

Araştırma makalesi

## ***Vinca major* subsp. *hirsuta*'nın antioksidan aktivitesinin ve RP-HPLC-UV ile fenolik bileşenlerinin belirlenmesi**

### ***Determination of antioxidant activity and phenolic compounds in Vinca major subsp. hirsuta by RP-HPLC-UV***

Özlem SARAL<sup>1</sup>, Hüseyin ŞAHİN<sup>2</sup>, Mustafa KARAKÖSE<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Artvin Çoruh Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetik Bölümü

<sup>2</sup>Giresun Üniversitesi, Espiye Meslek Yüksekokulu

<sup>3</sup>Karadeniz Teknik Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Mühendisliği Bölümü

#### **Özet**

Bu çalışma, *Vinca major subsp. hirsuta*'nın fenolik içeriğinin ve antioksidan aktivitesinin belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür. Bitkinin fenolik içeriğinin belirlenmesi için ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC-UV) kullanılmıştır. Toplam fenolik madde, FRAP ve DPPH radikal temizleme yöntemleriyle bitkinin antioksidan aktivitesi belirlenmiştir. Bitki yaprak, çiçek ve sap olmak üzere üç kısma ayrılmıştır. Uygulanan antioksidan yöntemlere göre bitkinin yaprak kısmı en yüksek aktivite göstermiştir. RP-HPLC-UV ile *Vinca major subsp. hirsuta*'nın tüm kısımlarında ve ekstraktlarında değişik konsantrasyonlardaki 5 farklı fenolik bileşen tespit edilmiştir. Klorojenik asit 5344,93 ila 112,97 µg phenolic bileşen/g kuru örnek birimle ana bileşen olarak belirlenmiştir. Üç örnekte de en düşük fenolik bileşen gallik asit olarak bulunmuştur. Bitkinin üç parçasında en yüksek fenolik bileşen içeriğini ise yaprak göstermiştir.

**Anahtar kelimeler:** Antioksidan, HPLC, Fenolikler, *Vinca major subsp. hirsuta*

#### **Abstract**

The aim of the study is to determine phenolic composition and antioxidant activity from *Vinca major subsp. hirsuta*. Reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC-UV) was used to determination phenolic compounds. The antioxidant activity of the plant was investigated in terms of total phenolic content, FRAP, and DPPH radical scavenging assays. The plant is divided into three parts: leaf, flower and stem. According to the applied antioxidant assays, leaf of the plant showed the highest activity. 5 different phenolic compounds in the range of concentrations were determined in the all extracts and parts of *Vinca major subsp. hirsuta* by RP-HPLC-UV. Chlorogenic acid was the main ranging from 5344.93 to 112.97 µg phenolic compound/g dry sample, respectively. Gallic acid was found to be lowest in the three parts of the samples. The leaf was observed highest phenolic compounds between the three samples.

**Keywords:** Antioxidant, HPLC, Phenolics, *Vinca major subsp. hirsuta*

#### **GİRİŞ**

*Vinca major subsp. hirsuta*, Apocynaceae familyasından çiçekleri morumsu-beyaz renkte, yaprakları herdem yeşil kalan bir bitkidir (Gilkey 1957). Yaprak sapı yoğun tüylüdür ve tüyler uzundur. *Vinca major*

*subsp. hirsuta*, Türkiye'nin Orta ve Doğu Karadeniz bölgelerinde ve Kafkaslar'da yetişmektedir (Stearn 1978). Ülkemizde *Vinca* türleri süs bitkisi olarak yetiştirilmektedir. Halk arasında *Vinca major*'e büyük cezayir menekşesi

denilmektedir. Ülkemizde *Vinca major* bitkisinin yaprakları kabız, idrar söktürücü, ateş düşürücü ve iştah açıcı olarak kullanılmaktadır (Baytop 1984). *Vinca* cinsi bitkilerden çıkartılan en az 86 alkaloid vardır (Hesse 2002). *Vinca major*'e ait alkaloidler (10-methoxyperakine, vincawajine, akuammicine, vincamajoridine, ervine ve majorinine gibi) kanser tedavisinde kullanılmaktadır (Atta-Ur-Rahman et al. 1995; Ilyashenko et al. 1977; Schittler 1973). Ayrıca kan basıncını düşürücü, antidiyabetik (Evans 1994), antimikrobiyal (Mehrab et al. 1995), anti-diyalet (Rajput et al. 2011) ve antioksidan (Logan et al. 1998) özellikler de göstermektedir.

Antioksidanlar reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı metabolik zararsızlaştırma tepkimelerine girerler. ROS'lar metabolik ve fizyolojik süreçler sonunda üretilir ve organizmada zararlı oksitadif reaksiyonlar meydana getirebilirler (Halliwell and Gutteridge 2000). Reaktif oksijen türlerinin süperoksit iyonu ( $O_2^{\cdot-}$ ) ve hidroksil ( $OH^{\cdot}$ ) gibi serbest radikaller içeren, farklı aktif oksijen formları vardır (Halliwell and Aruoma 1997). ROS, doku ve DNA hasarına neden olabilir (Aruoma 1998). Antioksidan bileşikler kanser veya radikallerin verdiği zararı önler ya da yavaşlatır (Halliwell 2000; Halliwell 2003). İkincil metabolit olarak adlandırılan ve bitkiler tarafından sentez edilen antioksidan bileşiklerin sayısı, özellikle fenoliklerin 4000 ve 6000 arasında olduğu tahmin edilmektedir (Havsteen 2002; Peterson and Dwyer 1998; Robards et al. 1999). Fenolik bileşenler antioksidan, antiinflamatuvar, antiaging ve antikanserojen gibi birçok biyolojik özelliğe sahiptir (Han et al. 2007). Bitkilerin fenolik içeriği ile antioksidan kapasitesi arasında

doğrusal bir ilişki olduğu bulunmuştur (Kolaylı et al. 2003).

Biyolojik maddelerin antioksidan kapasitesini belirlemek adına birçok metot bulunmaktadır (Rice-Evans ve ark. 1997; Schlesier ve ark. 2002). 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ve demir indirgeme/antioksidan güç (FRAP) en yaygın kullanılan antioksidan aktivite analiz yöntemleridir (Gülçin ve ark. 2003; Aljadi and Kamaruddin 2004). Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (veya yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, HPLC) bileşik karışımlarını ayırabilen bir tekniktir. Biyokimya ve analitik kimyada karışımlardan bileşenlerin tek tek saflaştırılması ve tanımlanmasında kullanılmaktadır (Snyder et al. 2009).

Çalışmamızın amacı hem tıbbi amaçlı hem de süs bitkisi olarak kullanılan *Vinca major subsp. hirsuta* bitkisinin HPLC ile fenolik ve flavonoid içeriğini ve *in vitro* antioksidan aktivitesini belirlemektir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Kimyasallar ve Cihazlar

HPLC analizi için, fenolik bileşik standartları (safılık >99.0%): gallik asit, *proto*-kateşik asit, *p*-hidroksi benzoic asit, vanilik asit, kafeik asit, klorojenik asit, şirincik asit, epikateşin, *p*-kumarik asit, ferulik asit, benzoik asit, *o*-kumarik asit, *trans*-sinnamik asit, absisik asit, kateşin, rutin, kuersetin, propilparaben iç standart (IS), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) firmasından temin edilmiştir. Sodyum karbonat, amonyum asetat, potasyum asetat, bakır (II) klorür, neocuproine (2.9-dimethyl-1.10-phenanthroline), alüminyum

nitrat nonahidrat, metanol, asetik asit ve asetonitril Merck (Darmstadt, Germany) firmasından temin edilmiştir. Trolox (6-hidroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2 carboxylic acid) ve Folin-Ciocalteu's Fluka Chemie GmbH (Switzerland) firmasından temin edilmiştir. Sonikatör Elma® Transsonic Digital, (Germany) firmasından, rotary evaporator (IKA, Werke, USA) firmasından alınmıştır.

### Örnekler ve Ekstraktların Hazırlanması

Bitki örnekleri Karadeniz Teknik Üniversitesi kampüsünden toplanmış ve daha sonra tür tanımlamaları yapılmıştır. Bitkiler çiçek, sap ve yaprak olmak üzere üç bölüme ayrılmıştır. Her bir parça oda sıcaklığında kurutulmuş ve daha sonra öğütülmüştür. Yaklaşık 5-10 g öğütülmüş kuru örnek tartılmış ve üzerine 30 mL metanol eklenmiştir. Üç saat boyunca 60°C'de, sonikatörde metanolla ön ekstraksiyonu yapılmıştır. Daha sonra her bir ekstarkttan 10 mL antioksidan aktivite için ayrılmıştır. Kalan metanolik ekstraktlar iki eş kısıma ayrılmıştır. Ayrılan birinci metanolik kısma uygun seyreltmeler yapılarak HPLC cihazında direkt analiz edilmiştir. İkinci kısım ekstraktların metanolleri 40°C'de rotary evaporatörde uçurulmuştur. İkinci kısımda elde edilen kalıntı 10 mL destile suda çözülerek dietileter ve etil asetat ekstraksiyonu yapılmış ve ekstraktlar birleştirilerek çözücüleri uçurulmuştur. Kalıntı uygun miktarda metanolla çözülerek HPLC ile analiz edilmiştir.

### RP-HPLC-UV ile Fenolik Bileşenlerin Belirlenmesi

RP-HPLC-UV ile fenolik bileşenlerin analizi Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm, 5µm) ters faz kolonu ile ikili çözücü gradient sistemi

kullanılarak yapılmıştır (Kolaylı ve ark. 2010; De Villiers ve ark. 2004) (A: 80% asetonitril metanolla hazırlanmış; B: 2% asetik asit saf su ile hazırlanmış). Kolon sıcaklığı 30 °C, mobil faz akış hızı 1,2 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 20 µL olarak analiz şartı oluşturulmuştur. Bu sistemde 17 fenolik bileşen 280 nm'de analiz edilmiştir. Tekrarlanabilirliği artırmak için iç standart (IS) tekniği analizi uygulanmıştır. Propilparaben bu sistem için uygun IS olarak kullanılmıştır (Öztürk ve ark. 2007). Analiz edilen tüm fenolik bileşenler için analitin istatistiksel olarak tayin edilen en düşük konsantrasyon düzeyi (LOD) ve kesinlik ve gerçeklik validasyon parametrelerinin desteklediği ölçülen en düşük analit konsantrasyonu (LOQ) hesaplanmıştır (Çizelge 1).

$$Tayin\ Limiti\ (LOD) = 3.3x \left( \frac{SD}{m} \right)$$

$$Ölçüm\ Limiti\ (LOQ) = 10x \left( \frac{SD}{m} \right)$$

SD = Kalibrasyon eğrisinin en düşük seviyesindeki standart sapma

m = Kalibrasyon eğrisinin eğimi

**Çizelge 1.** RP-HPLC-UV ile analiz edilen fenolik bileşenlerin LOD ve LOQ değerleri

Fenolik bileşikler	LOD	LOQ
Gallik asit	0,042	0,126
Protokatekuik asit	0,048	0,144
p-OH Benzoik asit	0,038	0,114
Kateşin	0,028	0,085
Klorojenik asit	0,039	0,119
Vanilik asit	0,029	0,088
Kafeik asit	0,037	0,112
Siringik asit	0,046	0,138
Epikateşin	0,036	0,108
p-Kumarik asit	0,104	0,312
Ferulik asit	0,054	0,162
Benzoik asit	0,033	0,101
Rutin	0,032	0,097
o-Kumarik asit	0,036	0,109
Absisik asit	0,024	0,072
Sinamik asit	0,039	0,109
Kuersetin	0,027	0,083

### Toplam Fenolik Madde Analizi

Toplam fenolik madde tayini Folin-Ciocalteu fenol reaktif yöntemi ile analiz edildi. Standart olarak gallik asit kullanılmıştır (Singleton and Rossi 1965). 20 µL değişik konsantrasyonlardaki gallik asit ve 20 µL metanolik örnekler (1 mg/mL) üzerine 400 µL 0.5 N Folin-Ciocalteu reaktifi, daha sonra 680 µL saf su eklenerek karıştırılmıştır. Üç dakika sonra 400 µL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10%) eklenmiş ve vorteklenmiştir. Oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildikten sonra spektrofotometrede 760 nm'de absorbansları okunmuştur. Konsantrasyona karşılık bulunan absorbans değerleri ile çizilen grafikten numunelerinin toplam fenolik madde miktarı bulunmuştur ( $r^2 = 0.998$ ). Analizler üç tekrarlı yapılmış ve ölçümlerin  $\pm$  standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

### Antioksidan Aktivite Analizleri

#### DPPH radikal temizleme aktivitesi

Metanolik ekstraktların radikal temizleme aktivitesi Molyneux (2004)'e göre belirlenmiştir. Yöntemin esası; DPPH'tan kaynaklanan mor rengin antioksidantlar tarafından sarı renge dönüşmesidir. Değişik konsantrasyonlardaki metanolik ekstraktlardan 0.75 mL alınmış ve üzerine 0.75 0.1 mM metanolik DPPH eklenmiştir. Oda sıcaklığında 1 saatlik inkübasyondan sonra spektrofotometrede 517 nm'de absorbanslar okunmuştur. Standart olarak Troloks kullanılmış ve radikal temizleme aktivitesi IC<sub>50</sub> (mg/mL) olarak verilmiştir. IC<sub>50</sub> değeri ne kadar düşük ise DPPH temizleme değeri o kadar yüksektir. Analizler üç tekrarlı yapılmış ve ölçümlerin  $\pm$  standart sapma değerleri hesaplanmıştır. IC<sub>50</sub> değerleri, lineer regresyon analizi ile hesaplanmıştır

(Microsoft Excel program for Windows, versus 2003).

#### Demir indirgeme/antioksidan güç (FRAP) tayini

Metodun prensibi ferrik 2,4,6-tripiryridyl-s-triazin kompleksinin (Fe<sup>3+</sup>-TPTZ) antioksidanların varlığında renkli (mavi) ferrous formuna (Fe<sup>2+</sup>-TPTZ) indirgenmesi esasına dayanır (Benzie ve Strain, 1999). Bu renkli kompleks 593 nm'de maksimum absorbans verir. TPTZ, FeCl<sub>3</sub> ve asetat tamponu içeren 3 mL FRAP reaktifi ve 100 µL örnek karıştırıldıktan 4 dakika sonra spektrofotometrede 593 nm'de absorbans okunmuştur. Kalibrasyon için Troloks'un değişen konsantrasyonları (100–1000 µM) kullanılmıştır. Analizler üç tekrarlı yapılmış ve ölçümlerin  $\pm$  standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

### TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda *Vinca major subsp. hirsuta*'nın fenolik bileşenlerinin tayini için RP-HPLC-UV kullanılmıştır. Ayrıca antioksidan aktivite ve toplam fenolik madde miktarı incelenmiştir.

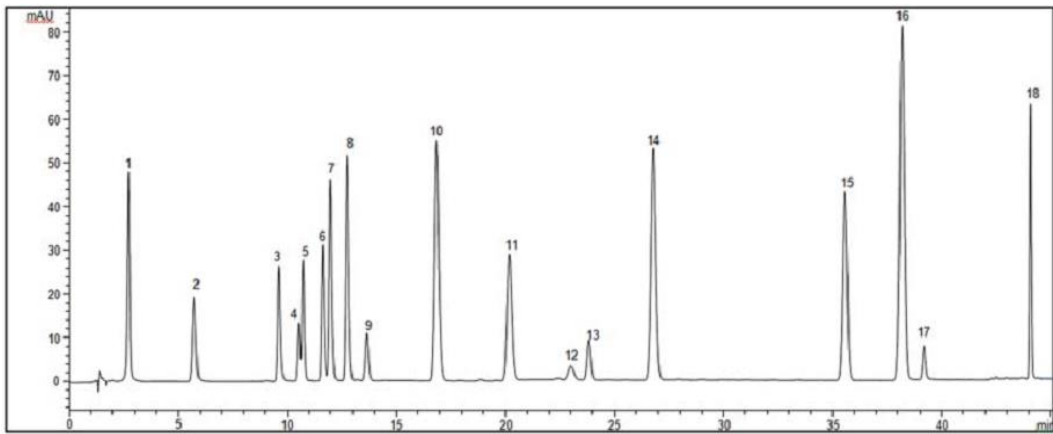
Çiçek, gövde ve yaprakların fenolik asit içeriği Çizelge 2'de verilmiştir. Kullandığımız HPLC standartlarının kromatogramı Şekil 1'de, *Vinca major subsp. hirsuta*'nın çiçek, gövde ve yaprak kısımlarının HPLC kromatogramları da Şekil 2, 3 ve 4'te verilmiştir. Yalnızca 5 adet fenolik asit (klorojenik asit, gallik asit, vanilik asit, kafeik asit ve *p*-kumarik asit) tespit edilmiştir. Klorojenik asit her üç örnek için ortak bileşen olarak görülmüştür. Klorojenik asit değerleri çiçek için 112.97 µg/g, gövde için 928.80 µg/g ve yaprak için 5344.93 µg/g olarak bulunmuştur. Çiçek, gövde ve yaprakta

en az bulunan fenolik asit ise gallik asittir. *p*-kumarik asit çiçek ve yaprakta gözlenirken gövde de bulunamamıştır (Çizelge 2). Vanilik asit ise sadece yaprakta (21.33 µg/g) tespit

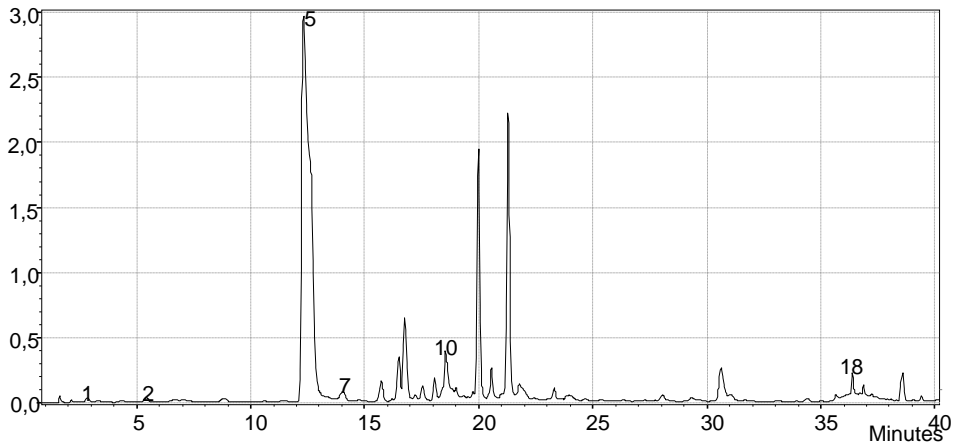
edilmiştir. Çiçek, gövde ve yaprak arasında en yüksek fenolik bileşen içeren kısım ise yaprak olarak bulunmuştur.

**Çizelge 2.** *Vinca major subsp. hirsuta* bitkisinin çiçek, gövde ve yaprak kısımlarına ait fenolik bileşik içerikleri.

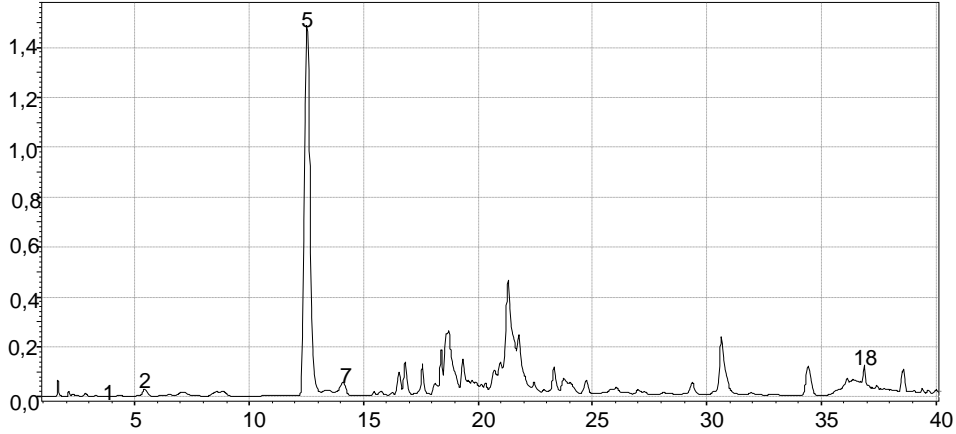
Fenolik Bileşikler	Çiçek	Gövde µg fenolik bileşen/g örnek	Yaprak
Gallik asit	18,98	3,21	9,22
Klorojenik asit	112,97	928,80	5344,93
Vanilik asit	-	-	21,33
Kafeik asit	30,79	13,92	119,87
<i>p</i> -Kumarik asit	8,82	-	0,44



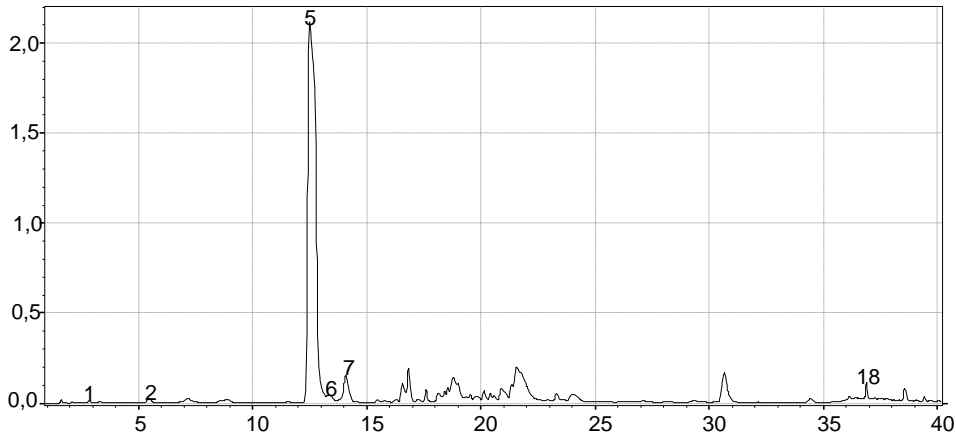
**Şekil 1.** HPLC-UV-VIS 17 standart fenolik bileşiklerin ayrılması için algılama prosedürü. Tüm pikler aşağıdaki gibi ticari standartlar ile alıkonma süresi ve UV spektrumları karşılaştırılması ile belirlenmiştir. Piklerin anlamı: (1) Gallik asit, (2) Protokatekuik asit, (3) *p*-OH Benzoik asit, (4) Katesin, (5) Klorojenik asit, (6) Vanilik asit, (7) Kafeik asit, (8) Siringik asit, (9) Epikatesin, (10) *p*-Kumarik asit, (11) Ferulik asit, (12) Benzoik asit, (13) Rutin, (14) *o*-Kumarik asit, (15) Absisik asit, (16) *trans*-Sinnamik asit, (17) Kuersetin ve (18) Propil paraben (IS).



**Şekil 2.** *Vinca major subsp. hirsuta*'nın çiçek kısmına ait HPLV-UV-VIS kromatogramı (1)Gallik asit, (2) Protokatekuik asit, (5) Klorojenik asit, (7) Kafeik asit, (10) *p*-Kumarik asit, (18) Propil paraben(IS)



Şekil 3. *Vinca major subsp. hirsuta*'nın gövde kısmına ait HPLV-UV-VIS kromatogramı. (1)Gallik asit, (2) Protokatekuik asit, (5) Klorojenik asit, (7) Kafeik asit, (18) Propil paraben(IS)



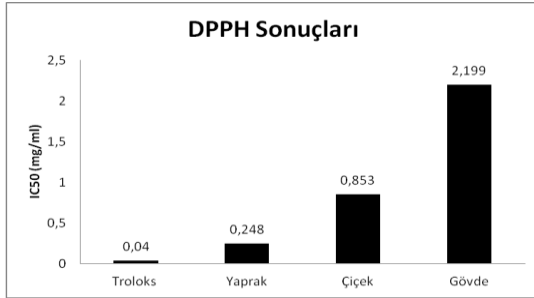
Şekil 4. *Vinca major subsp. hirsuta*'nın yaprak kısmına ait HPLV-UV-VIS kromatogramı (1)Gallik asit, (2) Protokatekuik asit, (5) Klorojenik asit, (6) Vanilik asit, (7) Kafeik asit, (10) p-Kumarik asit, (18) Propil paraben(IS)

Sakushima and Nishibe (1988) kütle spektrometrisi ile *Vinca major*'de klorojenik asit tespit etmiştir. Tatsuzawa (2015) tarafından HPLC ile yapılan çalışmada *Vinca major* ve *Vinca minor* bitkilerinin her ikisinde de klorojenik asit tespit edilmiştir. Bu sonuçlarla yapılan çalışmanın literatürle uyumluluk gösterdiği görülmüştür. Klorojenik asit birçok bitkide (örneğin; yeşil çay, şeftali) bulunmaktadır (Kweon et al 2001). Klorojenik asitin antioksidan aktivitesinin yanı sıra yemek sonrası kana glukoz salınımını yavaşlattığı bilinmektedir (Johnston et al. 2003).

*Vinca major subsp. hirsuta* bitkisinin çiçek, gövde ve yaprak kısımlarındaki toplam fenolik madde miktarının 13.320–46.674 mg GAE/g örnek olarak değiştiği görülmüştür (Çizelge 3). En yüksek fenolik madde miktarı yaprakta, en düşük fenolik madde miktarı ise gövdede tespit edilmiştir. FRAP analizinde en yüksek indirgeme gücü yaprakta, en düşük indirgeme gücü çiçekte bulunmuştur. DPPH analizi sonuçları toplam fenolik madde tayini ile paralellik göstermektedir. Yaprak en yüksek DPPH radikali temizleme aktivitesi göstermiştir (Şekil 5).

**Çizelge 3.** Toplam fenolik madde ve FRAP değerleri.

Analizler	Çiçek	Yaprak	Gövde
Toplam fenolik madde (mg GAE/g örnek)	20.678±0.07	46.674±0.02	13.320±0.05
FRAP (µmol FeSO <sub>4</sub> /g örnek)	0.554±0.12	6.253±0.01	0.726±0.03



**Şekil 5.** *Vinca major subsp. hirsuta* bitkisinin yaprak, çiçek ve gövde kısımlarına ait DPPH sonuçları.

Grace and Logan (1996) yaptıkları çalışmada *Vinca major*, *Schefflera arboricola* ve *Mahonia repens* bitkilerinin yapraklarına birkaç ay boyunca farklı büyüklükte fotonlar (20, 100, and 1200 pmol photons m<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>) vererek yetiştirmişlerdir ve foton miktarının artmasıyla antioksidan aktivitenin de arttığını bulmuşlardır. Bu çalışmada antioksidan aktivite tayini için antioksidan enzimler (SOD, GR, APX) ve bazı antioksidan metabolitler (Glutasyon, askorbat ve α-tokoferol) kullanılmıştır. Benzer parametrelerin kullanıldığı farklı bir çalışmada *Cucurbita pepo* L. ve *Vinca major* L. bitkilerinin yapraklarına farklı oranda güneş ışığı gönderilmiş (%3, 13, 58 ve 100) ve fotosentez foton akı yoğunluğu (PPFD) incelenmiştir. PPFD arttıkça antioksidan aktivitenin de arttığı gözlenmiştir (Logan et al. 1998).

Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre toplam fenolik madde ile antioksidan aktivite arasında pozitif bir korelasyon olduğu görülmüştür. En yüksek antioksidan kapasite ve fenolik içerik yaprakta bulunmuştur. Klorojenik asitin ana fenolik bileşen olduğu

tespit edilmiştir. Sonuç olarak *Vinca major subsp. hirsuta*'nın antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur.

## KAYNAKLAR

- Aljadi A M, Kamaruddin M Y (2004) Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys, *Food Chem*, 85: 513–518
- Aruoma O I (1998) Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease, *J Am Oil Chem Soc*, 75: 199-212
- Atta-Ur-Rahman, Sultana A, Nighat F, Bhatti M K, Kartal M, Kurucu S (1995) Alkaloids from *vinca major*, *Phytochemistry*, 38: 1057-1061
- Baytop T (1984) Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün), İstanbul, İstanbul Üniversitesi Yayınları, pp. 423
- Benzie I, Strain J J (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay, *Anal Biochem*, 239: 70-76
- De Villiers A, Lynen F, Crouch A, Sandra P (2004) Development of a solid-phase extraction procedure for the simultaneous determination of polyphenols, organic acids and sugars in wine, *Chromatographia*, 59: 403–409
- Direosti I E (2000) Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine, *Nutrition*, 16: 692-694
- Evans W C (1994) Trease and Evans' Pharmacognosy. London: Bailliere Tindall and Cansell Ltd.
- Gilkey H (1957) Weeds of the Pacific Northwest, Oregon State College, OR
- Grace S C, Logan B A (1996) Acclimation of foliar antioxidant systems to growth irradiance in three broad-leaved evergreen species, *Plant Physiol*, 112: 1631-1640
- Gülçin İ, Büyükkuroğlu M E, Oktay M, Küfrevioğlu Ö İ (2003) Antioxidant and analgesic activities of turpentine of *Pinus nigra arn. subsp. palisiana* (Lamb.) Holmboe, *J Ethnopharmacol*, 86: 51–58
- Halliwel B, Aruoma O I (1997) "Free radicals and antioxidants: The need for in vivo markers of oxidative stress". Aruoma, O I, Cuppett, S L (Eds.), *Antioxidant Methodology: in vivo and in vitro Concepts*, AOCS Press, Champaign, Illinois. pp. 1-22
- Halliwel B, Gutteridge J M C (2000) Free radicals in biology and medicine, Third ed. Oxford: Oxford Science Publications, p. 617–24

- Halliwell B (2000) The Antioxidant Paradox, *Lancet*, 355: 1179–1180
- Halliwell B (2003) Oxidative stress in cell culture: An under-appreciated problem, *FEBS Lett*, 540: 3–6
- Han X, Shen T, Lou H (2007) Dietary polyphenols and their biological significance, *Int J Mol Sci*, 8: 950-988
- Havsteen B H (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids, *Pharmacol Ther*, 96: 67–202
- Hesse M (2002) Alkaloids. Nature's Curse or Blessing? Wiley-VCH, Weinheim
- Il'yashenko L I, Malikov V M, Yagudaev M R, Yunusov S Y (1977) Alkaloids of *Vinca major*, *Chem Nat Comp*, 13: 324-327
- Johnston K L, Clifford M N, Morgan L M (2003) Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine, *Am J Clin Nutr*, 79: 728–733
- Kolaylı S, Küçük M, Duran C, Candan F, Dincer B (2003) Chemical and antioxidant properties of *Laurocerasus officinalis* Roem.(Cherry Laurel) fruit grown in the Black Sea region, *J Agric Food Chem* 51: 7489-7494
- Kolaylı S, Şahin H, Ulusoy E, Tarhan Ö (2010) Phenolic composition and antioxidant capacities of *Helichrysum plicatum*, *Hacettepe J Biol Chem* 38: 269–276
- Kweon M, Hwang H, Sung H (2001) Identification and Antioxidant Activity of Novel Chlorogenic Acid Derivatives from Bamboo (*Phyllostachys edulis*), *J Agr Food Chem*, 49: 4646–4652
- Logan B A, Demmig-Adams B, Adams W W, Grace S C (1998) Antioxidants and xanthophyll cycle-dependent energy dissipation in *Cucurbita pepo* L. and *Vinca major* L. acclimated to four growth PFDs in the field, *J Exp Bot*, 49: 1869-1879
- Mehrab S, Majd A, Tamadon T (1995) The antimicrobial effect of genus *vinca* on some pathogen microorganism, *Iran J Public Health*, 24: 7-14
- Molyneux P (2004) The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarın J Sci Technol*, 26: 211-219
- Öztürk N, Tuncel M, Tuncel N B (2007) Determination of phenolic acids by a modified HPLC: Its application to various plant materials, *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 30:587-596
- Peterson J, Dwyer J (1998) Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity, *Nutr Res*, 18: 1995–2018
- Rajput M S, Nair V, Chauhan A, Jawanjal H (2011) Dange, Evaluation of Antidiarrheal Activity of Aerial Parts of *Vinca major* in Experimental Animals, *Middle-East J Sci Res*, 7: 784-788
- Rice-Evans C A, Miller N J, Paganga G (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends Plant Sci*, 2: 152–159
- Robards K, Prenzler P D, Tucker G, Swatsitang P, Glover W (1999) Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits, *Food Chem*, 66: 401–436
- Schittler E J (1973) Introduction to *Vinca* alkaloids. In W Taylor (ed.), *The Vinca alkaloids*, New York: Inc, pp. 1-34
- Schlesier K, Harwat M, Böhm V, Bitsch R (2002) Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods, *Free Radical Res*, 36: 177–187
- Singleton V B, Rossi J A (1965) Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *Am J Enol Vitic*, 16: 144-158
- Snyder L R, Kirkland J J, Dolan J W (2009) Introduction to Modern Liquid Chromatography, John Wiley & Sons, New York
- Sakushima A, Nishibe S (1988) Mass spectrometry in the structural determination of flavonol triglycosides from *Vinca major*, *Phytochem*, 27: 915-919
- Stearn W T (1978) Davis P H, ed. *Flora of Turkey and the East Aegan Islands* 6, Edinburgh, University Press, pp. 161-163
- Tatsuzawa F (2015) Differences in the floral anthocyanin content of violet–blue flowers of *Vinca minor* L. and *V. major* L. (Apocynaceae), *Phytochem Lett* 13: 365–369