

ÇEŞİTLİ BİTKİ ÇAYLARININ MONOAMİN OKSİDAZ İNHİBİSYONLARININ VE ANTIOKSİDAN ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Başak YÜCE-DURSUN

Marmara Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, İstanbul

*Corresponding author: e-mail: basak.yuce@marmara.edu.tr

Alınış (Received): 29 Mart 2017, Kabul (Accepted): 22 Mayıs 2017, Erken Görünüm (Online First): 29 Temmuz 2017, Basım (Published): 15 Aralık 2017

Özet: Meyve çaylarının terapötik özellikleri içerdikleri polifenolik flavonoidlerden kaynaklanmaktadır. Bir flavoenzim olan monoamin oksidazı (EC 1.4.3.4, MAO) inhibe eden bileşiklerin, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif rahatsızlıkların tedavisinde ve çeşitli nörolojik rahatsızlıklarda ilaç olarak kullanıldığı bilinmektedir. Antioksidan özelliğe sahip doğal bileşiklerin nörodejenerasyonda önemli bir rol oynayan oksidatif stresi azaltarak bu hastalıkları önlediğine dair çok sayıda çalışma vardır. Bu nedenle monoamin oksidaz enzimini inhibe edebilecek ve oksidatif stresi azaltabilecek çift etkili ürünlerin bulunması ayrı bir önem taşımaktadır. Bu çalışmada Türkiye'deki marketlerden satın alınan çeşitli meyve çaylarının; ferrik indirgeyici antioksidan güç, bakır indirgeyici antioksidan kapasite ve 1,1-difenil-1-pikrilhidrazil radikal süpürücü metotları ile antioksidan aktiviteleri saptanmıştır ve toplam fenolik madde miktarları belirlenmiştir. Bu çay infüzyonlarının, MAO enzim inhibisyonları florometrik olarak tayin edilmiştir. Elde edilen tüm sonuçlar poşet yeşil çay ve siyah çay ile kıyaslanmıştır. Elde edilen sonuçlarda, bitki çayı örneklerinin antioksidan ve MAO inhibisyon özelliklerinin içerdikleri toplam fenolik madde miktarı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Nar içeren çay infüzyonları daha yüksek antioksidan aktivite ve fenolik madde içeriğine sahip olup aynı zamanda da yüksek MAO inhibisyonu göstermektedir. Elde edilen sonuçlar, kuşburnu başta olmak üzere çeşitli çay infüzyonlarında 2-3,5 kat arasında değişen MAO-B seçiciliği bulunduğunu da göstermektedir. Fenolik maddelerin MAO inhibisyonuna sebep olduğu bilgisinden yola çıkılarak yapılan bu çalışmada, çay infüzyonlarının MAO inhibisyon yetenekleri de olduğu ilk kez ortaya konulmuştur.

Anahtar kelimeler: Antioksidan aktivite, CUPRAC, çay infüzyonu, DPPH, FRAP, MAO inhibisyonu.

Determination of Monoamine Oxidase Inhibition and Antioxidant Effects of Various Herbal Teas

Abstract: The therapeutic properties of fruit teas are due to the polyphenolic flavonoids they contain. Compounds inhibiting the flavoenzyme monoamine oxidase (EC 1.4.3.4, MAO) are known to be used as medicines in treatment of neurodegenerative disorders such as Alzheimer's and Parkinson's diseases, and in various neurological disorders. There are many studies about natural compounds with antioxidant properties that prevent such diseases by reducing oxidative stress which plays an important role in neurodegeneration. It is therefore of particular importance to find double-acting products that can both inhibit monoamine oxidase and reduce oxidative stress. In this study, antioxidant activities of various fruit teas purchased from markets in Turkey were determined by ferric-reducing antioxidant power, cupric reducing antioxidant capacity and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl methods and their total phenolic contents were revealed. MAO enzyme inhibitions of these tea infusions was determined fluorometrically. The obtained results were compared with green and black tea bag infusions. The results showed that antioxidant and MAO inhibition properties of fruit tea samples were related to their total amount of phenolic substances they contained. Pomegranate containing tea infusions had higher antioxidant activity and phenolic content and exhibited high MAO inhibition. The results also showed that a MAO-B selectivity varying between 2 to 3,5-fold existed in various tea infusions with the highest value in rose hip tea. MAO inhibition abilities of tea infusions were demonstrated for the first time in this present study which was based on the fact that phenolic substances are responsible for MAO inhibition.

Keywords: Antioxidant activity, CUPRAC, tea infusion, DPPH, FRAP, MAO inhibition.

Giriş

Tıbbi ve aromatik bitkiler dünyada ve Türkiye'de önemli bir yere sahiptir. Yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular ve yoğun reklam kampanyaları dünya genelinde çay tüketimini artırmış ve çayı, sıvı tüketiminde sudan sonra ikinci sıraya yerleştirmiştir (Piljac-Žegarac

ve ark. 2010). Son yıllarda ülkemizi de içine alan sağlıklı yaşam arayışı ve doğru beslenmeye artan ilgi nedeniyle bitkisel çayların (infüzyon) kullanımı da yaygınlaşmıştır (Naithani ve ark. 2006, Çağındı ve Ötleş 2008). Çay tüketiminin, kalp-damar hastalığı, kanser, karaciğer

hastalıkları, artrit, viral ve bakteriyel enfeksiyonlara yakalanma riskini düşürdüğüne dair çalışmalar bulunmaktadır (Von Gadow ve ark. 1997, Naithani ve ark. 2006). Yine çaylarda bulunan kuersetin gibi polifenollerin de UV koruyucu etki göstererek cilt hasarını önlediği bilinmektedir (Piljac-Zegarac ve ark. 2010).

Bitkisel çayların; A, B₆, C, E vitaminleri, koenzim Q10, karotenoidler, selenyum, çinko, polifenoller ve diğer serbest radikal süpürücüler açısından zengin olduğu çok sayıda araştırmada yer almaktadır (Atoui ve ark. 2005, Piljac-Zegarac ve ark. 2010). Flavonoidler, flavanoller, flavonoller, izoflavonlar, fenolik asitler, glikozidler, aglikonlar bilinen önemli polifenoller arasındadır. Daha düşük toksisiteye sahip olmaları ve bilinen sentetik antioksidanlardan daha yüksek antioksidatif etki göstermeleri nedeniyle, gıda ve ilaç endüstrilerinde geniş uygulama alanı bulmaktadırlar (Naithani ve ark. 2006, Xi ve ark. 2009).

Bu infüzyonlar içerisinde bulunan doğal antioksidanlar, vücudu serbest radikallerin zararlı etkisine karşı korurlar. Bu serbest radikaller endojen (solunum zinciri sırasında, oksidatif enzimler ya da fagositik hücreler yoluyla) ya da eksojen (hava kirliliği, sigara tüketimi ve çeşitli toksinler) olarak meydana gelebilirler (Naithani ve ark. 2006). Polifenollerin antioksidan aktiviteleri indirgeyici ajan, hidrojen vericisi ve singlet oksijeni yakalayıcısı gibi davranmalarını sağlayan redoks özelliklerinden ileri gelmektedir. Organizmada açığa çıkan reaktif oksijen türleri membran, nükleik asit, protein ve lipid yapılarına zarar vererek iskemi, katarakt, kanser, gut, yaşlanma, diyabet, demans, renal toksisite, kalp ve nörolojik hastalıklar gibi çok sayıda patolojik durumun oluşmasına sebep olurlar (Atoui ve ark. 2005, Lo ve Cheung 2005, Naithani ve ark. 2006). Antioksidanlar, özellikle lipidlerin ve düşük yoğunluklu lipoproteinlerin oksidasyonunu önleyerek oksidatif stresi de azaltırlar. Tüm bu özelliklerinden dolayı antioksidanların, kalp ve damar hastalıklarını ve kanser risklerini azalttıkları, Alzheimer hastalığı gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıkların başlangıcını geciktirdikleri gösterilmiştir (Fang ve ark. 2002, Atoui ve ark. 2005, Moraes-de-Souza ve ark. 2008).

Monoamin oksidaz (MAO; EC 1.4.3.4), farklı hücrelerin mitokondri dış membranında bulunan, flavin adozin dinükleotid içeren bir flavoenzimdir. Önemli nörotransmitterlerin oksidasyonunda ve hücre içi konsantrasyonunun düzenlenmesinde rol oynar (Abdelhafez ve ark. 2013). MAO'nun, anahtar konumundaki nörotransmitterlerin metabolizmasında yer alması, bu enzimi nörolojik bozuklukların tedavisinde farmakolojik müdahale için önemli bir hedef haline getirmiştir (Van den Berg ve ark. 2007). MAO, farklı üç boyutlu yapı, substrat ve inhibitör seçim özellikleri ile birbirinden ayrılan ve MAO-A ve -B olarak adlandırılan iki izoenzim halinde bulunur. Spesifik MAO enzim inhibitörleri, nörodejeneratif rahatsızlıkların tedavisinde ve çeşitli nörolojik rahatsızlıklarda ilaç olarak kullanılabilirler. Nörodejeneratif rahatsızlıklar gelişmiş

ülkelerdeki en önemli üçüncü sağlık sorunudur ve Alzheimer ve Parkinson hastalıkları en sık karşılaşılan nörodejeneratif rahatsızlıklardır. MAO-A inhibitörleri depresyon ve anksiyete tedavisinde kullanım alanı bulurken MAO-B inhibitörleri Parkinson ve Alzheimer hastalıklarının tedavisinde kullanılabilirler (Shi ve ark. 2010). Bu bilgiler ışığında, meyve çaylarının nörodejeneratif hastalıklar üzerindeki etkilerini anlamak için MAO enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri de araştırma konusu olarak seçilmiştir.

Meyve çaylarının, özellikle kırmızı meyve çaylarının popülerliği ülkemizde de gün geçtikçe artmaktadır. Bu çayların içeriğine bakıldığında; kurutulmuş meyveler, meyve kabukları, yapraklar gibi farklı bitki kısımlarını da içerdikleri görülür (Emekli-Alturfan ve ark. 2009). Hazırlanması kolay ve pratik olduğu için poşet çaylar, evlerde ve işyerlerinde demleme çaylara tercih edilmektedir. Birçok markanın meyve ve kırmızı meyve poşet çayları marketlerde ve aktarlarda çeşitli isimler altında, antioksidan özelliği vurgulanarak satılmaktadır. Meyvelerin toplam antioksidan aktiviteleri ve toplam fenolik madde (TFM) miktarları ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen, poşet meyve çaylarının, özellikle de poşet kırmızı meyve çaylarının antioksidan aktiviteleri ile yapılan çalışmalar kısıtlıdır ve MAO inhibisyon etkileri ile ilgili literatürde çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı, ticari olarak satılan çeşitli bitki infüzyonlarının oksidatif stres ve bu stresin nedenlerinden biri olan nörodejeneratif rahatsızlıkların gelişimine etkisinin olup olmadığının *in vitro* olarak incelenmesidir. Bu sebeple, en çok tüketilen kırmızı meyve ve diğer meyvelerin poşet çaylarının toplam antioksidan aktiviteleri, radikal süpürücü etkileri, TFM miktarları ve MAO enzim inhibisyonuna olan etkileri saptanmış, yeşil ve siyah poşet çaylar ile karşılaştırmaları yapılmıştır.

Materyal ve Metot

Örnekler

Piyasada çeşitli üreticiler tarafından ticari olarak satılan poşet çaylar Türkiye'deki marketlerden temin edilmiştir ve içerikleri Tablo 1'de verilmiştir.

Kimyasallar

Folin-Ciocalteu reaktifi, gallik asit, troloks, insan rekombinant MAO-A (hMAO-A) ve MAO-B (hMAO-B) enzimleri Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); 1,1-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany) ve Amplex Red MAO Tayin Kiti İnvitrogen (Waltham, MA, A.B.D.) firmalarından temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik saflıktadır ve Merck (Darmstadt, Germany) firmasından temin edilmiştir.

Bitkisel İnfüzyonların Hazırlanması

Tablo 1'de isimleri ve kaynakları verilen çay poşetleri (2,5g) üretici firmaların tavsiye ettiği gibi 200mL kaynar su içine daldırılarak 5dk bekletildi ve süre sonunda

poşetler günlük kullanımda olduğu gibi sıkılarak kaptan çıkarıldı. Elde edilen infüzyonun oda sıcaklığına gelmesi beklendi. İnfüzyonlar distile su ile 1:10 seyreltildi ve antioksidan etkileri Fe^{3+} İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) ve Cu^{2+} İndirgeyici Toplam Antioksidan Kapasite (CUPRAC) yöntemleriyle tayin edildi. Radikal süpürücü etkileri 1,1-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) yöntemi ile ve çay örneklerinin içerdiği TFM miktarı Folin-Ciocalteu yöntemi ile saptandı. Çay örneklerinin MAO enzimini inhibe edici etkileri kit kullanım kılavuzuna uygun şekilde gerçekleştirildi.

Ekstraktlarda Bulunan TFM Miktarının Tayini

TFM miktarı tayini spektrofotometrik olarak Folin-Ciocalteu yöntemine göre (Ismail ve ark. 2004) yapıldı. 100µL seyreltilmiş çay ekstraktı, 750µL Folin-Ciocalteu (%10, h/h) reaktifi ve 750µL sodyum karbonat (%6, a/h) çözeltisi ile karıştırıldı. Elde edilen çözelti 90dk karanlıkta bekletildikten sonra oluşan mavi rengin absorbansı UV-Vis spektrofotometrede (Thermo Scientific, USA) 725nm'de, örnek içermeyen çözeltiye karşı okundu. Bu analiz için standart gallik asit çözeltisinin 8 farklı konsantrasyonu ile bir kalibrasyon eğrisi hazırlandı ($R^2=0,998$). Elde edilen eğri yardımıyla ekstraktların fenolik madde miktarı hesaplandı ve sonuçlar "mmol gallik asit eşdeğeri (GAE)/g kuru madde" olarak verildi. Deney iki paralel olarak tekrarlandı.

DPPH Radikalini Giderme Etkisi

Çay örneklerinin radikal süpürücü etkisi, DPPH yöntemi modifiye edilerek belirlendi (Danis ve ark. 2014). Bu amaçla seyreltilmiş çay ekstraktından 250µL alınarak 1mL DPPH çözeltisi (0,1mM; metanolde) ile karıştırıldı. Kontrol olarak distile su kullanıldı. Reaksiyon karışımı vorteks karıştırıcıda karıştırılıp 30dk oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildi. Süre sonunda karışımın absorbansı spektrofotometrede 517nm'de metanole karşı okundu. Antioksidan aktivite DPPH radikalinin % inhibisyonu cinsinden, aşağıdaki eşitlikten yararlanılarak hesaplandı. Deney iki paralel olarak tekrarlandı.

$$\% \text{ inhibisyon} = \left[\frac{Ak_{(0)} - A\ddot{o}_{(t)}}{Ak_{(0)}} \right] \times 100$$

$Ak_{(0)}$; kontrolün ilk andaki absorbansı, $A\ddot{o}_{(t)}$; örneğin t anındaki absorbansı.

FRAP Yöntemi ile Antioksidan Aktivite Tayini

Çay infüzyonlarının Fe^{3+} indirgeme gücü tayini için 100µL çay infüzyonu 200µL fosfat tamponu (50µM, pH:6,6) ve 200µL potasyum ferrisiyanür (%1, a/h) ile karıştırıldı. Karışım 50°C'de su banyosunda 20dk inkübe edildikten sonra soğutuldu ve 200µL triklorasetik asit (%10, a/h) ile 10.000g'de 10dk santrifüj edildi. Üst tabakadan alınan 700µL üzerine, 150µL demir klorür (%0,1, a/h) çözeltisi eklenerek karıştırıldı ve UV-Vis spektrofotometrede 700nm'de verdiği absorbans değerleri okundu (Danis ve ark. 2014). Deney iki paralel olarak tekrarlandı ve troloks pozitif kontrol olarak kullanıldı. Her bir örneğin toplam antioksidan kapasitesi

troloksa eşdeğer antioksidan kapasitesi (TEAC) cinsinden ifade edilerek verildi.

CUPRAC Yöntemi ile Toplam Antioksidan Kapasite Tayini

Bakır indirgeyici antioksidan kapasite Apak ve arkadaşları (2004) tarafından belirlenen yöntemde ufak değişiklikler yapılarak gerçekleştirildi. 800µL seyreltilmiş çay infüzyonları üzerine 160µL $CuCl_2$ (10mM), 160µL NH_4Ac (pH:7) ve 160µL neokuproin (7,5mM) çözeltileri eklenerek 30dk bekletildi. Absorbans değerleri 450nm'de UV-Vis spektrofotometrede okundu. Pozitif kontrol olarak troloks kullanıldı. Her bir örneğin toplam antioksidan kapasitesi TEAC cinsinden ifade edilerek verildi. Deney iki paralel olarak tekrarlandı.

Tablo 1. Denemelerde kullanılan ve Türkiye'deki marketlerden temin edilen poşet çayların içerikleri.

Çay Türü	İçindekiler
Adaçayı	Adaçayı yaprağı
Böğürtlen	Bamya çiçeği, elma, kuşburnu, böğürtlen yaprağı, böğürtlen aroması, portakal kabuğu, mürver meyvesi, böğürtlen, stevya, tarçın
Frenk Eriği-Tarçın	Bamya çiçeği, elma, tarçın, böğürtlen, elma, badem aromaları, kuşburnu, mürver, portakal kabukları, erik, karanfil
Kırmızı Meyveler A	Kuşburnu, bamya çiçeği, portakal kabuğu, aromalar, stevya, çilek, yaban mersini, ahududu, nar kabuğu, elma
Kırmızı Meyveler B	Elma ve çilek parçacıkları, kuşburnu meyvesi, bamya çiçeği, üzüm çekirdekleri tohumu, nar ve portakal kabuğu, böğürtlen yaprakları, nar-böğürtlen ve çilek aroması
Kuşburnu	Kuşburnu, bamya çiçeği
Nar	Bamya çiçeği, kuşburnu, portakal kabukları, böğürtlen, mürver, nar meyve kabuğu, tarçın, alıç, yaban mersini, frenk üzümü, nar aroması, nar suyu
Nar-Çilek	Bamya çiçeği, elma, nar-portakal kabuğu, kuşburnu, çilek - tropik portakal aroması, böğürtlen yaprağı, çilek ve yaban mersini parçacıkları, mürver ve stevya
Siyah Çay	Kenya, Seylan, Endonezya ve Türk çaylarının karışımı
Üzüm Çekirdeği-Mürdüm Erikli	Bamya çiçeği, elma, kuşburnu, portakal kabuğu, böğürtlen yaprağı, erik aroması, erik parçacıkları, üzüm çekirdeği
Yaban mersini	Bamya çiçeği, kuşburnu, elma, böğürtlen yaprakları, yaban mersini aroması, portakal kabukları, yaban mersini parçacıkları
Yeşil Çay	Yeşil çay, böğürtlen yaprakları, ginkgo yaprakları ve yeşil çay aroması
Zencefil-Limon Kabuklu	Limon otu, zencefil, melisa, dut yaprağı, meyankökü, limon kabuğu, stevya, limon aroması

MAO Enzim İnhibisyonunun Belirlenmesi

MAO enzim aktivitesi Invitrogen Amplex Red MAO tayin kiti kullanım kılavuzuna uygun olarak gerçekleştirildi. Çalışma süresince substrat (*p*-tiramin) ve reaksiyon tamponu karanlıkta ve oda sıcaklığında, enzimler ise buz üzerinde tutuldu. 2µL örnek (infüzyon çözeltilisinden 1/10 oranında seyreltilerek), 4,5µL hMAO-A veya hMAO-B ve 93,5µL reaksiyon tamponu, siyah düz tabanlı spektrofotometrik 96 kuyulu mikro plakalara konuldu. 15dk 37°C'de karıştırılarak inkübe edildi. Sürenin sonunda 100µL substrat çalışma çözeltilisi eklenerek reaksiyon başlatıldı. 37°C'de çoklu ölçümlü mikro plaka floresans okuyucuda (FLX800™, Bio-Tek® Instruments, Inc., Winooski, VT, USA; 545nm eksitasyon ve 590nm emisyon) 15dk boyunca her 30sn bir ölçüm alınarak enzimatik reaksiyonun ilerlemesi takip edildi. İnhibisyon yüzdesi, 15dk sonundaki gözlenen floresans şiddetinden başlangıç anındaki floresans şiddeti çıkarılarak aşağıdaki formüle göre belirlendi.

$$\% \text{inhibisyon} = \frac{F_{enz} - F_{inh}}{F_{enz}} \times 100$$

F_{enz} : inhibitörsüz enzim aktivitesi; F_{inh} : inhibitör varlığında enzim aktivitesi

İstatistiksel Analiz

Çalışmada kullanılan tüm istatistiksel analizler ve korelasyon ilişkisi GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) programı ile gerçekleştirildi. Temel bileşenler analizi için XLSTAT 19.01 programı (Addinsoft, Inc. Brooklyn, NY) kullanıldı.

Bulgular ve Tartışma

2000 yılı aşkın bir zamandır çaylar, tedavi edici ve keyif verici olarak dünyanın hemen her bölgesinde tüketilmektedir ve tüketimde sudan sonra ikinci sırayı almaktadır (Hodgson ve Croft 2010). Özellikle batı toplumlarında sağlıklı yaşama ilgi arttıkça meyve çaylarına da ilgi artmakta ve tüketimi yaygınlaşmaktadır. Yapılan bilimsel araştırmalarda bitki çaylarının genel halk sağlığını korumada ve bazı hastalıkları tedavide olumlu sonuçlar verdiği gösterilmiştir. Çayların bu etkileri içerdikleri antioksidan bileşikler ile ilişkilendirilmektedir ve çalışmalar standart referans antioksidanlar ile karşılaştırılarak değerlendirilmektedir. Oksidasyon işlemlerinde başlatıcı olan serbest radikalleri nötralizasyon ile etkisiz hale getirebilme özellikleri nedeniyle fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitelerini tayin etmek oldukça önemlidir. Bitkilerin antioksidan aktivite kapasiteleri, uygulanan analitik yöntemlere göre değişkenlik gösterebilmektedir (Çağındı ve Ötleş 2008).

Bitki ve meyve çayları yaşam kalitesine katkılarının ve yararlarının yanı sıra farklı keyif verici tatlar denemek için de tercih edilmektedirler. Bu çaylar, bitkilerin yaprak, çiçek, kök ve meyve gibi kısımlarının kurutulması ile elde edilirler. Kullanımı pratik olduğu için poşet meyve çayları dökme çaylara tercih edilmektedir. Bu çayların üretici tarafından da tavsiye edilen tüketim şekli infüzyon olarak nitelendirilen su ile haşlayarak demlemedir. Tablo 1'de de

görüldüğü gibi çalışmamızda kullandığımız meyve çayları kurutulmuş meyvelerin yanı sıra diğer bazı bitkilerin çiçek, yaprak ve tohum gibi diğer kurutulmuş kısımlarını da içermektedir. Genellikle, renk ve koku verici olarak kurutulmuş bamya çiçeği de üretici tarafından bu karışımlara eklenmektedir. Poşet çayların üretici tarafından kaynar su ile demlenerek hazırlanması önerilmektedir. Farklı sıcaklıklarda yapılan çalışmalar da literatürde yer almaktadır ancak en yüksek antioksidan aktivite ve TFM içeriği 100°C sıcaklıkta demleme ile elde edilmektedir (Şahin 2013).

TFM Miktarının Belirlenmesi

Çalışmada, TFM miktarı modifiye edilmiş Folin-Ciocalteu yöntemine göre gerçekleştirildi. Yöntem, alkali ortamda fosfotungstik asidin indirgenerek, mavi renk oluşturmasına dayanır. Oluşan fosfotungstat mavisinin şiddeti, aromatik fenolik grupların sayısı ile orantılıdır (Horzic ve ark. 2009). Bu yöntem özellikle gıdaların TFM miktarlarının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan güvenilir bir yöntemdir (Albayrak ve ark. 2010). Çalışmada denenen çay infüzyonları arasında en yüksek TFM içeriklerinin sırasıyla nar-çilek karışım, nar ve kuşburnu infüzyonlarında elde edildiği görülmüştür (sırasıyla, 0,424±0,172; 0,328±0,153; 0,291±0,185mmol GA/g KA). Siyah çay (0,535±0,208mmol GA/g KA) ve yeşil çay (0,564±0,215mmol GA/g KA) ile karşılaştırıldıklarında meyve çaylarının daha düşük TFM içerdikleri görülmektedir (Tablo 2). Zencefil-limon karışım infüzyonu ise incelenen infüzyonlar arasında en düşük fenolik madde içeriğine sahip olan çaydır (0,071±0,062mmol GA/g KA).

Böğürtlen yaprağı infüzyonu ile yapılan bir çalışmada 559±12mg GA/L (Gorjanović ve ark. 2012); böğürtlen ve çilek infüzyonu ile de 75,4±1,2 ve 62,4±1mg GA/g kuru madde (Buřičová ve ark. 2011) sonuç elde edilmiştir. Türkiye'deki farklı meyve poşet çaylar ile yapılan çalışmada ise nar infüzyonunun (6,91±0,47mg GA/g kuru madde) en yüksek TFM içeriğine sahip olduğu gösterilmiştir (Şahin 2013). Çalışmamızda elde edilen en yüksek TFM değeri mg cinsinden 72mg GA/g KA'ya karşılık gelmektedir ve literatürdeki çalışmalar ile benzerlik sergilemektedir.

Antioksidan Denemeler

Antioksidan kapasiteyi belirleyebilmek için literatürde çeşitli yöntemler yer almaktadır. Bu çalışmada kullanılan DPPH, FRAP ve CUPRAC yaygın olarak kullanılan yöntemlerdendir.

DPPH azotlu bir serbest radikal bileşimidir ve örneklerin serbest radikal süpürme etkisini ölçmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Moleküldeki serbest elektron yer değiştirerek önce koyu menekşe renk oluşturur, bileşik hidrojen verme yeteneğine sahip antioksidan ile karşılaştığında bu koyu menekşe renk kaybolarak açık sarı indirgenmiş form meydana gelir (Albayrak ve ark. 2010). Maddenin DPPH inhibisyonu ne kadar fazla ise o kadar fazla hidrojen verme yeteneğine dolayısı ile yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu

anlamına gelir (Şekil 1). Sonuçlar karşılaştırıldığında, yeşil çay en yüksek hidrojen verme kapasitesine sahip olan çaydır, sonrasında siyah çay gelmektedir. Meyve çayları arasında ise en yüksek aktiviteyi nar-çilek karışım infüzyonu, en düşük aktiviteyi ise zencefil-limon karışım infüzyonu göstermektedir. Nar-çilek karışım ve nar infüzyonlarının %50'nin üzerinde süpürme etkisi gösterdikleri görülmektedir. Diğer çay infüzyonlarında ise süpürücü etki daha azdır. Standart antioksidan bileşikler olan troloks ve askorbik asit ile karşılaştırma yapıldığında siyah ve yeşil çay infüzyonlarının standart bileşiklere oldukça yakın sonuçlar verdikleri ancak meyve çaylarının standartlar kadar yüksek etki gösteremedikleri görülmektedir.

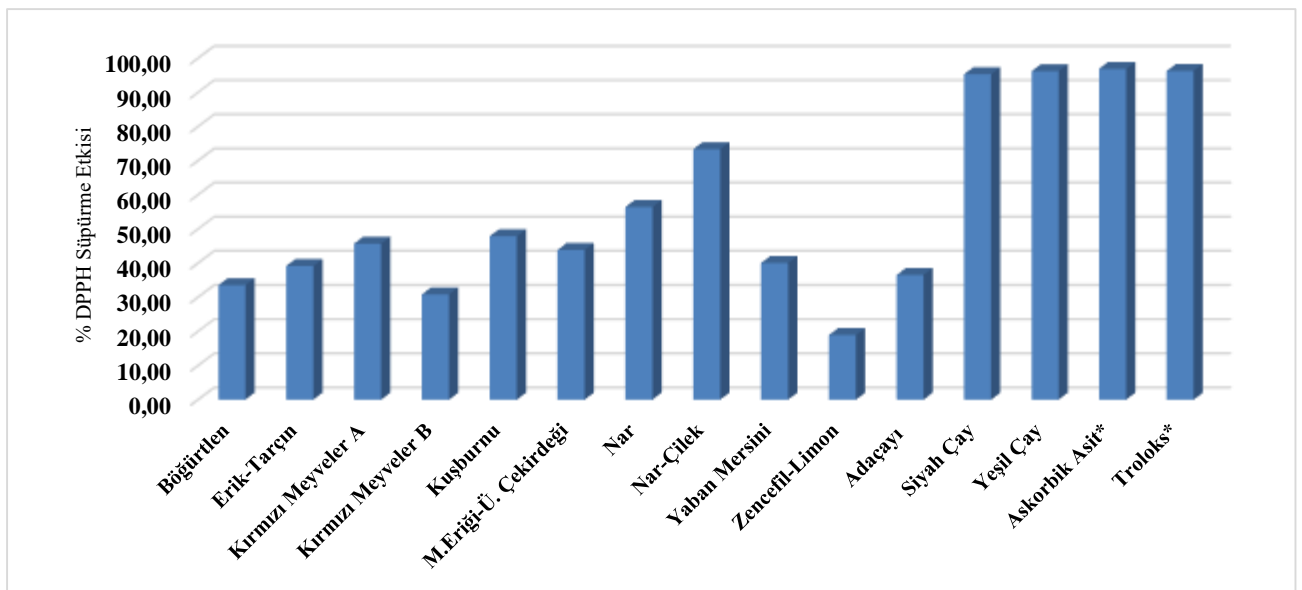
DPPH metodu çok sayıda bitkisel ekstrakta uygulanan standart yöntemlerden biridir. Meyvelerdeki yüksek antioksidan değerlerin antosiyanin ve flavonoidlerle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Faria ve ark. 2005). Böğürtlen yapraklarının toplanarak infüzyonlarının hazırlandığı bir çalışmada DPPH etkisi %81, mürver çiçeği infüzyonunda ise %37 olarak gösterilmiştir (Dawidowicz ve ark. 2006). Mürver çiçeği genellikle poşet çayların içeriğine eklenmektedir ancak çok yüksek etkiye sahip olmadığı görülmektedir. Yaban mersininin çeşitli ekstraktları ile yapılan bir çalışmada DPPH sonucu 5,37-6,40µmol troloks aralığında bulunmuştur. Böğürtlen yaprağı infüzyonu ile 2,37±0,23mM (Gorjanović ve ark. 2012) ve böğürtlen ve çilek infüzyonu ile de 125,2±2,9 ve 110,1±16,6mg askorbik asit/g kuru madde sonuç elde edilmiştir.

FRAP yöntemi, asidik ortamda Fe³⁺-2,4,6-tripiridil-S-triazin kompleksinin Fe²⁺'ya indirgenmesi esasına dayanır. Bu reaksiyonun şiddeti absorban değışikliği ile izlenir (Albayrak ve ark. 2010). Absorbanstaki artış indirgeme gücündeki artışı göstermektedir. FRAP metodu ile yapılan çalışmada en yüksek antioksidan aktiviteyi meyve çayları arasında nar-çilek karışım çayı

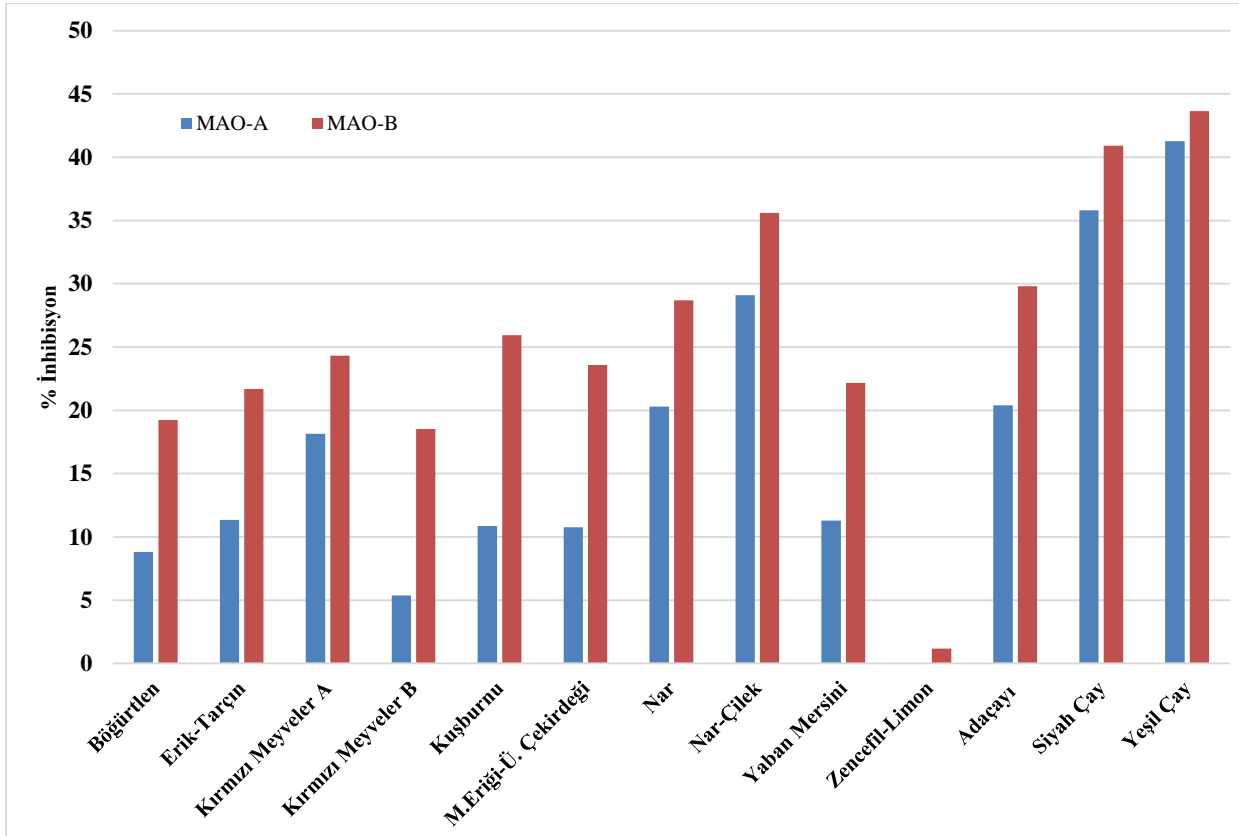
(0,793±0,087mmol troloks/g KA) göstermiştir. Nar, kuşburnu ve kırmızı meyveler-A karışım infüzyonları ise sırasıyla 0,650±0,098; 0,595±0,032 ve 0,561±0,035mmol troloks/g KA değerler ile yüksek aktivite gösteren diğer meyve çaylarıdır. Karşılaştırma için denenen siyah ve yeşil çay için sırasıyla 1,147±0,186 ve 1,090±0,172mmol troloks/g KA değerleri elde edilmiştir (Tablo 2). Böğürtlen yaprağı infüzyonu ile yapılan bir çalışmada 7,23±0,52mM (Gorjanović ve ark. 2012) ve böğürtlen ve çilek infüzyonu ile 36,7±11,1 ve 23,3±1,4mmol FeSO₄/L FRAP değeri elde edilmiştir (Buřičová ve ark. 2011).

CUPRAC yöntemi kromojenik ayıraç olarak neokuproin'in (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin), Cu(I) ile 2:1 oranında kompleks oluşturmaya dayanır. İki değerlikli bakırın bir değerlikli bakıra indirgenmesini temel alan CUPRAC metodu ile yapılan çalışmada ise en yüksek antioksidan aktiviteyi meyve çayları arasında nar infüzyonu (1,525±0,204mmol troloks/g KA) göstermiştir. Nar çayının yüksek total fenolik madde içeriğı ve antioksidan kapasitesi bulunduğu farklı yöntemlerde de gösterilmiştir (Şahin 2013). Nar-çilek karışımı ve kuşburnu infüzyonları da yüksek etki gösteren diğer infüzyonlardır (Tablo 2). Siyah çay ve yeşil çay ile yapılan denemeden elde edilen aktivite sonuçları tüm çaylardan yüksek bulunmaktadır.

CUPRAC ve FRAP değerleri arasındaki ilişki Pearson korelasyon analizi ile incelenmiş ve Pearson korelasyon katsayısı hesaplanmıştır, $p < 0.0001$ ($r = 0,984$). Bu sonuçlara göre, yapılan denemelerden elde edilen sonuçların birbirleri ile korele oldukları görülmektedir. Yapılan antioksidan denemelerin sonucunda meyve çaylarından elde edilen değerler siyah ve yeşil çay infüzyonları kadar yüksek değildir. Ancak çay tüketimine alternatif olarak kullanılırken aynı zamanda sağlık açısından da fayda sağlayacak düzeyde antioksidatif madde içerdikleri elde edilen sonuçlardan görülmektedir.



Şekil 1. Çay infüzyonlarının DPPH yöntemi ile tayin edilmiş % cinsinden DPPH süpürme etkileri (*: standart olarak kullanılan antioksidan bileşikler; 0,5mM).



Şekil 2. Denenen çay infüzyonlarının (10µg kuru madde/mL) %MAO-A ve -B enzim inhibisyonları.

Tablo 2. Denenen çay infüzyonlarının Toplam Fenolik Madde miktarları ve FRAP/CUPRAC yöntemleri ile indirgeyici güçleri.

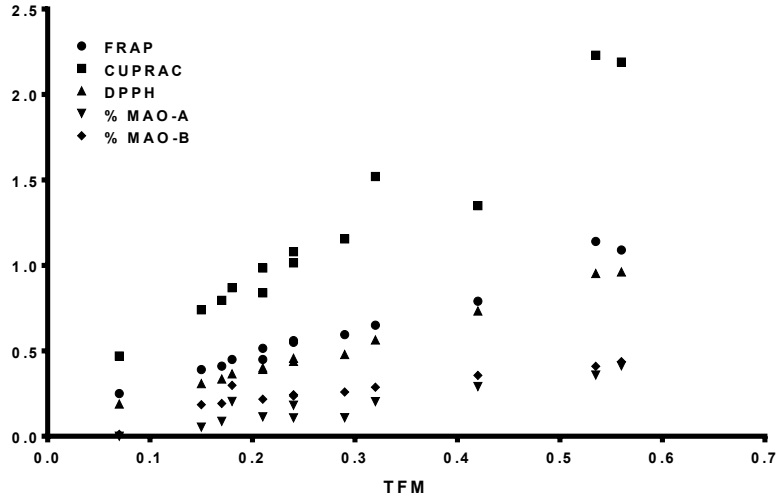
Çay infüzyonu	TFM ^a (mmol GA/g KA)	FRAP ^b (mmol troloks/g KA)	CUPRAC ^c (mmol troloks/g KA)
Böğürtlen	0,179±0,146	0,412±0,010	0,795±0,098
Erik-Tarçın	0,210±0,082	0,454±0,049	0,841±0,101
Kırmızı Meyveler A	0,244±0,033	0,561±0,035	1,087±0,102
Kırmızı Meyveler B	0,151±0,177	0,398±0,062	0,744±0,076
Kuşburnu	0,291±0,185	0,595±0,032	1,155±0,091
M.Eriği-Ü. Çekirdeği	0,242±0,182	0,551±0,011	1,015±0,087
Nar	0,328±0,153	0,650±0,098	1,525±0,204
Nar-Çilek	0,424±0,172	0,793±0,087	1,356±0,154
Yaban Mersini	0,218±0,018	0,515±0,045	0,985±0,106
Zencefil-Limon	0,071±0,062	0,254±0,012	0,473±0,058
Adaçayı	0,187±0,104	0,452±0,039	0,873±0,083
Siyah Çay	0,535±0,208	1,147±0,186	2,230±0,251
Yeşil Çay	0,564±0,215	1,090±0,172	2,199±0,219

TFM: Toplam Fenolik Madde, GA: Gallik Asit, KA: Kuru ağırlık, FRAP: Fe³⁺ İndirgeyici Antioksidan Güç, CUPRAC: Cu²⁺ İndirgeyici Toplam Antioksidan Kapasite, KA: Kuru Ağırlık

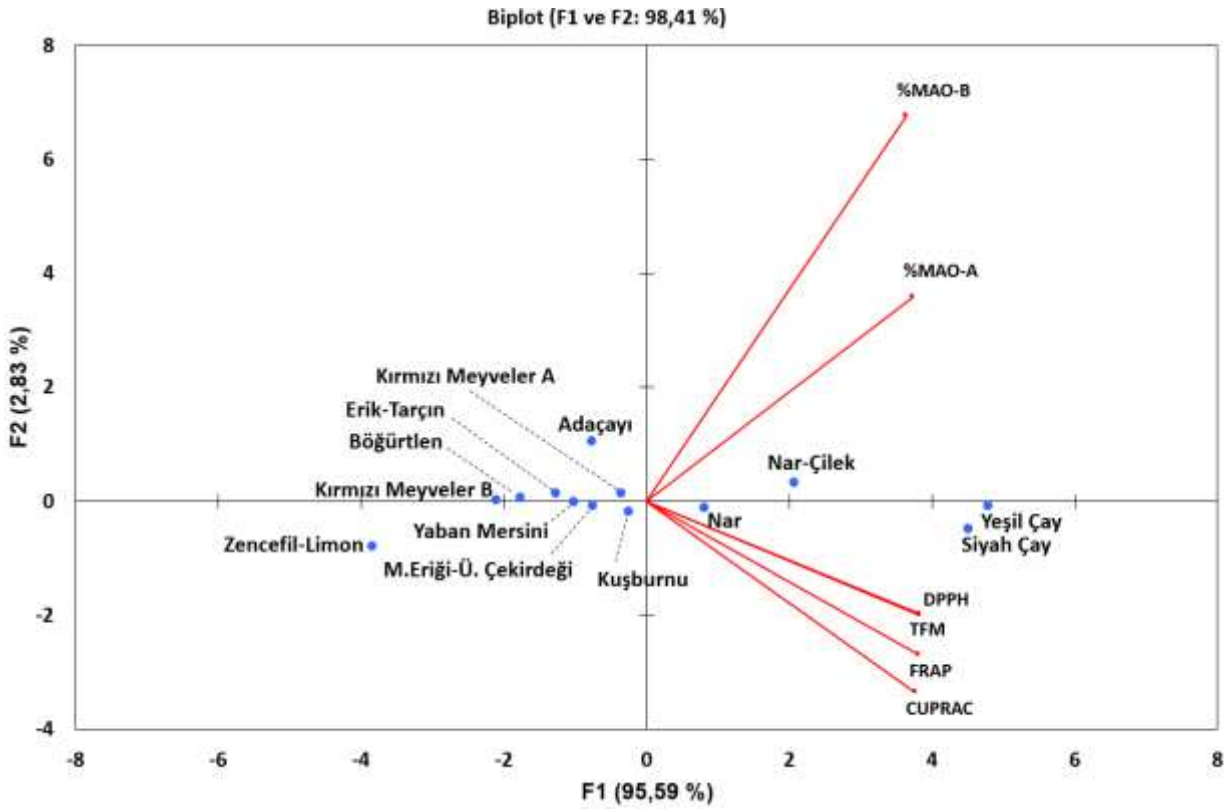
^a Total fenolik madde miktarı, mmol gallik asit eşdeğeri/g kuru ağırlık cinsinden verilmiştir.

^b Fe³⁺ indirgeyici antioksidan güç, troloksa eşdeğer antioksidan kapasitesi, mmol troloks/g kuru ağırlık cinsinden verilmiştir.

^c Cu²⁺ indirgeyici toplam antioksidan kapasite, troloksa eşdeğer antioksidan kapasitesi, mmol troloks/g kuru ağırlık cinsinden verilmiştir.



Şekil 3. TFM miktarı ile FRAP, CUPRAC, DPPH, MAO–A ve –B inhibisyon değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren grafik.



Şekil 4. TFM, FRAP, CUPRAC, DPPH, MAO–A ve –B inhibisyonu değerlerinin temel bileşenler analizi sonucu elde edilen biplot grafik.

MAO Enzim İnhibisyonu

Önceki yıllarda yapılan çalışmalarda bitkisel fenolik bir bileşik olan paeonolün MAO–A inhibitörü olduğu gösterilmiştir (Kong ve ark. 2004). Taze meyve kabukları ve yeşil çay yapraklarının (Ademosun ve Oboh 2014) MAO enzimi üzerine inhibisyon etkisinin bulunduğu dair çalışmalar olmakla birlikte çay infüzyonlarında yapılmış benzer bir çalışma bulunmamaktadır. Yaptığımız çalışmada 10µg kuru madde/mL

konsantrasyona karşılık gelen inhibisyon yüzdeleri, MAO–A ve –B enzimleri için ayrı ayrı çalışılmıştır (Şekil 2). En yüksek MAO–A inhibisyonu gösterenler, yeşil çay (%41,26) ve siyah çay (%35,8) infüzyonlarıdır. Diğer takip eden çay infüzyonları ise nar-çilek karışımı (%29,1), ada çayı (%20,4) ve nar (%20,3) infüzyonlarıdır. Zencefil-limon infüzyonu (%0,01) ise en düşük MAO–A enzim inhibisyonuna sahip olan çaydır. En yüksek MAO–B inhibisyonu gösterenler, yeşil çay (%43,64) ve siyah

çay (%40,92) infüzyonlarıdır. Diğer takip eden çay infüzyonları ise nar-çilek karışımı (%35,59), ada çayı (%29,81) ve nar (%28,7) infüzyonlarıdır. Zencefil-limon infüzyonu (%1,18) ise en düşük MAO-B enzim inhibisyonuna sahip olan çaydır. Tüm değerler karşılaştırıldığında diğer infüzyonlar kadar yüksek inhibisyon etkisi göstermemesine rağmen kırmızı meyve B çayının (MAO-A: %5,36; MAO-B: %18,53) 3,5 kat MAO-B seçiciliğine sahip olduğu görülmektedir. Kuşburnu infüzyonu 2,4 kat, mürdüm eriği-üzüm çekirdeği ile böğürtlen infüzyonları 2,2 kat, yaban mersini ile erik-tarçın infüzyonları ise 1,9 kat MAO-B seçici bulunmuştur. Çalışmada yüksek inhibisyon değeri gösteren yeşil çay ve siyah çayda herhangi bir seçicilik bulunmamaktadır.

TFM miktarları ile FRAP, CUPRAC, DPPH, MAO-A ve MAO-B inhibisyonu değerleri arasındaki ilişki Pearson analizi ile hesaplandı, $p < 0.0001$. Pearson korelasyon katsayıları sırasıyla $r = 0,990$; $0,972$; $0,997$; $0,938$ ve $0,912$ olarak elde edildi. Bu sonuçlara göre, yapılan denemelerden ortaya çıkan sonuçların TFM miktarı ile yüksek oranda ilişkili olduğu görülmektedir (Şekil 3).

Temel Bileşenler Analizi

Temel bileşenler analizi, çeşitli çay infüzyonlarının antioksidan etkilerini ve MAO inhibisyonlarını sınıflandırabilmek için tercih edilmiştir (Wang ve Hu 2014). Bu analiz yöntemi ile çok boyutlu farklı ve karmaşık verilerin yapısını grafik şeklinde incelemek mümkün olmaktadır. Çay infüzyonlarının TFM denemesi, 3 farklı antioksidan denemesi, MAO-A ve MAO-B inhibisyon denemelerinden elde edilen sonuçlar girilerek biplot grafik oluşturulmuştur (Şekil 4). Birinci ve ikinci temel bileşenlere göre en uyumlu sonuçlar olan %95,59 ve 2,83 data varyansları elde edilmiştir. Yöntemin yeterli

olabilmesi için varyans değerlerinin toplamının en az %90-95 olması gerekmektedir, elde ettiğimiz toplam varyans bu çalışma için %98,41'dir. Çalışmada elde edilen değerler, nar ve nar-çilek karışım çayının en yüksek etkiye sahip olan siyah çay ve yeşil çaya en yakın değerleri gösterdiğini ve aynı zamanda MAO enzim inhibisyonunu sağladığını ortaya koymaktadır.

Sonuç

Son yıllarda artan çalışmalar ile beslenme uzmanları ve bilim insanları, günlük tüketim sırasında besin yoluyla alınan antioksidanların sağlık açısından önemli bir ajan olduklarını kabul etmektedirler. Bunu sağlayan en önemli besin grubu, yüksek oranda antioksidan özelliklere sahip bileşikler ve çeşitli fitokimyasalları içeren meyve ve sebzelerden oluşmaktadır. Bu nedenle, her kültürde yerel olarak tüketilen pek çok ürünün antioksidan içeriği ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmaktadır.

Bu çalışmada Türkiye'de tüketilen çeşitli meyve çaylarının antioksidan etkileri ve MAO enzimini inhibe edici özellikleri araştırılmış, siyah çay ve yeşil çay ile karşılaştırılmıştır. Yüksek miktarda fenolik madde içeren çay infüzyonlarının yüksek antioksidan kapasiteye ve MAO inhibisyonuna sahip olduğu ortaya konulmuştur. Kuşburnu başta olmak üzere diğer bazı çay infüzyonlarının da MAO-B seçici inhibisyon sağladıkları görülmektedir. Oksidatif stresin nörodejeneratif hastalıkları tetiklediği ve antioksidan maddelerin oksidatif stresi önlediği bilgisinden yola çıkılarak yapılan bu çalışmada, yüksek antioksidan aktiviteye ve fenolik madde içeriğine sahip çay infüzyonlarının MAO enzimini inhibe edebildikleri ilk kez ortaya konulmuştur. Elde edilen sonuçlar özellikle kırmızı meyve çaylarının günlük siyah/yeşil çay tüketimine alternatif olarak kullanılmalarının insan sağlığına da pozitif katkısı olduğunu göstermektedir.

Kaynaklar

- Abdelhafez, O.M., Amin, K.M., Ali, H.I., Abdalla, M.M. & Batran, R.Z. 2013. Monoamine oxidase A and B inhibiting effect and molecular modeling of some synthesized coumarin derivatives. *Neurochemistry International*, 62: 198-209.
- Ademosun, A.O. & Oboh, G. 2014. Comparison of the inhibition of monoamine oxidase and butyrylcholinesterase activities by infusions from green tea and some citrus peels. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2014: 1-5.
- Albayrak, S., Sağdıç, O. & Aksoy, A. 2010. Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Erciyes University Journal of the Institute of Science and Technology*, 26: 401-409.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. & Karademir, S.E. 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 7970-7981.
- Atoui, A.K., Mansouri, A., Boskou, G. & Kefalas, P. 2005. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, 89: 27-36.
- Buřičová, L., Andjelkovic, M., Čermáková, A., Reblova, Z., Jurcek, O., Kolehmainen, E., Verh , R. & Kvasnička, F. 2011. Antioxidant capacities and antioxidants of strawberry, blackberry and raspberry leaves. *Czech Journal of Food Sciences*, 29: 181-189.
- Çağrı, Ö. & Ötleş, S. 2008. Farklı demleme sürelerinde hazırlanan bitki çaylarının antioksidan aktiviteleri ile renkleri arasındaki korelasyonun belirlenmesi. *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, 21-23 Mayıs, Erzurum, 109-112.
- Danis, O., Yuce-Dursun, B., Çimen, T., Demir, S., Salan, Ü., Yalçın, G. & Ogan, A. 2014. Evaluation of antioxidant, radical-scavenging and acetylcholinesterase inhibitory activities of various culinary herbs cultivated in southern Turkey. *Journal of Food Biochemistry*, 38: 602-611.
- Dawidowicz, A.L., Wianowska, D. & Baraniak B. 2006. The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidant properties of extracts). *LWT - Food Science and Technology*, 39: 309-315.

10. Emekli-Alturfan, E., Yarat, A. & Akyuz, S. 2009. Fluoride levels in various black tea, herbal and fruit infusions consumed in Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 1495-1498.
11. Fang, N., Yu, S. & Prior, R.L. 2002. LC/MS/MS characterization of phenolic constituents in dried plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3579-3585.
12. Faria, A., Oliveira, J., Neves, P., Gameiro, P., Santos-Buelga, C., De Freitas, V. & Mateus N. 2005. Antioxidant properties of prepared blueberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 6896-6902.
13. Gorjanović, S., Komes, D., Pastor, F.T., Belščak-Cvitanović, A., Pezo, L., Hećimović, I. & Sužnjević, D. 2012. Antioxidant capacity of teas and herbal infusions: Polarographic assessment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 9573-9580.
14. Hodgson, J.M. & Croft, K.D. 2010. Tea flavonoids and cardiovascular health. *Molecular Aspects of Medicine*, 31: 495-502.
15. Horžić, D., Komes, D., Belščak, A., Ganić, K.K., Iveković, D. & Karlović, D. 2009. The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. *Food Chemistry*, 115: 441-448.
16. Ismail, A., Marjan, Z.M. & Foong, C.W. 2004. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chemistry*, 87: 581-586.
17. Kong, L.D., Cheng, C.H.K. & Tan, R.X. 2004. Inhibition of MAO A and B by some plant-derived alkaloids, phenols and anthraquinones. *Journal of Ethnopharmacology*, 91: 351-355.
18. Lo, K.M. & Cheung, P.C.K. 2005. Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. *alba*. *Food Chemistry*, 89: 533-539.
19. Moraes-de-Souza, R.A., Oldoni, T.L.C., Regitano-d'Arce, M.A.B. & Alencar, S.M. 2008. Antioxidant activity and phenolic composition of herbal infusions consumed in Brazil. *Ciencia y Tecnologia Alimentaria*, 6: 41-47.
20. Naithani, V., Nair, S. & Kakkar, P. 2006. Decline in antioxidant capacity of Indian herbal teas during storage and its relation to phenolic content. *Food Research International*, 39: 176-181.
21. Piljac-Žegarac, J., Valek, L., Stipčević, T. & Martinez, S. 2010. Electrochemical determination of antioxidant capacity of fruit tea infusions. *Food Chemistry*, 121: 820-825.
22. Shi, L., Yang, Y., Li, Z., Zhu, Z., Liu, C. & Zhu, H. 2010. Design of novel nicotinamides as potent and selective monoamine oxidase a inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18: 1659-1664.
23. Şahin, S. 2013. Evaluation of antioxidant properties and phenolic composition of fruit tea infusions. *Antioxidants*, 2: 206-215.
24. Van den Berg, D., Zoellner, K.R., Ogunrombi, M.O., Malan, S. F., Terre'Blanche, G., Castagnoli, N., Bergh, J.J. & Petzer, J.P. 2007. Inhibition of monoamine oxidase B by selected benzimidazole and caffeine analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15: 3692-3702.
25. Von Gadow, A., Joubert, E. & Hansmann, C.F. 1997. Comparison of the antioxidant activity of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) with green, oolong and black tea. *Food Chemistry*, 60: 73-77.
26. Wang, R.J. & Hu, M.L. 2014. Antioxidant capacities of fruit extracts of five mulberry genotypes with different assays and principle components analysis. *International Journal of Food Properties*, 14: 1-8.
27. Xi, J., Shen, D., Zhao, S., Lu, B., Li, Y. & Zhang, R. 2009. Characterization of polyphenols from green tea leaves using a high hydrostatic pressure extraction. *International Journal of Pharmaceutics*, 382: 139-143.