

PISTACIA TEREBINTHUS MEYVESİ VE MENENGİÇ KAHVESİNDEN HAZIRLANAN EKSTRELERİN TOPLAM FENOLİK VE FLAVONOİT MADDE KOMPOZİSYONLARININ VE ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI*

COMPARISON OF TOTAL PHENOLIC AND FLAVONOID CONTENTS AND ANTIOXIDANT EFFECTS OF PISTACIA TEREBINTHUS AND MENENGIC COFFEE EXTRACTS

Gökçe Şeker KARATOPRAK¹, Gülsüm YILDIZ², Perihan GÜRBÜZ¹

¹Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı, Kayseri

²Yüzüncü Yıl Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı, Van

ÖZ

Bu çalışma kapsamında Anacardiaceae familyasına dahil olan *Pistacia terebinthus* L. bitkisinin meyvesinden elde edilen metanol ekstresinin ve menengiç kahvesinin DPPH• ve ABTS⁺ yöntemleriyle antioksidan aktiviteleri, Folin- Ciocalteu yöntemiyle de toplam flavonoit ve fenolik madde kompozisyonları incelenmiştir.

P.terebinthus bitkisinin meyve ekstresi toplam flavonoit ve fenol bakımından zengin bulunmuştur. Yapılan antioksidan çalışmalar meyve ekstresinin DPPH radikalini süpürücü aktivitede daha yüksek aktiviteye sahip olduğunu, Menengiç kahvesinin ise ABTS radikalini süpürücü aktivite de daha güçlü olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: *Pistacia terebinthus*; Anacardiaceae; Menengiç kahvesi; Antioksidan aktivite

GİRİŞ

Pistacia terebinthus L., Akdeniz ve Batı Asya' da yetişen çok yıllık küçük ağaç formunda bir bitkidir. Anacardiaceae familyasına ait olan ağaç, Anadolu' nun batı, iç ve güney bölgelerinde yaygın olarak yetişir ve menengiç adıyla bilinmektedir. Mart ve nisan aylarında açan, bir önceki yıla ait sürgünlerde gelişen çiçekler kırmızı erguvan; küremsi küçük meyveler ise olgunlaştığında mavi- yeşil renktedir (1, 2).

Türkiye'de elde edilen arkeolojik bulgular, menengiçin eski çağlardan beri gıda olarak kullanıldığını göstermektedir. Özellikle Anadolu'nun güney kesimlerinde halk arasında meyveleri çerez olarak tüketilmektedir. Ayrıca kırsal kesimlerde kuru incir, ceviz gibi diğer gıdalarla karıştırılan meyveler; öğütülmesinin ardından kavrulmakta ve özel açılmış yufka ekmeklerinin yapımında

*Bu çalışma, 2013 yılında Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Ab. D. tarafından bitirme projesi olarak kabul edilmiştir.

Makale Geliş Tarihi : 01.02.2016
Makale Kabul Tarihi: 30.03.2016

ABSTRACT

In this study, antioxidant activity of methanol extract prepared from *Pistacia terebinthus* L. fruit and water extract prepared from menengic coffee were studied with DPPH• and ABTS⁺ radical scavenging methods. Their total phenolic and flavonoid contents were determined with Folin- Ciocalteu method.

Methanol extracts of *P. terebinthus* fruits were found to be rich for phenolic and flavonoid compounds. Antioxidant activities showed that MeOH extracts of *P. terebinthus* fruits have higher antioxidant activity in DPPH test and Menengic coffee found to be more potent in ABTS radical scavenging activity.

Keyword: *Pistacia terebinthus*; Anacardiaceae; Menengic coffee; Antioxidant activity

kullanılmaktadır Ayrıca, bitkiden elde edilen sabit yağların yenilebilir özelliği bulunmaktadır (3).

P. terebinthus yaprakları dekoksasyon şeklinde karın ağrısında, üriner antiseptik olarak ve peptik ülserin tedavisinde kullanılmaktadır (4, 5). Ayrıca drupa tipindeki meyveler diüretik ve kuvvet verici etkiye sahiptir (2). Ayrıca yaprakların mikozisde haricen topikal kullanımını vardır (5).

Meyveler üzerinde gerçekleştirilen fitokimyasal çalışmalarda, flavon 6'-hidroksipolaetin 3'-metil eter, apigenin, luteolin, luteolin 7-O-glukozit, kersetin, kersetagetin 3-metil eter 7-O-glukozit, izoskutellarein 8-O-glukozit isimli flavonoitler izole edilmiştir (6).

Meyvelerden elde edilen sabit yağ üzerinde yapılan Gaz kromatografisi analizlerinde doymamış yağ asitlerinden linoleik, oleik, palmitoleik ve linolenik doymuş yağ asitlerinden de stearik ve palmitik asit tanımlanmıştır (7,

Corresponding Author: Yrd. Doç. Dr. Perihan Gürbüz, Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, Kayseri 38039

Tel: 0352 4380486

Fax: 0352 4379169

e-mail: pgurbuz@erciyes.edu.tr

8).

Meyveden elde edilen uçucu yağ üzerinde yapılan Gaz kromatografisi analizlerinde yağın, α pinen ve β pinen maddelerini yüksek oranda içerdiği tespit edilmiştir (9). Menengiç kahvesi, halk arasında kurutulmuş çitlenbik meyvelerinin kavruarak toz edilmesiyle hazırlanmakta ve eşit miktarda su veya sütle muamele edilerek tüketilmektedir. Ayrıca kahve farklı ticari isimlerle piyasada da bulunabilmektedir.

Kahve üzerinde son yıllarda yapılan çalışmalarda farklı markaların kahvelerinden farklı çözücülerle hazırlanan ekstrelerin nöroprotektif ve antioksidan etkileri değerlendirilmiş ve kahve ekstrelerinin 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ' de orta düzeyde nöroprotektif etkisi bulunmuştur (8, 10).

Bu çalışmanın amacı halk arasında sıcak su ile hazırlanarak tüketilen *Pistacia terebinthus* L. yöresel kahvesi ile meyvelerden elde edilen metanol ekstresinin içeriklerini taşıdıkları toplam fenol ve flavonoit miktarları üzerinden karşılaştırmak ve bu ekstrelerin, ABTS ve DPPH radikalini süpürücü etkilerini belirlemektir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bitkisel Materyal

Çalışmalarda kullanılan *Pistacia terebinthus* meyveleri 2012 yılında meyvelerin olgunlaşma zamanı olan Eylül ayında Tokat Gümenek bölgesinden yabani olarak yetişen ağaçlardan toplanmıştır. Ağacın yaprakları ve meyveye ait örnekler, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı'nda muhafaza edilmektedir.

Ekstrelerin Hazırlanışı

Bitkinin kurutulmuş olgun meyveleri (5 g) öğütücüde öğütülerek, metanol ile 37 °C' de 3 defa ekstre edildi. Elde edilen ekstre rotavaporu (< 37 °C) yoğunlaştırıldı. Ekstre analiz anına kadar -18 °C de saklandı. Ticari olarak temin edilen menengiç kahvesi 2 g ve 4 g olacak şekilde ayrı ayrı tartılarak, deneylerden önce 30 dakika süreyle ultrasonik banyoda bekletilerek hazırlanmış ve süzülükten sonra kullanılmıştır.

Kompozisyon Analizleri

Bitkisel materyallerden elde edilen ekstreler toplam fenolik bileşikler ve toplam flavonoitler bakımından spektrofotometrik olarak incelendi.

Toplam Fenol ve Toplam Flavonoit Miktar Tayini

Ekstrelerin içerdikleri toplam fenol miktarı gallik asite eşdeğer olarak Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak hesaplandı (11). 3.95 mL distile su içeren 10 mL'lik kap içerisine 50 μL örnek çözeltisi ve 250 μL Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edildi. 1 dakika sonra 750 μL %20'lik sulu Na_2CO_3 ilave edilip 10 mL' ye su ile tamamlandı. Kontrol olarak ekstre içermeyen reaktif karışımı kullanıldı. 25 °C' de 2 saat inkübe edildikten sonra 760 nm'de absorbans 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.

Ekstrenin ve kahvenin içerdikleri toplam flavonoit miktar tayini Zhishen ve ark. (12) metoduna göre yapılmıştır. $\text{AlCl}_3/\text{NaNO}_2$ yönteminde toplam flavonoit içeriği, (0.3 mL) % 10' luk alüminyum klorür ve 5 dakika sonra (0.3 mL) % 5' lik sodyum nitrit ve 6. dakikada (2 mL) 1 M sodyum hidroksit ayıraçları kullanılarak, alkali or-

tamda pembe renkli flavonoit alüminyum kompleksinin meydana gelmesiyle belirlendi. Çözeltilerin absorbansları 510 nm' de ölçüldü. $\text{AlCl}_3/\text{NaNO}_2$ yöntemleriyle bulunan toplam flavonoit içerikleri, katesine eşdeğer olarak hesaplandı.

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) radikalini süpürücü etki tayini

Ekstrenin ve kahvenin DPPH• radikalini süpürücü etkileri Gyamfi ve ark. (13) metoduna göre yapılmıştır. Tris-HCl tamponu (50 nM, pH 7.4) ve 1 mL 0.1 mM metanolde hazırlanmış 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil çözeltisi (DPPH•) ile karıştırıldı. Kontrol olarak ekstre içermeyen reaktif karışımı ve pozitif kontroller (BHT, BHA, askorbik asit ve gallik asit) kullanıldı. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildikten sonra absorbanslar 517 nm' de okundu. İnhibisyon yüzdesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı. IC_{50} değerleri nonlineer regresyon eğrileri kullanılarak (Sigma Plot 2001 versiyon7.0, SPSS Inc., Chicago IL) hesaplandı. Analizler 3 paralel olarak hesaplandı ve ortalama değerler kullanıldı.

$$\% \text{inhibisyon} = \frac{[\text{Abs}_{\text{kontrol}} - \text{Abs}_{\text{örnek}}] / \text{Abs}_{\text{kontrol}}}{1} \times 100$$

2, 2'- azino-bis (3- ethylbenziazoline-6- sulphonic acid) (ABTS•) radikalini süpürücü etki tayini

Ekstrenin ve kahvenin ABTS• radikalini süpürücü etkilerine Re ve ark. (14) metoduna göre yapılmıştır. ABTS• radikali (7 mM) ABTS' in sulu çözeltisi ile $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (2.45 mM, son konsantrasyon)'un karanlıkta 12-16 saat bekletilmesiyle meydana getirildi ve absorbansı oda sıcaklığında 734 nm' de 0.700 (± 0.030) olacak şekilde ayarlandı. Bu şekilde hazırlanan radikal çözeltisi (990 μL) ile ekstre çözeltileri (10 μL) karıştırıldı ve 734 nm de 1 dakikalık aralıklarla 30 dakika süresince reaksiyon kinetiği ölçüldü. Konsantrasyona karşı ölçülen inhibisyon yüzdeleri Troloks'a eşdeğer olarak (TEAC) hesaplandı.

İstatistiksel Analiz

Bütün istatistiksel analizler SPSS 12 istatistik programı ile yapılmıştır Varyansların analizi ANOVA prosedürüne göre uygulanmıştır. Ortalamalar arasındaki belirgin farklılıklar Tukey's pairwise kıyaslama testine göre $p < 0.05$ seviyesinde değerlendirilmiştir. Deney sonuçlarına ait veriler Shapiro- Wilk normallik testine göre değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Toplam Fenol ve Toplam Flavonoit Miktar Tayini

Ekstrenin toplam fenol ve flavonoit miktarı deneysel kısımda verilen yöntem kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Toplam fenol miktarı gallik aside, toplam flavonoit miktarları katesine eşdeğer olarak hesaplanmıştır. *P. terebinthus* meyve ekstresi toplam fenol miktarı 93.74 ± 1.84 mg GAE/g iken menengiç kahvesinin toplam fenol miktarı 43.5 ± 2.27 mg GAE/g bulunmuştur. Meyve ekstresi toplam fenol ve flavonoit içeriği olarak kahveden daha zengin bulunmuştur. Sonuçlar Tablo 1' de verilmiştir.

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) radikalini süpürücü etki tayini

P. terebinthus ekstresi ile yapılan çalışmalar sonucunda ekstrenin fizyolojik pH' da süpürücü etki gösterdiği belirlenmiştir. Menengiç kahvesinin aktivitesi ise 4 mg/

mL'den büyük bulunmuştur. Şekil 1' e göre *P. terebinthus* ekstresi pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asit, BHT, BHA, rozmarinik asit ve gallik asit kadar etkili bulunmamıştır. Çalışmada kullanılan ekstraller ve standartlara ait deney sonuçları Shapiro-Wilk normallik testine göre anlamlı bulunmuştur (sig=0,598).

sonuçları 0,25 ve 0,5 mg/mL konsantrasyonlar için Shapiro-Wilk normallik testine göre anlamlı bulunmuştur (sig=0,772, sig= 0,366).

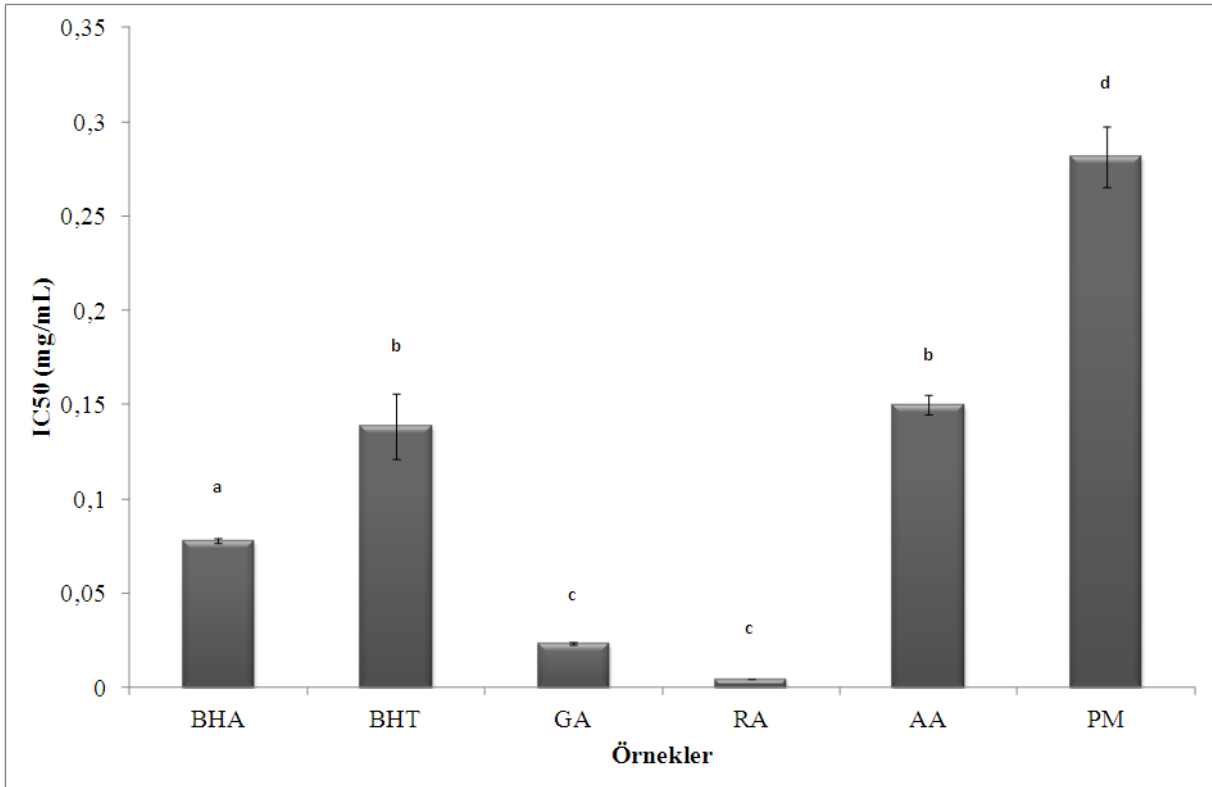
TARTIŞMA & SONUÇ

Bu çalışmada halk arasında sıcak su ile hazırlanarak tüketilen *Pistacia terebinthus* L. yöresel kahvesi ile mey-

Tablo I. *P. terebinthus*'ekstresinin ve kahvenin toplam fenol ve flavonoit miktarları

Ekstre*	Verim [%]	Toplam Fenol [mg _{GAE} /g _{ekstre}]	Toplam Flavonoit [mg _{ca} /g _{ekstre}]
PM	13.33	93.74 ± 1.84	76.01 ± 5.90
PK	-	43.5 ± 2.27	-

Ortalama ± SS; *(PM), metanol ekstresi; (PK), kahve.



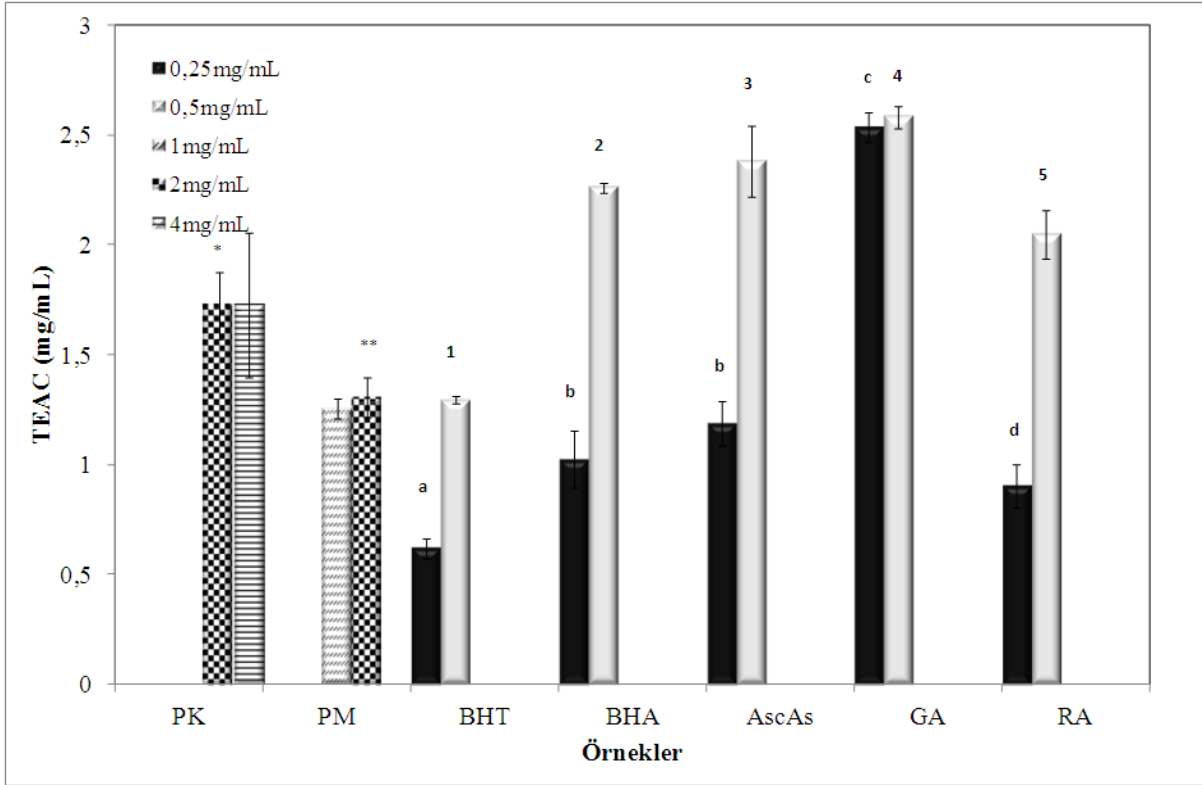
Şekil 1. *P. terebinthus* ekstresi ve standartların DPPH* radikalini süpürücü aktiviteleri. BHA, Butillenmiş hidroksianisol; BHT, Butillenmiş hidroksitoluen; GA, gallik asit; RA, rozmarinik asit; AA, askorbik asit; PM, *P. terebinthus* meyve ekstresi. (Ortalama ± SS olarak verilen değerler ± %95 güven aralığında belirtilmiştir. (a-d) arası aynı harflerle belirtilmiş barlar $p > 0,05$ ' den farklı değildir.)

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

Ekstrenin ve kahvenin ABTS* radikalini süpürücü etkileri değerlendirilmiş ve sonuçlar Şekil 2' de verilmiştir. Tüm ekstre ve standartlarda etki konsantrasyonla doğru orantılı bir şekilde artış göstermiştir. Ekstreler 2 mg/mL ve 4 mg/mL konsantrasyonlarda aktif bulunmuştur. Çalışmada kullanılan ekstraller ve standartlara ait deney

velerden elde edilen metanol ekstralarının içeriklerini, taşıdıkları toplam fenol ve flavonoit miktarları üzerinden karşılaştırarak ekstraların, ABTS ve DPPH radikalini süpürücü etkilerini belirlenmiştir.

DPPH* radikal süpürücü etki testleri polar ortamlarda yapılmaktadır. Bu nedenle de bu bileşiklerce zengin fraksiyonlar bu deney sisteminde etkili bulunmuştur. Ekstrelerin azot merkezli stabil bir radikal olan DPPH* radikalini süpürme kapasiteleri fizyolojik pH' da incelenmiş ve sonuçlar IC₅₀ olarak (mg/mL) verilmiştir. *P.*



Şekil 2. *P. terebinthus* ekstresi ve standartların ABTS[•] radikalini süpürücü aktiviteleri. BHA, butillenmiş hidroksianisol; BHT, butillenmiş hidroksitoluen; GA, gallik asit; RA, rozmarinik asit; AscAs, askorbik asit; PK, *P. terebinthus* kahve; PM, *P. terebinthus* meyve ekstresi. (Ortalama ± SS olarak verilen değerler ± %95 güven aralığında belirtilmiştir. (a-d) arası aynı harflerle, (1-5) arası aynı rakamlarla ve (*-**) arası aynı işaretlerle belirtilmiş barlar $p > 0,05$ ' den farklı değildir.)

terebinthus meyve ekstresinin IC₅₀ değeri 0.28 mg/mL'dir.

En çok kullanılan antioksidan aktivite ölçüm metodlarından birisi olan ABTS[•]/TEAC yöntemi, ABTS[•]'nin (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonyl) asit) oksidasyonu sonucu oluşan ABTS[•] radikal çözeltisi üzerine, antioksidan içeren örneğin eklenmesi sonucu radikalın indirgenmesi ve oluşan mavi/yeşil renkli ABTS[•] radikalinin renginin 600-750 nm dalga boyunda belirlenmesi ilkesine dayanmaktadır (15).

ABTS[•] radikalini süpürücü etki tayini *P. terebinthus* ekstresi için 2 mg/mL, menengiç kahvesi için 4 mg/mL dozlarda incelenirken pozitif standartlar 0.25 ve 0.5 mg/mL dozlarda çalışılmıştır. Hiçbir ekstre pozitif standart olarak kullanılan maddeler kadar aktivite göstermemiştir.

Orhan ve arkadaşları (8) tarafından yapılan Menengiç kahve ve meyve ekstralarının etilasetat ve metanol kullanılarak hazırlanan ve birbiriyle kıyaslandığı çalışmada, kahve ekstralarının meyve ekstralarından daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Gerçekleştirdiğimiz çalışmada ise ticari olarak temin edilen kahve, halkın kullandığı şekil olan sıcak su ile hazırlanmıştır. Dolayısıyla etkilerin karşılaştırılması mümkün olamamaktadır.

P. terebinthus' un meyve ekstresi ile yapılan çalışmalar sonucunda ekstrenin fenolik ve flavonoit bileşikler bakımından zengin olduğu tespit edilmiştir. Ancak menengiç kahvesinde içerik meyve ekstresi kadar zengin bulunmamıştır. Antioksidan aktivite deneylerinde de kahvenin DPPH radikalini süpürücü etkisinin zayıf ancak

apolar ortamda ABTS radikalini süpürücü etkisinin meyve ekstresinden daha güçlü olduğu bunun da fenolik yapıda olmayan bileşiklerin aktivite göstermesine bağlı olduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Yaltirik F. Anacardiaceae. In: Davis PH (eds), Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh University Press, Edinburgh 1967; Vol 2, pp 544-548.
2. Baytop T. Türkiyede bitkiler ile tedavi (geçmişte ve bugün). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 1999; ss 324.
3. Ayfer M. Bazı önemli *Pistacia* türlerinin meyvelerinde yağ miktarı ile yağ asitlerinin çeşit ve oranları ve bunlardan biyokimyasal sistematiğe yararlanma olanakları üzerinde araştırmalar. (Studies on the oil contents and the types and relative amounts of fatty acids in the nuts of some important *Pistacia* species and the possibilities of using these characteristics in biochemical systematics). Yalova Bahçe Kültür Araştırma Dergisi 1973; 6(1/2): 25-40.
4. Kültür Ş. Medicinal plants used in Kırklareli province (Turkey). J Ethnopharmacol 2007; 111(2): 341-364.
5. Yeşilada E, Honda G, Sezik E, et al. Traditional medicine in Turkey. V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains. J Ethnopharmacol 1995; 46(3): 133-152.

6. Topçu G, Ay M, Bilici A, et al. A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. Food Chem 2007; 103(3): 816-822.
7. Hacıbekiroğlu I, Yılmaz PK, Haşimi N, et al. In vitro biological activities and fatty acid profiles of *Pistacia terebinthus* fruits and *Pistacia khinjuk* seeds. Nat Prod Res 2015; 29(5): 444-446.
8. Orhan IE, Senol FS, Gulpinar AR, et al. Neuroprotective potential of some terebinth coffee brands and the unprocessed fruits of *Pistacia terebinthus* L. and their fatty and essential oil analyses. Food Chem 2012; 130(4): 882-888.
9. Usai M, Pintore G, Chessa M, et al. Essential oil composition of different aerial parts of *Pistacia terebinthus* L. growing wild in Sardinia. J Essent Oil Res 2006; 18(4): 383-385.
10. Sekeroglu N, Senol FS, Orhan IE, et al. In vitro prospective effects of various traditional herbal coffees consumed in Anatolia linked to neurodegeneration. Food Res Int 2012; 45(1): 197-203.
11. Singleton V, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic 1965; 16(3): 144-158.
12. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem 1999; 64(4): 555-559.
13. Gyamfi MA, Yonamine M, Aniya Y. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana: *Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries. Gen Pharmacol- Vasc S 1999; 32(6): 661-667.
14. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med 1999; 26(9): 1231-1237.
15. Dorman HD, Bachmayer O, Kosar M, et al. Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. J Agr Food Chem 2004; 52(4): 762-770.