

***Pelargonium quercetorum* Agnew. bitkisinin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi**

Gökçe Şeker Karatoprak¹, Mehmet Fırat², Müberra Koşar³

¹Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Farmakognozi AD., Kayseri

²Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Eğitim Fakültesi Biyoloji Bölümü, Tuşba, Van

³Doğu Akdeniz Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi AD., Gazimağusa, KKTC

Öz

Amaç: Antiparaziter olarak geleneksel kullanımı mevcut olan Geraniaceae familyasına dahil *Pelargonium quercetorum* Agnew.'in toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır. **Yöntem:** *P. quercetorum*'un toprak altı kısımlarından hazırlanan %70 metanol ve %11 etanol ekstraktları ile toprak üstü kısmından hazırlanan %70 metanol ekstraktının toplam fenolik, flavonoit ve flavonol içerikleri spektrofotometrik olarak incelenmiştir. Ekstrelerin antioksidan aktivitelerini belirlemek amacıyla 1.1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH[•]) ve 2.2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6- sulfonik asit) (ABTS^{•+}) radikal süpürücü etkileri, Fe(III)'ü Fe(II)'ye indirgeme özellikleri ve demir(II) şelat (kelat) aktiviteleri incelenmiştir. **Bulgular ve Sonuç:** %70 Metanol kök ekstraktının toplam fenolik ve flavonoit (242.29 ± 5.52 mg_{GAE}/g_{ekstre}, 64.95 ± 2.93 mg_{CA}/g_{ekstre}) içerik bakımından zengin olduğu ve antioksidan aktivite deneylerinde de güçlü etki gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Geraniaceae, *Pelargonium quercetorum*, antioksidan aktivite

Determination of antioxidant activity of *Pelargonium quercetorum* Agnew.

Abstract

Aim: It is aimed to investigate the total amount of phenolic substances and antioxidant activity of *Pelargonium quercetorum* Agnew., belongs to the Geraniaceae family, which is traditionally used as antiparasitic. **Method:** The total phenolic, flavonoid and flavonol contents of 70% methanol and 11% ethanol extract prepared from the underground parts of *P. quercetorum* and 70% methanol extract prepared from the aerial parts were investigated spectrophotometrically.

Yazının geliş tarihi: 26.02.2018

Yazının kabul tarihi: 03.05.2018

Sorumlu yazar: Gökçe Şeker Karatoprak, Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye, Tlf: 0352 438 04 86/28176, E-posta: gskaratoprak@gmail.com

Not: Bu araştırma, 2014 Yılında, Nevşehir'de Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı'nda poster olarak sunulmuştur

In order to determine the antioxidant activities of all extracts 1.1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH•), 2.2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS••) radical scavenging activity, reduction properties to Fe (III) to Fe (II) and iron(II) chelate formation were evaluated. **Results and Conclusion:** It was determined that the 70% methanol root extract was rich in total phenolics and flavonoids ($242.29 \pm 5.52 \text{ mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{extract}}$, $64.95 \pm 2.93 \text{ mg}_{\text{CA}}/\text{g}_{\text{extract}}$) and showed a strong effect in antioxidant activity assays as well.

Keywords: Geraniaceae, *Pelargonium quercetorum*, antioxidant activity

Giriş

Günümüzde doğal kaynaklı fenolik antioksidanlara olan yoğun ilginin sebebi sadece oksidatif hasarın sebep olduğu çeşitli hastalıklara karşı koruyucu ve tedavi edici özelliklerine değil aynı zamanda gıda ürünlerinin ömrünü uzatmalarına da bağlanmıştır.¹ Bitkiler serbest radikal süpürücü etkili flavonoidler, antosiyaninler, karotenoitler, vitaminler ve endojen metabolitler gibi çok çeşitli bileşikler içerir. Bitkisel kaynaklı antioksidanlar singlet ve triplet oksijen radikali süpürülmesinde, peroksit dekompozisyonunda ve enzim inhibisyonu ve indüksiyonunda görev alırlar.²

Oksijen molekülü gibi elektron alıcı moleküller kolaylıkla serbest radikallerle reaksiyona girerek reaktif oksijen türlerine (ROS) dönüşürler. Serbest radikallerin biomoleküllerde (lipit, protein ve nükleik asit) oksidatif hasarı indüklediği ve sonuçta insanda ateroskleroz, yaşlanma, kanser, diabet, enflamasyon, AIDS ve çeşitli

dejeneratif hastalıklara sebep olduğu kanıtlanmıştır.³⁻⁷

Geraniaceae familyası yeryüzünde 11 cins ve 750 türle, Türkiye'de ise *Biebersteina*, *Geranium*, *Erodium* ve *Pelargonium* olmak üzere dört cins ve toplam 62 tür ile temsil edilmektedir.^{8,9} Bu familyanın en önemli cinsi olan *Pelargonium*'ların Türkiye bitki örtüsünde iki türü kayıtlıdır. *Pelargonium quercetorum* Agnew.'de bu türlerden biridir (Fotoğraf 1). Takson genel olarak Kuzey Irak'ta yayılış gösterirken Türkiye'de Hakkâri ilinde yayılış göstermektedir. Yörede bahar aylarında popüler olan bu bitki Tolik ya da Tolik olarak bilinir. Yüksek rakımları ve nemi seven bu bitkinin aynı zamanda Kari (*Arum elongatum* Stev.) bitkisine benzer özellikleri bulunmaktadır. Yöre halkı tarafından önem verilen bu bitkinin yörede aynı zamanda ticari bir değeri de bulunmaktadır. Yöre halkı bu bitkiyi tıbbi amaçla kullanmanın yanı sıra gıda amaçlı olarak da kullanmaktadır.^{10,11}



Fotoğraf 1. *Pelargonium quercetorum* Agnew. bitkisi

P. quercetorum'un İran, Kürdistan bölgesinde antiparaziter olarak geleneksel kullanımı mevcuttur.¹² *P. quercetorum* ülkemizde ise boğaz rahatsızlıklarını ve cilt yaralarını tedavi etmek amacıyla ayrıca tohumları ve yaprakları çibaneleri patlatmak için kullanılmaktadır. Kurt düşürücü olarak etkili olan ve bu özelliğiyle çok önemsenen bu bitkinin aynı zamanda kronik baş ağrıları, boyun ağrıları ve migren için de kullanıldığı belirtilmiştir.¹¹

Pelargonium türlerinin önemi, Güney Afrika'da geleneksel ilaç olarak kullanılan *P. reniforme* Curt. ve *P. sidoides* DC. ile belgelenmiştir. Günümüzde *P. sidoides*'in standardize %11 etanolik ekstresi, EPs® 7630, kulak, burun ve boğaz hastalıkları ile birlikte solunum sistemi enfeksiyonlarının tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.¹³

Yapılan kaynak taramalarında ülkemizde doğal olarak yetişen *P. quercetorum* kökleri ve toprak üstü kısımları ile yapılan ayrıntılı aktivite çalışmalarına rastlanamamıştır. Bu yüzden çalışmanın amacı, Hakkâri ilinden toplanan *P. quercetorum*'un toprak üstü kısımlarından ve köklerinden hazırlanan ekstrelerin içeriklerini taşıdıkları toplam fenol, flavonoit ve flavonol miktarları üzerinden belirlemek ve bu ekstrelerin, demir (III)'ü indirgeme kapasitelerini, ABTS⁺ ve DPPH radikali süpürücü etkilerini ve demir (II) şelat aktivitelerini belirlemektir.

Yöntem

Bitkisel materyal

P. quercetorum 2014 yılı Mayıs ayında Hakkâri ilinden toplanmıştır ve herbaryum örneği Hacettepe Üniversitesi Herbaryum'unda (HUB 30648) muhafaza edilmektedir.

Ekstrelerin hazırlanışı

Ticari olarak kullanılan *P. sidoides*'in standardize ekstresinin (EPs® 7630) bitkinin toprak altı kısımlarından %11 etanol ile hazırlanması sebebiyle çalışmamızda *P. quercetorum* toprak altı kısımlarından %11 etanol ekstresi

hazırlanmıştır. Ayrıca karşılaştırma amaçlı olarak hem aglikon hem de glikozit olarak bulunan fenolik bileşiklerin ekstraksiyon yöntemi olan %70 metanol ekstraksiyonu ile de ekstreler hem toprak altı hem de toprak üstü kısımlarından hazırlanmıştır. Bitkisel materyallerin kurutulmuş toprak altı kısımları kabaca toz haline getirilerek, 87 g kök kısmı 500 mL %11'lik etanol ve 87 g kök kısmı 500 mL %70'lik metanol ile çalkalamalı su banyosunda 37 °C'de 8'er saat süreyle üç kez ekstre edilerek hazırlandı. Elde edilen ekstreler birleştirilip vakum altında rotavaporda (40 °C) yoğunlaştırıldı. Bitkisel materyalin 62 g toprak üstü kısmı 500 mL %70'lik metanol ile aynı şekilde ekstre edilerek rotavaporda yoğunlaştırıldı. Tüm ekstreler liyofilize edildi ve analiz anına kadar -20 °C'de saklandı. Ekstreler çalışılmadan önce %11 etanol ve %70 metanolde çözülerek stok çözelti olarak hazırlanmışlardır.

Toplam fenol, toplam flavonoit ve toplam flavonol miktar tayini

Ekstrelerin içerdikleri toplam fenol miktarı gallik asite eşdeğer olarak Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak hesaplandı.¹⁴ 6 mL distile su içeren 10 mL'lik kap içerisine 100 µL örnek çözeltisi ve 500 µL Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edildi. bir dakika sonra 1.5 mL %20'lik sulu Na₂CO₃ ilave edilip 10 mL'ye su ile tamamlandı. Kontrol olarak ekstre içermeyen reaktif karışımı kullanıldı. 25 °C'de iki saat inkübe edildikten sonra 760 nm'de absorbansı ölçüldü ve gallik asit kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırıldı. Toplam fenolik madde miktarı gallik asite eşdeğer olarak hesaplandı. Deneyler üç paralel olacak şekilde yapıldı ve sonuçlar ortalama değerler olarak verildi.

Ekstrelerin toplam flavonoit analizi Zhishen ve ark.'nın¹⁵ çalışmalarında kullandıkları metot modifiye edilerek yapıldı. Buna göre 1 mL ekstre t=0. dakikada 0.3 mL %5'lik NaNO₂ çözeltisi ile karıştırıldı, t=5. dakika' da 0.3 mL %10'luk AlCl₃.6H₂O çözeltisi ilavesinden sonra, t=6. dakika'da 2 mL 1 M NaOH çözeltisi eklendi ve 2.4 mL su ilave edilerek karıştırıldı. 510 nm'de köre karşı absorbans ölçüldü. Ekstrelerin içerdikleri toplam flavonoit miktarları

kateşine eşdeğer olarak mg_{CA}/g_{ekstre} olarak hesaplandı. Kateşinin kalibrasyon eğrisi aynı şekilde etanol kullanılarak hazırlandı. Bütün ölçümler üç paralel olacak şekilde yapıldı ve ortalama değerler alındı.

Ekstrelerin içerdikleri toplam flavonol miktarları rutine eşdeğer olarak (RE) mg_{RE}/g_{ekstre} olarak hesaplandı.¹⁶ 2 mL bitki ekstresi (10 g/L) 2 mL etanolik alüminyum triklorit (20 g/L) ve 6 mL sodyum asetat (50 g/L) karıştırıldıktan sonra 20 °C de 2.5 saat bekletildi ve 440 nm'de ölçüm yapıldı. Aynı işlemler kalibrasyon eğrisi hazırlamak üzere 0.5-0.015 mg/mL konsantrasyonlardaki etanolik rutin çözeltileri ile gerçekleştirildi. Bütün ölçümler üç paralel olarak yapıldı ve ortalama değerler kullanıldı.

İndirgenme gücünün belirlenmesi

Ekstrelerin demir (III)'ü indirgeme kapasiteleri Oyaizu¹⁷ yöntemine göre yapıldı. 1 mL ekstre çözeltisi (0.01-0.5 mg/mL konsantrasyon aralığı) 2.5 mL 0.2 M fosfat tamponu (pH 6.6) ve 2.5 mL %1' lik potasyum heksaziyanoferat çözeltisi ile karıştırıldı. 50 °C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra 2.5 mL % 10'luk trikloro asetik asit (TCA) ilave edildi ve karışım 10 dakika santrifüj edildi. Son olarak, 2.5 mL üst kısım, 2.5 mL su ve 0.5 mL %1'lik FeCl₃ ilave edilip karıştırılarak 700 nm'de absorbanları okundu. Ekstrelerin indirgenme güçleri askorbik asite eşdeğer olarak (AscAE) mmol askorbik asit/g örnek olarak verildi. Pozitif kontrol olarak BHA, gallik asit ve rozmarinik asit kullanıldı. Büyük AscAE değeri zengin indirgenme kapasitesini göstermektedir. Tüm analizler üç paralel olarak çalışıldı ve ortalama değerler olarak verildi.

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH*) radikalini süpürücü etkinin tayini

Ekstrelerin DPPH* radikalini süpürücü etkileri Gyamfi ve ark.'nın¹⁸ metoduna göre yapıldı. Tris-HCl tamponu (50 nM, p.H 7.4) ve 1mL 0.1 mM metanolde hazırlanmış 1.1-difenil- 2- pikrilhidrazil çözeltisi (DPPH*) ile karıştırıldı. Ekstreler 0.01- 1.25 mg/mL konsantrasyon aralığında çalışıldı. Kontrol olarak ekstreleri çözmek için kullanılan %11 etanol ve %70 metanol

ve pozitif kontrol olarak Bütil Hidroksianisol (BHA), gallik asit ve rozmarinik asit kullanıldı. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildikten sonra absorbanlar 517 nm'de okundu. İnhibisyon yüzdesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı. IC₅₀ değerleri nonlineer regregasyon eğrileri kullanılarak (Sigma Plot 2001 versiyon7.0, SPSS Inc., Chicago IL) hesaplandı. Analizler üç paralel olarak hesaplandı ve ortalama değerler kullanıldı.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{[(Abs_{kontrol} - Abs_{örnek}) / Abs_{kontrol}] \times 100}$$

2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolin- 6-sulfonik asit) (ABTS*) radikalini süpürücü etkinin tayini

ABTS* radikali (7 mM) ABTS' in sulu çözeltisi ile potasyum persülfat (K₂S₂O₈) (2.45 mM, son konsantrasyon)'ın karanlıkta 12-16 saat bekletilmesiyle meydana getirildi ve absorbanı oda sıcaklığında 734 nm'de 0.700 (±0.030) olacak şekilde ayarlandı. Ekstreler 0.25 ve 0.5 mg/mL konsantrasyonda hazırlandı. Hazırlanan radikal çözeltisi (990 µL) ile ekstre çözeltileri (10 µL) karıştırıldı ve 734 nm'de bir dakikalık aralıklarla 30 dakika süresince reaksiyon kinetiği ölçüldü. Konsantrasyona karşı ölçülen inhibisyon yüzdeleri Troloks'a eşdeğer olarak (TEAC) hesaplandı.¹⁹

Demir(II) şelat (kelat) aktivite

Demir(II) iyonlarının ekstrelerle şelasyonu Carter'e ²⁰ göre yapıldı. 200 µL ekstre çözeltisi 100 µL 2.0 mM sulu FeCl₂ ve 900 µL metanol karıştırıldı. Reaksiyon karışımının beş dakikalık inkübasyonundan sonra reaksiyon, 400 µL 5.0 mM ferrozin çözeltisi ile hızlandırıldı ve 10 dakikalık bekleme süresinden sonra absorban 562 nm'de okundu. Demir şelasyon aktivitesi kontrolün absorbanı (A_k) ve örnek absorbanı (A_ö) kullanılarak aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı ve Na₂EDTA ya eşdeğer ($mg_{Na_2EDTA}/g_{örnek}$) verildi. Sonuçlar üç paralel deneyin ortalaması olarak hesaplandı.

$$[(A_k - A_{\text{ö}}) / A_k] \times 100$$

İstatistiksel analiz

Bütün istatistiksel analizler SPSS 12 (Inc., Chicago, IL, USA) istatistik programı ile yapılmıştır. Varyansların analizi ANOVA prosedürüne göre uygulanmıştır. Ortalamalar arasındaki belirgin farklılıklar Tukey's pairwise ve Games-Howell kıyaslama testine göre $p < 0.05$ seviyesinde değerlendirilmiştir. Grupların varyans homojenliğini değerlendirmek için Levene testi kullanılmıştır. Değişkenler arasında Pearson korelasyon analizi uygulanmıştır.

Bulgular

Toplam fenol ve toplam flavonoid miktar tayini

Ekstrenin toplam fenol ve flavonoid miktarı deneysel kısımda verilen yöntemler kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiş ve sonuçlar Tablo 1'de verilmiştir. Toplam fenol miktarı gallik asite, toplam flavonoid miktarları kateşine ve toplam flavonol miktarı rutine eşdeğer olarak hesaplanmıştır. *P. quercetorum* %70 metanolik kök ekstresi toplam fenol miktarı 242.29 ± 5.52 mg_{GAE}/g_{ekstre} iken %11 etanol

ekstresi 162.90 ± 6.95 mg_{GAE}/g_{ekstre} olarak bulunmuştur. Varyans homojenliğini test etmek için uygulanan Levene istatistiği sonuçlarına göre değişken için varsayımın sağlanmadığı gözlenmiştir ($p=0.042$). Grupların çoklu karşılaştırıldığı Games-Howell testi sonuçlarına göre %11 etanolik kök ekstresi ve toprak üstü kısımdan hazırlanan %70 metanol ekstresi arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p=0.057$). %70 Metanolik kök ekstresinin toplam fenolik madde miktarı açısından diğer ekstrelerle arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p < 0.01$).

Toplam flavonoid miktarı toprak üstü kısmın %70 metanol ekstresi için 30.89 ± 3.58 mg_{CA}/g_{ekstre}, kök %70 metanol ekstresi için 64.95 ± 2.93 mg_{CA}/g_{ekstre} olarak bulunmuştur. Varyans homojenliğini test etmek için uygulanan Levene istatistiği sonuçlarına göre değişken için varsayımın sağlandığı gözlenmiştir ($p=0.638$). Grupların çoklu karşılaştırıldığı Tukey testi sonuçlarına göre ekstrelerin toplam flavonoid madde miktarı arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p < 0.01$).

Tablo 1. *P. quercetorum* ile hazırlanan ekstrelerin toplam fenol, flavonoid ve flavonol içerikleri

Ekstreler	Toplam Fenol [mgGAE/gekstre]	Toplam Flavonoid [mgCA/gekstre]	Toplam Flavonol [mgRE/gekstre]
Pqh	184.80 ± 0.31^a	$30.89 \pm 3.58^*$	21.02 ± 0.10^I
Pq11	162.90 ± 6.95^a	$46.63 \pm 1.93^{**}$	27.37 ± 0.24^{II}
Pq70	242.30 ± 5.52^b	$64.95 \pm 2.93^{***}$	28.37 ± 0.81^{II}

Pqh: %70 metanol toprak üstü ekstresi, Pq11: %11 etanol kök ekstresi, Pq70: %70 metanol kök ekstresi, Ortalama \pm SS olarak verilen değerler \pm %95 güven aralığında belirtilmiştir. (*,**), (**,**), (a,b) ve (I,II) arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.01$) aynı harflerle belirtilmiş değerler a grubu için $p=0.057$, II için $p=0.249$ olarak bulunmuştur.

Toplam flavonol madde miktarı %70 metanolik kök ekstresi için 28.37 ± 0.81 mg_{RU}/g_{ekstre}, kök %11 etanolik kök ekstresi için 27.37 ± 0.24 mg_{RE}/g_{ekstre} olarak bulunmuştur. Levene istatistiği sonuçlarına göre değişken için varsayımın sağlandığı gözlenmiştir ($p=0.180$). Grupların çoklu

karşılaştırıldığı Tukey testi sonuçlarına göre %70 metanolik kök ekstresi ve %11 etanolik kök ekstresi arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p=0.249$).

İndirgeme gücünün belirlenmesi

Maddelerin indirgeme güçleri ile antioksidan aktiviteleri arasında genellikle doğrusal bir ilişki vardır. Bu amaçla *P. quercetorum* türünden elde edilen ekstrelerin ve standartların demiri indirgeme kapasiteleri incelenmiş ve sonuçlar Tablo 2'de verilmiştir. Burada verilen sonuçlar askorbik asite eşdeğer olarak hesaplanmıştır. *P. quercetorum*' un köklerinden ve toprak üstü kısmından elde edilen ekstrelerin hiçbirisinin demir (III) ü indirgeme gücü pozitif standart olarak kullanılan BHA, gallik asit ve rozmarinik asit kadar yüksek bulunamamıştır. %70 Metanolik kök ekstresi (0.69 ± 0.01 mmol/g AscAE) ve %70 metanol toprak üstü ekstrlerinin (0.65 ± 0.005 mmol/g AscAE) demir (III)'ü demir (II)'ye indirgeme güçleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p > 0.05$). Levene istatistiği sonuçlarına göre değişken için varsayımın sağlanmadığı gözlenmiştir ($p = 0.002$). Grupların çoklu karşılaştırıldığı Games-Howell testi sonuçlarına göre ekstreler ve standart olarak kullanılan BHA, gallik asit ve rozmarinik asit arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p < 0.01$).

Tablo 2: *P. quercetorum* ekstrlerinin ve standartların demir(III)'ü demir(II)'ye indirgeme kapasiteleri

Örnekler	AscAE[mmol/g]
BHA	2.301 ± 0.006^a
GA	5.582 ± 0.108^b
RA	4.007 ± 0.014^c
Pqh	649 ± 0.0040^d
Pq11	0.518 ± 0.004^e
Pq70	0.692 ± 0.012^d
<i>p</i>	<0.001

Pqh: %70 metanol toprak üstü ekstresi, Pq11: %11 etanol kök ekstresi, Pq70: %70 metanol kök ekstresi BHA: butilhidroksianisol, GA: gallik asit, RA: rozmarinik asit. Ortalama \pm SS olarak verilen değerler \pm %95 güven aralığında belirtilmiştir. (a-d), arası farklı harflerle, belirtilmiş değerler arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.01$) aynı harflerle belirtilmiş değerler d grubu için $p = 0.066$ bulunmuştur.

1.1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH*) radikalini süpürücü etki tayini

Bütün ekstreler DPPH* radikalini fizyolojik pH'da konsantrasyona bağlı olarak süpürmüşlerdir. Tablo 3'e göre *P. quercetorum*'un %70 metanolik kök ekstresi (IC_{50} : 0.23 ± 0.004 mg/mL) diğer ekstrelerden daha aktif bulunmuştur. Ancak bitkiden elde edilen hiçbir ekstrinin kullanılan standartlar kadar etkili süpürücü etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir. Levene istatistiği sonuçlarına göre değişken için varsayımın sağlanmadığı gözlenmiştir ($p = 0.007$). Grupların çoklu karşılaştırıldığı Games-Howell testi sonuçlarına göre ekstrelerin aktiviteleri birbiri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p < 0.01$).

2.2'- azino-bis (3- ethylbenziazoline-6-sulphonic acid) (ABTS*) radikalini süpürücü etki tayini

Tüm ekstrelerin ABTS* radikalini süpürücü etkileri değerlendirilmiş ve sonuçlar Tablo 4'de verilmiştir. Tüm ekstrere ve standartlarda etki konsantrasyonla doğru orantılı bir şekilde artış göstermiştir. Ekstreler 0.25 mg/mL ve 0.5 mg/mL konsantrasyonlarda aktif bulunmuştur. %70 metanolik kök ekstresi 0.5 mg/mL konsantrasyonda 0.80 ± 1.13 mmol/ L Trolox değeriyle en aktif ekstrere olarak bulunurken en düşük aktiviteyi 0.25 mg/mL konsantrasyonda 0.29 ± 0.76 mmol/ L Trolox değeriyle %70 metanolik toprak üstü ekstresi göstermiştir. %70 metanolik kök ekstresinin her iki konsantrasyonda göstermiş olduğu aktivite ile standart olarak kullanılan rozmarinik asitin her iki konsantrasyondaki aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ($p > 0.05$). Varyans homojenliğini test etmek için uygulanan Levene istatistiği sonuçlarına göre değişken için varsayımın sağlanmadığı gözlenmiştir ($p < 0.001$). Grupların çoklu karşılaştırıldığı Games-Howell testi sonuçlarına göre standart olarak kullanılan gallik asitin her iki konsantrasyonunun aktivitesi ile %70 metanolik toprak üstü ekstresi ve %11 etanolik kök ekstresinin her iki konsantrasyonda göstermiş olduğu aktiviteler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p < 0.05$).

Tablo 3: *P. quercetorum* ekstrelerinin ve standartların DPPH• radikali süpürücü etkileri

Örnekler	DPPH (IC ₅₀) (mg/mL)
BHA	0.077 ± 0.001 ^a
GA	0.023 ± 0.000 ^b
RA	0.004 ± 0.000 ^c
Pqh	0.383 ± 0.005 ^d
Pq11	0.446 ± 0.005 ^e
Pq70	0.225 ± 0.003 ^f
<i>p</i>	<0.001

Pqh: %70 metanol toprak üstü ekstresi, Pq11: %11 etanol kök ekstresi, Pq70: %70 metanol kök ekstresi BHA: butilhidroksianisol, GA: gallik asit, RA: rozmarinik asit. Ortalama ± SS olarak verilen değerler ±%95 güven aralığında belirtilmiştir. (a-d), arası farklı harflerle, belirtilmiş değerler arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır (*p* < 0.01).

Demir(II) şelat aktivite

Ekstrelerin demir(II) iyonlarının şelasyonuna etkileri 100-2000 µg/mL konsantrasyon aralığında çalışılmıştır. Toplam flavonol içeriği istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermeyen %70 metanolik kök ekstresi ve %11 etanolik kök ekstresi benzer aktivite sergilemiştir (Şekil 1). Hiç bir ekstre standart olarak 10-60 µg/mL konsantrasyon aralığında çalışılan disodyum etilendiamintetraasetat dihidrat (Na₂EDTA) kadar aktivite gösterememiştir.

Tartışma

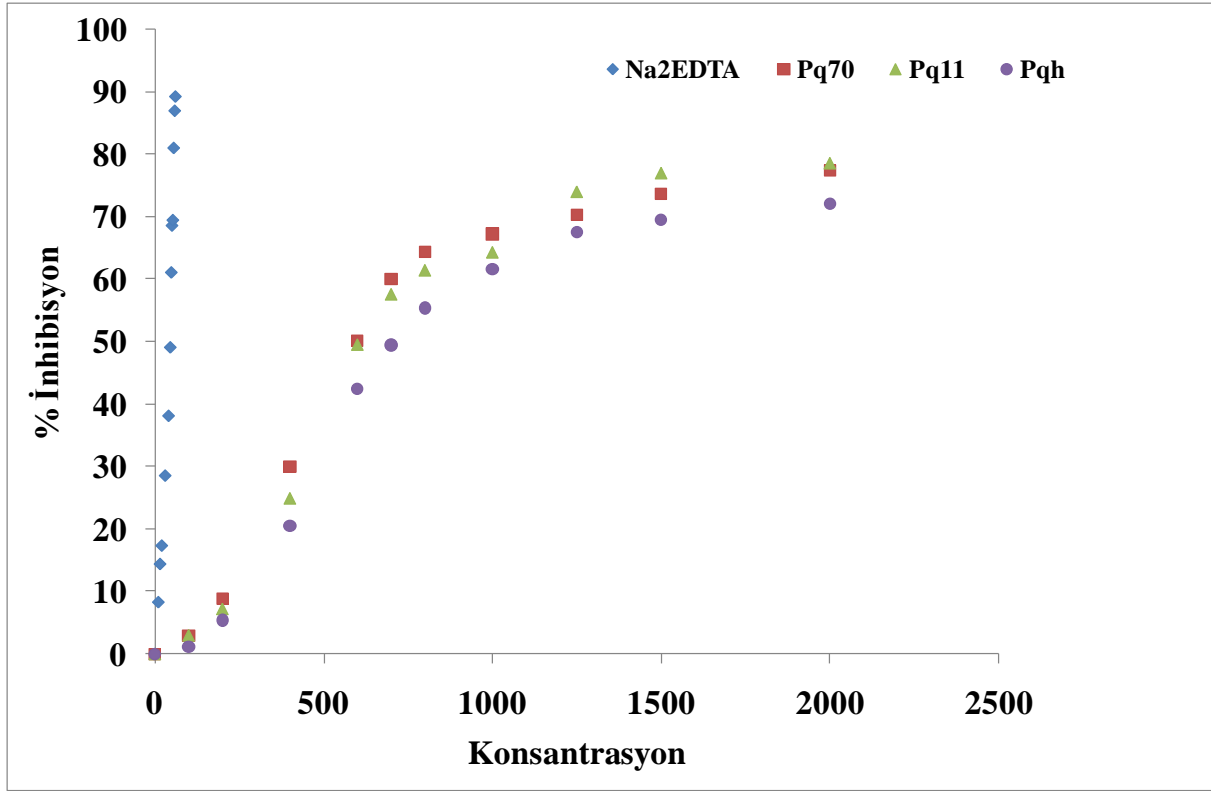
P. quercetorum ekstrelerinde toplam fenol, flavonoid ve flavonol içerikleri incelendiğinde fenolik bileşim bakımından %70 metanol kök ekstresi içerik bakımından en zengin ekstre olarak bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada *P. sidoides* standardize ekstresinden hazırlanan Umca® ekstresinin toplam fenol içeriği 9.43 ± 0.28 mg_{GAE}/g_{ekstre} bulunmuştur. Bu içerik *P. quercetorum* %11 etanolik kök ekstresinin toplam fenol içeriğine göre (162.90 ± 6.95 mg_{GAE}/g_{ekstre}) oldukça düşük olup *P. quercetorum*'un fenolik içerik

bakımından zengin olduğunu göstermektedir.²¹ *P. quercetorum*'un toplam fenolik içeriğinin, antioksidan ve sito/genotoksik aktivitelerinin incelendiği bir çalışmada *P. quercetorum* toprak üstü kısmından hazırlanan metanol ekstresinin toplam fenolik içeriği 576.6 ± 15.8 mg GAE/g ve su ekstresinin ise 460.6 ± 8.3 mg GAE/g olarak saptanmıştır. Bu çalışmada verilen sonuçların, çalışmamızda toprak üstü kısmından hazırlanan %70 metanol ekstresinin toplam fenolik içeriği ile uyumlu olmaması her iki çalışmada kullanılan deney yöntemleri arasındaki farklılıktan kaynaklandığı sonucunu doğurmaktadır. Bu çalışmada hem kullanılan ekstraksiyon çözeltisi hem de toplam fenol deney yöntemi farklıdır.²²

Tablo 4: *P. quercetorum* ekstrelerinin ve standartların ABTS• radikali süpürücü etkisi.

Örnekler	Konsantrasyon (mg/mL)	TEAC (mmol/L/Trolox)
BHA	0.25	1.023 ± 0.046 ^{a,b}
	0.5	2.260 ± 0.089 ^c
GA	0.25	2.534 ± 0.131 ^c
	0.5	2.581 ± 0.022 ^c
RA	0.25	0.903 ± 0.101 ^{a,b}
	0.5	2.045 ± 0.161 ^{a,c,d}
Pqh	0.25	0.287 ± 0.037 ^b
	0.5	0.761 ± 0.007 ^a
Pq11	0.25	0.335 ± 0.021 ^b
	0.5	0.569 ± 0.037 ^a
Pq70	0.25	0.800 ± 0.014 ^{a,b}
	0.5	1.137 ± 0.105 ^{a,c,d}
<i>p</i>		<0.001

Pqh: %70 metanol toprak üstü ekstresi, Pq11: %11 etanol kök ekstresi, Pq70: %70 metanol kök ekstresi BHA: butilhidroksianisol, GA: gallik asit, RA: rozmarinik asit. Ortalama ± SS olarak verilen değerler ±%95 güven aralığında belirtilmiştir. (a-d), arası farklı harflerle, belirtilmiş değerler arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır (*p* < 0.01), aynı harflerle belirtilmiş değerler *p* > 0.05 olarak bulunmuştur.



Şekil 1. *P. quercetorum* ekstrelerinin demir (II) şelat aktiviteleri. Pqh: %70 metanol toprak üstü ekstresi, Pq11: %11 etanol kök ekstresi, Pq70: %70 metanol kök ekstresi.

Ekstrelerin azot merkezli stabil bir radikal olan DPPH• radikalini süpürme kapasiteleri fizyolojik pH da incelenmiş ve sonuçlar IC₅₀ değerleri olarak (mg/mL) verilmiştir. IC₅₀ değeri küçüldükçe aktivite artmaktadır. *P. quercetorum*'dan elde edilen %70 metanol kök ekstresinin DPPH radikalini süpürücü etkisi (IC₅₀: 0.23 ± 0.004 mg/mL) diğer ekstrelerden yüksek bulunmuştur. Ekstrelerin DPPH• radikalini süpürücü etkisi ile toplam fenol içeriği arasındaki korelasyon $p=0.01$ seviyesinde anlamlı bulunmuştur. *P. endlicherianum* Fenzl. türü ile yapılan bir çalışmada bitkinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanol ekstresinin DPPH radikalini süpürücü etkisi 7.43 ± 0.47 µg/mL, standart olarak kullanılan askorbik asitin ise 3.80±0.17 µg/mL bulunmuştur.²³ *P. endlicherianum* kök ekstreleri ve *P. sidoses* standardize ekstresinden hazırlanan Umca® ekstresinin karşılaştırıldığı bir çalışmada Umca® ekstresinin IC₅₀ değeri 4.13 mg/mL olarak bulunurken çalışmamızda *P. quercetorum* %11 etanolik ekstresinin 0.446 mg/mL IC₅₀ değeri, daha güçlü radikal

süpürücü etkiye sahip olduğunu göstermektedir.²¹ *P. betulinum* (L.) L'Hér. ve *P. crispum* (L.) L'Hér. türlerinin (yaprak, yaprak sapı ve gövde) aseton ile hazırlanan ekstreleriyle yapılmış olan 1.1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) radikalini süpürücü etki tayini deneyinde, IC₅₀ değeri 4.72 ± 0.14 µg/mL olan askorbik asit pozitif kontrol olarak kullanılmış ve ekstrelerin IC₅₀ değerleri sırasıyla 4.13 ± 0.14 µg/mL ve 4.49 ± 0.18 µg/mL şeklinde bulunmuştur. Bu iki türünde askorbik asit kadar antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir.²⁴ Farklı türlerle yapılan bu çalışmalarda radikal süpürücü aktivitenin daha düşük konsantrasyonlarda bulunmuş olması kullanılan yöntem farklılıklarından kaynaklanacağı gibi türlerin fenolik bileşikleri bakımından farklılık göstermesinden de kaynaklanabilmektedir.

En çok kullanılan antioksidan yöntemlerinden biri olan ABTS•+ / TEAC yönteminde ekstreler ve standartlar 0.25 ve 0.5 mg/mL konsantrasyonda çalışılmıştır. %70 metanol kök ekstresi her iki konsantrasyonda da TEAC: 0.80 ± 0.001 ve

1.136 ± 0.105 mmol/ L/ Trolox bulunurken rozmarinik asit için 0.903 ± 0.101 ve 2.04±0.161 mmol/L/Trolox olarak bulunmuştur. %70 Metanol kök ekstresinin her iki konsantrasyonda göstermiş olduğu aktiviteler ile standart olarak kullanılan rozmarinik asitin her iki konsantrasyondaki aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olması ($p>0.05$) bu ekstrenin radikal süpürücü etkisinin güçlü olduğunu kanıtlamıştır. Arı ve ark.'nın²² yaptığı çalışmada *P. quercetorum* toprak üstü kısmından hazırlanan metanol ekstresinin ABTS⁺ radikalini süpürücü kapasitesinin 668.4 ± 20.0 mg TE/g liyofilize ekstre olarak bulunmuş ve radikal süpürücü kapasitesinin güçlü olduğu belirtilmiştir. *P. reniforme* ile yapılan bir çalışmada ise, yaprak ve köklerinden hazırlanan metanol ekstresinin ABTS⁺ radikali süpürücü aktivitesi 0.25 ve 0.5 mg/mL konsantrasyonlarda BHT'den daha aktif bulunduğu su ekstresinin aktivitesinin ise BHT'den daha düşük bulunduğu bildirmiştir.²⁵

Ekstrelerin demir(III)'ü demir(II)'ye indirgeme kapasitesi hidrojen verme kapasiteleri olarak değerlendirilir. İndirgeme kapasitesi radikal zincir reaksiyonlarının başlangıç safhasında oldukça önemlidir. Ayrıca yapılan çalışmalarda bitki ekstresinde indirgeme gücü ile antioksidan aktivite arasında doğrudan korelasyon olduğu gösterilmiştir.²⁶ Ekstrelerin demir(III)'ü demir(II)'ye indirgeme gücü askorbik asite (AscAE) eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Toprak üstü kısımdan ve kökten %70 metanol ile hazırlanan ekstreler benzer aktivite göstermişlerdir. Ekstrelerin indirgeme kapasiteleri ile DPPH• radikalini süpürücü etkileri arasındaki korelasyon $p=0.01$ seviyesinde anlamlı bulunmuştur. Ekstrelerin Fe²⁺ iyonlarını şelatlama aktivitesinin ölçümü 100-2000 µg/mL aralığındaki konsantrasyonlarda çalışılmıştır. Ekstrelerin Fe²⁺ şelatlama aktivitesinin konsantrasyona bağlı olarak arttığı gözlenmiş ancak hiç bir ekstrenin standart olarak kullanılan EDTA kadar aktivite gösteremediği tespit edilmiştir (Şekil 1). Geçiş metal iyonlarını bağlayarak ortamdaki konsantrasyonlarının azaltılması

ve dolayısıyla Fe²⁺ katalizli lipid peroksidasyonunun geciktirilmesi antioksidan kapasitesinin ölçülmesinde önemli bir mekanizmadır. 3-hidroksi-4-keto veya 5-hidroksi-4-keto grup içeren flavonollerin kuvvetli metal şelasyonu aktivitelerinin olduğu ve metallerle stabil kompleksler oluşturdukları literatürde kayıtlıdır.²⁷ Ekstrelerin metal şelatlayıcı aktivite göstermeleri flavonol içeriği ile uyumlu bulunmuştur.

Sonuç

P. quercetorum toprak üstü ve kök kısımlarından hazırlanan ekstrelerin fenolik ve flavonoit bileşikler bakımından zengin olduğu tespit edilmiştir. Antioksidan aktivite deneylerinde %70 metanol kök ekstresinin güçlü antioksidan aktivite göstermesi fenolik içeriği ile ilişkilendirilmiştir. Çalışmalarımız ekstrelerin etkiden sorumlu bileşiklerinin tespiti alanında devam etmektedir.

Kaynaklar

1. Matkowski A, Zielinska S, Oszmianski J, Lamer-Zarawska E. Antioxidant activity of extracts from leaves and roots of *Salvia miltiorrhiza* Bunge, *S. przewalskii* Maxim., and *S. verticillata* L. *Bioresour Technol* 2008;99:7892-7896.
2. Larson RA. Naturally occurring antioxidants. Lewis Publishers, New York 1997; pp 1-15.
3. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 1994;344:721-724.
4. Pincemail JJ. Free radicals and antioxidants in human diseases. In: Favier AE, Cadet J, Kalyanaraman B, Fontecave M, Pierre JL. (eds.): *Analysis of Free Radicals in Biological Systems*. Birkhauser Verlag, Berlin 1995, pp 83-98.
5. Dreher D, Junod AF. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer* 1996;32A:30-38.
6. Oberley TD, Oberley LW. Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histol. Histopathol* 1997;12:525-535.
7. Maxwell S. Anti-oxidant therapy: does it have a role in the treatment of human

- disease? *Exp Opin Invest Drugs* 1997;6:211-236.
8. Brendlera T, Van Wyk BE. A historical, scientific and commercial perspective on the medicinal use of *Pelargonium sidoides* (Geraniaceae). *J Ethnopharmacol* 2008;119:420-433.
9. Trun W, Kiderlen AF, Kolodziej H. Nitric oxide synthase and cytokines gene expression analyses in Leishmania-infected RAW 264.7 cells treated with an extract of *Pelargonium sidoides* (Eps 7630). *Phytomed* 2006;13:570-575.
10. Davis PH, Mill RR, Kit T. *Pelargonium L'Hérit* In: Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Davis PH (eds): University Press, Edinburgh, 1988;10:106.
11. Uce İ, Tunçtürk M. Hakkâri'de doğal olarak yetişen ve yaygın olarak kullanılan bazı yabancı bitkiler. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi* 2014;7(2):21-25.
12. Taherpour AA, Maroofi H, Kheradmand K. Chemical composition of the essential oil of *Pelargonium quercetorum* Agnew. of Iran. *Nat Prod Res* 2007;21(1):24-27.
13. Kolodziej H, Kiderlen AF. *In vitro* evaluation of antibacterial and immunomodulatory activities of *Pelargonium reniforme*, *Pelargonium sidoides* and the related herbal drug preparation EPs® 7630. *Phytomedicine* 2007;14(6):18-26.
14. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventó S RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: Packer L (ed.): *Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA, 1999;299:152-315.
15. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 1999;64:555-559.
16. Miliauskas G, Venskutonis PR, Van-Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem* 2004;85:231-237.
17. Oyaizu M. Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr* 1986;44:307-315.
18. Gyamfi MA, Yonamine M, Aniya Y. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana *Thonningia sanguinea* on experimentally induced liver injuries. *Gen Pharmacol* 1999;32:661-667.
19. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio Med* 1999;26:1231-1237.
20. Carter P. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). *Anal Biochem* 1971;40:450-458.
21. Çakal S. *Pelargonium endlicherianum* Fenzl.(Geraniaceae) kök ekstrelinin UMCA® preparatı ile karşılaştırılmalı araştırılması, (Yüksek Lisans Tezi), Hüsnü Can Başer, yayınlanmamış tez, Eskişehir 2009, ss 15-27.
22. Arı F, Çelikler S, Karakaş D, Cevatemre B, Ulukaya E. Total Phenolic Content, Antioxidant and Cyto/Genotoxic Activities of *Pelargonium quercetorum* Agnew in Human Breast Cancer Cells. *J Clin Exp Invest* 2017;8:22-30.
23. Tepe B, Sökmen M, Akpulat HA, Yumrutaş Ö, Sökmen A. Screening of antioxidative properties of the methanolic extracts of *Pelargonium endlicherianum* Fenzl. *Verbascum wiedemannianum* Fisch. & Mey. *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Borm., *Centaurea mucronifera* DC., and *Hieracium cappadocicum* Freyn. from Turkish flora. *Food Chem* 2006;98:9-13.
24. Lalli YY, Van Zyl RL, Van Vuuren SF, Viljoen AM. *In vitro* biological activities of South African *Pelargonium* (Geraniaceae) species. *S Afr J Bot* 2008;74:153-157.
25. Adewusi EA, Afolayan AJ. Antibacterial, antifungal and antioxidant activity of the roots and leaves of *Pelargonium reniforme* Curtis (Geraniaceae). *Afr J Biotechnol* 2009;8:6425-6433.
26. Walia H, Kumar S, Arora S. Effect of fractionation on *in vitro* antiradical efficacy of acetone extract of *Terminalia chebula*. *Afr J Pharm Pharmacol* 2014;8:311-320.
27. Shahidi F. Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications, AOCS Press, United States of America 1997:98.