

**BAZI *HYPERICUM* TÜRLERİNİN FENOLİK BİLEŞİMİ İLE
ANTIÖKSİDAN VE SERBEST RADİKAL SÜPÜRÜCÜ ETKİLERİ**

**Sevda İBADOVA
Yüksek Lisans Tezi**

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakoloji Anabilim Dalı
Temmuz - 2006**

**Bu Tez Çalışması Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.
Proje No: 30353**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Sevda İBADOVA'nın Bazı *Hypericum* Türlerinin Fenolik Bileşimi ile Antioksidan ve Serbest Radikal Süpürücü Etkileri başlıklı Farmakoloji Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 17 Temmuz 2006 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı): Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK
Üye : Prof. Dr. Nuray YILDIZOĞLU-ARI
Üye : Yrd. Doç. Dr. Nilgün ÖZTÜRK

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI *HYPERICUM* TÜRLERİNİN FENOLİK BİLEŞİMİ İLE ANTIOKSİDAN VE SERBEST RADİKAL SÜPÜRÜCÜ ETKİLERİ

SEVDA İBADOVA

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK

2006

Hypericum origanifolium Willd., *Hypericum montbretii* Spach. ve *H. perforatum* L.'un kurutulmuş çiçek ve yapraklarından farklı polaritede çözücüler kullanılarak hazırlanan ekstrelerinde çeşitli kimyasal ve spektroskopik yöntemlerle fenolik madde içeriği ile serbest radikal süpürücü ve antioksidan potansiyelleri değerlendirilmiştir. Ekstrelerin toplam fenol konsantrasyonu Folin-Ciocalteu yöntemi ile standart olarak gallik asit, flavonoid ve flavonol miktarları ise $AlCl_3$ ve $AlCl_3+Na$ -asetat ile standart olarak rutin kullanılarak değerlendirilmiştir. Ekstrelerin antioksidan potansiyali β -karoten-linoleik asit sistemi ve Ransimat yöntemi ile tayin edilmiştir. Serbest radikal süpürücü etkileri ise 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikali (DPPH^{*}) üzerinden belirlenmiştir. Sonuçlar sentetik antioksidan BHT'nin sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak her 3 tür içinde en yüksek aktivite değerleri etilasetat ekstrelerinde tayin edilmiştir. Yapılan deneysel çalışmalarda türlerin yapraklarının çiçeklere oranla daha fazla fenolik madde içerdiği ve dolayısıyla antioksidan potansiyellerinin daha fazla olduğu tesbit edilmiştir. *H. origanifolium*'un çiçek ve yapraklarının daha fazla fenolik madde içerdiği ve Ransimat yöntemi ile tayin edilen lipid peroksidasyonunu diğer türlere ve sentetik antioksidan BHT'ye oranla daha fazla inhibe ettiği tesbit edilmiştir. *H. montbretii* ve *H. origanifolium*'un çiçek ekstreleri β -karoten-linoleik asit sisteminde sentetik antioksidan BHT ve *H. perforatum* ekstrelerinden daha aktif bulunmuştur. Ayrıca, *H. montbretii* ve *H. perforatum* yapraklarının antiradikal potansiyellerinin BHT'den belirgin oranda fazla olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Hypericum origanifolium*, *Hypericum montbretii*, *Hypericum perforatum*, Antioksidan Aktivite, Radikal Süpürücü Etki

ABSTRACT

Master of Science Thesis

THE PHENOLIC CONTENT AND ANTIOXIDANT AND FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF SOME *HYPERICUM* SPECIES

SEVDA İBADOVA

Anadolu University

Graduate School of Health Sciences

Pharmacology Program

Supervisor: Prof. Yusuf ÖZTÜRK

2006

The total phenolic content, antioxidant and free radical scavenging potentials of extracts of dried flowers and leaves of *H. montbretii*, *H. organifolium* and *H. perforatum* and their fractions were evaluated by different chemical and spectrophotometric methods. The total phenolic concentration was analyzed by the Folin-Ciocalteu method using gallic acid as a standart; also flavonoid and flavonol content was investigated by $AlCl_3$ and $AlCl_3+Na$ -acetate using rutin as a standart. The antioxidant potential of extracts was evaluated by β -carotene-linoleic acid system and Rancimat method. For the free radical scavenging capacity 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH^{*}) method was used. The results were compared to the results of the synthetic antioxidant BHT. The highest activity was determined with all ethyl acetate extracts and it was observed that leaves of the studied species contain more phenolic compounds than the flowers, as well as the antioxidant capacity. It was determined that the flowers and leaves of *H. organifolium* contain high amount of phenolic compounds, consequently show the most lipid peroxidation activity on Rancimat method than the synthetic antioxidant BHT. The flower extracts of *H. montbretii* and *H. organifolium* exhibit higher activity on β -carotene-linoleic acid system than synthetic BHT. Also, the leaves of *H. montbretii* and *H. perforatum* demonstrated better anti-radical activity than BHT.

Keywords: *Hypericum organifolium*, *Hypericum montbretii*, *Hypericum perforatum*, Antioxidant activity, Radical Scavenging Activity

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın her aşamasında değerli bilgi ve önerileriyle beni yönlendiren, hiçbir konuda desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız, sayın hocam Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK'e,

Çalışmalarımın her aşamasında değerli bilgi ve önerileriyle desteğini esirgemeyen ve çalışmamın yönlendirilmesine çok önemli katkılar sağlayan Farmakognozi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi hocam Yrd. Doç. Dr. Nilgün ÖZTÜRK'e,

Çalışmalarım için bitkisel materyali sağlayan Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Dr. İsmühan POTOĞLU-ERKARA'ya,

Çalışmamızı gerçekleştirmemizde laboratuvar imkanlarını bize sunan AÜBİBAM yönetimine,

Maddi ve manevi destekleri ile hayatımın tüm aşamalarında yanımda olan aileme, özellikle Farmakognozi Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi nişanlım Emil Civişov'a,

Sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Antioksidanlar	3
1.1.1. Antioksidan tipleri ve etki mekanizmaları	4
1.1.2. Sentetik fenolik antioksidanlar	6
1.1.3. Doğal antioksidanlar	9
1.1.3.1. Flavonoidler	10
1.1.3.1. Fenolik asitler	12
1.2. Antioksidan Aktivitenin Değerlendirilmesi	14
1.2.1. Tayin yöntemleri	15
1.2.1.1. Lipid peroksidasyonu inhibisyonuna dayalı yöntemler	15
i) Peroksit sayısı	15
ii) Schaal fırın testi	15
iii) Tiyobarbitürik asit testi (TBARS)	15
iv) β -karoten-linoleik asit sistemi	16
v) Ransimat yöntemi	16
1.2.1.2. Serbest radikal süpürücü etkiye dayalı yöntemler	16
i) Toplam Antioksidan Kapasite	

	Ölçümü (TEAC)	16
ii)	DPPH• radikal süpürücü etki	17
iii)	Toplam radikal-trapping parametre (TRAP)	17
iv)	ABTS ⁺ radikal katyon renksizleştirme yöntemi	17
v)	Oksijen Radikali Absorpsiyonu Yeteneği yöntemi (ORAC)	18
vi)	Süperoksit anyon süpürücü aktivite testi (FRAP)	18
vii)	Elektron Spin Rezonans Spektroskopisi (ESR)	18
1.3.	Tez kapsamında Kullanılan <i>Hypericum</i> Türleri	19
1.3.1.	<i>Hypericum perforatum</i> (St. John's wort)	19
1.3.2.	<i>Hypericum montbretii</i> Spach.	20
1.3.3.	<i>Hypericum origanifolium</i> Willd.	21
2.	MATERYAL ve YÖNTEM	23
2.1.	Materyal	23
2.1.1.	Bitkisel materyal	23
2.1.2.	Kimyasal madde ve çözeltiler	23
2.1.3.	Kullanılan cihazlar	23
2.1.4.	Kullanılan malzemeler	24
2.2.	Yöntem	24
2.2.1.	Ekstrelerin hazırlanması	24
2.2.2.	Toplam fenolik madde miktar tayini	25
2.2.3.	Flavonoid miktar tayini	25
2.2.4.	Flavonol miktar tayini	26
2.2.5.	DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki	26
2.2.6.	β -karoten-linoleik asit sisteminde antioksidan aktivite tayini	27
2.2.7.	Ransimat yöntemi ile lipid peroksidasyonunu inhibe edici etki	28

3. BULGULAR	30
3.1. Ekstrelerin Fenolik Madde İçeriği	30
3.2. DPPH Üzerinden Serbest Radikal Süpürücü Etki Tayini	33
3.3. β -karoten-linoleik Asit Sisteminde Antioksidan Aktivite Tayini.....	35
3.4. Ransimat Yöntemi ile Lipid Peroksidasyonunu İnhibe Edici Etki	38
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	41
5. KAYNAKLAR	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

3.1. <i>Hypericum</i> türlerinden elde edilen ekstrelerin 3 farklı konsantrasyonda serbest radikal süpürücü etkileri	35
3.2. β -karoten-linoleik asit sisteminde <i>Hypericum</i> türlerine ait ekstrelerin antioksidan aktiviteleri	36
3.3. Ransimat yöntemi ile zeytin yağının peroksidasyonu üzerine <i>Hypericum</i> türlerinden elde edilen ekstrelerin etkisi	38

ÇİZELGELER DİZİNİ

3.1. <i>Hypericum</i> türlerinden elde edilen ekstrelerin kuru drog verimleri, toplam fenolik madde, flavonoid ve flavonol miktarları	31
3.2. <i>Hypericum</i> türlerinden elde edilen ekstrelerin DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki tayininde % İnhibisyon ve IC ₅₀ değerleri	34
3.3. <i>Hypericum</i> ekstrelerinin β-karoten-linoleik asit sisteminde antioksidan aktivite değerleri	37
3.4. %0.1 konsantrasyonda zeytin yağına ilave edilen <i>Hypericum</i> türlerine ait ekstrelerin Ransimat yöntemi ile ölçülen bozunma indisleri	39

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABAP	: 2,2-azobis-(2-amidinopropan)-hidroklorür
ABTS	2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) diammonyum tuzu
BHA	: Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	: Bütillenmiş hidroksitoluol
DG	: Dodesil gallat
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikali
EA	: Etil asetat ekstresi
Fe⁺³-TPTZ	: Demir tripidil-triazine kompleksi
FRAP	: Süperoksit anyon süpürücü aktivite testi
GSH	: Redükte glutatyon
ME	: Metanol ekstresi
HOC	: <i>H. origanifolium</i> çiçekleri
HOY	: <i>H. origanifolium</i> yaprakları
HMC	: <i>H. montbretii</i> çiçekleri
HMY	: <i>H. montbretii</i> yaprakları
HPC	: <i>H. perforatum</i> çiçekleri
HPY	: <i>H. perforatum</i> yaprakları
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein (Low Density Lipoprotein)
MDA	: Monoaldehitler
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (redükte)
ORAC	: Oksijen radikali absorpsiyonu yeteneği
PG	: Propil gallat

ROT	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksid dismutaz
SU	: Sulu ekstre
TEAC	: Toplam antioksidan kapasite
TBARS	: Tiyobarbitürik asit testi
TBHQ	: <i>ter</i> -bütilhidrokinon
TRAP	: Toplam radikal-trapping parametre
YBSK	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

1. GİRİŞ

Son yıllarda insanlar sağlıklı yaşam ve sağlıklı yaşlanma konularına büyük ilgi göstermektedirler. Buna paralel olarak da alınan gıdaların kalitesi ve gıdalara ilave edilen katkı maddeleri önem kazanmaya başlamıştır (Packer ve ark., 1999). Özellikle son yıllarda gerçekleştirilen biyomedikal araştırmalar, reaktif oksijen türlerinin (ROT) doku üzerindeki hasarları, etki mekanizması ve vücut savunma sistemleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu türler ilaçlar, ultraviole ışını, radyasyon ve çevre kirliliği gibi ekzojen kaynaklara maruz kalarak (Pryor, 1994), canlılarda kanser, şeker hastalığı, karaciğer yetmezliği, otoimmün hastalıklar, multiple skleroz, artrit ve yaşlanma gibi fizyopatolojik durumların oluşmasına neden olmaktadır (Tsao ve Deng, 2004; Halliwell, 2002). Hücreyel onarım sistemleri ve savunma mekanizmaları her zaman için oksidatif yıkım hedefidir (Beckman ve Ames, 1998). Bu nedenlerden dolayı günümüzde antioksidanlar önem kazanmaya başlamıştır.

Besin faktörlerinde bulunan antioksidanlar insan sağlığına faydalı olduğu gibi (Tsao ve Deng, 2004) gıda maddelerinin de raf ömrünü uzatarak ve oksidasyonu geciktirerek veya inhibe ederek besin değerlerindeki kaybı azaltmaktadırlar (Nishino, 1999; Frankel, 1999). Antioksidan madde içeren gıda tüketimi sonucu katarakt (Jacquez ve ark., 1994), kanser, kalp-damar ve serebrovasküler rahatsızlıklar gibi kronik hastalıkların oranında büyük ölçüde azalma görüldüğü saptanmıştır (Halliwell, 2002).

Besin maddelerinde en çok kullanılan sentetik antioksidanlar bütillenmiş hidroksianizol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluol (BHT), propil gallat (PG) ve tersiyer-bütillhidrokinon'dur (TBHQ) (Shahidi, 2000; Pinho ve ark., 2000; Wettasinghe ve Shahidi, 1999). Bu maddeler, serbest radikalleri nötralize ederek organizmayı hastalıklara karşı ve besin maddelerini ise bozulmaya karşı korumaktadırlar (Chung ve ark., 2005). Bu sentetik bileşikler toksik ve/veya mutajenik etkiler gösterdikleri için (Koleva ve ark., 2002) doğal antioksidanlarla kombine olarak kullanımları gittikçe daha çok yaygınlaşmaya başlamıştır (Wettasinghe ve Shahidi, 1999; Koleva ve ark., 2002). Bu nedenle günümüzde

bitkisel kaynaklı doğal antioksidanlar üzerindeki araştırmalar daha da önem kazanmıştır.

Birçok tayin yöntemi ile pekçok bitki ve doğal bileşiğin antioksidan aktivite gösterdikleri saptanmıştır. Özellikle bitkisel fenollerin primer antioksidan aktiviteye sahip oldukları görölmüştür (Rice-Evans ve ark., 1997; Shahidi, 2000).

Serbest radikal süpürücü etkiye sahip bitki ekstreleri hücre ve organları oksidatif hasara karşı korudukları için çok çalışılan konulardan biri olmuştur. Dünyada 400 türü bulunan Guttiferae (Hypericaceae) familyasının Türkiye’de 80 türü bulunmaktadır ve ölkemizde yetişen türler üzerinde çok az biyomedikal araştırma yapılabilmifitir. Buna karşın cinsin ofisinal türü olan *Hypericum perforatum*’un (St. John’s wort) belirgin oranda antioksidan etkiye sahip olduğu tesbit edilmiş ve bu nedenle birçok çalışmaya konu olmuştur (Mazza ve Oomah, 1998).

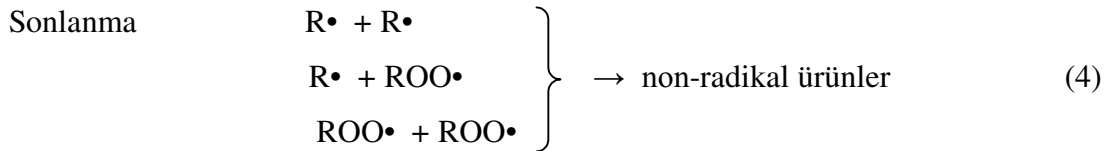
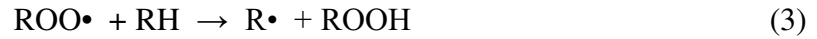
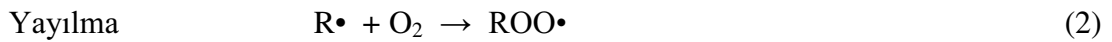
Bu çalışmada Eskişehir çevresinden toplanan iki *Hypericum* türünün (*H. montbretii* Spach., *H. origanifolium* Willd.) çiçek ve yapraklarının antioksidan ve serbest radikal süpürücü potansiyeli incelenerek ekstrelerin fenolik içerikleri spektroskopik yöntemler ile tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar cinsin ofisinal türü *Hypericum perforatum* ve sentetik antioksidan BHT’nin sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

1.1. Antioksidanlar

Lipid oksidasyonu, besin kalitesi bozulmasının başlıca nedenidir. Besinlerin kalitesi, rengi, tadı ve özelliklerini olumsuz etkileyen bazı değişimleri başlatmaktadır (Wettasinghe ve Shahidi, 1999; Sanchez-Moreno ve ark., 1998). Antioksidanlar, lipidlerin oksidatif bozulmasını önleyerek yada geciktirerek (Cao ve Prior, 2002) besin kalitesini koruyan veya oksidasyon boyunca besin maddesinin bozulmasını, küflenmesini ve renginin solmasını önleyen maddelerdir (Sanchez-Moreno ve ark., 1998).

Besinler için ideal bir antioksidan, renksiz, kokusuz ve tatsız olup, düşük konsantrasyonlarda etkili olmalıdır. Ayrıca ürüne eklenmesi kolay olup, işlem boyunca bozulmadan kalabilmeli ve ucuz olmalıdır (Antolovich ve ark., 2002).

Besinlerin oksidasyonu, genellikle yağların ışığa, ısıya, radyasyona, metal iyonları yada metal-protein katalizörlerine maruz kalma sonucu başlayan serbest radikal zincir reaksiyonları sonucu oluşmaktadır. Enzim lipojenaz da oksidasyonu başlatabilir (Shahidi ve Naczk, 1995). Oksidasyonun klasik yolu; başlangıç (lipid serbest radikallerinin üretimi), yayılma (çoğalma) ve sonlanma (non-radikal ürünlerinin prodüksiyonu) reaksiyonlarını içermektedir [reaksiyon (1)-(4)] (Bondet ve ark., 1997).



Prosesin başlamasına ısı, ışık, radyasyon ve metaller gibi dış faktörler sebep olmaktadır. Bu nedenle özellikle *in vivo* antioksidan aktivite ölçümlerinde serbest radikal oluşumu şekli göz önünde bulundurulmaktadır (Antolovich ve ark., 2002).

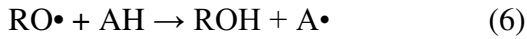
1.1.1. Antioksidan tipleri ve etki mekanizmaları:

Antioksidanlar etki şekillerine göre aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadırlar (Moure ve ark., 2001; Sanchez-Moreno ve ark., 1998):

- serbest radikal terminatörleri,
- metal iyonu şelatları
- kapalı sistemlerde oksijenle etkileşen oksijen süpürücüleri.

Böylece, birinci grup antioksidanlar, yüksek enerjili lipid radikalleri ile etkileşerek onları daha stabil termodinamik ürünlere çevirmeye çalışmaktadır. Önleyici antioksidanlar olarak da bilinen ikinci grup antioksidanlar, hiperoksidleri yıkarak zincir oluşumu hızını geciktirmektedir (Antolovich ve ark., 2002).

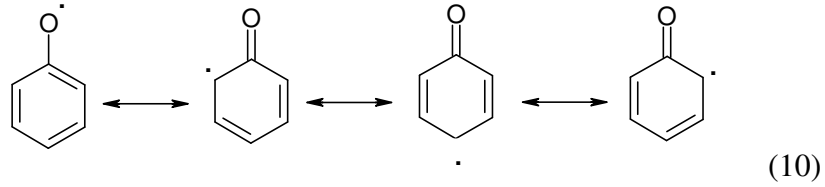
Antioksidanlar (AH), lipid radikallerine hızla hidrojen atomu vererek lipid oksidasyona etki etmektedirler [reaksiyon (5) ve (6)]. Sonraki reaksiyonlar ise zincir oluşumu (3) ve (9) reaksiyonları ile yarışmaktadır.



Bütün bu reaksiyonlar doğada ekzotermik olarak gerçekleşmektedir. Antioksidanların (AH) etkileri A-H bağı kuvvetinin azalmasıyla artmaktadır. Oluşan fenoksi radikal yeni serbest radikal reaksiyonunu başlatamamakta yada zincir reaksiyonu ile hızlı oksidasyona sebep olamamaktadır. Bu şartlar göz önüne alındığında, antioksidan aktivite için yapı olarak mükemmel hidrojen veya elektron donörü olan ve radikallerinin de rezonans delokalizasyonu boyunca nispeten daha sabit olup, moleküler oksijen saldırısına uygun bölgelere sahip olmayan en uygun kimyasal madde grubunun fenolik bileşikler olduğu görülmüştür (Antolovich ve ark., 2002).

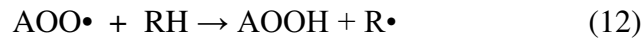
Fenolik antioksidanlar serbest radikal terminatörleri kategorisine girmekte ve serbest radikal süpürücü veya metal şelatörü gibi etki etmektedirler (Sanchez-Moreno ve ark., 1998).

Fenollerin lipid radikalleri ile reaksiyonu sonucu oluşan fenoksi radikalleri, aromatik halka etrafındaki tek elektronun delokalizasyonu ile stabilize edilmiştir [reaksiyon (10)].



Fenolün kendisi antioksidan olarak inaktiftir. *o*- ve *p*- konumlarında hidrojen atomlarının alkil grupları ile süstitüe olması hidroksil grubunun elektron yoğunluğunu arttırmakta ve böylece lipid radikaller üzerinde etkisi de artmaktadır. Metil grubu ile süstitüsyonuna oranla fenolik antioksidanların aktivitesi *p*-konumunda etil yada *n*-bütil grubu ile süstitüe olması ile daha çok artmaktadır (Shahidi ve Naczki, 1995).

Bütillenmiş hidroksitoluol (BHT) yada bütillenmiş hidroksianisol (BHA) örneklerinde olduğu gibi fenoksi radikallerinin stabilitesi, *o*- konumundaki büyük grupların bağlanmasıyla artmaktadır. Bu süstitüentler radikallerin bölgesindeki sterik engeli arttırmakla beraber antioksidan serbest radikalleri içeren yayılma reaksiyonlarının [reaksiyon (11), (12) ve (13)] hızlarını da azaltmaktadır.

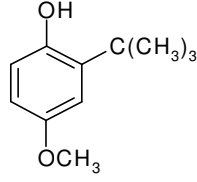


Fenol yapısındaki hidroksil grubunun *o*- veya *p*- konumuna ikinci bir hidroksil grubunun bağlanması ile antioksidan aktivite artmaktadır (Chen ve Ho, 1997). Antioksidan madde konantrasyonunun oksidasyon hızına etkisi, antioksidanın yapısı, oksidasyon koşulları gibi birçok faktöre bağlıdır (Moure ve ark., 2001). Örneğin, yüksek konsantrasyonlardaki fenolik antioksidanların (11), (12) ve (13) reaksiyonları gibi başlama reaksiyonlarına eklenmesiyle etkilerini kaybedip pro-oksidanlar olarak davrandıkları saptanmıştır (Hollman ve Katan, 1998).

Ayrıca, fenolik antioksidanlar bozulmamış yağa eklendiğinde indüksiyon süresinde uzama görülmektedir. Ama bozulmaya başlamış lipidlere eklendiklerinde etkisiz kalmaktadır. Bu nedenle, oksidasyona karşı maksimum koruma elde etmek için antioksidanların besin maddelerine mümkün olduğu kadar erken ilave edilmesi gerekmektedir (Shahidi ve Naczk, 1995).

1.1.2. Sentetik fenolik antioksidanlar

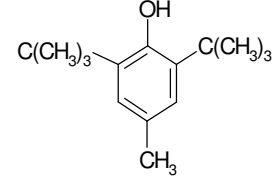
Gıda maddelerine antioksidan ilavesi çeşitli yönetmelikler tarafından sınırlandırılmıştır. Örneğin; ABD’de yürürlükte olan FDA yönetmeliği, besinlerde antioksidan varlığının ürünlerin etiketlerinde bildirilmesini ve ne amaçla kullanıldığının açıklanmasını istemektedir (Shahidi ve Naczk, 1995). Gıda ürünlerinde kullanıma uygun sentetik antioksidanlar: bütillenmiş hidroksitoluol (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA), gallatlar (propil gallat (PG), dodesil gallat (DG)) ve *ter*-bütillhidrokinon (TBHQ)’dur (Wettasinghe ve Shahidi, 1999; Pinho ve ark., 2000).



BHA

(3-tertiyer-butil-4-hidroksianisol)

(2-tertiyer-butil-4-metoksifenol)



BHT

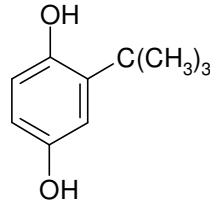
(3,5-tertiyer-butil-4-hidroksitoluol)

(2,6-tertiyer-butil-4-metilfenol)

BHA ve BHT monohidrik fenolik antioksidanlardır. Her iki madde de yağda çok çözünür, suda çözünmez. Gıda endüstrisinde kullanılmadan önce ilk defa petrolü oksidatif bozulmaya karşı korumak için kullanılmışlardır. Kimyasal olarak BHA, 3-tert-bütül-4-hidroksianisol'ün (%90) ve 2-tert-bütül-4-hidroksianisol'ün (%10) karışımıdır. Ticari amaçlı kullanımda, BHA beyaz mumsu tabakalar halinde, BHT ise beyaz kristal bileşik olarak bulunmaktadır. Ayrıca, BHT hayvansal yağlarda oksidasyonu önleyici ajan olarak bitkisel yağlardan daha etkilidir (Khan ve Shahidi, 2001).

Geniş uygulama alanına göre, BHA özellikle esansiyel yağların tat ve rengini korumada kullanılmakta ve her çeşit gıdaya katılabilen antioksidan olarak da ilgi görmektedir. BHA, özellikle tahıl ve şekerleme ürünlerinde kullanılan hindistan cevizi ve palmye özü yağları gibi kısa zincirli yağ asitlerinin oksidasyonunun kontrolünde etkilidir (Shahidi ve Nacz, 1995).

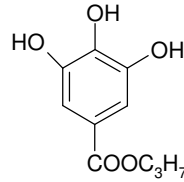
Uçucu yapıya sahip olduklarından dolayı hem BHA hem de BHT besin içine geçebilmektedir ve bu sebeple paketlenme sırasında da kullanılabilen önemli katkı maddeleridir. BHA ve BHT kombine olarak kullanıldıklarında sinerjik etki göstermektedir. Örneğin, bu iki antioksidanın kombine kullanımı fındık ve ürünlerinin oksidatif reaksiyonlarını önlemeleri açısından çok uygundur (Shahidi ve Nacz, 1995).



TBHQ

(*ter*-butilhidroksikinin)

ter-bütüldenrokinon (TBHQ) yanand yağları oksidasyona karşı korumak için önerilen BHA ve BHT benzeri etki gösteren en iyi antioksidan madde olup oksidatif stabiliteyi arttırmak için hidrojenasyona alternatif olarak gösterilmektedir. Bej renkli bir toz olan TBHQ, yağlarda yeterli miktarda çözünmekte, demir ve bakır gibi metallerle kompleks oluşturmamaktadır. Bundan dolayı, eklendiği ürünlerin rengini değiştirmemektedir. Maksimum dozu %0.02 yada 200 ppm olmak üzere BHA ve BHT ile kombine olarak yada tek başına kullanılabilir. TBHQ propil gallat'la kombine edilememektedir. Ham yağların stabilizasyonu için iyi performans gösterdiği kaydedilmiştir. Sitrik asit ve monoglisericid sitrat gibi şelat yapıcı ajanlar TBHQ'un lipid stabilize edici özelliğini arttırmaktadır. Bu kombinasyon esasen bitkisel ve katı yağlarda kullanılmakta olup, hayvansal yağlarda yaygın değildir (Shahidi ve Naczki, 1995).



PG

(3,4,5-trihidroksi propilbenzoat)

Propil gallat (PG), gallik asitin propil alkol ile esterifikasyonu sonucu alkol fazlasının distile edilmesi ile elde edilen bileşiktir. Beyaz kristal tozdu ve suda çok

az çözünmektedir. Özellikle hayvansal ve bitkisel yağların stabilizasyonunda kullanılmaktadır. Erime noktası 148°C olup, ısındıkça etkisini kaybetmekte ve bu nedenle 190°C'yi aşan ısıda kullanımı uygun bulunmamaktadır. PG demir iyonları ile birleşerek mavi-siyah kompleks oluşturduğundan, demir ve bakır katalizörleri elimine etmek için her zaman sitrik asit gibi şelatlarla kullanılmaktadır. BHA ve BHT ile sinerjik etkisi tesbit edilmiştir, fakat TBHQ ile kombinasyonu uygun görülmemektedir. PG, bitkisel ve hayvansal yağların, taze ve donmuş et ürünlerinin ve çerezlerin oksidasyonunu inhibe etmek için kullanılmaktadır. Bundan başka, PG amfifilik yapısından dolayı kuru (susuz) bitkisel yağlarda çok etkili bir antioksidandır. Gallatların uçucu özelliği BHA ve BHT'den daha düşük olduğundan, bu monohidrik fenollere oranla daha az fenolik kokuya sahiptir (Shahidi ve Naczki, 1995).

1.1.3. Doğal antioksidanlar

Besinlerdeki doğal antioksidanlar, bitkinin bütün kısımlarında bulunabilen polifenolik yapıya bileşiklerdir. Bitkisel fenoller çok fonksiyonlu olup indirgeyici ajan, metal şelatörleri ve oksidasyon önleyici etkileri vardır. Genel olarak, bitkisel fenolik antioksidanlara örnek olarak flavonoid bileşikler, fenolik asit türevleri, naftokinonlar, kumarinler ve tokoferoller gösterilmektedir. Doğal antioksidanlar organizmadan absorbe edildikten sonra fizyolojik fonksiyonları açısından önemli duruma gelirler (Triantaphyllou ve ark., 2001).

Besinlere ilave edilen sentetik antioksidanların ortaya çıkan çeşitli yan etkileri üreticileri doğal kaynaklı antioksidanları kullanmaya yöneltmiştir. Bu sentetik antioksidanların fenolik yapıda olması bu konuda yapılan araştırmaların da doğal yapıya sahip moleküllerin, özellikle de flavonoidler ve fenolik asitlerin incelenmesi üzerinde yoğunlaşmasını sağlamıştır (Balasundram ve ark., 2006). Fenolik bileşiklerin serbest radikallerin engellenmesinde önemli rolleri bulunmaktadır. Böylelikle LDL oksidasyonuna karşı dayanıklılığı artırır ve lipid peroksidasyonunu engellerler. Fenolik bileşiklerin aynı zamanda iltihap kurutucu

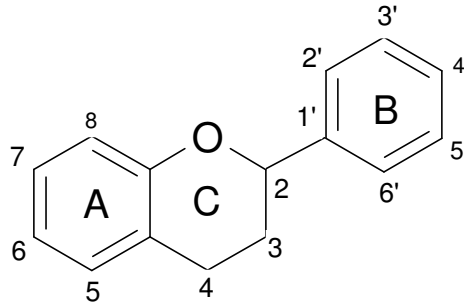
etkileri de vardır. Sağlığa yararlı olan fenolik bitkilerin pekçok kısımlarında, ayrıca çay, şarap gibi içeceklerde de bulunmaktadır. Ortalama flavonoid tüketiminin koroner kalp hastalıkları ölümleri ile ters orantılı olduğu görülmüştür (Samman ve ark.,1998).

Epidemiyolojik ve klinik çalışmalar meyve ve sebzelerdeki fenolik antioksidanların kardiyovasküler hastalıklar ve çeşitli kanser tipleri gibi kronik ve dejeneratif hastalıklara karşı koruyucu etkileri olduğunu göstermiştir (Sanchez-Moreno ve ark., 1998). Ayrıca, bu besin maddelerindeki antioksidanların ekstre edilip diğer gıda maddelerine katılması gıdaların oksidasyona karşı stabilizasyonu ve insan sağlığına faydaları açısından çok önemlidir (Shahidi, 2000).

1.1.3.1. Flavonoidler

Flavonoidler bitkilerde yaygın olarak bulunan fenolik maddelerdir. En çok meyve, sebze, fındık, tohumlar ve çiçeklerde bulunurlar (Frankel, 1999; Rice-Evans, 1999).

Yapıları aromatik A halkasına birleşmiş heterosiklik C halkasından ve buna da ikinci aromatik B halkasının birleşmesinden oluşmaktadır.



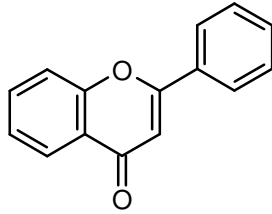
Bu yapının aromatik halkalarına hidroksil gruplarının bağlanmasıyla flavonoidler antioksidan aktivite gösterirler (Fuhrman ve Aviram, 2002).

Flavonoidler, önemli antioksidanlar olarak serbest radikal alıcı ve zincir kırıcı etki göstermektedirler. A-halkası 5. konumda hidroksillendiği zaman flavonoller 3-hidroksi-4-keto grubu ve/veya 5-hidroksi-4-keto grubunda metal

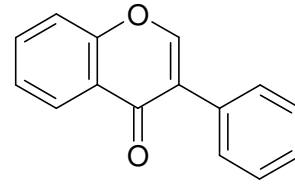
iyonlarını şelatlamaktadır. B halkasındaki *o*-kinol grubu da metal şelatlama aktivitesi göstermektedir. Bunun yanında flavonoidler reaktif oksijen türleri (ROT) oluşumunu azaltmaktadırlar. Yüksek oksitlenmiş ROT flavonoidler aracılığıyla daha az etkili aroksil radikallerine indirgenmektedir (Rice-Evans, 1999).

Flavonoidlerin biyolojik aktiviteleri son yıllarda daha iyi anlaşılmıştır. Antioksidan, serbest radikal süpürücü ve antienflamatuvar etkilerinin yanı sıra, farklı enzimlerin aktivitelerini modüle ederek ve spesifik reseptörlerle etkileşerek de insan sağlığına faydaları gösterilmiştir. Bunu yanında vazodilatör etki gösterirler, bakır ve demir gibi metal iyonlarını şelatlama özelliğine sahiptirler.

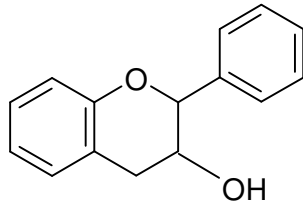
Flavonoidler antosiyanidinler ve antoksantrinler olarak ikiye ayrılırlar. Antosiyanidinler antosiyanidin glikozitleri olup meyve ve çiçeklerin kırmızı, mavi ve mor rengini veren suda çözünen pigmentlerdir. Antoksantrinler ise renksiz yada sarımsı-beyaz renktedirler ve flavon, flavonol, flavan, flavanol, ve izoflavonlar olarak ayrılırlar (Fuhrman ve Aviram, 2002).



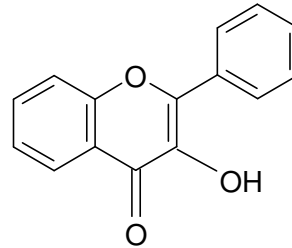
Flavon



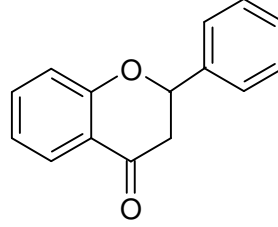
İzoflavon



Flavanol



Flavonol



Flavanon

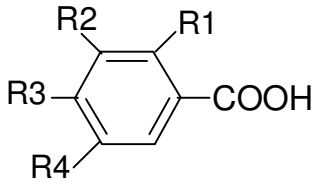
Besinlerdeki flavonoidler oksidatif strese karşı önemli ekzojen savunma mekanizmalarıdır. Siklooksijenaz ve lipooksijenaz'ı inhibe etmektedirler. Bu enzimler, platelet agregasyonu ile makrofaj oluşumu, prostoglandin ve lökotrien oluşumlarında anahtar rol oynamaktadırlar. Epidemiyolojik çalışmalar, flavonoidlerin ateroskleroz, tromboz ve karsinogenez olaylarında önemli etkisi olduğu düşünülen LDL peroksidasyonunu önlediğini ortaya koymaktadır. Ayrıca koroner kalp hastalıklarını önleyici ve antikanser özellikleri de vardır (Samman ve ark., 1998; Coşkun, 2005).

1.1.3.2. Fenolik asitler

Fenolik asitler bitkilerde yaygın olarak bulunan genellikle suda çözünen fenolik bileşiklerdir (Miller ve ark., 2000). Fenolik olmayan benzoik ve sinnamik asitlerden türeyen hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asit türevleri olarak iki grupta incelenmektedir. Fenolik asitler çoğu zaman bitki hücrelerinde serbest olarak bulunmamaktadır, kompleks şeklinde ya vakuollerde çözünmüş yada hücre duvarı bileşenlerine bağlanmış durumdadır (Macheix and Fleuriet, 1998).

Hidroksibenzoik asit türevleri genellikle C₆-C₁ yapısına sahip gallik asit, *p*-hidroksibenzoik asit, protokateşik asit, vanilik ve sirinjik asitleri içermektedirler (Balasundram ve ark., 2006). Bunlardan dördü (*p*-hidroksibenzoik, protokateşik,

vanilik ve sirinjik asitler) angiospermlerde yaygın olarak bulunmakta, diğeri ise (örn., gallik ve salisilik asit) daha çok şeker molekülleri yada organik asitlerle kombine olarak kompleks yapılar veya basit türevler şeklinde bitkilerde yer almaktadır (Macheix and Fleuriet, 1998).



$R_1=R_2=R_4=H$ $R_3=OH$ *p*-hidroksibenzoik asit

$R_1=R_4=H$ $R_2=R_3=OH$ protokateşik asit

$R_1=R_4=H$ $R_2=OCH_3$ vanilik asit

$R_3=OH$

$R_1=H$ $R_2=R_3=R_4=OH$ gallik asit

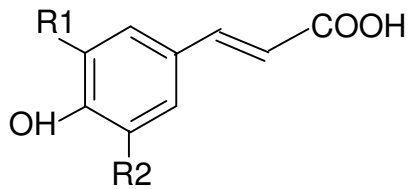
$R_1=H$ $R_2=R_4=OCH_3$ sirinjik asit

$R_3=OH$

$R_1=OH$ $R_2=R_3=R_4=H$ salisilik asit

$R_1=R_4=OH$ $R_2=R_3=H$ genistik asit

Hidroksisinnamik asitler ise üç karbonlu yan zinciri içeren aromatik halkalı yapılarıdır, örn., kafeik, *p*-kumarik, ferulik ve sinapik asitler gibi (Balasundram ve ark., 2006). Sennamik asitten türemiş ve genellikle kumarik, kafeik, ferulik ve sinapik asitlerin kombinasyonları şeklindedirler (Macheix and Fleuriet, 1998). Çoğunlukla organik asit veya glikozitlerin esterleri şeklinde yada proteinlere veya diğeri hücre duvarı polimerlerine bağlı olarak bulunmaktadırlar (Chen ve Ho, 1997).



$R_1=R_2=H$ *p*-kumarik asit

$R_1=OH$ $R_2=H$ kafeik asit

$R_1=OCH_3$ $R_2=H$ ferulik asit

$R_1=R_2=OCH_3$ sinapik asit

Fenolik asit ve esterlerinin antioksidan aktivitesi moleküldeki hidroksil gruplarının sayısı ile orantılı olarak artmaktadır (Balasundram ve ark., 2006). Antioksidan aktivitelerini, hidrojen atomlarını vererek, hidroksil, singlet oksijen, peroksil, peroksinitrit radikallerini süpürerek veya geçiş metalleriyle şelat oluşturarak göstermektedirler (Halliwell, 2002). Yapılan çeşitli antioksidan aktivite çalışmalarında, hidroksisinnamik asit türevlerinin hidroksibenzoik asit türevlerine göre daha etkili olduğu gösterilmiştir (Chen ve Ho, 1997).

Fenolik asitlerin lipid peroksidasyonunu önlediği de saptanmıştır. Direkt olarak LDL oksidasyonunu ve agregasyonunu inhibe etmektedirler. Ayrıca arteriyel duvarda birikerek arteriyal makrofajlarda NADPH oksidazın aktivasyonunu inhibe edip makrofaj lipid peroksidasyonunun da önüne geçmektedirler (Halliwell, 2002).

1.2. Antioksidan Aktivitenin Değerlendirilmesi

Antioksidan aktivite, lipid oksidasyonunun primer ve sekonder ürünlerinin kantitatif olarak belirlenmesi ve reaksiyonlardaki diğer değişikliklerin tesbit edilmesi şeklinde değerlendirilmektedir. Genellikle, hidroperoksit oluşumunu geciktirme yöntemi ya da oksidasyon boyunca oluşan sekonder ürünleri kimyasal ve duyuşsal olarak tesbit yöntemi kullanılmaktadır (Shahidi ve Naczki, 1995).

Antioksidanlar, oksidatif sürecin aşağıda belirtilen farklı aşamalarında etkilidirler (Moure ve ark., 2001):

- başlangıç radikallerini süpürücü ;
- metal iyonlarını bağlayıcı;
- peroksil radikallerini süpürücü;
- oksidatif hasar görmüş biyomolekülleri uzaklaştırıcı.

Antioksidanların *in vivo* olarak biyoyararlanımı, absorpsiyonu, metabolizması, farmakokinetiği ve besin maddelerinde kullanımını açısından bu mekanizmalar önem kazanmıştır (Moure ve ark., 2001).

1.2.1. Tayin yöntemleri

1.2.1.1. Lipid peroksidasyonunun inhibisyonuna dayalı yöntemler

i) Peroksit sayısı

Peroksit sayısını tayin etmek için en çok başvurulan yöntem iyodometrik titrasyon yöntemidir. Potasyum iyodürden serbest hale geçen iyodun tiyosülfat ile titrasyonu sonucu peroksit içeriği değerlendirilmektedir (Antolovich ve ark., 2002).

ii) Schaal fırın testi

Bu testte ısıya karşı oksidatif kararlılık ölçülmektedir. Kişisel koku ve tat duyusuna göre karar verilmektedir (Frankel ve Meyer, 2000).

iii) Tiyobarbitürik asit testi (TBARS)

En çok kullanılan lipid peroksidasyonu tayin yöntemidir. TBARS yöntemi; doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ile oluşan monoaldehitlerin (MDA), glasiyel asetik asit ve 2-tiyobarbitürik asitle ısıtılması sonucu verdikleri kırmızı rengin şiddetinin spektrofotometrik yöntemle ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Rice-Evans ve ark., 1991).

MDA için YBSK analizleri de mevcuttur. Bu teknik daha fazla zaman alıcı, fakat daha spesifiktir. C₁₈ kolon ve asetonitril veya metanol gibi mobil fazlar analiz için uygundur (Antolovich ve ark., 2002).

iv) β -karoten-linoleik asit sistemi

Bu yöntemde, antioksidan aktivite linoleik asit sisteminde β -karotenin oksidasyonu ölçülerek tayin edilmektedir (Koleva ve ark., 2002). Reaksiyon sonunda çözeltide β -karotenin kaybolan karakteristik sarı renginin absorbansı 470 nm’de UV-Spektrofotometre’de kaydedilerek, sonuçlar standart olarak kullanılan sentetik antioksidanlar ile karşılaştırılarak verilmektedir (Wettasinghe ve Shahidi, 1999). Reaksiyon genellikle 50°C civarında başlar, basit, duyarlı ve hızlı bir yöntemdir (Koleva ve ark., 2002).

v) Ransimat yöntemi

Çeşitli antioksidanların antioksidatif potansiyellerini değerlendirmek için kullanılan bir yöntemdir. Kullanılan sabit yağın acılaşması sonucu oluşan lipid oksidasyon ürünü küçük moleküllerin elektrik geçirgenliğindeki artışı ölçmeye dayanan Ransimat cihazı ile gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemde otooksidasyon ile oluşan uçucu organik asitler su içine yüksek düzeyde absorbe edilmekte ve indüksiyon zamanını göstermek için kullanılmaktadır (Shahidi ve Naczki, 1995; Chen ve Ho, 1997; Kowalski ve ark., 2004).

1.2.1.2. Serbest radikal süpürücü etkiye dayalı yöntemler

i) Toplam Antioksidan Kapasite ölçümü (TEAC)

Troloks eşdeğer antioksidan kapasite (TEAC) denilen bu yöntemle toplam antioksidan kapasite ölçülebilmektedir. Bu amaçla, vitamin E, β -karoten, flavonoidler, GSH, urat, bilirubin, transferrin, seruloplazmin, albümin, Se, SOD, katalaz seviyeleri değerlendirilmektedir. Yöntemin temeli, radikallerin ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiyazolin)-6-sulfonik asit) ile reaksiyon vermesine dayanır.

Oksijen radikali absorblama yeteneği de aynı TEAC'nin tesbiti için kullanılır, fakat burada floresans dedektör ile ölçüm yapılmaktadır (Frankel ve Meyer, 2000).

ii) DPPH• radikal süpürücü etki

Kararlı bir radikal olan DPPH• bir elektron veya hidrojen kabul eder. Antioksidanların, DPPH radikaline bir hidrojen atomu verme yetenekleri üzerinden süpürücü etki gösterdikleri düşünölmektedir. Bu yöntem ile antioksidanların stabil DPPH• radikalini, indirgenmiş DPPH (DPPH-H) formuna getirme yetenekleri değeriendirilir.



Diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında kısa zamanda sonuç veren bir yöntemdir (Molynex, 2004; Sanchez-Moreno ve ark., 1998; Sanchez-Moreno ve ark., 1999; Cakir ve ark., 2003).

iii) Toplam radikal-trapping parametre (TRAP)

Plazma ve serum'un toplam antioksidan kapasitesini ölçmek için geliştirilmiştir. 2,2'-azobis-(2-amidinopropan)-hidroklorür (ABAP), antioksidanları oksitlemek için peroksil radikallerini üretmektedir. İndüksiyon süresi standart olarak kullanılan Troloks'unki ile karşılaştırılmaktadır. Oksidasyon olayı oksijen absorpsiyonu ile gözlenebilmektedir (Frankel ve Meyer, 2000).

iv) ABTS•+ radikal katyon renksizleştirme yöntemi

ABTS, 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) diammonyum tuzu radikal katyon renksizleştirme deneyi, maddelerin antioksidan aktivitesini değeriendirmede kullanılan spektrofotometrik bir yöntemdir (Milauskas ve ark.,

2004). H_2O_2 'in metmiyoglobini aktive etmesi sırasında oluşan ferrimiyogloblin radikallerinin ABTS ile reaksiyonu sonucu $ABTS^{+ \cdot}$ radikalinin meydana gelmesi esasına dayanmaktadır (Tsao ve Deng, 2004).

v) Oksijen Radikali Absorpsiyonu Yeteneği yöntemi (ORAC)

Bu yöntem suda çözünen fitokimyasalların antioksidan aktivitelerini değerlendirmek için uygulanmaktadır. Yöntemde flöresan proteini R-fikoeritrin (kırmızı fotoreseptör pigmenti içeren fikobilirubin) ve peroksil radikali oluşmasına neden olan AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihidroklorid) kullanılmaktadır (Tsao ve Deng, 2004; Frankel ve Meyer, 2000).

vi) Süperoksit anyon süpürücü aktivite testi (FRAP)

Antioksidanların elektron yakalama kapasitesi ile doğru orantılı olarak demirin indirgeme gücünü doğrudan antioksidanın demir tripidil-triazine kompleksini (Fe^{+3} -TPTZ), mavi renkli demir kompleksine (Fe^{+2} -TPTZ) indirgeyebilme yeteneğiyle ölçmektedir (Antolovich ve ark., 2002).

vii) Elektron Spin Rezonans Spektroskopisi (ESR)

Bu yöntem en çok kullanılan doğrudan radikal ölçüm yöntemidir. Radikallerin bünyesinde bulunan magnetik enerji seviyesinin dışarıdan uygulanan bir magnetik alanla iki farklı enerji seviyesine ayrılma olayı üzerine kurulmuştur. Yöntemin dezavantajı, birkaç saniye gibi kısa ömürlü radikallerin ölçüm işleminin zor olmasıdır. Bu yüzden sadece uzun ömürlü radikaller doğrudan analiz edilebilmektedir. Bu dezavantajı yenmek için kısa ömürlü radikaller spin tuzağı denilen nitrozo veya nitron içeren bileşiklerle reaksiyona sokularak uzun ömürlü türevler haline getirilir ve analiz ancak bu şekilde mümkün olabilmektedir (Rice-Evans ve ark., 1991; Antolovich ve ark., 2002).

1.3. Tez kapsamında kullanılan *Hypericum* türleri

Hypericum L., Guttiferae (Hypericaceae) familyasına dahil olan ve Türkiye'de geniş yayılış gösteren bir cinstir. Bu familya, dünyada 46 cins ve 1000 kadar tür ile temsil edilmektedir. Bu güne kadar Türkiye'de bu familyaya ait bulunan tek cins *Hypericum*'dur ve ülkemizde 80 kadar türü olduğu bilinmektedir (Potoğlu-Erkara ve Tokur, 2004).

Hypericum cinsi, yeryüzünde tropik ve subtropik bölgelerde, Afrika, Kuzey Amerika, Asya ve Avrupa'da yayılış göstermektedir.

Yurdumuz *Hypericum* türleri yönünden önemli bir gen merkezidir. *Hypericum* türleri, içerdikleri naftodiantronlar, tanen, uçucu yağ, alkaloidler, flavonoidler ve vitaminlerden dolayı tıbbi bakımdan büyük öneme sahiptirler. Türlerin içerdiği bu maddelerin bazıları hayvanlara zarar vermelerine rağmen bitkinin çiçekli dal ve yaprakları halk arasında tedavi edici olarak kullanılmaktadır. Bitkiden elde edilen ekstratlar insanlarda antidepresif ve öfori verici olarak çeşitli preparatların hazırlanmasında kullanılmaktadır (Mazza ve Oomah, 1998). Bu bitkilerin, toprak üstü kısımları, özellikle çiçekleri kurutulup çay olarak içilmektedir. Bitki zeytinyağında bekletilerek hazırlanan hülasa, sinir yatıştırıcı, ülser, astım gibi hastalıklarda, böbrek taşlarını düşürmekte, şeker hastalığına karşı ve antibiyotik etkisinden dolayı da yara ve yanık tedavisinde kullanılmaktadır (Baytop, 1984). Aynı zamanda, çiçek ve yapraklardan elde edilen boya maddesi sayesinde, sinai yönden de oldukça önemli bir cins olduğu belirtilmiştir (Sakar ve ark., 1988).

1.3.1. *Hypericum perforatum* (St. John's wort)

Cinsin tıbbi olarak en çok bilinen türü *Hypericum perforatum* (St. John's wort) ülkemizde sarı kantaron, binbirdelik otu, kanotu, kılıçotu, koyunkıran, kuzukıran, mayasıl otu, yaraotu (Baytop, 1984) isimleri ile bilinmektedir. Halk arasında sedatif, antienflamatuvar, anksiyolitik, yara iyileştirici, yanık tedavisi, uykusuzluk, şoklar, beyin sarsıntısı, histeri, gastrit, hemoroit, böbrek hastalıkları için

kullanımları yaygındır (Mazza ve Oomah, 1998). Halk arasında bu kadar yoğun olarak kullanımı olan tür üzerinde yapılmış pek çok bilimsel çalışma mevcuttur. Özellikle son yıllarda yapılan klinik çalışmalar *Hypericum perforatum* ekstrelerinin hafif ve orta şiddetli depresyon tedavilerinde etkin olarak kullanıldığını ortaya çıkarmıştır (Öztürk, 1997), kısaca bitki depresyon tedavisinde umut vericidir. Ayrıca, son yıllarda yapılan çalışmalarda *H. perforatum*'un antioksidan potansiyeli farklı metodlar kullanılarak incelenmiş, örneğin, bitkinin hiperisin ve hiperforince standardize edilmiş ekstresi serbest radikal oluşumu ve lipid peroksidasyonunu önleyerek kuvvetli süperoksit radikali süpürücü etkisi olduğu görülmüştür (Benedi ve ark., 2004); buna karşılık yapılan başka bir çalışmada *H. perforatum*'un etanol ekstresinin flavonoid ve fenolik asit fraksiyonlarının serbest radikal oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu önemli derecede indirgediği ifade edilerek, hiperisin ve hiperforinin ise antioksidan aktiviteye katkısı olmadığı belirtilmiştir (Silva ve ark., 2005). Ayrıca, *H. perforatum*'un hem *in vitro* olarak hem de canlı organizmada belirgin radikal süpürücü etkisi olduğu saptanmıştır (Hunt ve ark., 2001).

Bunların dışında cinsin diğer türleri de antioksidan aktivite açısından taranmış ve çarpıcı sonuçlara ulaşılmıştır.

H. hyssopifolium'un etil asetatlı fraksiyonlarında yüksek toplam fenol miktarı ve DPPH radikal süpürücü etki tesbit edilmiştir (Cakir ve ark., 2003). *H. triquetrifolium* toprak üstü kısımlarının metanol ekstrelerinin TBAR ve radikal süpürücü aktivite tayinlerinde önemli derecede antioksidan etki gösterdikleri belirlenmiş, bu bulgular flavonoid ve kısmen de I3,II8-biapigenin varlığı ile açıklanmıştır (Couladis ve ark., 2002). *H. adrosaemum*'dan hazırlanan infüzyonun ise süperoksit ve hidroksil radikallerine karşı kuvvetli antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Valentao ve ark., 2002).

1.3.2. *Hypericum montbretii* Spach.

Sin.: *H. cassium* Boiss., *H. nordmannii* Boiss.

H. montbretii, Drosocarpium (Spach.) seksiyonuna dahil, çok yıllık, tüysüz bitkidir. Gövdesi 15-60 cm, dik veya yatay olarak uzanmıştır. Gövdede genellikle uç sürgünlere sahip değildir. Yaprak, anterler, sepaller ve petaller üzerinde kenar ve yüzeysel siyah glandları mevcuttur. Yaprakları 15-55 mm büyüklüğünde ovat-oblong veya triangular-lanseolata kadar değişiklik göstermiştir ve ağsı damarlanma söz konusudur. Petaller ve stamenler devamlıdır. Petaller 8-14 mm büyüklüğünde uca doğru siyah glandlıdır. Stamenler üçlü demetler halinde ve stilusu üç parçalıdır. Sepaller lensoolat-oblong, akut-aküminant şeklindedir. Kapsül 7-10 mm büyüklüğünde dar ovoid piramidaldir ve valfli, turuncu veziküllü ve kısa dorsal çizgilidir. Tohumlar boyuna damarlı ve yüzeysel çizgilidir (Robson, 1988).

Çiçeklenme zamanı Nisan-Temmuz aylarıdır. Yetiştirme ortamı: Taşlık tepeler ve çalılıklar. Yükseklik: 200-1750 m. Yeryüzündeki yayılışı: Balkanlar, Batı Suriye, Gürcistan. Türkiye'deki yayılışı: A1, A2, A3, A4, A5, A8, B1, B2, B3, B5, C1, C2, C3, C5. Eskişehir'de ise Kalabak köyü ve çevresi, 1300 m., orman altında yetiştirilmektedir (Davis, 1967).

1.3.3. *Hypericum origanifolium* Willd.

Sin: *H. pulverulentum* Fenzl, *H. gheiwense* Boiss.

H. origanifolium, Origanifolia (Stef.) seksiyonuna dahil çok yıllık çalimsı bitkidir. Gövdesi 15-30 (37) cm., yarı dik yükselici, dallanmış fakat genellikle tabanda köklü olmayan kısa beyazımsı pubescent tüylere sahiptir. Gövdede uç sürgünleri yoktur. Yapraklar 5-30 mm. büyüklüğünde, ovat-obavat eliptik-oblong şekillidir. Yaprak iç kenarlarında yüzeysel siyah glandlı, pubescent tüylere sahiptir. Sepaller dar oblong-oblong spatulata, akut obtus şeklindedir. Genellikle yüzeysel siyah glandlara sahip, puberulos veya glabrosdur. Petaller ve stamenler devamlıdır. Petaller 9-15 mm. büyüklüğünde siyah yüzeysel glandlı ve bazen kenarları siyah glandlıdır. Stamenleri üçlü demetler halindedir ve stilusu üç parçalıdır. Kapsül 7-12 mm. büyüklüğünde dorsal vittalı ve yanal veziküllüdür ve valfli, boyuna kesik çizgilidir. Tohumlar buruşuk ve kabarık çizgilidir.

Çiçeklenme zamanı Mayıs-Ağustos aylarıdır. Yetiştirme ortamı: Kuru otluk veya kayalı yokuşlar veya stepler. Yükseklik: 50-2400 m. Yeryüzündeki yayılışı: Gürcistan, Zonguldak. Türkiye'deki yayılışı: A2, A3, A4, A5, A6, B2, B3, B4, B5, B6, C3, C5, C6. Eskişehir çevresinde ise Sivrihisar, 1100 m., Hub.-Mor., Tekören Köyü yol üzeri ve Yörükçürka köyü, 1000 m., kırsal alanda yetişmektedir (Robson, 1988).

H. montbretii ve *H. origanifolium* bitkileri ile yapılan tek anatomik çalışma olmasına rağmen (Potoğlu-Erkara ve Tokur, 2004) içeriklerini belirleyen birçok fitokimyasal çalışma rapor edilmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre *H. origanifolium* toprak üstü kısımlarının naftodiantronlar (hiperisin, psödohiperisin, proto-psödohiperisin, emodin ve frangulin), flavonoidler (rutin, kersetin, mirsetin, hiperosit), ksantonlar (mangiferin ve izomangiferin); *H. montbretii*'nin ise naftodiantronlar (hiperisin, psödohiperisin, proto-psödohiperisin, emodin ve frangulin), flavonoidler (rutin, kersetin, mirsetin, mirsitrin, kersitrin, izo-kersitrin, hiperosit, kateşin (+)), ksantonlar (mangiferin ve izo-mangiferin), biflavonoidler (I3,II8-biapigenin), fenolik asitler (klorojenik asit) ve uçucu bileşikler (α -, δ -, γ -kadinen, α -kadinol, *D*-germakren, *tr*-nerolidol ve valesen) içerdikleri saptanmıştır (Mathis ve Ourisson, 1964; Kitanov ve ark., 1998; Sakar ve ark., 1991; Erken ve ark., 2001).

H. montbretii ve *H. origanifolium* ile ilgili yapılan biyo-aktivite çalışmaları ise antimikrobiyal, antibakteriyal ve antiyeast özelliklerinin belirlenmesi ile sınırlıdır (Sakar ve ark., 1988; Sakar ve Tamer, 1990). Antioksidan aktivite ile ilgili daha önce yapılmış hiçbir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı; *H. origanifolium* ve *H. montbretii*'nin farklı polaritedeki ekstralarının antioksidan ve serbest radikal süpürücü etkileri araştırılarak sonuçların referans bitki olarak değerlendirilen *H. perforatum* ve sentetik antioksidan BHT'nin sonuçları ile karşılaştırılması ve ekstraların toplam fenolik madde, flavonoid ve flavonol miktarlarının belirlenmesidir.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Bitkisel materyal

H. origanifolium Willd., Sivrihisar, Tekören köyü, 1100 m. Haziran 2002 (OUFE 10334).

H. montbretii Spach., Kalabak köyü, 1300 m. Haziran 2002, (OUFE 10332).

Hypericum perforatum Linn., Türkmen Dağları, Kalabağın üst tarafları, 1300 m. Haziran 2003 (OUFE 10337).

Hazırlanan herbaryum örnekleri başta "Türkiye Florası" olmak üzere çeşitli eserlerden yararlanılarak teşhis ve tayin edilmişlerdir (Davis, 1967). Hazırlanan herbaryum örneklerinin Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Herbaryum Merkezi'ndeki (EGE) örnekler ile kontrol ve karşılaştırmaları yapılmıştır.

2.1.2. Kimyasal madde ve çözeltiler

Gallik asit, β -karoten, BHT (butillenmiş hidroksitoluol), DPPH (2.2-difenil-1-pikrilhidrazil) Folin-Ciocalteu reaktifi (Sigma-Aldrich), linoleik asit (Fluka), Tween 80, metanol, etilasetat, kloroform, etanol, sodyum karbonat, sodyum asetat, alüminyum klorür (Merck). Ham zeytin yağı Üstün Zeytincilik, Balıkesir firmasından alınmıştır.

2.1.3. Kullanılan cihazlar

UV-visible Spektrofotometre (Shimadzu 160A), Ransimat Cihazı (743 Metrohm AG, İsviçre), ELISA mikroplaka okuyucu (Bio.Tek. EL_x808_{IU}), Ultrasonik banyo (1 L, J.P. Selecta), Etüv (Venticell-55), Hassas Terazi (Shimadzu-AEX 200G), Rotavapor (Buchi-R114), Vortex karıştırıcı (Nuvemix-NM110 vibratör).

2.1.4. Kullanılan malzemeler

6 mL borosilikat vial (Cole Parmer), Spektrofotometre küveti (S-10SM 1 mL Quartz), 96 kuyucuklu mikrolaka (Corning), Otomatik Pipetör (100µL, 1000 µL, 5000 µL, Eppendorf), Steril otomatik mikropipet ucu (100 µL, 1000 µL, 5000 µL, Eppendorf), beher (250 mL, İldam), armudi balon (50 mL, İldam), Pyrex-cam tüp (10 mL, 16x100 mm, İldam), Kapaklı cam tüp (10 mL, İldam), balon joje (10 mL, 25 mL, 100 mL, 250 mL, İldam).

2.2. Yöntem

2.2.1. Ekstrelerin hazırlanması

Çalışmada kullanılan *Hypericum* türlerinin çiçek ve yaprakları gölgede kurutularak toz edilmiştir. Her 3 drog için de aynı ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır.

Yaklaşık 30 g toz drog Soxhlet apareyinde önce yağlarından kurtarılmak üzere petrol eteri (40-60°C) ile 8 saat ekstre edilmiş, geride kalan drog, petrol eteri uzaklaştırdıktan sonra 2 kısma ayrılmıştır. İlk kısım %70'lik MeOH ile 40°C'deki su banyosunda 30 dakika (4 kez) ekstre edilmiş, süzüntüler 40°C'de alçak basınç altında metanolden kurtarıldıktan sonra sulu kısım liyofilize edilmiştir (ME). İkinci kısım da aynı şekilde %70'lik MeOH ile 40°C'deki su banyosunda 30 dakika (4 kez) ekstre edildikten ve süzüntüler 40°C'de alçak basınç altında metanolden kurtarıldıktan sonra sulu kısım EtOAc ile sıvı-sıvı ekstraksiyona tabi tutulmuş (4 kez) ve ayrılan her iki faz ayrı ayrı yoğunlaştırılmıştır (EA ve SU). Her ekstre için kuru baz üzerinden % verim hesaplanmıştır. Bu şekilde her 3 bitki için elde edilen ekstratlar aktivite tayinlerinde kullanılmıştır.

2.2.2. Toplam fenolik madde miktar tayini

Ekstreler içindeki toplam fenol miktarları Folin-Ciocaltaeu Metodu kullanılarak kolorimetrik olarak tayin edilmiştir (Folin ve Ciocaltaeu, 1928). Bütün örnekler ve standart olarak kullanılan gallik asit %50'lik metanolde çözülmüştür. 0.5 mL örnek, 2.5 mL Folin-Ciocaltaeu reaktifi (%10'luk, h/h, suda) ve 7.5 mL sodyum karbonat çözeltisi (%20'lik, a/h, suda) deney tüpünde karıştırılarak 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Çözeltilerin absorptans değerleri 750 nm'de spektrofotometrede okunmuş, toplam fenol miktarı gram ekstrede mg gallik asite eşdeğer olacak şekilde hesaplanmıştır.

2.2.3. Flavonoid miktar tayini

Flavonoid içeriği standart olarak rutin kullanılarak belirlenmiştir. Sarı rengin absorptansı oda sıcaklığında 60 dakika bekletildikten sonra 415 nm'de ölçülmüştür (Miliauskas ve ark., 2004).

1 mL bitki ekstresi (10g/L metanolde) ile 1 mL alüminyum triklorür (AlCl₃) (20 g/L) ile karıştırılarak distile su ile 25 mL'ye tamamlanmıştır. Çözeltinin absorptansı 60 dakika sonra UV-spektrofotometrede 415 nm'de ölçülmüştür. Kör olarak; 1 mL ekstre + 1 damla asetik asit karıştırılarak 25 mL'ye tamamlanan çözelti kullanılmıştır. Aynı koşullar altında rutin çözeltisinin absorptansı da ölçülmüştür. Tüm tayinler iki kez tekrarlanmıştır. Bitki ekstrelerindeki rutine eşdeğer flavonoid miktarı aşağıdaki formülle hesaplanmıştır:

$$X = \frac{A \times m_0}{A_0 \times m} \times 10$$

X: bitki ekstresinin rutine eşdeğer mg/g flavonoid içeriği

A: bitki ekstresinin absorptansı

A₀ : standart rutin çözeltisinin absorptansı

m: bitki ekstresinin ağırlığı (g)

m_o : çözeltildeki rutin ağırlığı (g)

2.2.4. Flavonol miktar tayini

Flavonol içeriği aşağıda verilen yönteme göre belirlenmiştir. 2.5 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra oluşan renk 440 nm’de ölçülmüştür. Bitki ekstraları ve rutin çözeltisi de aynı işlemde geçirilmiştir (Milauskas ve ark., 2004).

0.02-0.09 mg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan etanolik rutin çözeltisinden 2mL, alüminyum triklorür çözeltisinden (20 g/L) 2 mL ve sodyum asetat çözeltisi (50 g/L) nden 6 mL alınarak karıştırılmıştır. Karışımın 20°C’de 2.5 saat bekletildikten sonra 440 nm’de UV-spektrofotometrede absorbansı ölçülmüş ve rutin kalibrasyon eğrisi ve denklemi hesaplanmıştır. Aynı prosedür rutin çözeltisi yerine 10 g/L konsantrasyonda hazırlanan bitki ekstralarına uygulanmıştır. Herbir deney 2 kez tekrarlanmıştır. Ekstrelerin rutine eşdeğer flavonol miktarları aşağıdaki formülle hesaplanmıştır:

$$X = C \times \frac{V}{m}$$

X: bitki ekstresinin rutine eşdeğer mg/g flavonol içeriği

C: kalibrasyon eğrisinden elde edilen rutin çözeltisinin konsantrasyonu (mg/mL)

V,m: bitki ekstralarının hacmi (mL) ve ağırlığı (g).

2.2.5. DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki

Test edilen *Hypericum* türlerinden elde edilen ekstralardan hazırlanan çözeltilerin 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH[•]) üzerindeki serbest radikal süpürücü etkileri Sanchez-Moreno ve arkadaşları (1998) tarafından modifiye edilmiş yöntem kullanılarak tayin edilmiştir.

Metanol içerisinde hazırlanmış 0.1, 0.2 ve 0.4 mL örnek çözeltileri (reaksiyon ortamındaki örnek konsantrasyonları 9.6×10^{-4} - 3.6×10^{-3} mg/mL) üzerine metanolde hazırlanmış 3 mL DPPH (2×10^{-2} g/L) çözeltisi ilave edilerek vortekste 30 saniye karıştırılmış ve karanlıkta, oda sıcaklığında 30 dakika bekletilen çözeltilerin 517 nm’de absorbanans değerleri kaydedilmiş, serbest radikal süpürücü etki (Antioksidan İndeks) aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{kontrol absorbanansı} - \text{örneğin absorbanansı}}{\text{kontrol absorbanansı}} \times 100$$

Radikal süpürücü etki konsantrasyona karşı korele edilmiş ve DPPH konsantrasyonunu %50 inhibe eden ekstre konsantrasyonları (IC₅₀ değerleri) belirlenmiştir (Çizelge 3.2). Her test 3 kez tekrarlanarak ortalamaları alınmış, referans madde olarak BHT kullanılmıştır.

2.2.6. β-karoten-linoleik asit sisteminde antioksidan aktivite tayini

Bu yöntem, β-karoten ve linoleik asit sulu emülsiyon sisteminde ısı yardımıyla oksidasyonunun indüklenmesi esasına dayanmaktadır (Koleva ve ark., 2002).

Kuru bir kaba tartılan 40 mg linoleik asit ve 400 mg Tween 80 ile β-karoten çözeltisinin tamamı (3mg/mL kloroformda) vortekste iyice karıştırılmış, kloroform alçak basınç altında 40°C’de rotavaporda ortamdan uzaklaştırılmıştır. Bakiye su ile emülsifiye edilerek 100 mL’ye tamamlanmıştır. Portakal renkli bu stok çözelti deneyler sırasında karanlıkta saklanmıştır. 3 mL β-karoten çözeltisi içerisinde 0.2 mL numune çözeltisi (0.6 mg/mL konsantrasyonda) ilave edilerek vortekste iyice karıştırılmış, herbir numune çözeltisi (0.2 mL) mikropalakalara yerleştirilerek işlem sırasında 40°C’de etüvde tutulmuş ve 15 dakika aralıklarla 490 nm’de ELISA mikropalaka okuyucuda absorbanansları ölçülmüştür. Herbir deney 3 kez tekrarlanmış, sonuçlar zamana (dakika) karşı okunan absorbanans değerleri olarak grafiğe geçirilip,

antioksidan aktivite fenolik asit ilave edilmeksizin kontrole karşı oksidasyonun inhibisyon yüzdesi olarak aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmış ve sentetik antioksidanlar BHT'nin sonuçları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Kontrol olarak metanol kullanılmıştır.

$$\% \text{ Antioksidan aktivite} = 100 \times [1 - (A_s^0 - A_s^{180}) / (A_k^0 - A_k^{180})]$$

A_s^0 = örneğin başlangıçtaki absorbansı (490 nm)

A_s^{180} = örneğin 180 dakika sonraki absorbansı (490 nm)

A_k^0 = kontrolün başlangıçtaki absorbansı (490 nm)

A_k^{180} = kontrolün 180 dakika sonraki absorbansı (490 nm)

2.2.7. Ransimat yöntemi ile lipid peroksidasyonunu inhibe edici etki

Ransimat yöntemi çeşitli antioksidanların antioksidatif potansiyelini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir.

Çalışılan *Hypericum* türlerine ait ekstraların antioksidan aktiviteleri yağlarda bulunan doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan bozunma ürünlerinin su içine absorbe edilerek suyun iletkenliğinin değişmesi prensibine göre çalışan Ransimat cihazı ile test edilmiştir (Chen ve Ho, 1997; Kowalski ve ark., 2004).

Bu testte linoleik asitçe zengin (%60-65) ham zeytin yağı kullanılmıştır. 3 g yağ içine % 0.1 olacak şekilde numune veya standart madde (BHT) ilave edilerek yağ içerisinde dağılması sağlanmıştır. 100°C'de, 20 L/saat hava akışına maruz bırakılan numunelerin bozunma zamanları ölçülmüş ve antioksidan aktiviteleri, (Bozunma İndisleri) hesaplanmıştır. Her test 3 kez tekrarlanarak ortalamaları alınmıştır.

$$\text{Bozunma İndisi (I.I.)} = I_{\text{numune}}/I_{\text{kontrol}}$$

Formüle göre; örneklerin Bozunma İndisleri kontrol ile karşılaştırılarak antioksidan aktiviteleri tayin edilmiştir.

3. BULGULAR

Antioksidan aktivitenin değerlendirilmesi için birçok *in vitro* ve *in vivo* yöntem geliştirilmiştir. Bunun yanında, tek bir antioksidanın veya fitokimyasal antioksidanların antioksidan kapasitesini tam olarak belirleyici bir sistem bulunmamaktadır. Doğal antioksidanların çoğu bitkilerden elde edilmekte olup, yüksek bitkilerin bütün kısımlarında ve genellikle fenolik ve polifenolik bileşikler olarak bulunmaktadırlar (Shahidi, 2000). Doğal antioksidanlar; indirgeyici ajanlar, serbest radikal süpürücüler, prooksidan metallerin kompleks oluşumunu engelleyiciler ve singlet oksijen oluşumunu nleyiciler olarak etki etmektedirler (Pratt, 1992).

Tez kapsamında, son yıllarda özellikle gıda endüstrisinde doğal kaynaklı antioksidan maddelerin önem kazandığını ve insan sağlığı açısından daha kullanışlı ve zararsız olduğu göz önüne alınarak, iki *Hypericum* türünün (*H. montbretii* Spach. ve *H. origanifolium* Willd.) yaprak ve çiçeklerinden elde edilen farklı polaritedeki ekstrelerin fenolik madde bileşimi, flavonoid ve flavonol miktarları belirlenerek ve DPPH üzerinden anti-radikal aktiviteleri, -karoten linoleik asit sistemi ve Ransimat yöntemi ile antioksidan kapasiteleri değerlendirilmiş ve sonuçlar *H. perforatum* ve sentetik antioksidan BHT'nin sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

3.1. Ekstrelerin Fenolik Madde İçeriği

Hypericum ekstrelerinin toplam fenolik madde miktarları Folin-Ciocalteu metodu kullanılarak gallik asit üzerinden; flavonoid ve flavonol miktarları ise AlCl₃ ve AlCl₃+Na-asetat metodları ile rutin üzerinden değerlendirilmiş, sonuçlar ve ekstrelerin kuru baz üzerinden % verimleri izelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. *Hypericum* türlerinden elde edilen ekstrelerin kuru drog verimleri, toplam fenolik madde, flavonoid ve flavanol miktarları

Ekstreler	Ekstraksiyon verimi (%)	Toplam fenolik madde miktarı^{1,*}	Toplam Flavonoid miktarı^{1,†}	Toplam Flavanol miktarı^{1,†}
HOC-ME	29.43	278.63 ± 1.25	16.30 ± 0.37	2.58 ± 0.05
HOC-EA	7.27	302.67 ± 1.25	50.04 ± 0.81	6.92 ± 0.83
HOC-SU	21.45	154.52 ± 1.49	2.13 ± 0.36	0.19 ± 0.01
HOY-ME	34.93	172.09 ± 0.72	12.01 ± 0.60	2.02 ± 0.17
HOY-EA	7.49	451.33 ± 4.81	54.77 ± 0.63	7.15 ± 0.03
HOY-SU	23.47	104.91 ± 5.78	1.16 ± 0.45	0.14 ± 0.02
HMC-ME	24.75	199.19 ± 1.86	19.30 ± 0.31	3.31 ± 0.18
HMC-EA	15.51	442.41 ± 6.16	55.30 ± 0.65	7.32 ± 0.11
HMC-SU	28.23	192.22 ± 1.63	1.87 ± 0.30	0.41 ± 0.04
HMY-ME	25.81	336.91 ± 0.59	10.48 ± 0.23	0.96 ± 0.07
HMY-EA	7.29	394.30 ± 0.53	16.00 ± 0.55	1.90 ± 0.01
HMY-SU	23.03	216.03 ± 0.82	2.86 ± 0.21	0.24 ± 0.01
HPC-ME	39.63	319.34 ± 2.46	10.33 ± 0.00	2.51 ± 0.03
HPC-EA	12.19	385.98 ± 1.23	25.37 ± 0.60	5.75 ± 0.04
HPC-SU	27.85	257.78 ± 1.82	4.59 ± 0.15	0.78 ± 0.15
HPY-ME	35.66	328.70 ± 0.99	12.72 ± 0.09	2.82 ± 0.31
HPY-EA	7.82	443.43 ± 2.32	38.48 ± 0.54	7.49 ± 0.23
HPY-SU	25.94	271.91 ± 3.13	6.67 ± 0.41	1.51 ± 0.02

¹ mg/gram ± standart sapma, * gallik asite eşdeğer, † rutine eşdeğer

Çizelge 3.1’de de görüldüğü gibi her üç bitkiden %70 metanol ile hazırlanan ham ekstrelerde toplam fenol miktarlarında oldukça belirgin bir artış gözlenmiştir.

Tez kapsamında çalışılan *Hypericum* türlerinden hazırlanan farklı polaritedeki ekstrelerin çözünen madde miktarları kuru baz üzerinden % olarak hesaplanmıştır. Ekstraksiyon verimleri %7.27 (HOC-EA) ile %39.63 (HPC-ME) arasında değişmektedir. Her üç türün çiçek ve yapraklarına ait metanolik ekstrelerinin diğer ekstrelere oranla daha yüksek ekstre verimine sahip olduğu görülmektedir (Çizelge 3.1). Bu durum metanol ekstrelerindeki polar bileşiklerin varlığı ile ilişkilidir.

Hypericum türlerinin toplam fenol miktarı değişik polaritedeki ekstrelerde tayin edilmiş ve toplam fenol içeriği gallik asit eşdeğeri olarak ifade edilmiştir (mg gallik asit/g ekstre). En yüksek miktarda fenolik madde taşıyan ekstreler, etil asetatlı ekstreler olarak tesbit edilmiştir. Ekstrelerin toplam fenolik madde içerikleri sırasıyla, HOC-EA < HPC-EA < HMY-EA < HMC-EA < HPY-EA < HOY-EA olarak artmaktadır. Sulu ekstrelerin toplam fenol içeriği ise en düşük olarak bulunmuştur. Çizelge 3.1’e göre *H. origanifolium* yapraklarının EA ekstresi 451.33 mg/g, *H. perforatum* yapraklarının EA ekstresi 443.43 mg/g ve *H. montbretti* yapraklarının EA ekstresinin 394.30 mg/g toplam fenolik madde taşıdığı tesbit edilmiştir. Buradan anlaşılacağı üzere, türlerin yaprakları çiçeklerinden daha fazla oranda toplam fenolik madde içermektedir.

Ekstrelerin rutine eşdeğer flavonoid içeriği (mg/g), 1.16-55.33 mg/g arasında değişmektedir. Flavonoidler için en yüksek değerler yine etil asetatlı ekstrelerde tesbit edilmiştir. Ekstrelerin flavonoid miktarları sırasıyla HMY-EA < HPC-EA < HPY-EA < HOC-EA < HOY-EA < HMC-EA olarak artmaktadır. Sulu ekstrelerde toplam fenolik madde içeriği gibi flavonoid içeriği de çok azdır.

Çalışılan *Hypericum* türlerine ait ekstrelerdeki flavonol konsantrasyonları mg/g rutin eşdeğeri olarak ifade edilmiştir ve 0.14-7.49 mg/g arasında değişmektedir. En fazla flavonol içeren ekstreler yine etilasetat ekstreleri olarak tesbit edilmiştir. Ekstrelerdeki flavonol miktarları; HMY-EA < HPC-EA < HOC-EA < HOY-EA <

HMC-EA < HPY-EA olarak artmaktadır. Bu sonuçlar çözücü polaritesine bağlı olarak beklenildiği gibi elde edilmiştir.

3.2. DPPH Üzerinden Serbest Radikal Süpürücü Etki Tayini

Genel olarak, kimyasal maddelerin elektron verme yetenekleri lipid oksidasyona karşı gösterdikleri antioksidan aktivitelerinin sonucudur. DPPH serbest radikal süpürücü etki tayini; hidrojen verme potansiyelinin araştırılması için en kısa, en ucuz yöntemlerden birisidir (Kikuzaki ve ark., 2002).

Doğadaki birçok radikal iyonu değişik kimyasal reaksiyonlarla çeşitli bileşikler tarafından etkisiz hale getirilmektedir. Kararlı bir organik radikal olan DPPH bitki ekstraktları gibi maddelerin antioksidan aktivitesini belirlemede kullanılmaktadır. Son zamanlarda DPPH yöntemi sonuçlarını yorumlamak için etkin konsantrasyon veya EC₅₀ ifadesi (diğer deyimle inhibisyon konsantrasyonu, IC₅₀ değeri) kullanılmaktadır. Bu, DPPH aktivitesinin %50 kaybına neden olan substrat konsantrasyonu olarak tanımlanmıştır (Brand-Williams ve ark., 1995). Dolayısıyla; en düşük IC₅₀ değeri en yüksek antioksidan aktivitenin göstergesidir.

Bu yöntemle *H. origanifolium* ve *H. montbretti*'nin çiçek ve yapraklarının metanollü, etil asetatlı ve sulu ekstraktlarının anti-radikal aktiviteleri DPPH[•] (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) serbest radikali üzerinden Sanchez-Moreno ve arkadaşları (1998) tarafından modifiye edilmiş yöntem kullanılarak tayin edilmiştir. Sonuçlar test edilen konsantrasyonlarda % inhibisyon olarak değerlendirilmiş, *H. perforatum* ve sentetik antioksidan BHT'nin değerleriyle karşılaştırılmıştır. Örneklerin serbest radikal süpürücü etkileri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

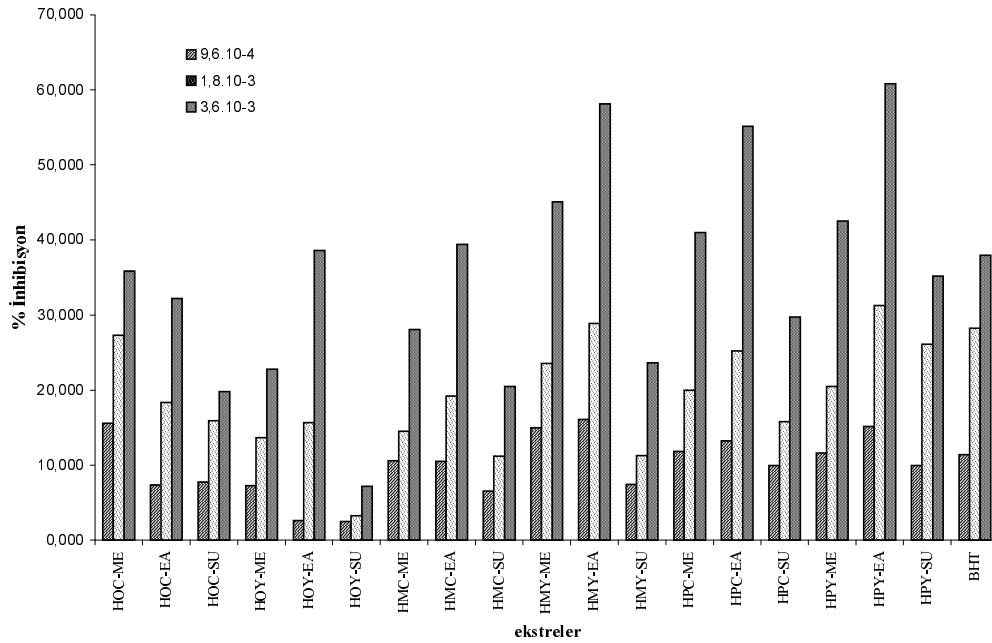
DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki tayininde; test edilen madde konsantrasyonu ile antioksidan aktivitenin doğru orantılı olduğu görülmektedir.

Çizelge 3.2. *Hypericum* türlerinden elde edilen ekstrelerin DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki tayininde % İnhibisyon ve IC₅₀ değerleri

Ekstreler	% İnhibisyon			IC ₅₀
	9.6 x 10 ⁻⁴ *	1.8 x 10 ⁻³ *	3.6 x 10 ⁻³ *	
HOC-ME	15.58 ± 0.20	27.29 ± 0.81	35.85 ± 0.72	4.72 ± 0.47
HOC-EA	7.33 ± 0.94	18.34 ± 0.55	32.19 ± 0.85	5.22 ± 0.84
HOC-SU	7.74 ± 0.41	15.88 ± 0.56	19.81 ± 0.27	9.24 ± 0.90
HOY-ME	7.26 ± 0.47	13.65 ± 0.56	22.76 ± 0.41	6.68 ± 0.49
HOY-EA	2.58 ± 0.62	15.64 ± 0.96	38.60 ± 0.59	3.37 ± 0.26
HOY-SU	2.51 ± 0.96	3.27 ± 0.25	7.15 ± 0.89	13.7 ± 0.88
HMC-ME	10.59 ± 0.94	14.52 ± 0.79	28.05 ± 0.99	5.49 ± 0.22
HMC-EA	10.50 ± 0.28	19.20 ± 0.56	39.39 ± 0.53	3.82 ± 0.02
HMC-SU	6.51 ± 0.70	11.21 ± 0.23	20.48 ± 0.44	7.50 ± 0.36
HMY-ME	14.97 ± 0.96	23.56 ± 0.54	45.05 ± 0.47	3.53 ± 0.07
HMY-EA	16.09 ± 0.85	28.89 ± 0.54	58.14 ± 0.76	2.84 ± 0.07
HMY-SU	7.43 ± 0.54	11.31 ± 0.23	23.63 ± 0.32	6.54 ± 0.07
HPC-ME	11.80 ± 0.97	19.98 ± 0.92	40.97 ± 0.63	3.63 ± 0.01
HPC-EA	13.20 ± 0.81	25.24 ± 0.63	55.15 ± 0.12	2.63 ± 0.01
HPC-SU	9.94 ± 0.28	15.79 ± 0.68	29.73 ± 0.56	4.71 ± 0.04
HPY-ME	11.62 ± 0.11	20.47 ± 0.41	42.54 ± 0.32	3.73 ± 0.07
HPY-EA	15.15 ± 0.65	31.29 ± 0.56	60.82 ± 0.74	2.87 ± 0.12
HPY-SU	9.94 ± 0.85	16.08 ± 0.49	35.19 ± 0.53	5.11 ± 0.22
BHT	11.41 ± 0.58	28.25 ± 0.45	37.97 ± 0.33	4.39 ± 0.43

Sonuçlar ortalama değer ± standart sapma (n=3) olarak verilmiştir.

* ilave edilen ekstre/BHT miktarı (mg/mL)



Şekil 3.1. *Hypericum* türlerinden elde edilen ekstrelerin 3 farklı konsantrasyonda serbest radikal süpürücü etkileri

3.3. β -karoten-linoleik Asit Sisteminde Antioksidan Aktivite Tayini

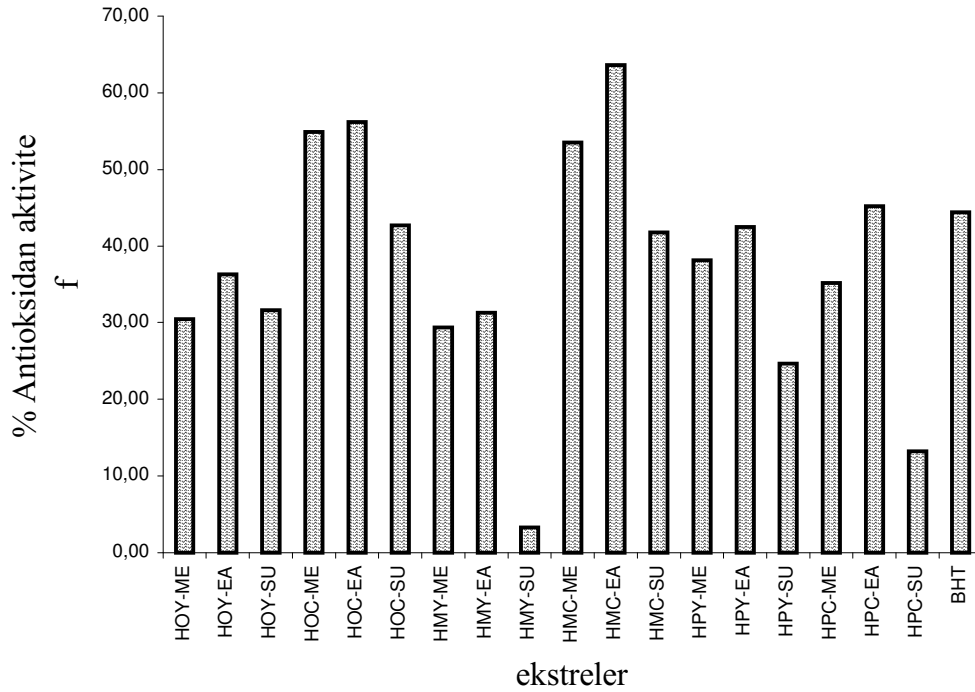
Bu yöntem, emülsiyondaki linoleik asit oksidasyonu sonucu oluşan radikallerin β -karoten'le reaksiyonundan oluşan sarı rengin zaman içerisinde kaybolmasına dayanmaktadır. Antioksidan madde varlığı rengin açılmasını önlemektedir (Kulisic ve ark., 2004). β -karoten-linoleik asit sisteminde test süresi olan 3 saat boyunca β -karotenin solmasının önlenmesi yüksek potansiyel antioksidan aktivitenin varlığını göstermektedir.

Bu yöntemle *H. origanifolium* ve *H. montbretti*'nin çiçek ve yapraklarının metanollü, etil asetatlı ve sulu ekstralarının antioksidan aktiviteleri ölçülmüş ve sonuçlar *H. perforatum* ve sentetik antioksidan olan BHT'nin sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

Hypericum ekstraları β -karoten-linoleik asit sisteminde test edilmiş ve çözücüye bağlı olarak farklı sonuçlar elde edilmiştir. En yüksek % antioksidan

aktivite değerleri etil asetatlı ekstrelerde tesbit edilmiştir. Etil asetatlı ekstrelerde saptanmış % antioksidan aktivite değerleri HMY < HOY < HPY < BHT < HPC < HOC < HMC olarak artmaktadır. Metanollü ekstrelerde görülen antioksidan aktivite sulu ekstrelere göre daha çok fakat etil asetatlı olanlara göre ise daha azdır, HMY < HOY < HPC < HPY < BHT < HMC < HOC. Sulu ekstrelerde antioksidan aktivite HMY < HPC < HPY < HOY < HMC < HOC < BHT şeklinde artmaktadır.

Çizelge 3.3'de gösterildiği gibi, genel olarak bu üç *Hypericum* türünde de çiçeklerde görülen antioksidan aktivite yapraklara göre daha fazladır. Ayrıca, bu üç türün de çiçeklerinin etil asetatlı ekstrelerinin antioksidan aktivitesi sentetik antioksidan BHT'den daha fazla olduğu tesbit edilmiştir.



şekil 3.2. β -karoten-linoleik asit sisteminde *Hypericum* türlerine ait ekstrelerin antioksidan aktiviteleri

Çizelge 3.3. *Hypericum* ekstrelerinin β -karoten-linoleik asit sisteminde % antioksidan aktivite değerleri

Ekstreler	AA (%)¹
HOC-ME	54.86 ± 0.88
HOC-EA	56.17 ± 0.64
HOC-SU	42.67 ± 0.78
HOY-ME	30.48 ± 0.56
HOY-EA	36.30 ± 0.50
HOY-SU	31.62 ± 0.92
HMC-ME	53.56 ± 0.34
HMC-EA	63.58 ± 0.35
HMC-SU	41.80 ± 0.46
HMY-ME	29.39 ± 0.22
HMY-EA	31.35 ± 0.32
HMY-SU	3.27 ± 0.41
HPC-ME	35.20 ± 0.29
HPC-EA	45.22 ± 0.12
HPC-SU	13.26 ± 0.34
HPY-ME	38.18 ± 0.38
HPY-EA	42.51 ± 0.35
HPY-SU	24.64 ± 0.28
BHT	44.40 ± 0.56
kontrol	1.84 ± 0.05

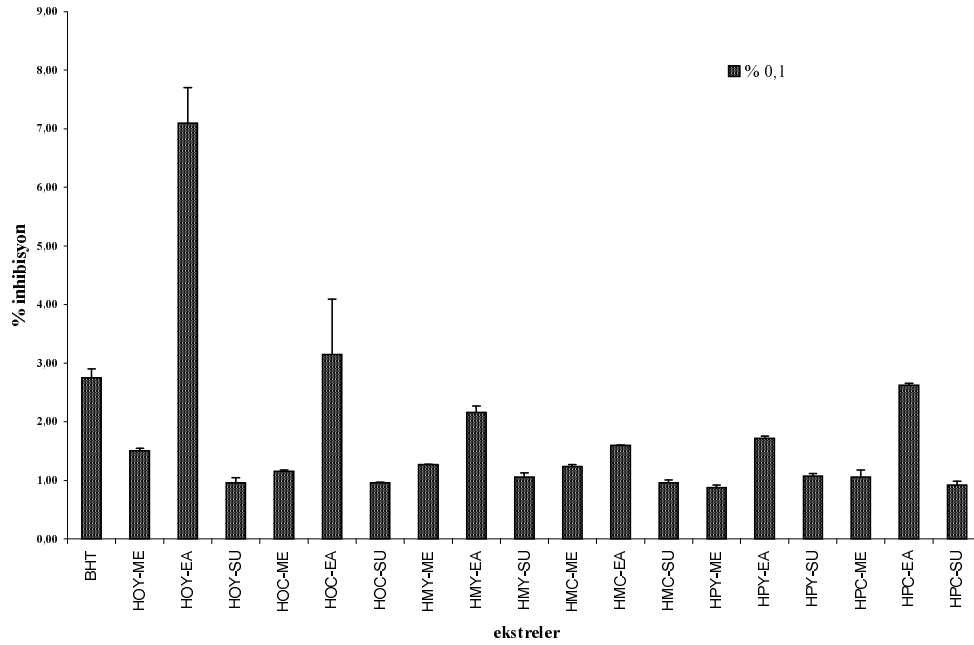
¹% İnhibisyon = $100 \times [1 - (A_s^0 - A_s^{180}) / (A_k^0 - A_k^{180})]$

²Sonuçlar ortalama değer ± standart sapma (n=3) olarak verilmiştir.

3.4. Ransimat Yöntemi ile Lipid Peroksidasyonunu İnhibe Edici Etki

Ransimat yöntemi genellikle çeşitli antioksidanların antioksidan aktivitelerini değerlendirmede kullanılan ve lipid peroksidasyonu boyunca oluşan küçük moleküllerin elektrik iletkenliği artışına dayanan bir yöntemdir (Chen ve Ho, 1997).

BHT ve bu çalışmada elde edilen ekstrelerin lipid peroksidasyonuna karşı etkileri yağlarda bulunan doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan bozunma ürünlerinin su içine absorbe edilerek suyun iletkenliğinin değişmesi presibine göre çalışan Ransimat cihazı ile test edilmiştir.



Şekil 3.3. Ransimat yöntemi ile zeytin yağının peroksidasyonu üzerine *Hypericum* türlerinden elde edilen ekstrelerin etkisi

Çizelge 3.4. %0.1 konsantrasyonda zeytin yağına ilave edilen *Hypericum* türlerine ait ekstrelerin Ransimat yöntemi ile ölçülen bozunma indisleri

Uygulama	Bozunma İndisi ^{1,2}
	% 0.1
Zeytin yağı + HOY-ME	1.50 ± 0.04
Zeytin yağı + HOY-EA	7.10 ± 0.60
Zeytin yağı + HOY-SU	0.96 ± 0.09
Zeytin yağı + HOC-ME	1.15 ± 0.03
Zeytin yağı + HOC-EA	3.14 ± 0.95
Zeytin yağı + HOC-SU	0.96 ± 0.01
Zeytin yağı + HMY-ME	1.27 ± 0.01
Zeytin yağı + HMY-EA	2.16 ± 0.11
Zeytin yağı + HMY-SU	1.05 ± 0.07
Zeytin yağı + HMC-ME	1.24 ± 0.03
Zeytin yağı + HMC-EA	1.60 ± 0.00
Zeytin yağı + HMC-SU	0.96 ± 0.05
Zeytin yağı + HPY-ME	0.87 ± 0.05
Zeytin yağı + HPY-EA	1.72 ± 0.03
Zeytin yağı + HPY-SU	1.07 ± 0.04
Zeytin yağı + HPC-ME	1.05 ± 0.12
Zeytin yağı + HPC-EA	2.62 ± 0.03
Zeytin yağı + HPC-SU	0.92 ± 0.07
Zeytin yağı + BHT	2.74 ± 0.15

¹Bozunma indisi: zeytin yağı + örnek bozulma zamanı/zeytin yağı bozunma zamanı

² Sonuçlar ortalama değer \pm standart sapma (n=3) olarak verilmiştir.

H. origanifolium'un yapraklarının ve çiçeklerinin etilasetat ekstrelerinin Ransimat metoduna göre lipid peroksidasyonunu sentetik antioksidan BHT'den ve çalışılan diğer türlerden daha fazla inhibe ettiği tesbit edilmiştir (izelge 3.4). Diğer türlere ait ekstrelerin ise BHT'den daha az inhibisyon gösterdikleri grlmştr.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitkiler, yüksek oranda içerdikleri çok çeşitli kimyasal maddeler nedeniyle günümüzde hala ilaç, parfümeri-kozmetik ve gıda endüstrileri için primer bir kaynak durumundadır. Çok boyutluluğu nedeniyle antioksidan aktivite, bitkiler açısından bu üç büyük endüstri kolu çok merkezi bir konum oluşturmaktadır. Canlı organizmalarda çeşitli oksidatif süreçlerin kanser, şeker hastalığı, karaciğer yetmezliği, kalp-damar hastalıkları, otoimmün hastalıklar, hematolojik bozukluklar, multiple skleroz, artrit, katarakt, nörodejeneratif hastalıklar, yaşlanma gibi çeşitli fizyopatolojik olaylarda rol oynadığının anlaşılmasından sonra (Murphy ve Kehrer, 1986; Bast ve Goris, 1989; Jenner, 1991; Tsao ve Deng, 2004; Halliwell, 2002), antioksidan bileşiklere ve özellikle de doğal olanlarına karşı ilgi artmış bulunmaktadır. Bu fizyopatolojik olaylardan yaşlanma parfümeri-kozmetik endüstrisini de yakından ilgilendirmektedir, çünkü canlı vücutta fazla oluşan serbest radikaller ve oksidatif ürünler yaşlanma sürecini hızlandırmaktadır (Giacomoni ve Rein, 2004). Bu olayı yavaşlatmak üzere kullanılan “anti-aging” etkili preparatlar aslında antioksidan ve/veya antiradikal etkilidir.

Antioksidan etkili maddeler oksidatif bozulmayı önlediğinden ilaç, parfümeri-kozmetik ve gıda endüstrilerinde prezervatif madde olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır. Bu alanda da tercihler hızla doğal antioksidanlar tarafına kaymaktadır, çünkü katkı maddesi olarak adı geçen bu endüstri ürünleri ile vücuda giren sentetik antioksidan maddelerin çok çeşitli toksik etkileri olduğu anlaşılmıştır (Smith, 1984; Ito ve ark., 1985; Sun ve Fukuhara, 1997). Prezervatif bir katkı maddesi olarak antioksidan özellikler taşıyan bitkilerin kullanımı toksik etkilerin ortaya çıkmamasına, hatta ilaç, parfümeri-kozmetik ve gıda ürünlerini kullanan tüketicilerin vücudunda çeşitli yararlar sağlanmasına yol açabilecek olumlu bir uygulama olarak karşımıza çıkmaktadır.

Yukarıda belirtilen nedenlerden ötürü, antioksidan ve antiradikal etkili bitkiler son yıllarda yoğun biçimde araştırılmaktadır. Araştırılan çok sayıda bitki arasında özellikle *Hypericum perforatum* dikkat çekmektedir (Zheng ve Wang, 2001; Hunt ve

ark., 2001; Singh ve ark., 2002; Benedi ve ark., 2004; Silva ve ark., 2005). Ülkemizde yetişmekte olan diğer *Hypericum* türleri hem antioksidan/antiradikal etkiler hem de diğer biyolojik etkileri açısından çok az sayıda araştırmaya konu olabilmışlardır.

Bu çalışmada iki *Hypericum* türünün (*H. montbretii* ve *H. origanifolium*) kurutulmuş çiçek ve yapraklarının farklı polaritedeki ekstralarının antioksidan ve serbest radikal süpürücü etkileri, toplam fenol miktarı, flavonoid ve flavonol içeriği ve lipid peroksidasyonu inhibe edici etkileri araştırılmıştır. Bu testler için DPPH yöntemi, Ransimat ve β -karoten-linoleik asit tayinleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar bu türün çok çalışılan örneği olan *H. perforatum* ve sentetik antioksidan BHT sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

Gözlemler sırasında en çok toplam fenolik madde miktarı *H. origanifolium* yapraklarının etil asetatlı ekstralarında ve *H. montbretii* çiçeklerinin de etil asetatlı ekstralarında tesbit edilmiştir. Buna paralel olarak bu örneklerin flavonoid ve flavonol miktarları da yüksek tesbit edilmiştir. Bu değerler *H. perforatum*'un değerlerinden yüksektir.

Serbest radikal süpürücü kapasite tayininde en yüksek aktivite her üç konsantrasyonda da *H. perforatum* yapraklarının etil asetatlı ekstralarında görülmüştür. Daha sonra *H. montbretii* yapraklarının etil asetatlı ekstraları, *H. perforatum* çiçeklerinin etil asetatlı ekstraları ve *H. montbretii* yapraklarının metanollü ekstraları ve *H. perforatum* yapraklarının metanollü ekstralarında görülmüştür. Bütün bu değerler BHT'nin farklı polaritede hazırlanan ekstralarında görülen değerlerden önemli derecede yüksektir. En az etki bitkilerin sulu ekstralarında tesbit edilmiştir.

β -karoten-linoleik asit sisteminde değerler toplam fenolik madde içeriğine paralel olarak elde edilmiştir. En yüksek fenolik madde içeren HMC-EA ve HOC-EA ekstralarında yüksek aktivite görülmüştür ve bu değerler BHT'nin değerlerinden yüksektir. Ayrıca, HOC-ME ve HMC-ME değerleri deney sırasında BHT'den daha yüksek bulunmuş ve bu da etkinin daha yüksek olduğunu göstermiştir.

Ransimat metodu ile lipid peroksidasyonu inhibe edici etki sisteme HOY-EA katıldığında BHT'den en az 3 kez, HOC-EA'da ise 1.5 kez daha kuvvetli olmuş ve yağların bozulmasını daha uzun süre için geciktirmiştir. Ayrıca, bu deneyde HPC-EA ve HMY-EA da BHT'ye yakın derecede etki göstermiştir.

Tüm bu sonuçlar özellikle *H. origanifolium* ve *H. montbretii* türlerinin belirgin antioksidan aktivitelerinin olduğunu ve yukarıda belirtilen kullanım alanları açısından bir kaynak oluşturabileceğini açıkça ortaya koymaktadır. Ancak, bu konuda daha kesin bir yargıya varmak için daha başka çalışmalara da gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

ANTOLOVICH, M., PRENZLER, P.D., PATSALIDES, E., McDONALD, S. and ROBARDS, K., *Methods for Testing Antioxidant Activity, Analyst*, **127**, 183-198, 2002.

BALASUNDRAM, N., SUNDRAM, K. and SAMMAN, S., *Phenolic Compounds in Plant and Agri-Industrial By-Products: Antioxidant Activity, Occurrence, and Potential Uses, Food Chem.*, **99**, 191-203, 2006.

BAST, A. and GORIS, R.J., *Oxidative stress. Biochemistry and human disease, Pharm. Weekbl. Sci.*, **15**, 11, 199-206, 1989.

BAYTOP, T., *Türkiyede Bitkilerle Tedavi, Geçmişte ve Bugün, İstanbul Üniversitesi Yayınları*, No: 3255, 185-186, 1984.

BECKMAN, K.B. and AMES, B.N., *The Free Radical Theory of Aging Matures, Physiol. Rev.*, **78**, 547-581, 1998.

BENEDI, J., ARROYO, R., ROMERO, C., MARTIN-ARAGON, S. and VILLAR, A.M., *Antioxidant Properties and Protective Effects of a Standardized Extract of Hypericum perforatum on Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Damage in PC12 Cells, Life Sci.*, **75**, 1263-1276, 2004.

BONDET, V., BRAND-WILLIAMS, W. and BERSET, C., *Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity Using the DPPH Free Radical Method, Lebens.-Wiss. u.-Technol.*, **30**, 609-615, 1997.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E. and BERSET, C., *Use of Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity, Lebensm. Wiss. Technol.*, **28**, 25-30, 1995.

CAKİR, A., MAVİ, A., YILDIRIM, A., DURU, M.E., HARMANDAR, M. and KAZAZ, C., *Isolation and Characterization of Antioxidant Phenolic Compounds from the Aerial Parts of Hypericum hyssopifolium L. by activity-guided fractionation*, *J. Ethnopharm.*, **87**, 73-83, 2003.

CAO, G. and PRIOR, R.L., *Measurement of Total Antioxidant Capacity of Oxidant Stress In Vivo*, *Handbook of Antioxidants*, 2nd Ed., Ed. by Cadenas, E. and Packer, L., University of Southern California School of Pharmacy, USA, 2002.

CHEN, J.H. and HO, C.-T., *Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds*, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 2374-2378, 1997.

CHUNG, Y.-C., CHEN, S.-J., HSU, C.-K., CHANG, C.-T. and CHOU, S.-T., *Studies on the Antioxidative Activity of Graptopetalum paraguayense E.Walther*, *Food Chem.*, **91**, 419-424, 2005.

COŞKUN, T., *Fonksiyonel Besinlerin Sağlığımız Üzerine Etkileri, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, **48**, 69-84, 2005.

COULADIS, M., BAZIOU, P., VERYKOKIDOU, E. and LOUKIS, A., *Antioxidant Activity of Polyphenols from Hypericum triquetrifolium Turra*, *Phytother. Res.*, **16**, 769-770, 2002.

DAVIS, P.H., *Flora of Turkey and Eastern Islands*, **2**, 355-401, 1967.

ERKEN, S., MALYER, H., DEMIRCI, F., DEMIRCI, B. and BAŞER, K.H.C., *Chemical Investigations of Some Hypericum Species Growing in Turkey I*, *Chem. Nat. Comp.*, **37**, 434-438, 2001.

FRANKEL, E.N., *Natural Phenolic Antioxidants and Their Impact on Health, Antioxidant Food Supplements in Human Health*, Ed. by Packer, L., Hiramatsu, M. and Yoshikawa, T., Academic Press, USA, 1999.

FRANKEL, E.N. and MEYER, A.S., *The Problems of Using One-Dimensional Methods to Evaluate Multifunctional Food and Biological Antioxidants*, *J. Sci. Food Agric.*, **80**, 1925-1941, 2000.

FOLIN, O. and CIOCALTEU, V., *On tyrosine and Tryptophane Determinations in Proteins*, *J. Biol. Chem.*, **73**, 627-50, 1928.

FUHRMAN, B. and AVIRAM, M., *Polyphenols and Flavonoids Protect LDL Against Atherogenic Modification*, *Handbook of Antioxidants*, 2nd Ed., Ed. by Cadenas, E. and Packer, L., University of Southern California School of Pharmacy, USA, 2002.

GIACOMONI, P.U. and REIN, G., *A Mechanistic Model for the Aging of Human Skin*, *Micron*, **35**, 179-184, 2004.

HALLIWELL, B., *Food-Derived Antioxidants: How to Evaluate Their Importance in Food and In Vivo*, *Handbook of Antioxidants*, 2nd Ed., Ed. by Cadenas, E. and Packer, L., University of Southern California School of Pharmacy, USA, 2002.

HOLLMAN, P.C.H. and KATAN, M.B., *Absorption, Metabolism, and Bioavailability of Flavonoids*, *Flavonoids in Health and Disease*, Ed. by Rice-Evans, C.A. and Packer, L., Marcell Decker Inc., USA, 1998.

HUNT, E.J., LESTER, C.E., LESTER, E.A. and TACKETT, R.L., *Effects of St. John's Wort on Free Radical Production*, *Life Sci.*, **69**, 181-190, 2001.

ITO, N., FUKUSHIMA, S. and TSUDA, H., *Carcinogenicity and Modification of Carcinogenic Response by BHA, BHT and other Antioxidants*, Crit. Rev. Toxicol., **15**, 109-150, 1985.

JACQUEZ, P.F., CHYLAC, L.T. and TAYLOR, A., *Relationships between Natural Antioxidants and Cataract Formation, Natural Antioxidants in Human Health and Disease*, Ed. by Frei, B., Harvard School of Public Health, USA, 1994.

JENNER, P., *Oxidative Stress as a Cause of Parkinson's Disease*, Acta Neurol. Scand., **136**(Suppl), 6-15, 1991.

KHAN, M.H. and SHAHIDI, F., *Effects of Natural and Synthetic Antioxidants on the Oxidative Stability of Borage and Evening Primrose Triacylglycerols*, Food Chem., **75**, 421-437, 2001.

KIKUZAKI, H., HISAMOTO, M., HIROSE, K., AKIYAMA, K. and TANIGUCHI, H., *Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Related Compounds*, J. Agric. Food Chem., **50**, 2161-68, 2002.

KITANOV, G.M. and NEDIALKOV, P.T., *Mangiferin and Isomangiferin in Some Hypericum Species*, Biochem. Syst. Ecol., **26**, 647-653, 1998.

KOLEVA, I.I., van BEEK, R.A., LINSSEN, J.P.H., de GROOT, A. and EVSTATIEVA, L.N., *Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparison Study on Three Testing Methods*, Phytochem. Anal., **13**, 8-17, 2002.

KOWALSKI, B., RATUSZ, K., KOWALSKA, D. and BEKAS, W., *Determination of the Oxidative Stability of Vegetable Oils by Differential Scanning Calorimetry and Rancimat measurements*, Eur. J. Lipid Sci. Technol., **106**, 165-169, 2004.

KULISIC, T., RADONIC, A., KATALINIC, V. and MILOS, M., *Use of Different Methods for Testing Antioxidative Activity of Oregano Essential Oils*, *Food Chem.*, **85**, 633-640, 2004.

MACHEIX, JJ. and FLEURIET, A., *Phenolic Acids in Fruits, Flavonoids in Health and Disease*, Ed. by Rice-Evans, C.A. and Packer, L., Marcell Decker Inc., USA, 1998.

MATHIS, C. and OURISSON, G., *Chemo-Taxonomic Study of the Genus Hypericum. III. The Distribution of Saturated Hydrocarbons and Monoterpenes from the Essential oil of Hypericum*, *Phytochem.*, **3**, 133-141, 1964.

MAZZA, G. and OOMAH, B.D., *Chemistry, Pharmacology and Clinical Applications of St. John's Wort and Ginkgo Biloba; Herbs, Botanicals, and Teas*, Ed. by Mazza, G. and Oomah, B.D., CRC Press, Canada, 1998.

MILAUSKAS, G., VENSKUTONIS, P.R. and van BEEK, T.A., *Screening of Radical Scavenging Activity of Some Medicinal and Aromatic Plant Extracts*, *Food Chem.*, **85**, 231-237, 2004.

MILLER, H.E., RIGELHOF, F., MARQUART, L., PRAKASH, A. and KANTER, M., *Antioxidant Content of Whole Grain Breakfast Cereals, Fruits and Vegetables*, *J. Am. Coll. Nutr.*, **19**, 312S-319S, 2000.

MOLYNEX, P., *The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity*, *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, **26(2)**, 211-219, 2004.

MOURE, A., CRUZ, J.M., FRANCO, D., DOMINGUEZ, J.M., SINEIRO, J., DOMINGUEZ, H., HUNEZ, M.J. and PARAJO, J.C., *Natural Antioxidants from Residual Sources, Food Chem.*, **72**, 145-171, 2001.

MURPHY, M.E. and KEHRER, J.P., *Free Radicals: a Potential Pathogenic Mechanism in Inherited Muscular Dystrophy, Life Sci.*, **39**, 2271-2278, 1986.

NISHINO, H., *Cancer Prevention by Natural Carotenoids, Antioxidant Food Supplements in Human Health*, Ed. by Packer, L., Hiramatsu, M. and Yoshikawa, T., Academic Press, USA, 1999.

ÖZTÜRK, Y., *Testing the Antidepressant Effects of Hypericum Species on Animal Models, Pharmacopsychiatry*, **30**, 125-128, 1997.

PACKER, L., HIRAMATSU, M. and YOSHIKAWA, T., *Antioxidant Food Supplements in Human Health*, Academic Press, USA, 1999.

PINHO, O., FERREIRA, I.M.P.L.V.O., OLIVEIRA, M.B.P.P. and FERREIRA, M.A., *Quantification of Synthetic Phenolic Antioxidants in Liver Pâtés, Food Chem.*, **68**, 353-357, 2000.

POTOĞLU-ERKARA, İ. and TOKUR, S., *Morphological and Anatomical Investigations on Some Hypericum L. Species Growing Naturally in and Around Eskisehir, Trakya Univ. J. Sci.*, **5(2)**, 97-105, 2004.

PRATT, D.E., *Natural Antioxidants from Natural Material in Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II*. Ed. Huang, M.T., Ho, C.T., Lee, C.Y. ACS, Washington, pp. 54-71, 1992.

PRYOR, W.A., *Free Radicals and Lipid Peroxidation: What They Are and How They Got That Way, Natural Antioxidants in Human Health and Disease*, Ed. by Frei, B., Harvard School of Public Health, USA, 1994.

RICE-EVANS, C.A., DIPLOCK, A.T. and SYMONS, M.C.R., *Techniques in Free Radical Research, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Ed. by Burdon, R.N. and van Knippenberg, P.H., Vol. **22**, Elsevier, Amsterdam, 1991.

RICE-EVANS, C.A., *Screening of Phenolic and Flavonoids for Antioxidant Activity, Antioxidant Food Supplements in Human Health*, Ed. by Packer, L., Hiramatsu, M. and Yoshikawa, T., Academic Press, USA, 1999.

RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J. and PAGANDA, G., *Antioxidant Properties of Phenolic Compounds, Trends Plant Sci.*, **2**, 152-159, 1997.

ROBSON, N.K.B., *Hypericum L.-In Flora of Turkey and the East Aegan Islands* (eds. Davis P.H., Mill R.R. & Tan K.), **10: 96**, Edinburg University Press, 1988.

SAKAR, M.K., EZER, N. and ENGELSHOWE, R., *Constituents of Hypericum montbretii, Int. J. Pharmacog.*, **29**, 228-230. 1991.

SAKAR, M.K. and TAMER, A.U., *Antimicrobial Activity of Different Extracts from Some Hypericum Species, Fitoterapia*, **61**, 464-466, 1990.

SAKAR, M.K., TAMER, A.U. and TOKUR, S., *Antimicrobial Activities of Some Hypericum Species Growing in Turkey, Fitoterapia*, **59**, 49-52, 1988.

SAMMAN, S., WALL, P.M.L. and COOK, N.C., *Flavonoids and Coronary Heart Disease: Dietary Perspectives, Flavonoids in Health and Disease*, Ed. by Rice-Evans, C.A. and Packer, L., Marcell Decker Inc., USA, 1998.

SANCHEZ-MORENO, C., LARRAURI, J.A. and SAURA-CALIXTO, F., *Free Radical Scavenging Capacity of Selected Red, Rose and White Wines*, *J. Sci. Food Agric.*, **79**, 1301-1304, 1999.

SANCHEZ-MORENO, C., LARRAURI, J. and SAURA-CALIXTO, F., *A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols*, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **76**, 270-276, 1998.

SINGH, A., NAIDU, P.S., GUPTA, S. and KULKARNI, S.K., *Effect of Natural and Synthetic Antioxidants in a Mouse Model of Chronic Fatigue Syndrome*, *J. Med. Food.*, **5**, 211-220, 2002.

SILVA, B.A., FERRERES, F., MALVA, J.O. and DIAS, A.C.P., *Phytochemical and Antioxidant Characterization of Hypericum perforatum alcoholic extracts*, *Food Chem.*, **90**, 157-167, 2005.

SHAHIDI, F., *Antioxidants in Foods and Food Antioxidants*, *Nahrung*, **44**, 158-163, 2000.

SHAHIDI, F. and NACZK, M., *Food Phenolics*, A Technomic Publication, USA, 1995.

SMITH, L.J., *Lung Damage Induced by Butylated Hydroxytoluene in Mice, Biochemical, Cellular, and Morphologic Characterization*, *Am. Rev. Respir. Dis.*, **130**, 895-904, 1984.

SUN, B. and FUKUHARA, M., *Effects of Co-Administration of Butylated Hydroxytoluene, Butylated Hydroxyanisole and Flavonoids on the Activation of Mutagens and Drug-Metabolizing Enzymes in Mice*, *Toxicology*, **122**, 61-72, 1997.

TRANTAPHYLLOU, K., BLEKAS, G. and BOSKOU, D., *Antioxidative Properties of Water Extracts Obtained from Herbs of the Species Lamiaceae*, *Intern. J. Food Sci. Nutr.*, **52**, 313-317, 2001.

TSAO, R., and DENG, Z., *Separation Procedures for Naturally Occuring Antioxidant Phytochemicals*, *J. Chromatogr. B*, **812**, 85-99, 2004.

VALENTAO, P., FERNANDES, E., CARVALHO, F., ANDRADE, P. B., SEABRA, R.M. and BASTOS, M.L., *Antioxidant Activity of Hypericum androsaemum Infusion: Scavenging Activity Against Superoxide Radical, Hydroxyl Radical and Hypochlorous Acid*, *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1320-1323, 2002.

WETTASINGHE, M. and SHAHIDI, F., *Antioxidant and Free Radical-Scavenging Properties of Ethanolic Extracts of Defatted Borage (Borago officinalis L.) Seeds*, *Food Chem.*, **67**, 399-414, 1999.

ZHENG, W. and WANG, S.Y., *Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs*, *J. Agric. Food. Chem.*, **49**, 5165-5170, 2001.