yapılan sürekli ekstraksiyon yönteminin seçilmesinin daha uygun olduğu kanısına varılabilir.

Yapılan çalışmada, bizim çalışmamızdan farklı olarak total flavonoid bileşik miktarları, rutin ekivalanı olarak (44,15 mg RE/g) ifade edilmiştir ve üç ekstre arasında, metanol ekstresinin en yüksek total flavonoid bileşik miktarına sahip olduğu bildirilmiştir. Bizim sonuçlarımız kateşin ekivalanı (24,84 ± 0,64 CE/g) olarak ifade edildiği için tam bir karşılaştırma yapılamamıştır. DPPH• giderici aktivite ise bizim çalışmamızdan farklı olarak, troloks ekivalanı (mg TE/g ekstre) olarak ifade edilmiştir ve ekstreler DPPH• giderici aktivite bakımından su ekstresi (37,80 mg TE/g) > metanol ekstresi (33,71 mg TE/g) > etil asetat ekstresi (2,50 mg TE/g) olarak sıralanmıştır. Bizim çalışmamızda DPPH• giderici aktivite $EC_{50}$ değeri olarak ifade edildiğinden sonuçlar tam olarak karşılaştırılamamıştır.

Sonuç olarak, bu çalışmada yapılan *in vitro* deneyler ile *Parentucellia latifolia*'nın iki alt türünün birbirine benzer miktarda total fenolik/flavonoid bileşik madde içerdiği ve antioksidan aktiviteye sahip oldukları gösterildi. Yapılacak ileri analizler ile bitki türünün oksidatif strese karşı koruyucu bir antioksidan olarak kullanılabileceği sonucuna varıldı.

## EKLER

**Şekil 2.1**: Oksidatif denge (Özcan ve diğ., 2015)

**Şekil 2.2**: *Parentucellia latifolia* subsp. *Latifolia*

**Şekil 2.3** :Türe ait Türkiye coğrafyasındaki dağılım

**Şekil 3.1:** *Parentucellia latifolia* subsp. *Latifolia*

**Şekil 0.1:** Soxhlet ekstraksiyonu

**Şekil 3.3:** Rota evaporatör ile metanolün uzaklaştırılması

**Şekil 3.4:** Gallik asid standart eğrisi ve regresyon denklemi

**Şekil 3.5:** Kateşin standart eğrisi ve regresyon denklemi.

**Şekil 4.1:** Ekstrelerin total fenolik ve flavonoid bileşik miktarları

**Şekil 4.2:** Ekstrelerin ve pozitif kontrolün DPPH• giderme aktiviteleri

**Tablo 2.1:** Ekzojen antioksidanlar

**Tablo 2.2:** Endojen antioksidanlar

**Tablo 2.3:** *Parentucellia* bitkisinin taksonomik sınıflandırılması

**Tablo 2.4** : Türe ait genel bilgiler

**Tablo 4.1:** Ekstrelerin total fenolik ve flavonoid bileşik miktarları

**Tablo 4.2:** Ekstrelerin ve pozitif kontrolün DPPH• giderme aktiviteleri

## KAYNAKLAR


ALTINER, A., 2018, Serbest radikaller ve stres ile ilişkisi. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 7(1), 51-55

Anonim 1: TÜBİVES, Türkiye Bitkileri Veri Servisi, 2012, http://194.27.225.161/yasin/tubives/index.php?sayfa=1&tax_id=7314, [Erişim tarihi: 17.02.2020].

Anonim 2: Soxhlet Extractor, Fruit extraction is in progress, https://en.wikipedia.org/wiki/File:Soxhlet_Extractor.jpg, [Erişim tarihi: 22.04.2020].

BECKMAN K.B. ve AMES B.N., 1998, The free radical theory of aging matures, *Physiological Reviews*, 78(2):547-81.

BIANCO, A., PASSACANTILLI, P., RIGHI, G., NICOLETTI, M., 1985, Iridoid glucosides from *Parentucellia viscosa*. *Phytochemistry*, 24(8), 1843-1845.

BUSHWAY A.A., HU, W., SCHUPP, J. R., WORK, T., & KOLLER, S. I., 2002, Quality characteristics of five disease-resistant apple cultivars. *Journal of the American Pomological Society*, 56(2), 94-105.

ÇAYLAK, E., 2011, Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi, 9*(1), 73-83.

ÇETİN, E., ÇETİN, N., KÜÇÜK, O., Toklularda karayolu ile taşımanın oksidan-antioksidan sistem üzerine etkisi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi.* 2011; 6(2), 109-103.

FUHRMAN B., BUCH S., VAYA J., BELINKY P.A., COLEMAN R., HAYEK T., AVIRAM M., 1997, Licorice extract and its major polyphenol glabridin protect low-density lipoprotein against lipid peroxidation: *in vitro* and *ex vivo* studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *The American Journal of Clinical Nutricion*, 66(2), 267-75.

KARABULUT, H. ve GÜLAY, M.Ş., 2016, Antioksidanlar, *Mehmet Akif Ersoy University Journal of Health Sciences Institute*, 1, 1, 65-76.

LLORENT-MARTÍNEZ E.J., FERNÁNDEZ-DE CÓRDOVA M.L., ZENGIN G., BAHADORI M.B., AUMEERUDDY M.Z., RENGASAMY K.R., FAWZI MAHOMOODALLY M., 2018, *Parentucellia latifolia* subsp. *latifolia*: A potential source for loganin iridoids by HPLC-ESI-MSn technique. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 165, 374-380

MCCORMICK M., DENNING G.M., RESZKA G.M., 2000, Biological effects of menadione photochemistry. *Biochemical Journal*, 350, 797-804.

MILLER, J.K., BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E. VE MADSEN, F.C., 1993, Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *Journal Dairy Science*, 76, 9, 2812-2823.

ÖZCAN, O., ERDAL, H., ÇAKIRCA, G., YÖNDEN, Z., 2015, Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, *6*(3), 331-336

SIES H., 1991, Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*, 30, 31S-38S.

URONES, J. G., MARCOS, I. S., CUBILLO, I., GARRIDO, N. M., BASABE, P., 1990, Terpenoid compounds from *Parentucellia latifolia*. *Phytochemistry*, 29(7), 2223-2228.

URONES, J. G., MARCOS, I. S., CUBILLO, L., MONJE, V. A., HERNÁNDEZ, J. M., BASABE, P. 1989, Derivatives of malonic acid in *Parentucellia latifolia*. *Phytochemistry*, 28(2), 651-653.

YILDIRMAK T., 1998, İnfeksiyon hastalıklarında oksidatif stres ve antioksidan tedavi, *Flora Dergisi*, 3(4), 224-234

# ÖZGEÇMİŞ

**Kişisel Bilgiler**

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Adı** | Fatih İbrahim | **Soyadı** | Güney |
| **Doğum Yeri** | Artvin | **Doğum Tarihi** | 27.02.1994 |
| **Uyruğu** | Türkiye Cumhuriyeti | **TC. Kimlik No.** | 24742244256 |
| **E-mail** | fthgny0894@gmail.com | **Tel.** | +90 530 959 6721 |

**Eğitim Düzeyi**

| | **Mezun Olduğu Kurumun Adı** | **Mez. Yılı** |
|---|---|---|
| **Lise** | Artvin Fen Lisesi | 2012 |

**Yabancı Dil**

| | **Okuduğunu Anlama*** | **Konuşma*** | **Yazma*** | **YDS puanı** | **(Diğer) Puan** |
|---|---|---|---|---|---|
| **İngilizce** | Orta | Orta | Orta | | |

***Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin.

**Bilgisayar Bilgisi**

| **Program** | **Kullanma becerisi** |
|---|---|
| Microsoft Office | İyi |
| Adobe | İyi |

**Özel İlgi Alanları (Hobileri):** Futbol, Basketbol, Yüzme