



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Fumaria officinalis'un ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Berna ÖZENÇ

YÜKSEK LİSANS

Kimya Anabilim Dalı

Mart-2011
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS
Fumaria officinalis'in ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Berna ÖZENÇ

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Fizikokimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Salih YILDIZ

2011, 66 Sayfa

Jüri
Danışman: Prof. Dr. Salih YILDIZ

Bu çalışmada Türkiye'de yetişen *Fumaria officinalis* adlı bitkinin metanol ekstraktının antioksidan aktivite tayini ile toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları tayin edildi. Antioksidan kapasite tayinleri demir ve bakır indirgeme gücü (FRAP ve CUPRAC), DPPH radikalini süpürme aktivitesi, β-karoten-linoleik asid metodu ve metal şelatlama kapasitesi ile gerçekleştirildi. Ekstraktın toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları sırasıyla gallik asit ve kuersetine eşdeğer olarak bulundu. 1 g metanolik ekstrakt 250 mg gallik asite eşdeğer fenolik ve 200 mg kuersetine eşdeğer flavonoid madde ihtiva ederek yüksek antioksidan aktivite gösterdi. Bununla birlikte bu çalışmada *Fumaria officinalis* in fenoliklerinin ve yağ asidi bileşiminin tayini sıvı ve gaz kromatografisi ile gerçekleştirildi. Sonuçlar gösterdi ki Türkiye'de yetişen *Fumaria officinalis* doğal bir antioksidan madde kaynağıdır.

Anahtar Kelimeler: *Fumaria officinalis,* Antioksidan aktivite, FRAP, CUPRAC, yağ asidi

ABSTRACT

MS THESIS

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF *Fumaria officinalis*

Berna ÖZENÇ

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN DEPARTMENT OF CHEMISTRY

Advisor: Prof. Dr. Salih YILDIZ

2011, 66 Pages

Jury
Prof. Dr. Salih YILDIZ

In this study, we investigated the antioxidant capacity and total phenolic and flavonoid contents of methanolic extract of *Fumaria officinalis* from Turkey. The antioxidant capacity of the methanolic extract from *Fumaria officinalis* leaves was measured by various assays including ferric reducing antioxidant power assay, cupric reducing antioxidant capacity assay, DPPH radical scavenging, β-caroten-linoleic acid assay and metal chelating capacity. Total phenolic and flavonoid content of the extract were measured as gallic acid and quercetin equivalent by Folin–Ciocalteu reagent and aluminium chelating method, respectively. The methanolic extract showed higher antioxidant activity related to high phenolic content with 250 mg GAE and falvonoid content with 200 mg QE/g dry weight. Phenolics and fatty acid compositions of the methanolic extract of *Fumaria officinalis* were analysed by high performance liquid and gas chromotography. Data suggested that *Fumaria officinalis* grown in Turkey may be importance source as natural antioxidant.

Keywords: *Fumaria officinalis*, Antioxidant activity, FRAP, CUPRAC, fatty acid

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmam boyunca her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Fizikokimya Ana Bilim Dalı Başkanı danışman hocam Sayın Prof. Dr. Salih YILDIZ'a derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca çalışmamda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, çalışmanın her aşamasında her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen sevgili hocam Arş. Gör. Esra MALTAŞ başta olmak üzere bütün araştırma laboratuvarında çalışan arkadaşlarıma ve maddi manevi desteğini esirgemeyen sevgili aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimle aynı ismi taşıyan 10201096 sayılı projeme maddi destek sağlayan Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Berna ÖZENÇ
KONYA-2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **ix**

1. GİRİŞ **1**

1.1.Serbest Radikaller 1
1.1.1. Serbest radikal çeşitleri 4
1.2. Serbest Radikallerin Metabolizmaya Etkileri 10
1.2.1. Serbest radikallerin lipidlere etkileri 10
1.2.2. Serbest radikallerin proteinlere etkileri 11
1.2.3. Serbest radikallerin nükleik asitlere ve DNA'ya etkileri 11
1.2.4. Serbest radikallerin karbonhidratlara etkileri 12
1.3. Serberst Radikallere Bağlı Hastalıklar 12
1.4. Korunma 14
1.5. Antioksidanların Etki Mekanizması 16
1.6. Antioksidan Türleri 17
1.6.1. Enzim yapısındaki bazı antioksidanlar 17
1.6.2. Enzim yapısında olmayan bazı antioksidanlar 18
1.6.3. Fenolik asitler 29
1.6.4. Fenolik Polimerler (Tanenler) 30
1.6.5. Karotenoidler 31

2. MATERYAL VE METOT **33**

2.1.Materyal 33
2.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler 33
2.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar 33
2.2. Metot 33
2.2.1. Bitki ekstraktlarının hazırlanması 33
2.2.2. Toplam fenolik ve flavonoid madde konsantrasyonu 34
2.2.3.DPPH• (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) radikal süpürme etkisi 34
2.2.4. β- karoten- lineolik asit emülsiyon yöntemi 35
2.2.5. Demir (III) indirgeme kapasitesi(FRAP) tayini 35
2.2.6. Bakır(II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi tayini(CUPRAC) 36
2.2.7. Metal şelatlama aktivitesi 36
2.2.8. Bitki ekstraklarındaki yağ asitlerinin bileşiminin GC-MS analizi 37
2.2.9. Bitki ekstraklarındaki fenolik bileşiklerin HPLC analizi 37

3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA **38**

3.1. Toplam Fenolik ve Flavonoid Madde Tayini 38

3.2. DPPH• Serbest Radikal Giderme Aktivitesi Sonuçları 41
3.3. β- Karoten- Lineolik Asit Emülsiyon Sistemi Yöntemi 44
3.4. Bakır(II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi Tayini (CUPRAC) Sonuçları 46
3.5. Demir (III) indirgeme kapasitesi(FRAP) Metodu 48
3.6. Metal Şelatlama 50
3.7. GC-MS ile Yağ Asidi Analizi..... 52
3.8. HPLC ile Fenolik Madde Tayini 55

4. SONUÇ VE ÖNERİLER..... 56

KAYNAKLAR 59

ÖZGEÇMİŞ 66

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

A•:	Aktif antioksidan molekülü
AH:	Antioksidan molekülü
AO:	İnaktif antioksidan molekülü
Cu(II)-Nc:	Bakır(II)-neokuproin kelatı
H_2O_2:	Hidrojen peroksit
HOCl:	Hipoklorik asit
LOOH:	Lipid peroksitleri
LOO•:	Lipid peroksit radikalleri
L•:	Lipid radikali
NO•:	Nitrik oksit
OH•:	Hidroksil radikali
$O_2•^-$:	Süperoksid
Tween 20:	Polioksietilensorbitan monolaurat

Kısaltmalar

BHA:	Bütillenmis hidroksianisol
BHT:	Bütillenmis hidroksitoluen
CAT:	Katalaz enzimi
CUPRAC:	Bakır(II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi
DNA:	Deoksiribo nükleik asit
DPPH :	1,1-Difenil 2-pikril hidrazil
DPPH• :	1,1-Difenil 2-pikril hidrazil radikali
DPPH-H :	İndirgenmiş 1,1-difenil 2-pikril hidrazil
FRAP:	Demir (III) indirgeme kapasitesi
GAE:	Galik asit ekivalent
GPx:	Glutatyon peroksidaz
MDA:	Malondialdehit
NDGA:	Nordihidroguairatik asit
QE :	Kuersetin ekivalent
ROT:	Reaktif oksijen türleri
SOD:	Süperoksit dismutaz enzimi
TBHQ:	Tersiyer bütil hidrokinon
TCA:	Triklorasetik asit
TEAC:	Troloks eşdeğer antioksidan aktivitesi
Trolox:	6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit

1. GİRİŞ

Sağlık alanında, hastalıkların tedavisinde yeni yöntemlerin araştırılmasının yanında sağlıklı bir yaşam sürdürmek ve hastalıkları önlemek açısından ciddi çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalarla ilgili olarak, son zamanlarda antioksidanlara daha fazla ağırlık verilmektedir. Vücudumuzdaki dokularda oluşan bazı kimyasal reaksiyonlar, serbest radikal oluşumuna neden olarak, dokularda hasar meydana getirmektedir. Serbest radikaller hücre büyüme gelişimi üzerine oldukça etkilidirler ve hücre yaşamı üzerine olan bu etkilerinden dolayı damar sertliği, kanser, romatizmal hastalıklar ve yaşlılık hastalıkları gibi bazı hastalıkların oluşmasında önemli rol oynarlar (Baykal ve ark., 2002).

1.1.Serbest Radikaller

Antioksidanların öyküsü serbest radikallerle başlamaktadır. Bu yüksek aktiviteye sahip bileşikler (serbest radikaller); kirli havalarda, sigara dumanında, radyasyonda (ışınım), bitki koruma ilaçlarında, bozulmuş gıdalarda ve normal vücut metabolizmasında bulunmaktadır. Serbest radikaller vücuttaki hücrelere saldırarak onu tahrip etmektedirler. İlk saldırıda öncelikli olarak yeni bir serbest radikal oluşmakta ve kontrol edilemeyen zincirleme bir reaksiyon başlamaktadır (Floyd, 1990; Uğuzlar, 2009).

Serbest radikaller ile ilgili çalışmalar Gomberg'in 1900'lerde trifenilmetil radikalinin ($Ph_3C^{\cdot}$) varlığını ispatlamasıyla başlamıştır (Gomberg, 1900). Serbest radikal, bir orbitalde sadece bir veya birden fazla ortaklanmamış elektron bulunduran kimyasal türlerdir. Radikallerin reaktiviteleri farklılık göstermesine rağmen, genellikle radikal olmayan türlerden daha az kararlıdırlar. En basit serbest radikal, bir proton ve bir elektron ihtiva eden hidrojen atomudur. Hemen her radikal türü diğer bir radikali veya molekülü farklı bir mekanizma ile etkileyebilir. Bu tür etkileşimlerin seçiciliği, radikallerin konsantrasyonuna, radikalde bulunan ortaklanmamış elektronların delokalizasyonuna ve radikallerin etkileştiği moleküllerin zayıf bağlar içermesine bağlıdır. Birçok biyolojik molekül, sadece ortaklanmış elektronlar içeren radikal olmayan türlerin kimyasal yapısı üzerine yoğun araştırmalar ve tartışmalar bulunmaktadır (Weiss, 1935; Waters, 1943; Hey, 1973; Cadogan, 1973; Moad, 1995; Perkins, 1996; Uğuzlar, 2009). 1960'ların başlarında süperoksidin, ksantin oksidaz dahil

birçok enzim ile ilgisi olduğu belirlendi. Ayrıca 1968'de sellüler toksisiteye sebep olan süperoksidin, çözeltilerde mevcut olduğu da bulundu (McCord, 1969; Michelson, 1977; Aruoma, 1993; Uğuzlar, 2009). Tıpta, biyolojide, toksikolojide ve gıda ile farmasötik sanayinde serbest radikaller gittikçe artan bir ilgi alanına sahip olmaktadır. Lipit peroksidasyonunun serbest radikalik reaksiyonları, gıda endüstrisinde imalat prosesleri boyunca karşılaşılan en önemli sorunlardan biridir. İmalatçılar, antioksidanları kullanarak, lipit içeren gıdaların oksidasyonunu yavaşlatmayı hedeflerler. Bunun yanısıra biyomedikalciler ve klinisyenler de organizmayı, reaktif oksijen türleri tarafından oluşan hasara karşı korudukları için antioksidanlara ilgi duymuşlardır (Frankel, 1980; Block, 1992; Aruoma, 1993; Papas, 1993 Aruoma, 1996; Duthie, 1996; Pezzuto, 1997; Uğuzlar, 2009).

Diğer bir deyişle serbest radikal, atomik ya da moleküler yapılarda çiftlenmemiş tek elektron bölümlerine verilen isimdir. Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine girebilen bu moleküllere ''oksidan moleküller'' veya reaktif oksijen partiküller de denmektedir (Çavdar ve ark., 1997**).** Bu radikaller hücredeki diğer moleküllerle kolayca etkileşime girerek oksidatif stres meydana getirirler. Serbest radikaller normal hücresel metabolizma sırasında oluşabildiği gibi çeşitli dış etkenler aracılığı ile de meydana gelebilir. Oksidatif stres, organizmadaki pro-oksidan ve antioksidan dengenin bozulması olarak tanımlanmaktadır. Radikaller: lipitler, proteinler ve nükleik asitler gibi temel hücresel bileşenlerde hasara yol açabilme özelliğine sahiptir. Oluşan bu hasarın kanser, yaşa bağlı bağışıklık yetersizliği ve hipertansiyon gibi çeşitli hastalıklar ile ilişkilidir ve biyolojik yaşlanma süresinde rol almaktadır. Günümüzde hemen her hastalığın bir dereceye kadar oksidatif strese bağlı olduğu kabul edilmektedir (Çakatay ve Kayalı, 2004). Canlı organizmalar serbest radikallerin etkisinden korunmak için antioksidatif korunma sistemine sahiptirler (Tunalıer ve ark., 2002)**.**

Serbest radikal oluşturan kaynaklar; radyasyon, virüsler, ultraviole ışınları, sigara dumanı, enfeksiyonlar, stres, yağ metabolizması toksik ürünleri, bazı tahrip edici kimyasal maddeler, haşere kontrol ilaçları ve bunlar gibi daha birçok etken bulunmaktadır. Serbest radikaller gıda maddelerinde bulunabilecekleri gibi, vücuttaki metabolik olaylar sonucunda da oluşabilirler. Strese bağlı olarak veya vücuttaki zararlı nedenleri etkisiz hale getirmek için bağışıklık sistemi tarafından oluşturulan serbest radikaller vücutta bir denge halinde bulunurlar. Eğer serbest radikal üretimi fazla olur ve koruyucu etkili antioksidanlar yetersiz kalırsa vücutta hasar ortaya çıkar. Mesela,

serbest radikaller DNA moleküllerinde hasarı tetikleyerek, kansere sebep olabileceği gibi, pankreasta yoğunlaşarak şeker hastalığına, gözde katarakta, kalp ve dolaşım sistemi hastalıklarına da sebep olabilir. Oluşan fazla miktardaki serbest radikaller kronik yorgunluk ve bitkinlik gibi etkiler de gösterebilir.

İnsan vücudu serbest radikallerin oluşturduğu bu hasarlara karşı gıda takviyesi ile ya da metabolik olaylar ile bazı tedbirler almaktadır. Alınacak tedbirlerle bu maddelerin vücuttaki zararlı etkileri en aza indirilebilir. Bu zararlı etkilerin önlenmesinde en etkili maddelerden biri de antioksidanlardır. Antioksidanlar, serbest radikal oluşumunu önleyici veya var olan serbest radikalleri etkisiz hale getirici özellikteki maddelerdir (Baykal ve ark., 2002).

Çoğunlukla polifenolik yapıda olan antioksidan maddeler nerdeyse tüm bitkilerde, meyvelerde, sebzelerde, mikroorganizmalarda, mantarlarda ve hayvansal dokularda bulunmaktadır. Bu antioksidan maddelerin en önemlileri: tokoferoller, flavonoidler, karotenoidler ve askorbik asittir (Yanishlieva, 2001; Hudson, 1990; Shahidi, 2000). Bitkilere renklerini veren de büyük ölçüde bu polifenolik yapılı flavonoidtir ve 4000 civarında flavonoid bileşiğinin kimyasal yapısı aydınlatılmıştır (Murray, 1996). Canlı sistemlerinde bulunan bütün fizyolojik prosesler; enzim, hormon ve iz elementleri gibi farklı ajanlar tarafından yönetilen oksidasyon ve indirgeme reaksiyonlarının kompleks kombinasyonlarını içerir. Canlılarda redoks dengesinde meydana gelebilecek herhangi bir değişiklik, hücrelerin ve doku fonksiyonlarının bozulmasına sebep olabilir. Antioksidan maddeler farklı oksidasyon reaksiyonlarını düzenler ve dokularda doğal bir şekilde bulunur. Ayrıca antioksidan maddeler veya antioksidan telafi sistemlerinde bulunan bazı bileşenlerin endojen sentezinde meydana gelebilecek bir yetersizlik, farklı hastalık türlerini meydana getirir. Hücrelerde çok sayıda savunma mekanizması bulunur. Organizmanın normal oksijen metabolizmasının toksik etkilerine karşı kendisini koruması için bu mekanizmalar gereklidir (Fridovich, 1976). Vücudumuz serbest radikalleri tanıyan ve etkisiz hale getiren bir sisteme sahiptir. Enzimler ile antioksidanlardan oluşan bu sistem; serbest radikalleri hücre zarına, nükleik asitlere (DNA) ve hücre bileşenlerine saldırmadan kendine çekmekte ve bağlamaktadır (Miguel ve ark., 1982).

Serbest oksijen radikalleri, sahip oldukları ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktif atom ve moleküllerdir. Serbest oksijen radikalleri üretimi ve antioksidatif savunma mekanizması arasındaki denge bozulduğunda, serbest oksijen radikalleri düzeyi artmaktadır. Serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu doku hasarının

en önemli mekanizması hücre zarlarında bulunan lipidlerin peroksidasyonudur. Sağlıklı dokularda çok düşük düzeylerde olan lipid peroksidasyonun artışı, serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu doku hasarının göstergesi olarak kullanılabilmektedir (Yarıktaş ve ark., 2003). Antioksidanların birçok tanımı yapılmakla beraber en genel tanımı, lipit peroksidasyonunu yavaşlatan veya başlamasını geciktiren kimyasal bileşikler şeklindedir.

Amerika Bileşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından yapılan tanımlama ise şu şekildedir; oksidasyondan dolayı oluşan acılaşmayı, bozulmayı ve renk bozukluğunu geciktirerek gıdaların korunması amacıyla kullanılmasına izin verilen maddelerdir (Elitok, 1996).

Çizelge 1.1. Oksijen ve nitrik oksitten oluşan başlıca reaktif türleri

Tür Adı		**Tür Adı**	
$^1O_2$	Singlet oksijen	$HO_2\cdot$	Hidroperoksil radikali
$O_2^{-}\cdot$	Süperoksit	$NO\cdot$	Nitrik oksit
H_2O_2	Hidrojen peroksit	NO_2	Nitrojen dioksit
$HO\cdot$	Hidroksil radikali	NO_2^{+}	Nitril katyonu
$ROO\cdot$	Peroksil radikali	$ONOO^{-}$	Peroksinitrit
ROOOH	Hidroperoksit	$ONOO\cdot$	Peroksinitrit radikali
$RO\cdot$	Alkoksil radikali	N_2O_3	Dinitrojen trioksit

1.1.1. Serbest radikal çeşitleri

1.1.1.1. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit, yapısında ortaklanmamış elektron bulundurmadığından radikal özelliği göstermez, reaktif bir tür değildir. Hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi ya da süperoksitlerin enzimatik ve non-enzimatik dismutasyonu tepkimeleri sonucu oluşur. Ayrıca aynı ortamda bulunduğu geçiş metal iyonları ile reaksiyonu sonucu hidroksil radikalleri meydana getirir. Biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2'nin oksitleyici özelliği nedeniyle, hücrelerde antioksidan olarak görev yapan katalaz ve peroksidaz enzimleriyle en kısa sürede ortamdan uzaklaştırılması gerekir. (Ak, 2006; Uğuzlar, 2009).

1.1.1.2. Ozon (O_3)

Kuvvetli bir oksitleyici ajan olan üç oksijen atomu içeren triatomik bir moleküldür. İn vivo olarak üretilmeyen bu mavi gaz palesi, atmosferde güneş radyasyonuna karşı önemli bir koruyucu olarak hizmet vermektedir. Dünyanın yüzeyine yakın olan ozon, istenmeyen bir oksidandır. Bir toksit hava kirleticisi olarak da görülmektedir (Stokinger, 1965; Ak, 2006; Uğuzlar, 2009). Ozon, yüksek UV ışın üreten lambalara sahip olan cihazların olduğu laboratuarlarda ve yerleşim merkezlerinde fotokimyasal reaksiyonlar ve hava kirliliğinin sonucu olarak meydana gelebilmektedir. Ozonun biyolojik etkisine birden katkıda bulunmasıdır. Bu etki bazen de serbest radikal mekanizmasını etkileme tarzında da olabilir (Mustafa, 1990; Kanofsky, 1991; Pyryor, 1994; Ak, 2006).

1.1.1.3. Nitrik oksit (NO•)

Nitrik oksit memelilerde önemli bir sinyal molekülü ve aynı zamanda bir serbest radikal türüdür. Oksijenle çok hızlı etkileşip zehirli etkiye sahip azot dioksit meydana getirebilir. Nitrik oksit hücresel bozukluklarda önemli bir rol oynayan çözünebilir, serbest radikal gazıdır. (Ignarro, 1987; Palmer, 1988; Sneddon, 1988; Ak, 2006). Kan damarlarında bulunan damar endoteliyal hücrelerinin nonradikal ürünler üretmek için nitrik oksit ile reaksiyona girebilen az miktarda süperoksit ürettiği de bilinmektedir. Endotelyum tarafından nitrik oksit ve süperoksit üretimindeki bu değişiklik, vasküler özellikleri ve bunun sonucu olarak da kan basıncını düzenleyen bir mekanizma sağlamaktadır. Nitrik oksidin sıtma, kalp hastalıkları, akut inflamasyon, kanser, sinirsel bozukluklar ve şeker hastalığı gibi hastalıklarla da ilgisi ispatlanmıştır. NO• hücre fonksiyonlarının düzeninde ve dokuların yaşam özelliklerinde etkili bir şekilde kullanılır. Nitrik oksit ile süperoksit arasındaki reaksiyon sonucu peroksinitrit (ONOO•) meydana gelir. Oluşan peroksinitritlerin oksidatif DNA hasarlarına yol açtığı bilinmektedir. Peroksinitritin, nitrik okside bağlı bir toksisiteye de sahip olduğu tahmin edilmektedir (Ak, 2006). Aynı zamanda NO• vücut metabolizması için gereklidir. Araştırmalar gösteriyor ki; NO• kan basıncını düşürüyor, kan dolaşımını düzenliyor, damar sertliği başlangıcını veya ilerlemesini geciktiriyor, olası felçleri ve kalp krizi riskini azaltıyor(Uğuzlar, 2009).

1.1.1.4. Hidroksil radikalleri (HO•)

Hidroksil radikalleri oldukça reaktif olmalarına rağmen, kısa ömürlüdür. Hidroksil radikali hücre içerisinde 10^{-9} sn'lik bir yarılanma ömrüne sahip, oksijen merkezli ve oldukça reaktif olan bir radikal türüdür. Hidroperoksitler (ROOH)'in parçalanması veya atomik oksijeninin su ile reaksiyonu sonucu kolayca meydana gelebilirler. Organik kimyada ise 1-Hidroksi-2(1H)-piridinetyonun fotolizi sonucu da oluşabilmektedir. HO• membran ve DNA dahil olmak üzere hemen hemen bütün biyolojik moleküllere saldırırlar. HO• Fenton tipi reaksiyonlarda oluşması durumunda HO• oluşumunun büyüklüğü büyük bir ölçüde katalizör olan metal iyonlarının varlığına ve bulunduğu duruma bağlıdır.

Lipit peroksidasyonu sonucu membranı parçalanan ve stabilitesi bozulan hücreler, akciğer rahatsızlıklarına, böbrek hasarlarına, damar tıkanıklığına, yaşlanmaya ve kansere sebep olduğu da bilinmektedir (Ak, 2006). Bunun yanı sıra dışardan diyetle alınan veya çevrede bulunan pro-oksidant bileşiklerin de DNA hasarlarına (Ames, 1993) yaşlanma ile ilgili patalojik durumlara (Peto ve ark., 1981; Cros ve ark., 1987; Schwartz ve ark., 1988) sebep olduğu bildirilmiştir. Bunların aksine antioksidan bileşikler ise bazı kanser türlerini ve damar hastalıklarının gelişmesini engellemede önemli rol oynamakta ve yukarıda sayılan toksit etkileri hem azaltılabilmektedir ve hem de ortamda bulunan oksijen radikallerini indirgeyebilmektedir (Ak, 2006). Toksit etkilerin varlığında ise tedavi amaçlı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Frankel ve ark., 1998). Kısaca serbest oksijen radikalleri bütün bu istenmeyen durumlara sebep olurken ve antioksidanlar bunların aksine terapötik ajan olarak yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Cross ve ark., 1987; Halliwel, 1997; Ak, 2006).

1.1.1.5. Süper oksit radikalleri (O_2•$^{\square}$)

Süperoksit radikalleri biyolojik olarak oldukça toksiktir ve mikrooganizmalara saldırarak öldürür. Fagositlerde patojenlerin savunma mekanizmalarını yok etmek için NADH oksidaz enzimi tarafından fazla miktarda üretilmektedir. Ksantin oksidaz gibi diğer birçok enzim tarafından üretilmesinin yanı sıra solunum zincirindeki reaksiyonlar sonucunda bol miktarda meydana gelebilmektedir. Süperoksit radikalleri birçok enzim tarafından meydana getirilebildiği gibi nonenzimatik elektron transferleri sonucu da oluşabilmektedir. Süperoksit anyon radikalleri selektif reaktiviteli oksijen merkezli

radikallerdir. Süperoksit radikalleri sulu çözeltilerde askorbik asiti oksitleyebilir. Ayrıca sitokrom c ve ferriketilendiamintetraasetik asit (Fe^{3+}-EDTA) gibi belirli demir komplekslerini de indirgeyebilir. Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi, $O_2\bullet^-$' in peroksit ve oksijene dönüşümünü katalizlerler (Ak, 2006).

Hücresel koşullarda üretilen süperoksit, oksitleyici veya indirgeyici olarak davranabilir. Aldığı elektronu metal iyonuna, sitokrom c'ye veya bir radikale verirse tekrar oksijene oksitlenir. Oksijenden daha oksitleyici olan süperoksit bir elektron daha alırsa peroksi anyonuna indirgenir. Bu tepkime biyolojik moleküllerin oksidasyonuna neden olduğundan tercih edilmez. Aerobik canlılarda süperoksitlerin H_2O_2'e çevrilmesi katalitik aktivitesi çok yüksek bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) tarafından katalizlenir.

$$2O_2\bullet^- + 2H^+ + SOD \rightarrow H_2O_2 + O_2 \qquad (1.1)$$

SOD tarafından katalizlenen bu tepkime dismutasyon tepkimesi diye adlandırılır. Süperoksit, özellikle hafif asidik koşullarda SOD olmadan kendiliğinden dismutasyonla da H_2O_2'e çevrilebilir. SOD enziminin yüksek katalitik etkisi nedeniyle hücrelerde süperoksit birikimine izin verilmez. Ancak çeşitli patolojik durumlarda süperoksit yapımının artmasıyla süperokside özgü tepkimeler görülmeye başlar:

Süperoksit metal iyonlarını indirgeyerek bağlı olduğu proteinlerden salınımına neden olur. Kofaktörlerin oksidasyon düzeylerini bozar ve metal iyonlarının katıldığı hidroksil radikali yapım tepkimelerini hızlandırır. Diğer radikallere göre daha az reaktif olsa da indirgenmiş nükleotitlerin, bazı amino asitleri ve antioksidan bileşikleri oksitler. Süperoksit, hücre zarlarının hidrofobik ortamlarında daha uzun ömürlü ve çözünürlüğü daha fazladır. Zar fosfolipidleri nedeniyle hücre zarı yüzeyleri daha asidiktir ve süperoksit burada daha kolayca bir proton alarak ($H_2O_2\bullet$)'ni oluşturur. Bu radikal de çok reaktif olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonunu başlatabilir ve antioksidanları oksitleyebilir (Uğuzlar, 2009).

1.1.1.6. Peroksi radikalleri (ROO•)

Peroksi radikalleri çoklu doymamış yağ asitlerin oksidasyonu esnasında meydana gelen ara ürünlerdir. Lipit peroksidasyonu, membranda bulunan araşidonik asit veya linoleik asit gibi çoklu doymamış yağ asitlerinin yan zincirinden bir hidrojen

atomunu koparacak kadar reaktiviteye sahip olan herhangi bir bileşik tarafından meydana getirilebilir. Araşidonik asit, prostaglandin, tromboksan ve lökotrienlerin ön bileşiğidir, özellikle hidrojen atomu koparılmaya meyilli olan birçok çift bağ içerir (Esterbauer ve ark., 1992). Lipit peroksidasyonunun biyolojik önemi ve mekanizması hakkında birçok makale olmasına rağmen, ölçümüyle ilgili metotlar için bir görüş birliği yok gibi görünüyor. DNA hasarı, hatalı DNA tamiri, proto-onkojen aktivasyon ve lipit peroksidasyonunun son ürünlerinin bazı özellikleri arasındaki bağlantı, büyük ölçüde kanser promotörü olarak değerlendirilir (Cerruti, 1985; Cheeseman, 1993).

1.1.1.7. Hipoklorik asit (HOCl)

Hipoklorik asit bir serbest radikal olmamakla beraber potansiyel bir klorlama ve oksitleme ajanıdır. Son zamanlarda hücre parçalanmalarına ve ölüme yol açtığı, hücre membranının bozulmasına neden olduğu ve kolesterol klorohidrinlerinin formasyonuna katıldığı tahmin edilmektedir (Carr, 1996). HOCl diğer birçok biyolojik moleküllere de saldırabilmektedir. Örneğin, primer aminlere, proteinlerin sülfhidril gruplarına da saldırmakta ve DNA'da pürin bazlarını kolayca klorlayabilmektedir (Dennis 1979; Gould 1982). Kozumbo ve arkadaşları (1992) yaptıkları bir çalışmada HOCl'nin fizyolojik düzeyinin sübstitüe olmuş aril aminleri etkileyerek DNA'yı bağlayabilen ve insan hücrelerinde genotoksisite sağlayan uzun ömürlü ürünler meydana getirdiğini ispatlamışlardır (Ak, 2006).

1.1.1.8. Singlet oksijen

Oksijenin enerjetik olarak uyarılan bu formunda reaktivite çok yüksektir. Aldığı enerjiyi çevreye dalga enerjisi şeklinde verip yeniden oksijene dönebilir. Başlıca şu mekanizmalarla vücutta oluşabilir:

a. Pigmentlerin (örneğin flavin içeren nükleotidler, retinal, bilirubin) oksijenli ortamda ışığı absorblamasıyla,

b. Hidroperoksitlerin metaller varlığındaki yıkım tepkimelerinde,

c. Kendiliğinden dismutasyon tepkimeleri sırasında,

d. Prostaglandin endoperoksit sentaz, sitokrom p450 tepkimeleri, myelo / kloro / lakto peroksidaz enzimlerinin etkileri sırasında.

Oksijenin bu enerjetik reaksiyonu sonucunda iki tip singlet oksijen üretilir.

1. Sigma singlet oksijen: Enerjisi daha fazladır ve çok kısa ömürlüdür.
2. Delta singlet oksijen: Daha uzun ömürlüdür ve gözlenen kimyasal reaksiyonlardan esas sorumlu form olduğu kabul edilmektedir.

Singlet oksijen diğer moleküllerle etkileştiğinde ya içerdiği enerjiyi transfer eder, ya da kovalent tepkimelere girer. Özellikle karbon-karbon çift bağları singlet oksijenin tepkimeye girdiği bağlardır. Doymamış yağ asitleri ile de doğrudan tepkimeye girerek peroksi radikalini oluşturur ve OH• kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilir. Skualen ise bir serbest radikal gidericisi olmakla beraber, singlet oksijen söndürücü olarak da görev yapmaktadır (Uğuzlar, 2009).

Gıda sektöründe trigiliseritlerin, lipitlerin ana grubunu oluşturmasına rağmen, doymamış yağ asitleri ve bunların esterleri, lipit oksidasyonu ve antioksidan aktivite çalışmaları için model substratlar olarak daha yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Oksidasyon, bir atom ya da molekülün bir alıcıya elektron vermesi ile meydana gelen yükseltgenme prosesidir. Yükseltgenme potansiyeli yüksek olan madde yükseltgenirken diğer madde indirgenir. İnsan vücudunda ve besinlerde bulunan lipitler, proteinler, karbonhidratlar, nükleik asitler de oksidasyona uğrayabilmekte ve canlı organizma için zararlı olabilecek oksidasyon ürünleri oluşabilmektedir (Papas, 1996). Bu durumun oksidatif stres olarak ifade edildiği belirtilmiştir. Çizelge 1.2'de gösterilen reaktif oksijen ve reaktif azot türleri oksidatif strese en çok sebep olan önemli faktörlerdendir (Aruoma ve Cuppett, 1997).

Çizelge 1.2. Reaktif oksijen türleri

Reaktif Oksijen Türleri			
Radikaller	**Formülü**	**Nonradikaller**	**Formülü**
Süperoksit	$O_2^{\bullet -}$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Hidroksi	HO•	Hipoklorik asit	HOCl
Peroksi	ROO•	Hipobromik asit	HOBr
Alkoksi	RO•	Ozon	O_3
Hidroperoksi	HOO•	Singlet oksijen	$^1O_2$

1.2. Serbest Radikallerin Metabolizmaya Etkileri

1.2.1. Serbest radikallerin lipidlere etkileri

Çoklu doymamış yağ asitleri, doymuş yağ asitlerine göre hidrojen koparılmasıyla oluşan radikalin çift bağın konjügasyonuyla kararlı hale getirilmesi ve böylece de hidrojenin daha kolay koparılmasına sebep olmasından dolayı, otoksidasyona daha yatkındırlar (Halliwell ve Gutteridge, 1989; Uğuzlar, 2009).

Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar.

Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri (L•) ve lipid peroksit radikallerinin (LOO•) oluşması, reaktif oksijen türlerinin (ROT) neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Serbest radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna "nonenzimatik lipid peroksidasyonu" denir.

Hücre membranlarında lipid peroksidasyonuna uğrayan başlıca yağ asitleri poliansatüre yağ asitleridir. Lipid peroksidasyonu genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipid radikali niteliği kazanmasıyla başlar.

Lipid radikali (L•) dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipid radikallerinin (L•) moleküler oksijenle (O_2) etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikalleri (LOO•) oluşur. (LOO•)'leri, membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid peroksitlerine (LOOH) dönüşürler ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder.

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan LOOH'ların yıkılımı geçiş metalleri iyon katalizini gerektirir. Plazma membranı ve subsellüler organel lipid peroksidasyonu serbest radikal kaynaklarının hepsiyle uyarılabilir ve geçiş metallerinin varlığında artar. Lokal olarak (H_2O_2)'den Fenton reaksiyonu sonucu (OH•) oluşması zincir reaksiyonunu başlatabilir.

LOOH'lar yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından

diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit (MDA) meydana gelir.

MDA kanda ve idrarda ortaya çıkar, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamakla beraber lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik materyalde MDA ölçülmesi lipid peroksit seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır.

Nonenzimatik lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehitlerle indirekt olarak diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece doku hasarına ve birçok hastalığa neden olur.

1.2.2. Serbest radikallerin proteinlere etkileri

Proteinler serbest radikallere karşı poliansatüre yağ asitlerinden daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme derecesi amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Bu etki sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur.

Serbest radikallerin etkileri sonunda, yapılarında fazla sayıda disülfit bağı bulunan immünoglobülin G (IgG) ve albümin gibi proteinlerin tersiyer yapıları bozulur, normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Prolin ve lizin, ROS üreten reaksiyonlara maruz kaldıklarında nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilirler. Hemoglobin gibi hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin süperoksit radikali ($O_2\bullet^-$) veya (H_2O_2)'le reaksiyonu methemoglobin oluşumuna neden olur.

1.2.3. Serbest radikallerin nükleik asitlere ve DNA'ya etkileri

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. (HO•) deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan H_2O_2 membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. ($O_2\bullet^-$)'ne maruz kalan DNA molekülleri hayvanlara enjekte edildiklerinde daha fazla antijenik özellik gösterirler ki

bu oldukça önemli bir etkidir, çünkü otoimmün bir hastalık olan sistemik lupus eritematozusta (SLE) ve romatoit artritte (RA) dolaşımda anti-DNA antikorlar bulunur.

1.2.4. Serbest radikallerin karbonhidratlara etkileri

Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisiyle çeşitli ürünler meydana gelir ve bunlar, çeşitli patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar. Diyabet ve diyabetin ileri safhada gelişimi, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, sedef hastalığı, eklem romatizması, behçet hastalığı, çeşitli deri ve göz hastalıkları, kanser gibi birçok hastalıkta ve yaşlılıkta serbest radikal üretiminin arttığı, antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir. Ancak bu hallerde serbest radikal artışının sebep mi yoksa sonuç mu olduğu tam olarak bilinmemektedir.

1.3. Serberst Radikallere Bağlı Hastalıklar

Serbest radikallerin hücrelerde oluşturduğu hasarlar sonucu meydana gelen rahatsızlıklar Çizelge 1.3.'te gösterilmiştir. Serbest radikallerin bu etkileri antioksidanların önemini ortaya koymaktadır (Temür, 2005).

Çizelge 1.3. Serbest radikallerin sebep olduğu hastalıklar

Kardiyovasküler sistem patolojisi	
Aterosklerozis (Damar sertliği)	Savunma sistemindeki aşırı yüklenme veya hatalar
Beyindeki düzensizlikler	
Anoksia	Kandaki oksijen azlığı
Nöral lipofuskinosis	Hücrelelerdeki yapısal bozunmalar
Alzhemier hastalığı	Aktifleşmiş fagositik hücrelerin aşırı $O_2\bullet^-$, H_2O_2 ve HClO üretimi
Parkinson hastalığı	Hücrelerdeki yapısal bozunmalar
Down sendromu	Savunma sistemindeki aşırı yüklenme veya hatalar
Multiple selerosis	Hücrelerdeki yapısal bozunmalar
Kronik granülomatöz hastalık	Antioksidan sistemdeki gen hasarı
Diabetes Mellitus	Anormal substrat oksidasyonu veya oksijen konsantrasyonundaki değişim
İnflamatory (ateşli) düzensizlikler	
Astım	Aktifleşmiş fagositik hücrelerin aşırı $O_2\bullet^-$, H_2O_2 üretimi
Romatizmal artirit	Aktifleşmiş fagositik hücrelerin aşırı $O_2\bullet^-$, H_2O_2 üretimi
Demir yüklenmesi	
İdoyopatik hemokromatosis	Geçiş metallerinden oksijene elektron transferi sonucu
Talesemi	Geçiş metallerinden oksijene elektron transferi sonucu
Akciğer düzensizlikleri	
Asbestosis	Aktifleşmiş fagositik hücrelerin aşırı $O_2\bullet^-$, H_2O_2 üretimi
Yetişkin solunum stresi solunumu	Aktifleşmiş fagositik hücrelerin aşırı $O_2\bullet^-$, H_2O_2 üretimi
Radyosyon hasarları	
Zedelenme (reperfusyon)	Anormal substrat oksidasyonu veya oksijen konsantrasyonundaki değişim
Deri bozuklukları	
Solar radyasyon zehirlenmesi	Yüksek veya düşük radyasyon enerjisi ile doku hasarı
Bloom sendromu	Savunma sistemindeki aşırı yüklenme veya hatalar
Oluşan zararlı (toksit) maddeler	
Zenobiyotikler	İlaç ve toksin kullanımında

Metal iyonları (Hg, Fe, Cu)	Geçiş metallerinden oksijene elektron transferi
Sitositatikler (blomyein)	İlaç ve toksin kullanımında
Kanser	Mesane, Bağırsak, Göğüs, Kolorektal, Karaciğer, Akciğer, Lösemi, Deri, Prostat

Bu hastalıkları oluşum kaynaklarına göre sınıflandırabiliriz:

1) Genetiğe bağlı (Fanconi's anemia, bloom sendromu)

2) Çevresel bileşenler (iş hastalıkları, virus ve bakteriyal enfeksiyonlar)

3) Hem genetik hem çevresel (bronşial astım, diabetes mellitus, kanser, kardiovasküler hastalıklar) (Uğuzlar, 2009).

1.4. Korunma

Normal fizyolojik şartlarda, hücreler oluşan serbest radikal türlerinin neden olabileceği oksidatif hasara karşı antioksidan savunma sistemleri tarafından korunmaktadır. Bu sistemler Çizelge 1.4' de şu şekilde sınıflandırılmıştır:

Çizelge 1.4. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar (Temür, 2005)

Enzimatik antioksidanlar	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Katalaz
Selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz (GPx)	Glutatyon redüktaz (GR)
Glutatyon-S-transferaz (GST)	
Enzimatik olmayan antioksidanlar	
Vitamin C	Vitamin E
Flavonoidler	Vitamin A
Melatonin	Ürik Asit
Albümin	Haptoglobulin
Sistein	Seruloplazmin
Transferrin ve Laktoferrin	Ferritin
Oksipurinol	Ubikinon
Bilirubin	Mannitol
Lipoik asit	Hemopeksin

Genel olarak enzimatik antioksidanlar hücre içinde, enzimatik olmayan antioksidanlar ise hücre dışında daha fazla etkilidir. Antioksidanlar etkilerini başlıca iki şekilde gösterirler:

I. Serbest radikal oluşumunun önlenmesi:

a) Başlatıcı reaktif türevleri uzaklaştırıcı etki,

b) Oksijeni uzaklaştırıcı veya konsantrasyonunu azaltıcı etki,

c) Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırıcı etki.

II. Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi:

a) Toplayıcı (scavenging) etki: ROT'u etkileyerek onları tutma veya çok daha az reaktif başka bir moleküle çevirme (Ör: Enzimler).

b) Bastırıcı (quencher) etki: ROT ile etkileşip onlara bir proton ekleyerek aktivite kaybına neden olma (Ör: Flavonoidler, vitaminler).

c) Onarıcı (repair) etki.

d) Zincir kırıcı (chain breaking) etki: ROT'u ve zincirleme reaksiyonları başlatacak diğer maddeleri kendilerine bağlayıp zincirlerini kırarak fonksiyonlarını önleyici etki (Ör: Hemoglobin, seruloplazmin, mineraller).

Antioksidanlar, serbest oksijen radikallerinin hedef dokularda neden olacakları hasarı önleyen, geciktiren veya meydana gelen hasarın tamirinde görev alan maddelerdir. Antioksidanlar, enzimatik ve non-enzimatik (enzimatik olmayan) olmak üzere iki grup altında toplanırlar. Enzimatik antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz (GPx), non-enzimatik antioksidanlar ise vitamin E, vitamin C, vitamin A (β-karoten), selenyum, transferrin ve laktoferrindir. Antioksidanlar sıklıkla in vivo bazen de in vitro olabilirler (Berköz ve ark., 2008).

Oksijen serbest radikalleri lipid peroksidasyonunun oluşumuna önderlik etmektedir. Serbest radikaller hücrenin lipid membranına saldırarak buradan elektron çıkarırlar. Lipid peroksidasyonu lipid hidroperoksitlerini oluşturmak için, oksijen radikali ile hücre membran fosfolipidlerindeki poliansatüre yağ asitlerinin reaksiyona girdiği kompleks bir işlemdir. Lipid peroksidasyonu sonucunda hücre membranında bulunan çoklu doymamış yağ asitleri suda çözünebilen ürünlere dönüşüp, hücre membranının bütünlüğünü bozmakta ve hücrenin ölümüne kadar giden değişik reaksiyonlar oluşmaktadır (Uluçay, 2007).

Yağlar vücutta değişime uğradığında; hücre zarının yapısı ve fonksiyonları zarara uğrar, hücre zarı gıdaların, oksijenin ve suyun uzun süreli olarak transferini yapamaz,

harcanan ürünlerin atılmasını düzenleyemez. Serbest radikal saldırısının devamı; hücre zarının yapısında bulunan yağların parçalanmasına, zarın yırtılmasına ve hücre bileşenlerinin dağılmasına sebep olur. Hücre içi bileşenlerin hücre dışına akması etraftaki dokulara da zarar verir. Serbest radikal saldırısı ve hücre zarının tahribatı "Yağların Oksidasyonu" veya "Oksidatif Zarar" olarak adlandırılır (Uğuzlar, 2009).

Oksidasyon prosesi, radikalik zincir reaksiyonları vasıtasıyla meydana gelir. Radikaller eşleşmemiş elektronlarını eşleştirme eğiliminde oldukları için özellikle gevşek bağlı elektronları koparabilirler. Radikallerin bu özellikleri, onlara kimyasal aktiflik sağlar. Radikallerin organizmada kontrolsüz bir şekildeki varlığı, biyomoleküllerin modifikasyonuna sebep olur. Hayatımızın vazgeçilmez bir öğesi olan oksijen gazının da bir diradikal olması da aerobik canlılar için bir dezavantajdır. Bu sebeple aerobik canlılarda biyolojik sistem oksidasyona doğru giderken, oksidasyon önleyici veya geciktirici sistemler oksidasyonu durdurma veya yavaşlatma yönünde hareket ederek sürekli bir denge oluştururlar. Gıda maddeleri özellikle de yağ ihtiva eden ürünler, işlenme ambalajlanma esnasında oksijenden uzak tutulmakta ya da antioksidanlar aracılığı ile oksidasyondan korunmaya çalışılmaktadırlar (Ak, 2006).

Yağlarda otooksidasyon, serbest radikallerin oluşumuyla, zincirleme reaksiyon sonucu meydana gelmektedir. Bu reaksiyon oksijen ve katalizör varlığında başlar ve sıcaklık, ışık, dış enerji ve metal iyonları gibi etkenlerle hızlanır. Başlangıç aşamasında meydana gelen serbest radikaller, daha sonra lipit peroksit radikal formuna dönüşür. Bu lipit peroksi radikali ileri aşamada hidroperoksi vermek üzere reaksiyona girer. Gelişme aşamasında daha çok serbest radikal sağlanarak zincirin kendi kendine çoğalması sağlanır. Sonuç olarak kötü kokulu alkenler, alkoller, aldehitler ve asitler meydana gelir (Angelo, 1996; Yanishlieva ve Marinova, 2001; Eskin ve Pryzbylski, 2001; Gordon, 2003; Çetintaş, 2005).

1.5. Antioksidanların Etki Mekanizması

Zincirleme reaksiyon teorisine göre enerji emilimi ile aktive edilen madde (lipit molekülü), oksijenle birleşerek okside olmakta ve bu şekilde meydana gelen aktiflenmiş peroksit molekülleri, enerjilerini maddenin okside olabilen başka moleküllerine aktararak otooksidasyona devam etmektedir. Antioksidanların kullanımı ile, aktivasyon enerjisini antioksidan molekülü kullanmakta, bu enerjiyi başka moleküllere aktaramamaktadır. Antioksidan molekülünün araya girmesiyle otookside olabilen

maddenin birçok molekülleri okside olmaktan kurtulmakta, yani oksidasyon yavaşlamış, kısmen durdurulmuş olmaktadır.

$$R\bullet + AH \rightarrow RH + A\bullet \quad (1.2)$$

$$RO\bullet + AH \rightarrow ROH + A\bullet \quad (1.3)$$

$$HO\bullet + AH \rightarrow H_2O + A\bullet \quad (1.4)$$

$$ROO\bullet + AH \rightarrow ROOH + A\bullet \quad (1.5)$$

$$A\bullet + O \rightarrow AO \quad (1.6)$$

Antioksidanın aktif molekülü (A•) enerjisini yağ moleküllerine aktarmamakta, genellikle inaktif moleküllere okside olmaktadır (AH: Antioksidan molekülü, A·: Aktif antioksidan molekülü, AO: İnaktif antioksidan molekülü). Gıdalarda kullanılacak antioksidanlar bazı özelliklere sahip olmalıdır. Bunlardan bazıları şunlardır:

- İnsan sağlığı için zararsız olmalı,
- Çok küçük miktarlarda kullanılmalı, böylece maliyeti arttırmamalı,
- Gıdanın doğal koku, görünüş ve tadını bozmamalı,
- Koruyacağı madde içinde çözünmeli veya iyice karışmalı,
- Normal üretim sırasında etkisini kaybetmemelidir (özellikle yüksek sıcaklık uygulamalarında) (Maddox, 1976; Josse, 1987; Köylüoğlu ve Yurteri, 2000; Sezgin, 2004).

1.6. Antioksidan Türleri

1.6.1. Enzim yapısındaki bazı antioksidanlar

Süperoksit dismutaz (SOD) : Süperoksiti hidrojen peroksit ve moleküler oksijene çeviren reaksiyonu katalizleyen bir metalloenzimdir.

$$2O_2\bullet^- + 2H^+ + SOD \rightarrow H_2O_2 + O_2 \quad (1.7)$$

Bu reaksiyon "oksidatif strese karşı ilk savunma" olarak da adlandırılır. Çünkü, süperoksit zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısıdır. Bu sistem sayesinde doku hücrelerindeki $O_2\bullet^-$ düzeyleri kontrol altında tutulur.

Katalaz (CAT) : Katalaz esas olarak peroksizomlarda lokalize olan ve yapısında 4 "hem" grubu bulunan bir hemoproteindir. Karaciğer ve eritrositlerde en yüksek aktiviteye sahiptir. Bir radikal olmamasına karşın SOD aracılığıyla oluşan hidrojen peroksit, reaktif oksijen türlerinden en reaktif olan HO• radikalinin öncüsüdür. Bu nedenle birçok reaktif oksijen türlerinden daha fazla oksidatif hasara neden olmaktadır. Katalaz hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene parçalar:

$$2H_2O_2 + CAT \rightarrow H_2O + O_2 \qquad (1.8)$$

Glutatyon peroksidaz (GPx) : Glutatyon peroksidaz, hidrojen peroksit ve büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerinin indirgenmesinde görevlidir. Hücrenin sitozol kısmına yerleşmiş, 4 selenyum atomu içeren tetramerik yapılı bir enzimdir. En yüksek derecede karaciğerde; orta derecede kalp, akciğer ve beyinde; düşük derecede kaslarda aktivite göstermektedir.

GPx, aşırı hidrojen peroksit varlığında glutatyonun (GSH) okside glutatyona (GSGS, glutatyon disülfit) oksidasyonunu katalize eder; bu arada H_2O_2 da detoksifiye edilmiş olur (Temür, 2005):

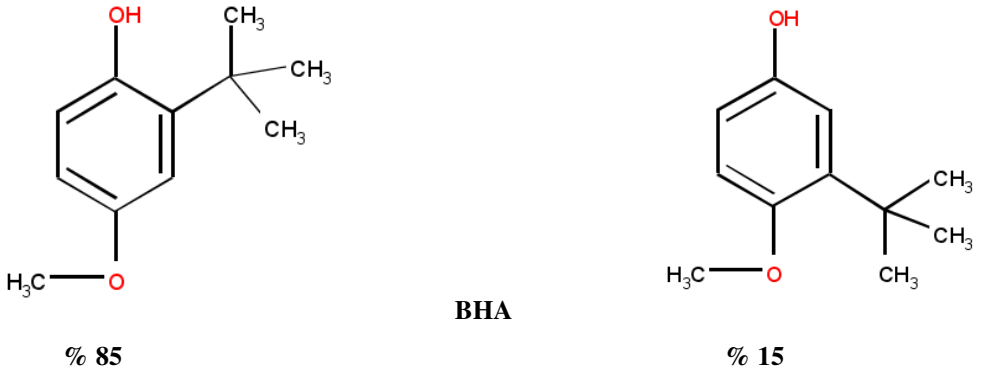
$$H_2O_2 + 2GSH + GPx \rightarrow GSSG + 2H_2O \qquad (1.9)$$

1.6.2. Enzim yapısında olmayan bazı antioksidanlar

Sağlık ve gıda alanlarında son derece önemli olan bu bileşikleri sentetik ve doğal antioksidanlar olmak üzere iki grup altında inceleyebiliriz.

a) Sentetik Antioksidanlar: Gıda sanayinde en yaygın olarak kullanılan sentetik antioksidanlar; PG (propil gallat), BHA (bütil hidroksianisol), BHT (bütil hidroksitoluen) ve TBHQ (tersiyer bütilhidrokinon)'dır. Bunlara ek olarak, NDGA (Nordihidroguairatik asit) verebiliriz (Elitok, 1996; Uğuzlar, 2009).

BHA: Bu antioksidan Şekil 1.1'deki gibi, ticari olarak 3-tersiyerbütil-4-hidroksianisol (%85) ile 2-tersiyerbütil-4-hidroksianisol (%15) izomerlerinin karışımı halindedir. Beyaz mumsu katı bir yapıya sahip olup, bitkisel ve hayvansal yağlarda kullanılmaktadır (Nawar, 1996; Uğuzlar, 2009). Bu iki izomer karışımı, yağda çözündüğü halde suda çözünmemektedir. BHA'nın gıda içerisinde taşınması BHT'ye göre daha iyidir (Özyürek, 2005). Bitkisel yağlardaki antioksidatif etkisi, hayvansal yağlardaki etkisine göre daha azdır (Uğuzlar, 2009). BHA özellikle uçucu yağların renk ve tat-kokularının korunmasında, özellikle de kısa zincirli yağ asitlerinin oksidasyonunun kontrol edilmesinde etkilidir. Genellikle tahıllarda ve ihtivasında şeker bulunan ürünlerde kullanılmaktadır (Özyürek, 2005).

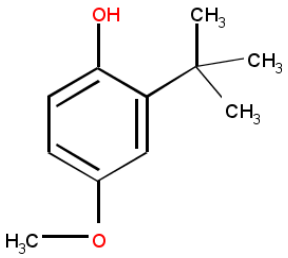


BHA

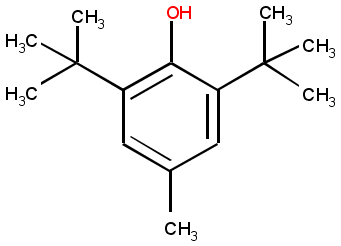
% 85 **% 15**

Şekil 1.1. 3-tersiyerbütil-4-hidroksianisol ile 2-tersiyerbütil-4-hidroksianisol izomerlerinin kimyasal yapıları ve oranları

BHT: BHT (2,6-ditersiyer bütil-4-metil fenol); beyaz renkli kristal yapıdadır. Bu antioksidan da BHA gibi ısıya oldukça dayanıklıdır. Bu yüzden fırında pişirme ve kızartma gibi işlemlerde daha fazla ortamda kalır ve gıdaya dayanıklılık kazandırır. BHA ile sinerjist etki gösterirken, PG ile göstermez (Yanishlieva, 2001; Uğuzlar, 2009).



BHA



BHT

Şekil 1.2. BHA ve BHT'nin kimyasal yapıları

PG(propil gallat): Gallik asitin esteri olan ve beyaz renkte katı kristaller halindeki propil gallat, hayvansal ve bitkisel yağlarda en çok kullanılan sentetik antioksidandır (Gökalp ve Çakmakçı, 1992; Uğuzlar, 2009). Ancak bitkisel yağlarda TBHQ'dan daha az etkilidir. PG daima sitrik asitle birlikte kullanılmaktadır. Sitrik asit, demir ve bakır iyonlarının kataliz ettiği prooksidatif reaksiyonları engelleyebilmektedir. PG, BHA ve BHT ile beraber kullanıldığında iyi sinerjik etki verir, ancak TBHQ ile kullanımına izin verilmemektedir (Özyürek, 2005).

TBHQ: TBHQ, beyaz ile açık kahverengi arası renkte kristal yapıda olup bitkisel yağlar için çok etkili bir antioksidandır. Birçok uygulamada diğer antioksidanlara göre en iyi etkiyi gösterdiği belirtilmektedir (Yanishlieva, 2001; Altuğ, 2001; Uğuzlar, 2009). Tek başına veya BHA ve/veya BHT ile birlikte kullanımı daha uygundur. PG ile birlikte kullanımı, etkiyi azalttığından tavsiye edilmemektedir. Sitrik asit ile karıştırıldığında, stabilize edici özellik kazanmaktadır (Özyürek, 2005).

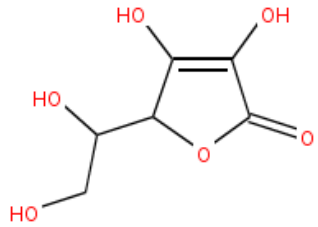
NDGA: Bu madde bir çöl bitkisi olan *Larrea divaricata*'dan doğal olarak ekstrakte edilebildiği gibi sentetik olarak da elde edilebilmektedir. Gri-beyaz kristalimsi bir maddedir. Bu maddenin yağlardaki çözünürlüğü sınırlı (%0.5-1) olup gıdalarda kullanımı ülkemiz dahil diğer bir çok ülkede yasaklanmıştır (Nawar, 1996; Altuğ, 2001; Uğuzlar, 2009).

Yapılan bazı araştırmalar sonucu sentetik antioksidanların, bazı yan etkilerine rastlandığı saptanmıştır. Dolayısıyla tüketiciler sentetik antioksidanların sağlık açısından güvenilirlikleri hakkında ciddi endişeler taşımaktadır (Branen, 1975; Ito ve ark., 1983).

Sentetik antioksidanların kullanımı geniş piyasada olmasına rağmen, istenmeyen bazı yan etkilerinden dolayı son zamanlarda kullanım alanları ciddi şekilde sınırlandırılmıştır. Bu nedenlerden dolayı birer doğal antioksidan olan α-tokoferol ve askorbik asit; BHA, BHT, PG ve TBHQ gibi sentetik antioksidanlardan daha düşük aktivite göstermelerine rağmen, yağlı maddelerin üretiminde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Nisihina ve ark., 1991; Osawa ve Namiki, 1981).

b) Doğal Antioksidanlar: Başlıca doğal antioksidanlar, vitaminler(Vitamin C,E,A), flavonoidler, polifenoller, karotenoidlerdir. Yapılan birçok araştırmaya göre meyve ve sebze tüketimi ile bazı kanser ve kalp rahatsızlıklarının oluşumu arasında ters orantılı bir ilişki olduğu belirlenmiştir (Rice-Evans ve ark, 1997).

C Vitamini: C vitamini (askorbik asit), insanlar için zorunlu bir besindir. C vitamininin vücudun çoğu dokusuna sağlamlığını veren kolajenin üretiminden alyuvarların işlemesine kadar çok sayıda görevi vardır. Bütün canlı dokularda bulunan askorbik asit (C vitamini) vücutta birçok kimyasal tepkimenin normal olarak yürümesi için gereklidir. Doğada yaygın olarak bulunan bu vitaminin en zengin kaynakları taze meyve ve sebzelerdir.

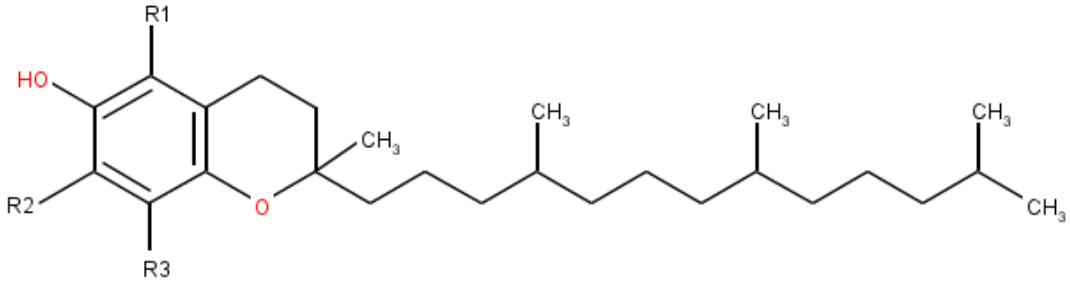


Şekil 1.3. Askorbik asit (C vitamini)

Askorbik asit oksijen tutma özelliğine sahip olması nedeniyle antioksidan olarak kullanılır. Yağların ve yağlı besinlerin uzun süre saklanabilmesi, beyaz renkteki sebze ve meyvelerin kararmasının önlenmesi için kullanılır (Uğuzlar, 2009).

E Vitaminleri (tokoferoller): E vitamini, kimyasal yapı itibarı ile bir tokol olup antisterilite vitamin olarak da bilinir. E vitamini yağda çözünen önemli bir

antioksidandır ve özellikle hücre zarları ve lipoproteinlerde önemli antioksidan işlevler görmektedir (Uğuzlar, 2009).



Şekil 1.4. α-> β - > γ ->δ-Tokoferol

Çizelge 1.5. α-β-γ-δ Tokoferolün sübstientleri

	R_1	R_2	R_3
α	**CH_3**	**CH_3**	**CH_3**
β	**CH_3**	**H**	**CH_3**
γ	**H**	**CH_3**	**CH_3**
δ	**H**	**H**	**CH_3**

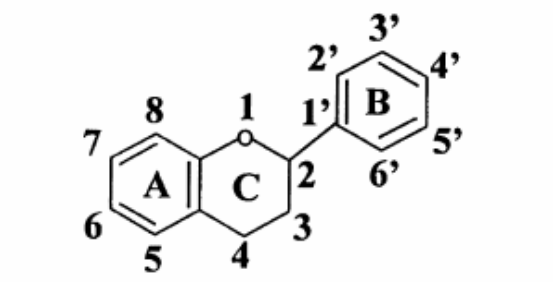
Tokollerin (tokoferol ve tokotrienol) farklı bileşikleri E vitamini aktivitesi gösterir. En aktifi alfa-tokoferoldür. Tokoferoller; metil grubunun aromatik tokol halkası üzerindeki pozisyonuna bağlı olarak, α-,β-,γ-,δ-tokoferol olarak dört temel isim alır *(*Mukhopadhyay, 2000; Uğuzlar, 2009). Bunların antioksidatif etkisi; tokoferolün kimyasal yapısına ve konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Ancak genel olarak şu şekilde sıralayabiliriz; α-> β - > γ ->δ-tokoferol' dür. Birçok ülkede yapılan klinik çalışmalar ve deneyler sonucunda düzenli olarak E vitamini alınmasının çeşitli hastalıkların (kalp-damar, erken yaşlanma, şeker ve kanser türleri) oluşumunun önlenmesinde önemli oranda katkılar sağladığı tespit edilmiştir (Shahidi, 2000; Uğuzlar, 2009). Tokoferol ve karotenoidler gibi doğal antioksidanların depolandığı temel organ karaciğerdir. Bunun yanı sıra adipoz dokuda, akciğer ve böbreklerde de depolandığı belirtilmiştir (Surai ve ark., 1998; Ak, 2006).

Polifenolik Bileşikler: Polifenoller; bitki dünyasının büyük bir kısmında mevcut olan, fitokimyasalların en geniş kategorilerinden birini oluşturan ve insan yaşamında gerekli olan bileşiklerdir. Besin enolikleri; flavonoidleri, fenolik asitleri ve fenolik polimerleri içerir. Polifenoller güçlü antioksidanlardır ve aktiviteleri kimyasal yapılarına bağlıdır. Bitki polifenolleri multifonksiyonel bileşikler olup, indirgeme aracı, hidrojen atom-donör antioksidanlar ve singlet oksijen söndürücü olarak, bazıları metal iyonu şelatlama özelliklerine sahip antioksidanlar olarak davranırlar. Bir polifenolün antioksidan olarak tarif edilebilmesi için iki temel şartı sağlaması gerekir:

• Okside olabilen substratlara oranla düşük konsantrasyonlarda bulunduklarında, otooksidasyonu veya serbest radikal merkezli oksidasyonu erteleyebilmeli, geciktirebilmeli veya önleyebilmelidir.

• Süpürme sonunda oluşan radikal, oksidasyon zincir reaksiyonunu kesmekte kararlı olmalıdır (Karademir 2005).

Flavonoidler: Flavonoidler; önemli antioksidan ve şelatlama özelliğine sahip, düşük molekül ağırlıklı ve en geniş bitki fenolikleri sınıfıdır. 6 karbonlu A, B ve C halkalarından oluşan heterosiklik bileşikler, hetero halkanın yükseltgenme derecesine göre farklılık gösterirler. Aromatik halkalar A ve B, hetero halka ise C olarak ifade edilir. Karbon atomları C halkasındaki oksijenden başlayarak, B halkasındaki karbon atomları ise üssü (') rakamlarla numaralandırılır (Şekil 1.5). Doğada, birçoğu yaprak, çiçek ve kökte bulunan 4000'den fazla flavonoid çeşidi bulunmaktadır. Meyve, sebze, şarap, kakao ve çayda bol miktarda bulunurlar. Antioksidan aktivitelerini belirleyen ve aromatik halkalara bağlı olan birçok fenolik hidroksil grupları içerirler. Metal şelatlama, lipid peroksidasyonunu engelleme, reaktif oksijen türlerini içeren diğer prosesleri azaltma özellikleri vardır. Yiyeceklerde genellikle 3-orto glikozidleri ve polimerleri şeklinde bulunurlar. Glikozit birimi genellikle glukozdur ancak glukoramnoz, galaktoz, arabinoz ve ramnoz da bulunabilmektedir. Bu bileşikler yapılarına bağlanan grupların çeşidi, pozisyonu ve sayısına göre farklı radikal yutma ve şelatlama aktivitesine sahiptirler.



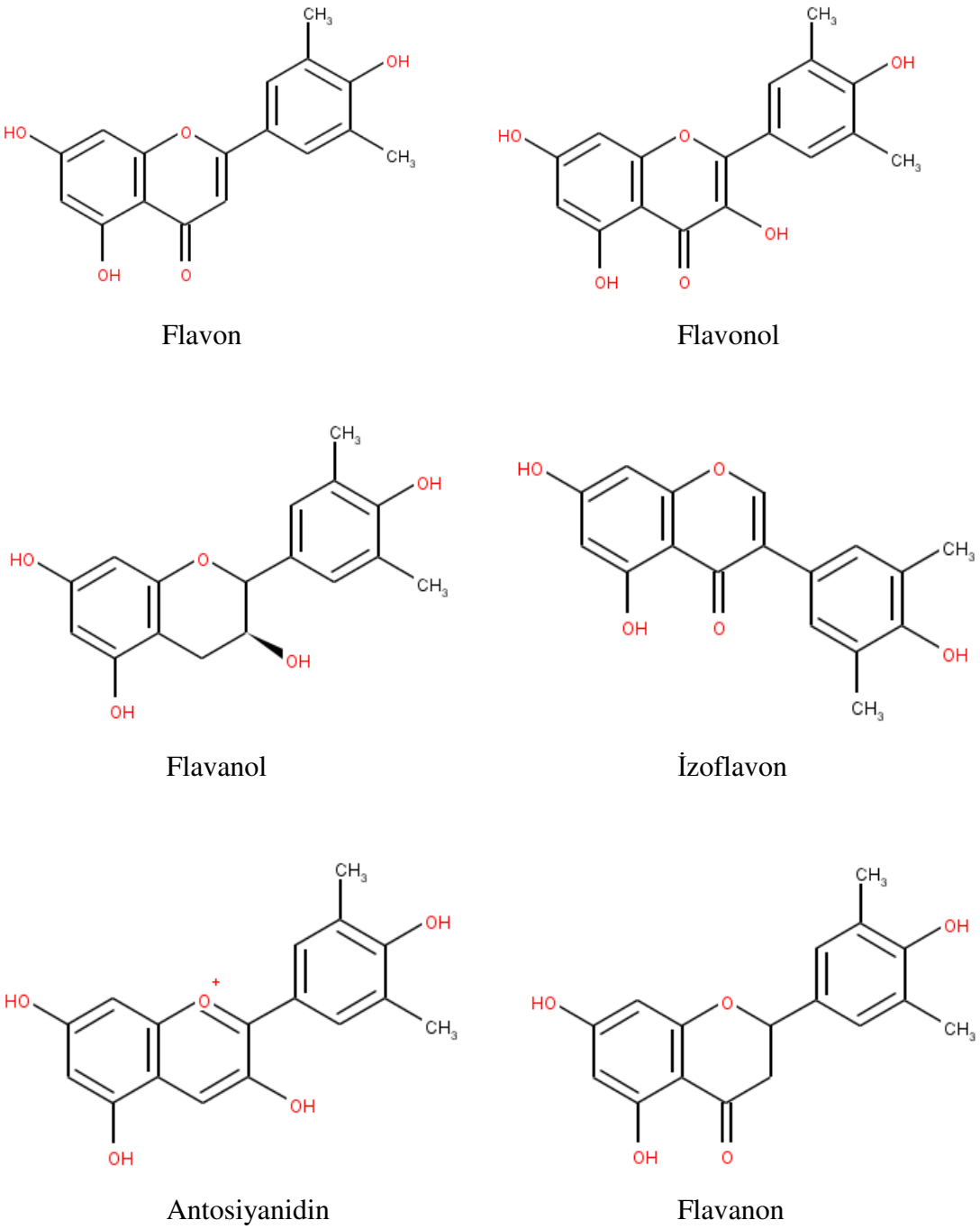
Şekil 1.5. Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı

Flavonoidler, fenolik ve furan halkalarından oluşan benzo-γ-furan türevleridir. Bu bileşikler; A, B ve C halkalarından oluşan halka yapısında çeşitli hidroksil, metoksi ve glikozid yan grupları içerirler. Halkalar arasındaki yapısal değişiklikler flavonoidleri çeşitli sınıflara ayırmaktadır. Flavonoid çeşitleri öncelikle, antoksantinler ve antosiyaninler olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. Antoksantinler ise kendi arasında beş farklı sınıfa ayrılmaktadır:

1. Antoksantinler

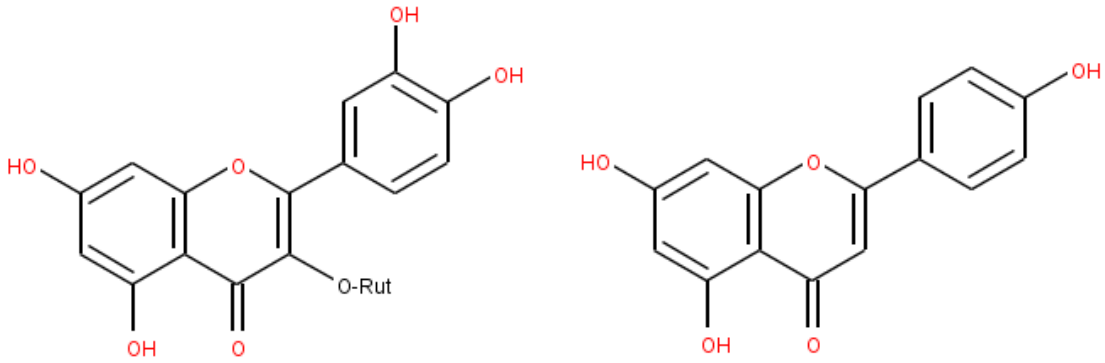
- Flavanoller
- Flavonlar
- Flavonoller
- Flavanonlar
- İzoflavonlar

2. Antosiyanin ve antosiyanidinler



Şekil 1.6. Flavonoidlerin temel kimyasal yapıları

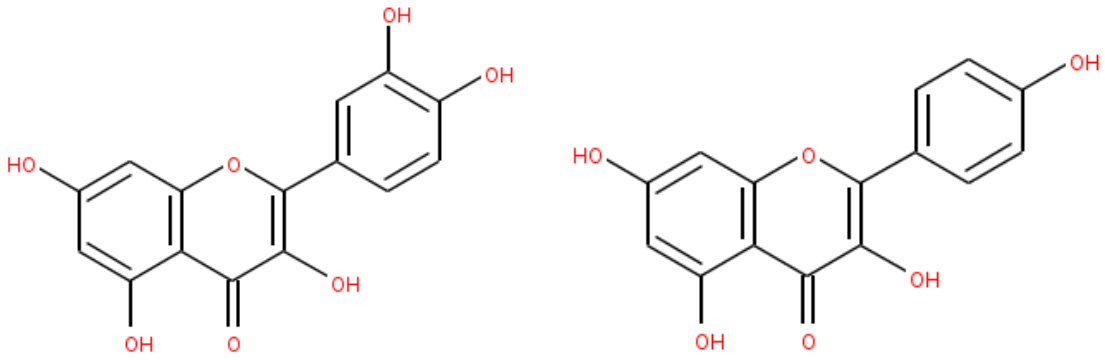
Flavonoidler sınıfının temel maddesi *2-fenil kromon* olan *flavon*'dur. En önemli flavonlar; rutin, apigenin, krisin ve luteolin'dir. Rutin kuersetinin glikozidi olup kırmızı şarap ve domateste mevcuttur. Apigenin; maydonoz ve kereviz sapında, krisin; meyve kabuğunda, luteolin ise acı biberde bulunmaktır.



Rutin Apigenin

Şekil 1.7. Rutin, apigenin, krisin ve luteolin'in kimyasal yapısı

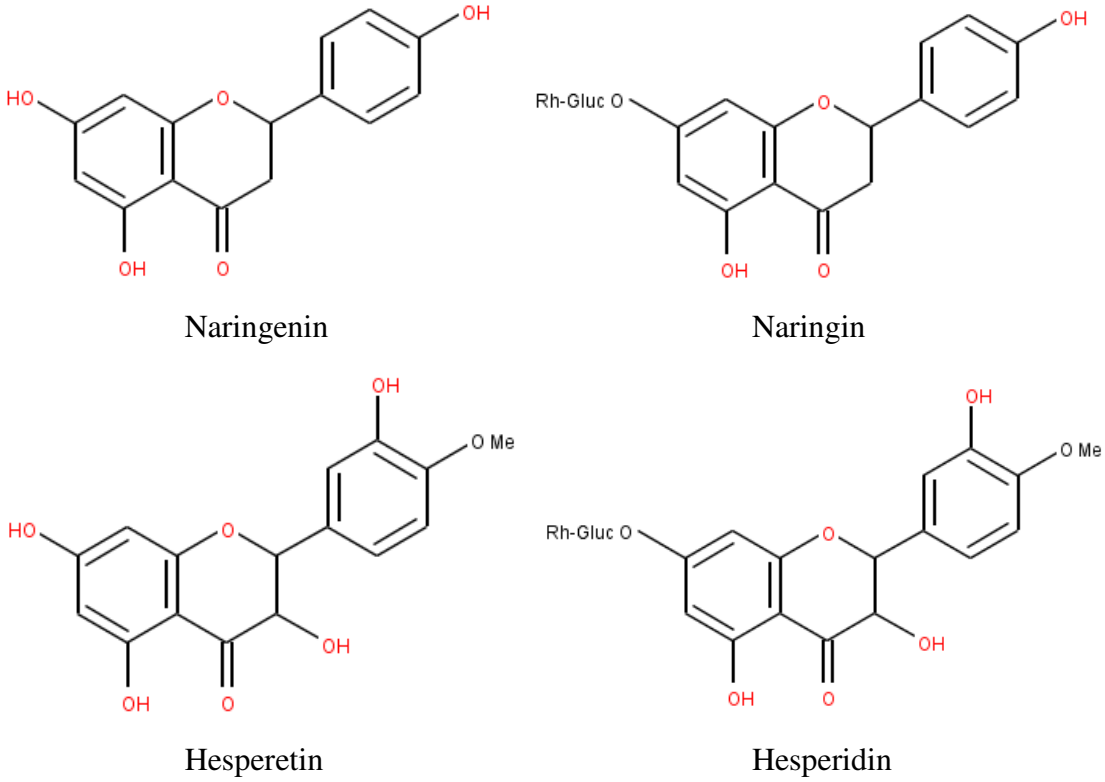
Flavonoller (3-hidroksiflavon), flavonun 3. karbon atomuna bağlı bir hidroksil grubu taşırlar. Flavonoidlerin bitkilerde en yaygın olarak bulunan sınıfıdır. En önemli flavonoller kuersetin, mirisetin, fisetin ve kaempferol'dur. Kuersetin flavonoidlerin en önemli bileşiği ve bitkilerin temel fenolik bileşenidir. Soğanda, elmada ve lahanada bol miktarda bulunur.



Kuersetin Kaempferol

Şekil 1.8. Kuersetin ve kaempferolün moleküler yapısı

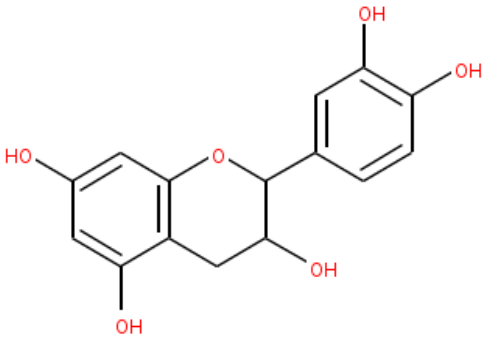
Flavonun dihidroksi türevi *flavanon*'dur. En önemlileri naringenin, naringin, hesperidin ve hesperetin'dir. Naringenin 3-hidroksi flavanon'dur. Greyfurtun karakteristik acılığını veren bileşik naringeninin glikozidi olan naringin'dir. Turunçgillerden ekşi portakalda bulunur ve son derece acıdır. Naringinin aglikonu olan naringenin ise acı değildir. Hesperidin ve hesperetin limon ve portakalda bolca bulunur. Hesperidin, hesperetinin glikozididir.



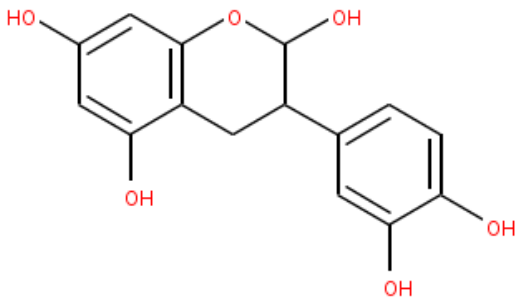
Şekil 1.9. Naringenin, naringin, hesperetin ve hesperidinin kimyasal yapıları

Flavonların izomeri olan *izoflavonlar* ise aromatik B halkasının, C halkasının 3. Karbon atomuna bağlanmasıyla oluşur. Genistein, daidzein ve bunların glikozidleri olan genistin ve daidzin başlıca izoflavonlar olup soya fasulyesi ve soya fıstığında mevcuttur.

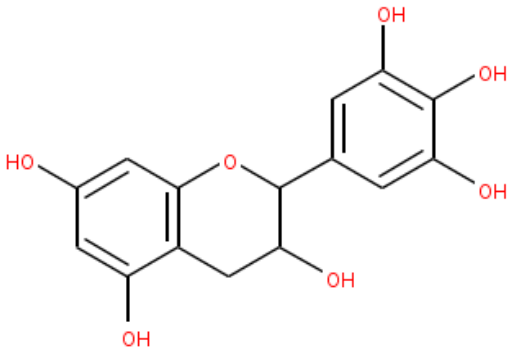
Flavonollerin C halkasında bulunan çifte bağlı oksijen atomunun yerine -CH_2 grubu geldiğinde *flavanol* oluşur. Flavonların indirgenmiş türevleridir. En önemlileri kateşin ve epikateşin' dir. Kateşin ve epikateşinin gallik asitle kombinasyonları sonucu kateşin ve epikateşin gallatlar meydana gelir. Bu bileşikler çoğunlukla yeşil ve siyah çayda, kırmızı ve beyaz şarapta, şeftalide ve elmada bol miktarda bulunurlar.



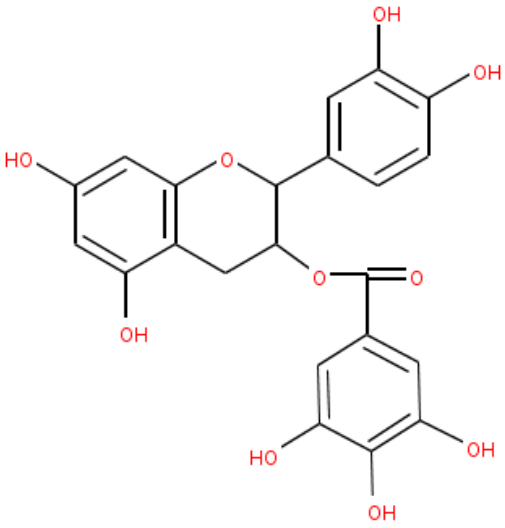
Kateşin



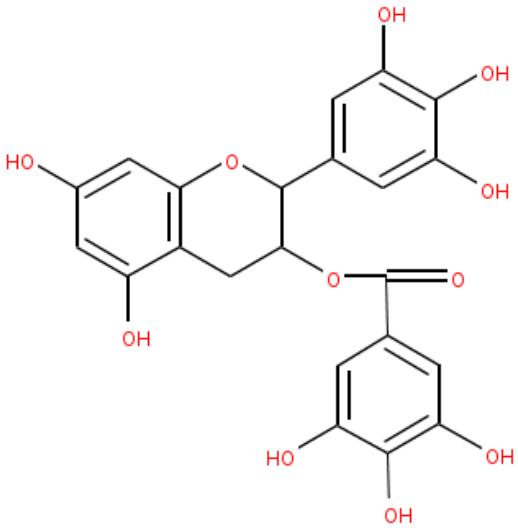
Epikateşin



Epigallokateşin



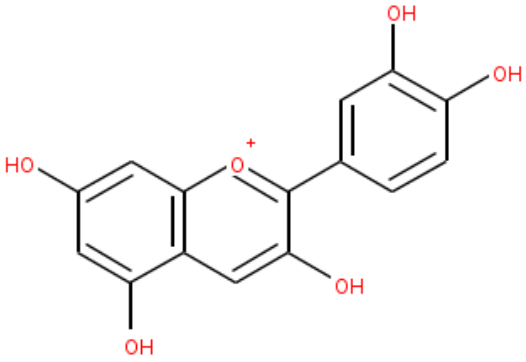
Epikateşin gallat



Epigallokateşin galat

Şekil 1.10. Kateşin, epikateşin, epigallokateşin, epikateşin gallat, epigallokateşin galatlın kimyasal yapıları

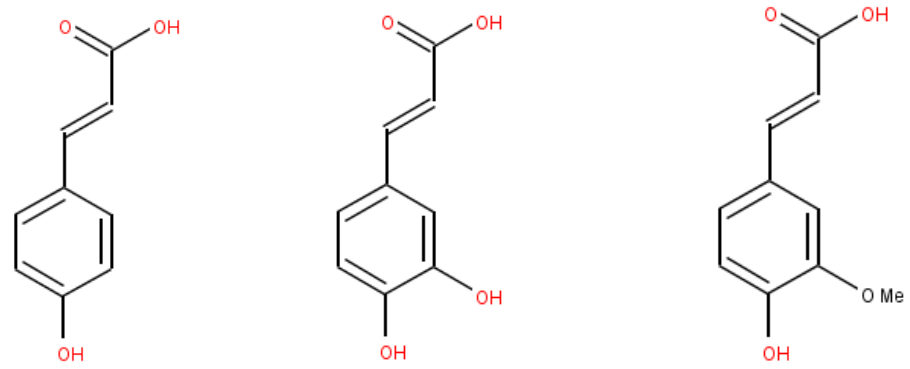
Antosiyaninler, flavanollerin B aromatik halkasına bir hidroksil grubunun bağlanmasıyla meydana gelir. Aglikonları *antosiyanidinler*'dir. En önemlileri; apigenidin, siyanidin, malvidin ve delfinidin'dir. Renkli meyvelerde özellikle kırmızı ve mor renkli meyvelerde bol miktarda bulunur.



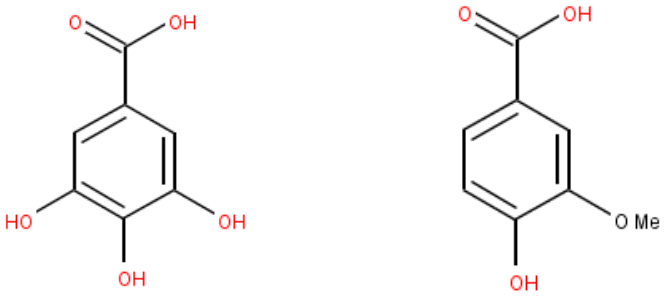
Şekil 1.11. Siyanidinin kimyasal yapısı

1.6.3. Fenolik asitler

Bitkilerde çok miktarda bulunan fenolik asitler, diğer ismiyle fenil propanoidler, hidroksi sinnamik ve hidroksi benzoik asitleri içeren iki gruptan oluşur. Fenolik asitlerin çoğunu hidroksi sinnamik asitler oluşturur. L- fenil alanin veya L- tirosinden pkumarik, ferulik, kafeik, sinapik ve klorojenik asit meydana gelir. Yapılarındaki -CH=CH-COOH gruplarının varlığı, hidrojen verebilme yeteneklerini arttırmakla birlikte benzoik asitlere göre radikalleri daha kararlı hale getirebilirler. Benzoatlardan daha etkilidirler. Hidroksi benzoik asitler yapılarındaki hidroksi ve metoksi gruplarının yerleşimi ve sayılarına göre çeşitlenirler. Bunlardan birkaçı; gallik asit, vanilik asit, şiringik asit, resorsilik, protokateşuik asit'dir. Mono hidroksi benzoatlar etkili hidroksil radikal süpürücülerdir çünkü hidroksillenmeye ve hidroksil radikallere yüksek reaktivite göstermeye eğilimlidirler. Fenolik halka ile karboksilat grubu arasına metilen grubu girmesiyle oluşan fenil asetik asitlerde orto ve meta hidroksi türevleri 1 mM'a yakın antioksidan aktivite gösterirler. Dihidroksi benzoik asit türevlerinin antioksidan aktiviteleri hidroksil gruplarının pozisyonlarına bağlı olup, o-p pozisyonlarında aktivite yüksek olurken, m-p pozisyonlarına sahip olanlarda aktivite düşer.



p- Kumarik asit Kaffeik asit Ferulik asit

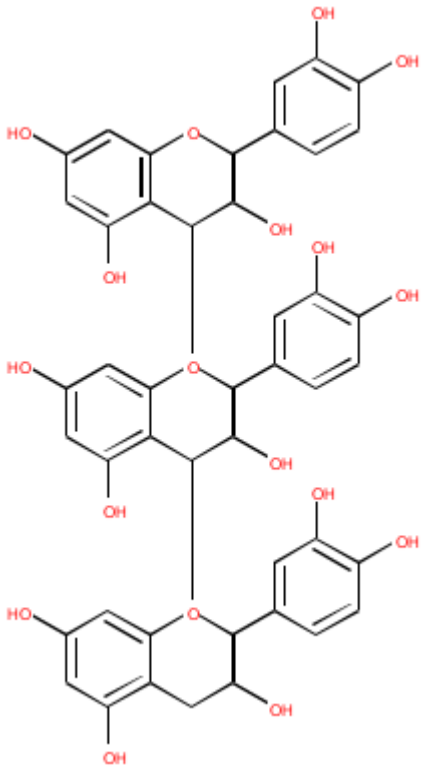


Gallik asit Vanilik asit

Şekil 1.12. Fenolik asitlerin kimyasal yapıları

1.6.4. Fenolik Polimerler (Tanenler)

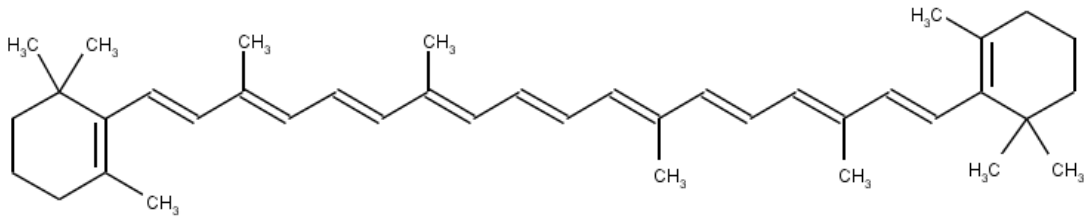
Fenolik polimerler, yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Yoğunlaşmış tanenler bu gruba girerler. Bugün besin tanenleri denilince genellikle kateşin ve epikateşinin polimerleri anlaşılmaktadır. Koyu renkli ve tadı buruk bileşiklerdir. Kırmızı ve beyaz şarapta, elma ve nar suyunda mevcutturlar.



Şekil 1.13. Fenolik polimerlerin yapısı

1.6.5. Karotenoidler

Karotenoidler; bitkilerde sentezlenirler, fakat hayvanlar için önemlidirler. Yüksek derecede doymamış izoprenidlerdendir. Çifte bağların konjuge oluşundan kuvvetli renklidirler. Açık sarıdan kırmızıya kadar renkli, birçok bitki ve hayvanlarda bulunan, azot içermeyen, suda çözünmeyen fakat yağlarda ve organik çözücülerde çözünen pigmentlerdir. Birçok sebze, meyve ve çiçeklerin karakteristik renkleri bunlardan ileri gelir. Havuç, mısır, domates, tereyağı, süt, yumurta sarısı ve birçok meyvede bolca bulunur. En yaygın kullanılanı A-provitamini olarak da bilinen β-karoten'dir. A19 vitamininin kendiliğinden antioksidan özelliği bulunmazken, β-karoten antioksidan aktiviteye sahiptir (Karademir, 2005).



Şekil 1.14. β-karotenin yapısı

Karetonoidlerin pek çok fizyolojik işlevi vardır. Yapıları gereği serbest radikalleri etkili bir şekilde bertaraf ederler ve bağışıklık sistemini güçlendirirler. Epidemiyolojik çalışmalarda diyetinde ve kan plazmasında yüksek oranda beta-karoten bulunan kişilerde akciğer kanser riskinin anlamlı ölçüde azaldığı bulunmuştur. Öte yandan sigara kullananların yüksek dozda beta-karoten kullanılmasının kanser riskini artırdığı görülmüştür. Bir olasılıkla aşırı miktardaki beta-karotenin yıkım ürünleri plazmadaki A vitaminini azaltıp, sigara dumanının neden olduğu akciğer hücrelerindeki çoğalmayı kötüleştirmektedir. Ayrıca turuncu renkli ve A vitaminin öncüsü olan β-karoten, genellikle eşit renklendirme oluşturmak için gıda maddelerine katılır (Mukhopadhyay, 2000; Uğuzlar, 2009).

2. MATERYAL VE METOT

2.1.Materyal

2.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Bu çalışmada kullanılan Folin reaktifi, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH•) Sigma-Aldrich firmasından ve Na_2CO_3, metanol, gallik asit, bütillendirilmiş anisol (BHA), bütillendirlmiş hidroksitoluen (BHT), kloroform ($CHCl_3$), β-karoten, lineolik asit, polioksietilensorbitan monolaurat (Tween 20), deiyonize su, $FeCl_3$, Fosfat tamponu, potasyum ferrosiyanat, trikloroasetikasit (TCA), $CuCl_2.2H_2O$, amonyum asetat, troloks, α-tokoferol Merck firmasından temin edildi.

2.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Analizlerde kullanılan cihazlar: absorbsiyon ölçümleri için Shimadzu UV 1700 spekrofotometre, pH ölçümleri için Inolap marka pH metre, tartımlar için Precisa XB 220A hassas terazi, ısıtma ve kurutma işlemleri için Nüve marka inkübatör, ekstraksiyon sonrası çözücüyü uzaklaştırmak amacıyla Heidholph marka evaporatör ve Lancome marka liyofilizatör kullanıldı.

2.2. Metot

2.2.1. Bitki ekstraktlarının hazırlanması

Bitkiler toplanıp, gölgede kurutulup değirmende toz haline getirildi ve her birinden yaklaşık 15 g alınıp sokslet kartuşuna yerleştirildi. 30 ^oC'de metanol çözücüsünde 6 saat ekstrakte edildi. Elde edilen ekstraktın çözücüsünü uzaklaştırmak için evaporatörde vakum altında 40 ^oC'ye tabi tutuldu. Evaporasyondan sonra liyofilize edildi ve analiz yapılmak üzere 4 ^oC'de saklandı.

2.2.2. Toplam fenolik ve flavonoid madde konsantrasyonu

Toplam fenolik madde tayini Folin-Ciocaltaeu metoduna göre yapıldı (Singleton, Orthoter, Lamuela-Raventos, 1999). Standart olarak kullanılan gallik asit ve bitki ekstraklarının çözeltileri metanol içerisinde hazırlandı. Gallik asit kalibrasyon eğrisi için, gallik asidin 5 farklı konsantrasyonlarda metanol çözeltileri hazırlandı. Bitki ekstrakların konsantrasyonu ise metanolde bir seri çözeltisi (0,05-0,5 mg/ml) hazırlandı ve her bir deney tüpüne bitki ekstraklarından 0,5 ml alındı. Üzerine 2,5 ml folin reaktifi (suda, %10'luk) ve 7,5 ml Na_2CO_3 (suda, %20'lik) ilave edildi ve kuvvetlice karıştırıldı. Oda sıcaklığında karanlıkta 2 saat bekletildi ve sonra 750 nm'de çözeltilerin absorbansları okundu. Aynı işlemler kalibrasyon eğrisi için hazırlanmış farklı konsantrasyonlardaki gallik asit çözeltilerine de uygulandı. Ekstraktların absorbansları, çizilen gallik asit kalibrasyon eğrisinden okunarak toplam fenolik madde konsantrasyonu eşdeğer gallik asit olarak hesaplandı (mg/ml GAE).

2.2.3.DPPH• (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) radikal süpürme etkisi

Qian ve Nihorimbere (2004)'e göre Sanchez-Moreno metodu esas alınarak yapılmıştır. Metodda kullanılan ve güçlü bir radikal olan DPPH'in kalibrasyon eğrisi için farklı konsantrasyonlarda (6.10^{-5}-$1,85.10^{-7}$ M) metanoldeki çözeltileri hazırlandı. *Fumaria officinalis*'in metanol ekstraktının ve sentetik antioksidan BHT ve BHA'nın metanolde bir seri çözeltisi (0,05-0,5 mg/ml) hazırlandı. Hazırlanan ekstrakt ve stadard çözletilerden 0,5 ml alınarak her birinin üzerine 3 ml DPPH çözeltisi (6.10^{-5} M) ilave edildi. Kuvvetlice karıştırılıp ağzı kapatıldıktan sonra 30 dakika karanlıkta bekletildi. Bu sürenin sonunda her bir karışımın absorbansları spektrofotometrede 517 nm'de okundu. Her bir karışımın ayrı ayrı inhibisyon değerleri Eşitlik 2.1'e göre hesaplandı;

$$I\,(\%) = \left[\frac{A_{boş} - A_{numune}}{A_{boş}}\right] \text{x } 100 \qquad (2.1)$$

Bu değerlerden ve DPPH'ın kalibrasyon eğrisinden yararlanarak her bir bitki için DPPH serbest radikalinin yarısının süpürüldüğü andaki bitki ekstraktı

konsantrasyonu (IC_{50}) değerleri hesaplandı. Sentetik antioksidan olan BHT ve BHA ile kıyaslandı.

2.2.4. β- karoten- lineolik asit emülsiyon yöntemi

Bu metot Amin ve Tan (2002)'ye göre yapıldı. β- Karoten- Lineolik Asit Emülsiyon Yöntemi: 0,2 mg β- karoten, 1ml kloroformda çözüldü. Üzerine 0,02 ml lineolik asit çözeltisi ve 200 mg tween 20 ilave edildi. Kloroform 40 ^{0}C'de tamamen uzaklaştırıldı. 100 ml deiyonize suda çözüldü. Şiddetli şekilde karıştırıldı. Kontrol çözeltisi içinde aynı işlemleri tekrarlandı. Ancak sadece β- karoten ilave edilmedi. Numunelerin ve karşılaştırılmak üzere hazırlanan sentetik antioksidanların konsantrasyonu 2 mg/ml olacak şekilde metanolde hazırlandı. Deney tüplerine, hazırlanan drog, BHA ve BHT çözeltilerinden 0,2' şer ml alınarak üzerlerine 5 ml, hazırlanan emülsiyon çözeltisi ilave edildi. 40 ^{0}C'de su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Deney tüplerindeki numunelerin ve kontrol çözeltisinin absorbansı 470 nm'de okundu (t_0). Bu andan itibaren inkübasyondaki çözeltilerin absorbansı her 15 dakikada bir 120 dakika boyunca okundu. Bu absorbansa dayanarak, yapılan hesaplamalarda absorbans değişim oranı (AO) ve buna bağlı olarak da % oksidasyonu engelleme katsayıları hesaplandı.

$$R= \ln(a/b) \tag{2.2}$$

Burada; ln: doğal logaritma, a: başlangıç absorbansı, b: 120 dakika inkübasyondan sonraki absorbansı AA; antioksidan aktivite eşitliğidir.

$$AA= \left[\frac{R_{kontrol} - R_{numune}}{R_{kontrol}} \right] x100 \tag{2.3}$$

2.2.5. Demir (III) indirgeme kapasitesi(FRAP) tayini

Drogların indirgeme gücü Oyaizu (1986) metodu ile belirlendi. Drogların 5 farklı konsantrasyonda metanol çözeltileri hazırlandı (0,1-0,5 mg/ml). Hazırlanan her bir çözeltiden deney tüplerine 2,5 ml numune alındı. Her birinin üzerine 200 mM, 2,5 ml

fosfat tamponu ve %1'lik potasyum ferrosiyanat çözeltisi ilave edildi. Tüpler 45 ^{0}C'de 20 dk. boyunca su banyosunda inkübe edildi. Daha sonra 2,5 ml %10'luk trikloro asetik asit (TCA) ilave edildi, 10 dk. boyunca 700 rpm' de santrifüj edildi. Tüplerdeki karışımların üst kısımlarından 5'er ml alıp başka tüplere aktarıldı. Yeni tüplere aktarılan numunelerin her birinin üzerine 5 mL deiyonize su eklendi. %0,1'lik $FeCl_3$ ilave edildikten sonra oluşan yeşil renkli çözeltilerin absorbansı spekrofotometrede 700 nm 450 nm'de ölçüldü. Aynı metod uygulanarak 450 nm'de ölçülen absorbans değerlerinden elde edilen troloksun kalibrasyon eğrisi denkleminden ekstraktın troloks eşdeğeri cinsinden antioksidan kapasiteleri hesaplandı (Apak ve ark., 2006).

2.2.6. Bakır(II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi tayini(CUPRAC)

İçerisine sırasıyla 1 ml 10^{-2} M $CuCl_2$, 1 ml $7{,}5.10^{-3}$ M Nc ve 1 ml 1 M NH_4Ac konulup çalkalanan tüplere, bitki ekstraktlarından (duruma göre eğer yüksek absorbans verirse ona göre bitki ekstraktlarına gerekli seyreltme yapılmalı) 0,5 ml eklenip üzerine (Bitki ekstraktlarından alınacak hacmi çok yüksek absorbans değeri vermeyecek şekilde seçilerek, örneğin 0,5 ml alındığında) toplam hacim 4,1 ml olacak şekilde 0,6 ml H_2O ilave edildi. Tüpler ağzı kapalı bir biçimde 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 450 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Ardından her bitkinin troloks eşdeğeri cinsinden antioksidan kapasiteleri hesaplandı (Apak ve ark., 2006).

2.2.7. Metal şelatlama aktivitesi

Fumaria officinalis ekstraktının metal şelatlama kapasitesi Que ve arkadaşlarının metoduna göre tayin edildi. Çeşitli konsantrasyonlardaki ekstrakt çözeltilerinin 1 ml'si, 1 ml metanol, 0,1 ml 2 mM $FeCl_2.4H_2O$ ve 0.2 ml 5 mM ferrozin ilave edildi. 10 dakika sonra absorbans 562 nm de kaydedildi. Metal şelatlama kapasitesi Eşitlik 2.4'e göre hesaplandı.

$$I\,(\%) = \left[\frac{A_{boş} - A_{numune}}{A_{boş}}\right] \text{x } 100 \qquad (2.4)$$

A_{numune}: Numunenin absorbans değeri; $A_{boş}$: Kontrolün absorbans değeri

2.2.8. Bitki ekstraklarındaki yağ asitlerinin bileşiminin GC-MS analizi

Fumaria officinalis ekstraktından 0,1-0,2 g alınarak üzerine %5'lik sodyum metoksit ilave edilerek bir gece inkübe edildi. Türevlendirilen numunelerin üzerine 1 ml hekzan ilave edilerek hekzan fazının 1 mikrolitesi cihaza enjekte edildi. Gaz kromotografik kütle spektroskopik analizleri QP Shimadzu marka, 5050 model, EI (Electron Ionization detector) dedektörlü ve otomatik injektörlü gaz kromatografi kütle spektrometresi ile gerçekleştirilmiştir. Analizlerde 50 metrelik Cp Wax 52 CB kapiller kolon (0,32 mm, 1,2 µm) kullanılmıştır. Gaz kromatografisinde injektör bloğu sıcaklığı 240 ^{0}C, dedektör bloğu sıcaklığı 250 ^{0}C olarak ayarlanmıştır. Kolona sıcaklık programı uygulanmıştır. Kolonun başlangıç sıcaklığı 60 °C'de 4 dakika bekledikten sonra 175 °C'e dakikada 13 °C'lik artışla ulaşıyor. 175 °C'de 27 dakika bekletildikten sonra dakikada 4°C'lik artışla 215°C'ye ulaşıyor. Bu sıcaklıkta 5 dakika bekliyor. 4°C'lik artışla 240°C'ye ulaşıyor. Bu sıcaklıkta 15 dakika bekliyor. Sonuçta analizler 75 dakikada tamamlanmıştır. Gaz kromotografisinde taşıyıcı gaz olan helyumun akış hızı 10 psi/dak., olarak ayarlanmıştır.

2.2.9. Bitki ekstraklarındaki fenolik bileşiklerin HPLC analizi

Bitki ekstraklarındaki fenolik bileşiklerin HPLC analizi için öncelikle 15 farklı fenolik bileşik standardının ayrı ayrı kalibrasyon grafiği çizilerek analiz metodu geliştirildi. Numuneden 20 mg tartılıp 1 ml metanol, aseton ve hekzan'da çözüldükten sonra, çözeltinin 20 mikrolitresi HPLC' ye enjekte edildi. Öncelikle standart fenolik maddelerin enjeksiyonu yapıldı. Sonuçlar mikrogram/gram olarak % 95 güven aralığı ile verildi.

İnjeksiyon şartı

Mobil faz: A: %3 asetik asit, B: Metanol, aseton, hekzan
Akış Hızı: 0,8 ml/dakika
Kolon sıcaklığı: 30 ^{0}C
Enjeksiyon hacmi: 20 mikrolitre

3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Son yıllarda bitkilerin tedavi edici özelliği üzerine pek çok çalışma yapılmaktadır. Bitkilerin bu tedavi edici özelliği antioksidan madde ihtiva etmelerinden kaynaklanmaktadır. Antioksidanlar insan metabolizmasında normal yollarla oluşan radikallerin süpürülmesinde kullanılmaktadır. Bu nedenle gıda sanayinde de son derece önemli maddelerdir. Bitkilerde bulunan en önemli antioksidanlar flavonoid, karatenoid ve fenolik bileşiklerdir. Bu bileşiklerin tanımlanması için çeşitli spektroskopik ve kromotografik yöntemler geliştirilmiş ve bitki ve yiyecek numunelerinde kateşin, gallik asit, rutin, kuersetin gibi pek çok antioksidan madde tayin edilmiştir. Ancak bu yöntemler pahalı olup moleküller tanımlandıktan sonra antioksidan özellik verip veremeyeceği hakkında tam olarak yorum yapılamaz. Antioksidan tayini için toplam antioksidan aktivite tayini, toplam indirgeme kapasitesi, $DPPH^{\cdot}$, β-karoten ve CUPRAC yöntemi, toplam flavonoid madde tayini ve buna benzer yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır.

3.1. Toplam Fenolik ve Flavonoid Madde Tayini

Fenolik yapılı maddeler en önemli antioksidan bileşiklerdir. Fenollerin yapısı bakımından taşıdıkları fonksiyonel gruplardan dolayı elektron ve hidrojen verebilirler. Bu gruplar radikalleri ve oksitleyici grupları elimine eder. Fenolik gruplar OH grubunca zengindir. Bu gruplar onlara polar olma özelliği katar ve antioksidan özelliğini artırır.

Toplam fenolik madde tayininde Folin ($(PMoW_{11}O_{40})^{4-}$, Molibdo-fosfo-tungstat) reaktifinin 1 elektron alması sonucu Mo(VI), Mo(V)'e indirgenerek mavi renkli türler oluşur. Aşağıdaki reaksiyonda gösterildiği gibi 1 elektronun Mo(VI)'e aktarıldığı düşünülür:

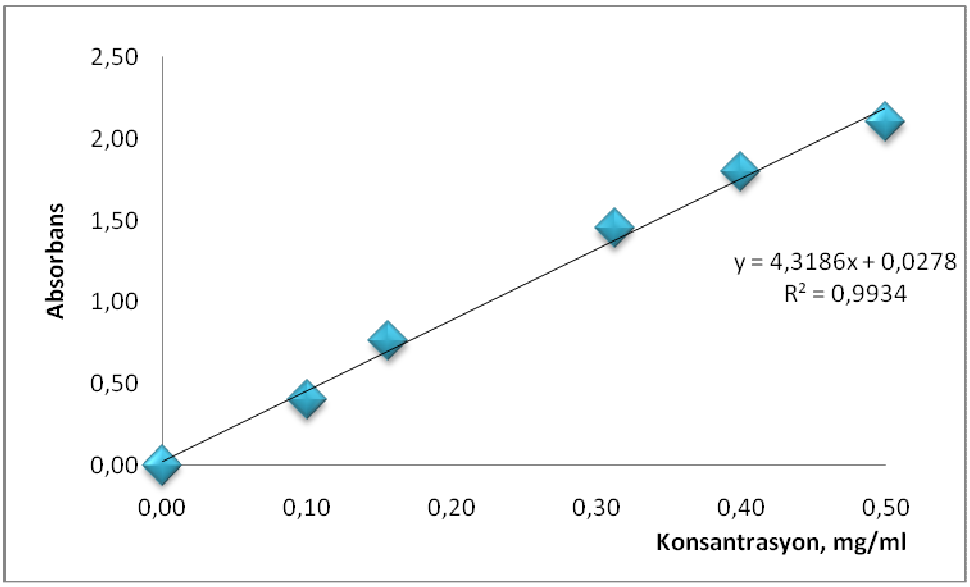
$$Mo(VI)\ (sarı) + e^{-} \rightarrow Mo(V)\ (mavi) \qquad (3.1)$$

Folin reaktifinin sodyum karbonatla bazikleştirilmiş reaksiyon ortamında (pH ~10) fenolik maddeler yükseltgenerek reaksiyona girer. Fenolik proton bazik ortamda dissosiye olur:

$$Ar\text{-}OH \rightarrow Ar\text{-}O(-) + H+ \qquad (3.2)$$

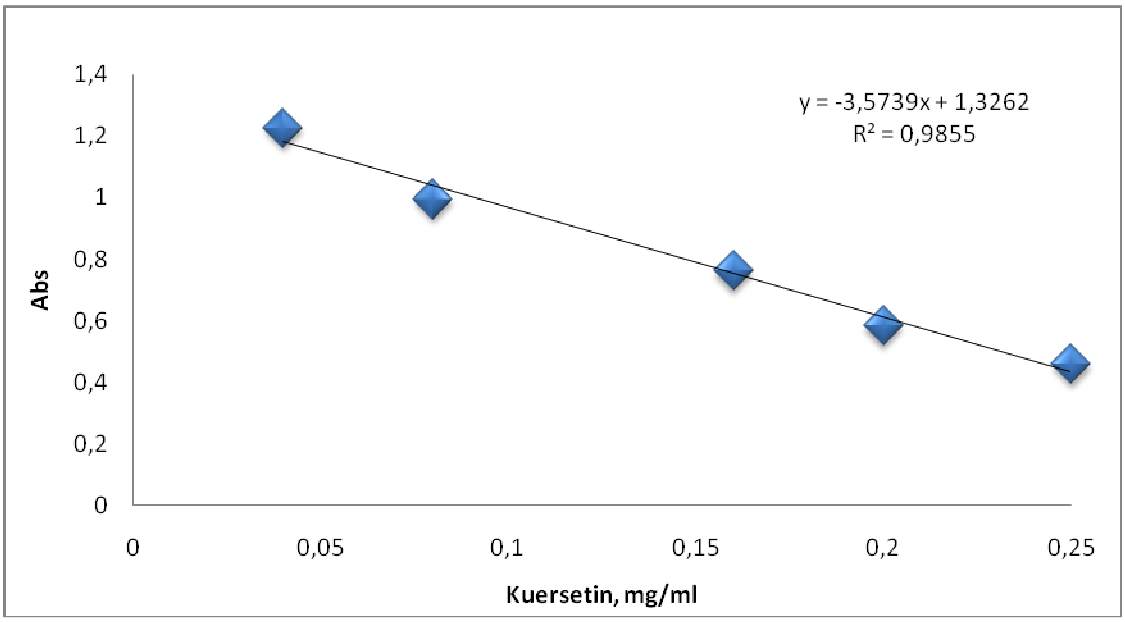
Çoğu antioksidan Folin reaktifinin çalışma pH'sında protonunu vermiş olacağından toplam antioksidan kapasitesinin, fizyolojik pH'larda gerçekleşen değerinin üzerinde hesaplanma olasılığı vardır.

Bu çalışmada toplam fenolik madde tayini, Folin-Ciocaltaeu metoduna göre yapıldı. Toplam flavonoid madde miktarı ise aluminyum şelatlamaya dayalı bir metodla gerçekleştirildi. Standart olarak kullanılan gallik asitin ve kuersetinin *0*,05-0,5 mg/ml konsantrasyon aralığında kalibrasyon eğrileri çizildi.



Şekil 3.1. Gallik asit kalibrasyon eğrisi grafiği.

Fumaria officinalis ekstraktlarında bulunan toplam fenolik ve flavonoid bileşiklerin konsantrasyonları Şekil 3.1 ve 3.2'de verilen gallik asit ve kuersetinin metanol çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerinden elde edilen grafik denklemlerinden toplam fenolik madde miktarı gallik asite ve toplam flavonoid miktarı kuersetine eşdeğer olarak hesaplandı. Elde edilen grafik denklemleri sırasıyla y = 4,3186x +0,0278 ve y = -3,5739x + 1,3262 olarak bulundu.



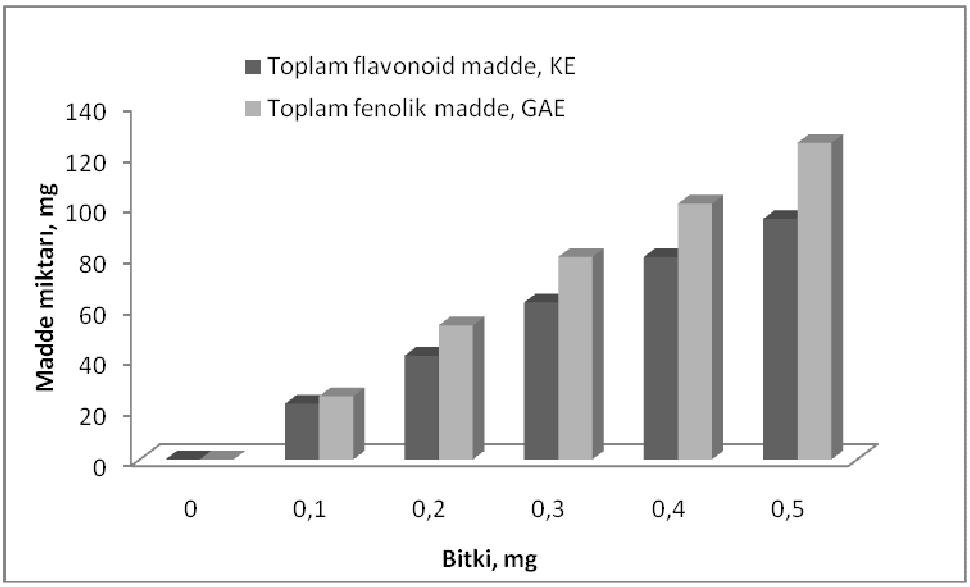
Şekil 3.2. Kuersetinin kalibrasyon eğrisi grafiği

Şekil 3.1'de verilen sonuçlara göre *Fumaria officinalis*'in metanol ekstraktratının yüksek miktarda fenolik ve flavonoid madde içerdiği gözlendi. Bunun sebebi metanolün yüksek polaritesi nedeniyle bitkiden yüksek miktarda polar olan fenolik ve flavonoid bileşiğin ekstrakte edilmesini sağlamasıdır.

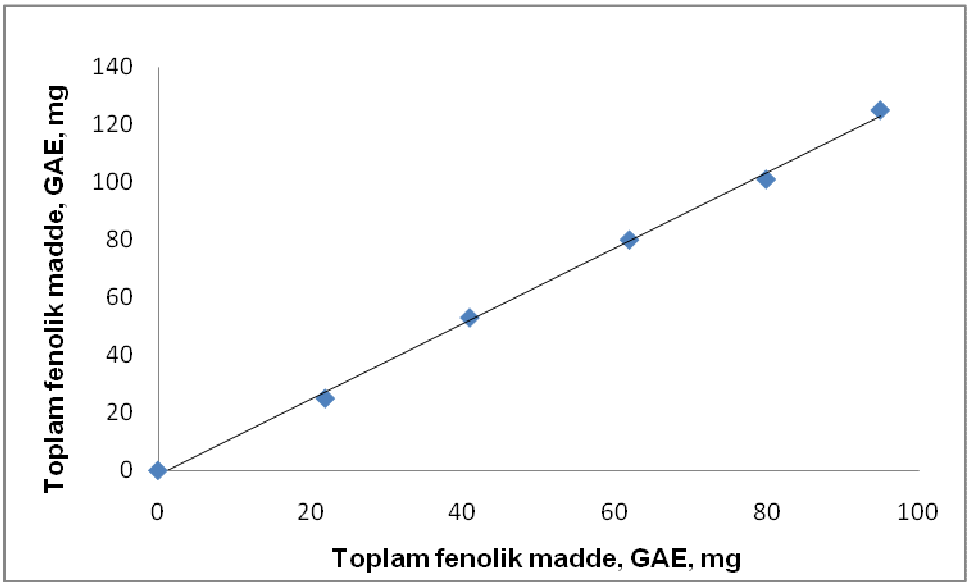
Çizelge 3.1. *Fumaria Officanilis* ekstraktlarının(mg/ml) gallik aside ve kuersetine eşdeğer konsantrasyonları

Bitki, mg	**Toplam flavonoid madde, QE, mg**	**Toplam fenolik madde, GAE, mg**
100	22	25
200	41	53
300	62	80
400	80	101
500	95	125

Bununla birlikte Şekil 3.3 ve 3.4'teki grafiklerden aynı bitki konsantrasyonunda toplam flavonoid maddenin toplam fenolik maddeden fazla olduğu gözlemlendi.



Şekil 3.3. Çeşitli bitki miktarlarındaki toplam fenolik ve flavonoid madde miktarlarına ilişkin sütun grafiği



Şekil 3.4. Aynı bitki konsantrasyonunda toplam fenolik madde miktarına karşılık gelen toplam flavonoid madde miktarlarına ilişkin grafik

3.2. DPPH• Serbest Radikal Giderme Aktivitesi Sonuçları

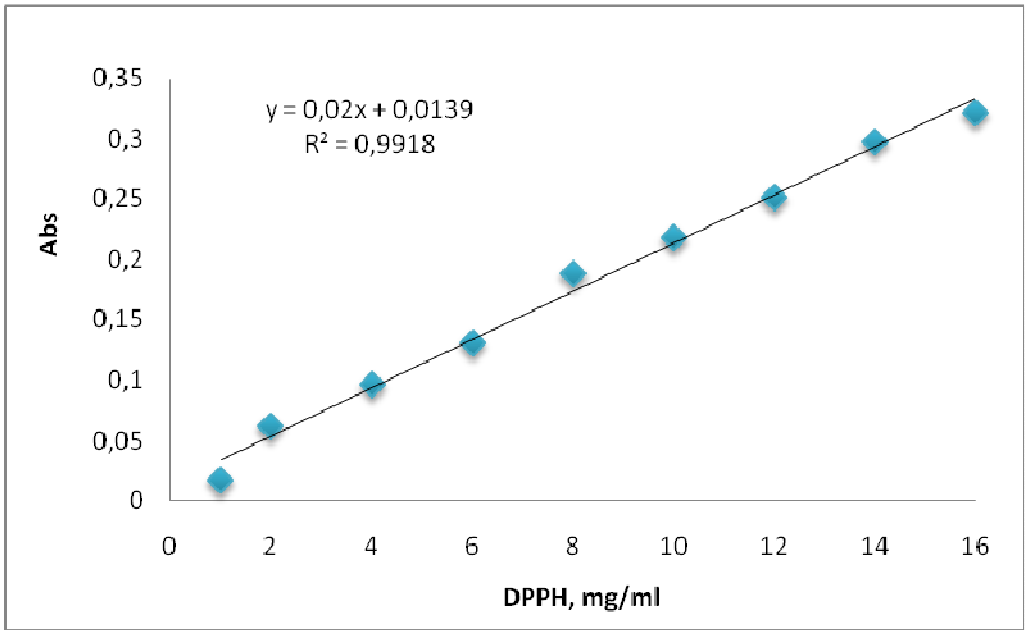
DPPH• radikali uzun ömürlü bir azot radikalidir. Antioksidan maddelerin radikal giderme aktivitelerini belirlemek için en sık kullanılan bileşiklerdendir (Özçelik ve ark., 2003). Bu metotta DPPH• radikalinin indirgenmeden önce rengi koyu mor olup antioksidan maddeler tarafından indirgendiğinde ise açık pempemsi renge dönmektedir. Bu da DPPH• radikalinin indirgenip difenil-pikrilhidrazine dönüştüğünü gösterir. Bu

metotun temeli hidrojen veren guruplara sahip antioksidan maddelerin DPPH• radikalini indirgemesine dayanmaktadır. DPPH• molekülü 517 nm'de yüksek absorbsiyon vermekte iken, indirgendiği zaman antioksidan madde miktarına bağlı olarak absorbsiyonda düzenli bir azalma meydana gelir. Radikal gideren antioksidan veya antiradikal türlerin $(AH)_n$ varlığında DPPH• radikali DPPH-H formuna dönmüştür.

Fumaria officinalis'in metanol ekstraktı ile BHA ve BHT gibi standart antioksidan bileşiklerin DPPH• radikal giderme aktivite tayini için DPPH'in farklı çözücülerde kalibrasyon eğrileri çizildi (Şekil 3.5). Elde edilen grafik denkleminden (y=0,02x+0,0139) *Fumaria officinalis*'in metanol ekstraktı ile BHA ve BHT'nin IC_{50} değeri olarak ifade edilen DPPH radikal konsantrasyonunun yarıya düşüren ekstrakt ya da standardın miktarı hesaplandı ve her biri için IC_{50} değerleri Çizelge 3.2'de verildi.

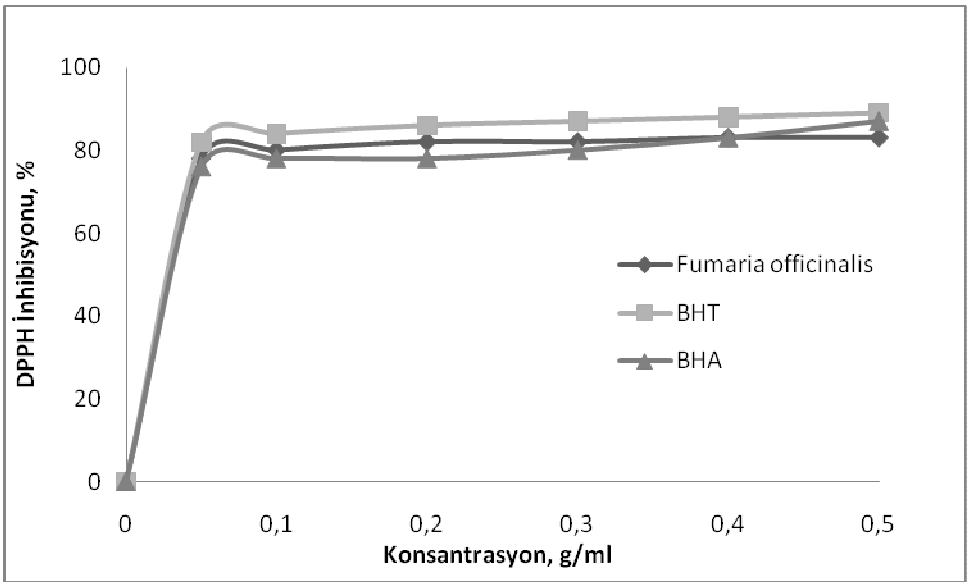
Çizelge 3.2. *Fumaria officinalis* ekstraktları ile BHA ve BHT'ye ilişkin IC_{50} değerleri

	Metanol ekstraktı, mg/ml	**BHA mg/ml**	**BHT mg/ml**
IC_{50}	0.008±0.001	0.035±0.007	0.020±0.001



Şekil 3.5. DPPH radikalinin kalibrasyon eğrisi

Farklı konsantrasyonlardaki metanolde çözünmüş *Fumaria officinalis* bitkisinin, birer standart olan BHA ve BHT'nin DPPH serbest radikal giderme aktiviteleri belirlendi. Bu amaçla elde edilen absorbsiyon değerlerinden 0,05-0,5 mg/ml konsantrasyon aralığında inhibisyon değerleri hesaplanarak konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi.



Şekil 3.6. Fumaria Officanilis'in metanol ekstraktları ile BHA ve BHT'nin farklı konsantrasyonları (0,05-0,5 mg/ml aralığında) için DPPH radikalini süpürme aktivitesinin kıyaslanması

Fumaria officinalis'in metanol ekstraktının DPPH radikal giderme aktivitesi Şekil 3.6'da görüldüğü gibi konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artmaktadır. DPPH radikal giderme aktivite değerleri kontrol ile kıyaslandığında aynı bitki ya da standart konsantrasyonunda inhibisyon değerlerinin birbirine yakın olduğu görülmüştür.

Çizelge 3.3. *Fumaria officinalis* ekstraktları ile BHA ve BHT'a ilişkin DPPH serbest radikalinin inhibisyon değerleri

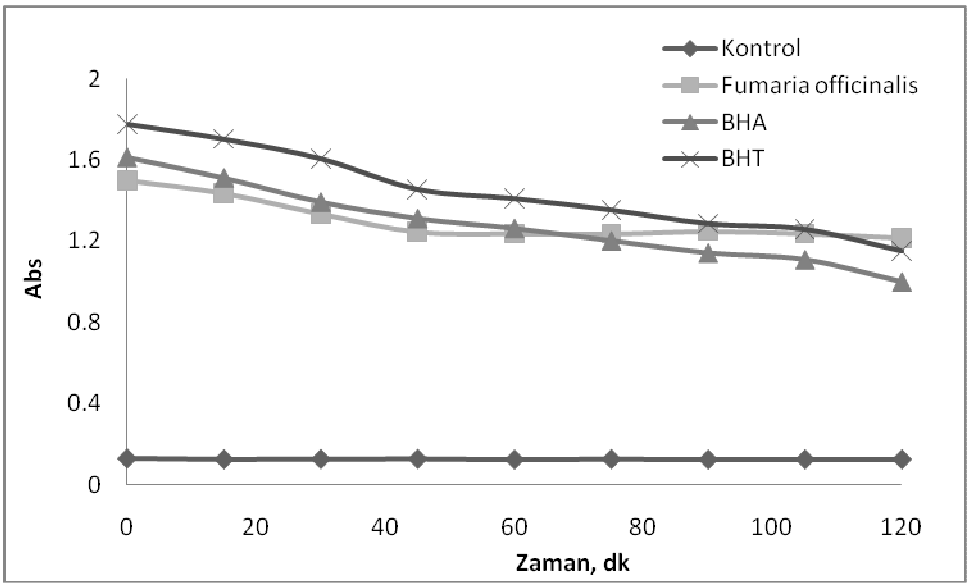
Konsantrasyon, mg/ml	**Ekstrakt, %**	**BHT, %**	**BHA, %**
0,05	78	82	76
0,1	80	84	78
0,2	82	86	78
0,3	82	87	80
0,4	83	88	83
0,5	89	90	88

Çizelge 3.3'de verilen her bir ekstraktın ve standardın DPPH radikalini giderme yüzdelerinden (% inhibisyon) anlaşıldığı gibi *Fumaria officinalis* ekstraktları ile BHA ve BHT standartları şu şekilde DPPH• radikali giderme aktivitesi sergilediler; BHT >ekstrakt >BHA. Bu değerler 1 mg/ml konsantrasyonda sırasıyla %90, %89 ve %88 olarak hesaplandı. *Fumaria officinalis*'in metanol ekstraktının standart antioksidanlara eşdeğer radikal giderme aktivitesi gösterdiği gözlendi.

3.3. β- Karoten- Lineolik Asit Emülsiyon Sistemi Yöntemi

Serbest radikaller, hücre zarının ihtiva ettiği yağ moleküllerine saldırdığında yağ molekülü değişime uğrar. Bu değişim bitkisel yağların acılaşmasına sebep olan küçük bir değişikliktir. Yağlar vücutta değişime uğradığında ise hücre zarının yapısı ve fonksiyonları zarara uğrar ve hücre zarı gıdaların, oksijenin ve suyun uzun süreli olarak transferini yapamaz. Bununla birlikte harcanan ürünlerin atılmasını da düzenleyemez. Serbest radikallerin saldırısı uzun süre devam ederse hücre zarının yapısında bulunan yağların parçalanmasına, bitki zarının yırtılmasına ve hücre bileşenlerinin dağılmasına sebep olur. Hücre içi bileşenlerin hücre dışına akması etraftaki dokulara da zarar verir. Serbest radikal saldırısı ve hücre zarının tahribatı "Yağların Oksidasyonu" veya "Oksidatif Zarar" olarak adlandırılır.

β- Karoten-lineolik asit emülsiyon sistemi yöntemi, emülsiyondaki lineoik asit oksidasyonu sonucu oluşan radikallerin β-karoten'le reaksiyonundan oluşan sarı rengin zaman içerisinde kaybolmasına dayanmaktadır. Antioksidan varlığı rengin açılmasını önlemektedir (Uğuzlar, 2009). β-karoten lineolik asit sisteminde test süresi 120 dakika boyunca sarı rengin solmasını önlenmesi yüksek potansiyel antioksidan varlığını göstermektedir.



Şekil 3.7. β-karoten lineolik asit emülsiyon sistemindeki *Fumaria officinalis,* BHA ve BHT zaman karşı absorbsiyon değişim grafiği. (□=450 max.)

Bu yöntemle *Fumaria officinalis*'in metanol ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri ölçülüp, sentetik antioksidan olan BHA ve BHT'nin antioksidan aktiviteleri ile karşılaştırıldı (Şekil 3.7). Bu amaçla aşağıdaki formülü ile kullanılarak her bir ekstrakt ve standard için AA değerleri hesaplandı.

$$R = \ln(a/b)/120 \tag{3.3}$$

$$AA = \left[\frac{R_{kontrol} - R_{numune}}{R_{kontrol}}\right] X 100 \tag{3.4}$$

Burada, a; t, sıfır anındaki başlangıç absorbansı, b; 120 dakika inkübasyondan sonraki absorbansı ve AA; antioksidan aktivite eşitliği olarak ifade edilir.

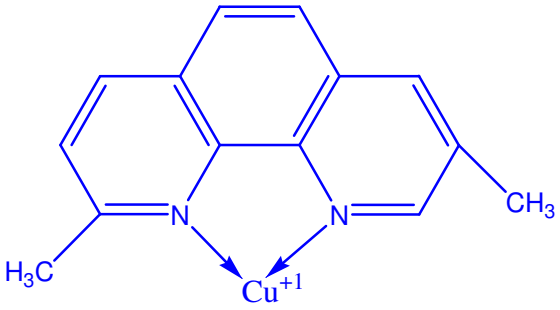
Çizelge 3.4. *Fumaria officinalis* ekstraktları ile sentetik antioksidanlara (BHA ve BHT) ilişkin % inhibisyon değerleri ve absorbans değişim oranları

	Metanol ekstraktı	**BHA**	**BHT**
AA değerleri,%	85,42±3.3	81.4±2.3	84.2±2.1

Yapılan β-karoten lineoleik asit emülsiyon sistemi yönteminde *Fumaria officinalis*'in metanol ekstraktı yüksek antioksidan aktivite gösterdi (Çizelge 3.4). Bu sonuç bize metanol yüksek antioksidan molekül içerdiği yönde fikir verir.

3.4. Bakır(II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi Tayini (CUPRAC) Sonuçları

Cu(I)-Nc "bakır(I)-neokuproin kelatı" , Cu(II)-Nc reaktifinin indirgenmesi sonucu oluşur.



Şekil 3.8. Cu(I)-Nc'nin kimyasal yapısı

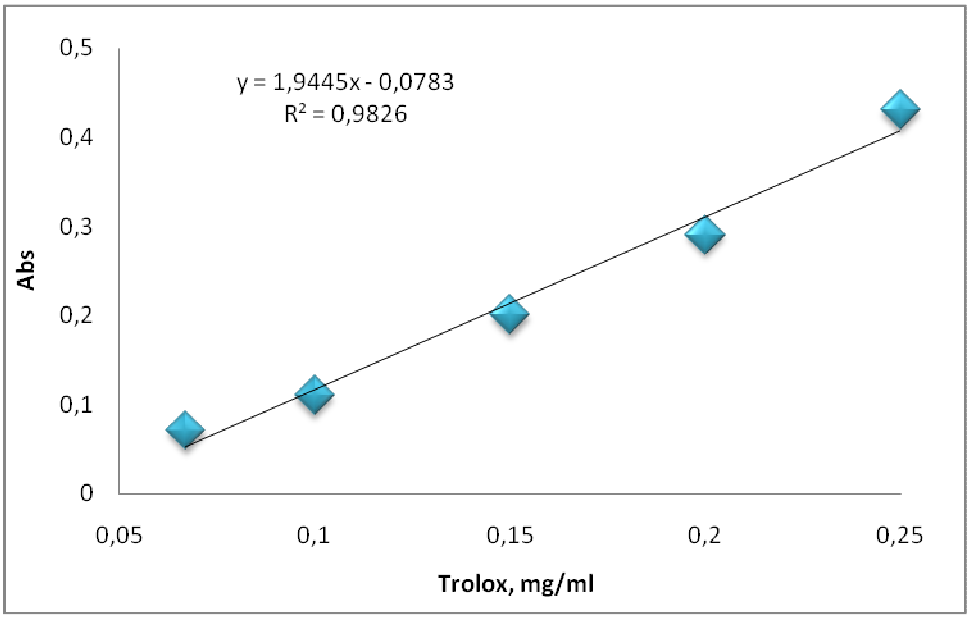
Geliştirilen CUPRAC yönteminin kromojenik oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc reaktifi, antioksidanlarla (Ar(OH)n) aşağıdaki reaksiyonu vermektedir:

$$n\ Cu(Nc)_2^{2+} + Ar(OH)_n \quad \rightarrow \quad n\ Cu(Nc)^{+} + \ Ar(=O)_n + n\ H^{+} \qquad (3.5)$$

Bu reaksiyonda $Ar(=O)_n$, hidroksi grubu içeren antioksidan polifenolden oluşan kinonu ifade etmektedir. Tepkime sonunda 2 proton açığa çıkmakta ve $Ar(OH)_n$ grubu antioksidan bileşikler kinona dönüşmektedir.

Cu(II) klorür çözeltisi, neokuprein çözeltisi ve amonyum asetat (pH=7 tamponu) çözeltilerinin karıştırılmasından sonra, üzerine tayin edilecek antioksidan çözeltisi (direkt veya asid hidrolizi sonunda) ilave edilmesi ve bunu takip eden 30 dakika sonunda içerisinde antioksidan bulunmayan referansa karşı 450 nm'de absorbans değerlerinin ölçülmesinden ibarettir. Cu(II)-Nc ise 450 nm'de maksimum gösteren şiddetli renk oluşumuyla birlikte Cu(I)-Nc şelatına dönüşmektedir. Bu reaksiyonda, n-

OH gruplu antioksidan bileşik 2n e^- donör olarak hareket etmektedir (Apak ve ark., 2004).



Şekil 3.9. CUPRAC yöntemi ile elde edilen metanollü standart troloksun kalibrasyon grafiği, (□=450 nm' maksimum)

Cuprac yönteminin *Fumaria officinalis* ekstraktlarında bulunan toplam fenolik bileşiklerin konsantrasyonları Şekil 3.9'da verilen troloksun 450 nm'deki metanol çözeltilerinin kalibrasyon eğrisinden elde edilen grafik denkleminden troloksa eşdeğer olarak hesaplandı. Elde edilen grafiğin denklemi metanol çözeltisinde y = 1,9445x + 0,0783 olarak bulundu. Çizelge 3.5'de verilen sonuçlara göre *Fumaria officinalis*'in metanol ekstraktı fenolik madde içerdiğinden kuprik iyonunu kupröze indirgemesi sonucunda troloksa eşdeğer antioksidan konsantrasyonu (TEAK) miktarının metanolde yüksek olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 3.5. *Fumaria officinalis* ekstraktların troloksa eşdeğer konsantrasyonlarının ($CUPRAC_{TEAC}$ değerleri) karşılaştırılması

Bitki, mg	**TEAC, mg**
100	100
200	250
300	370
400	408
500	470

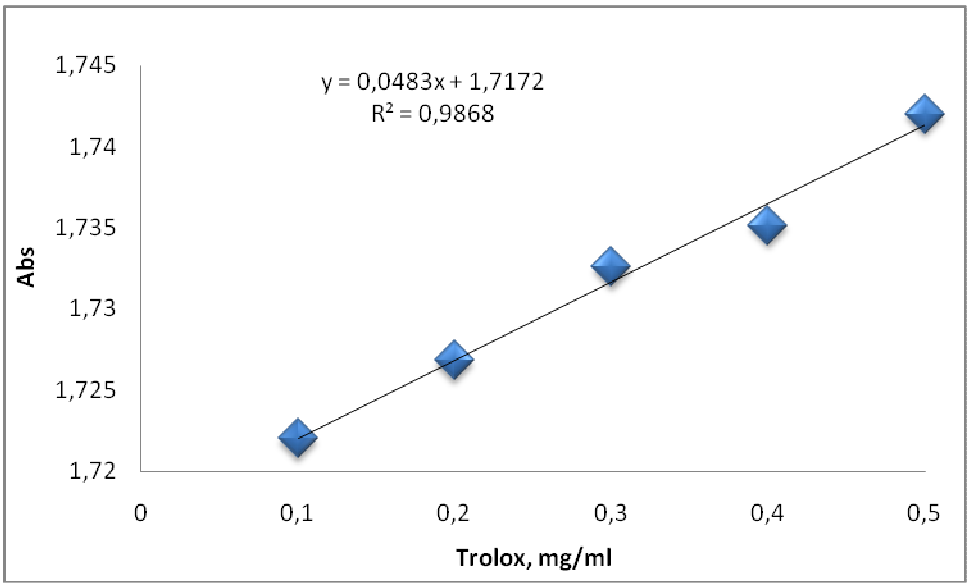
CUPRAC yöntemi, *Fumaria officinalis.*'in metanol ekstraktı için olumlu sonuç vermiştir. Cuprac yöntemi antioksidan aktivitesine ilişkin diğer uyguladığımız yöntemlerin sonuçları ile parelel sonuçlar vermiştir.

3.5. Demir (III) indirgeme kapasitesi(FRAP) Metodu

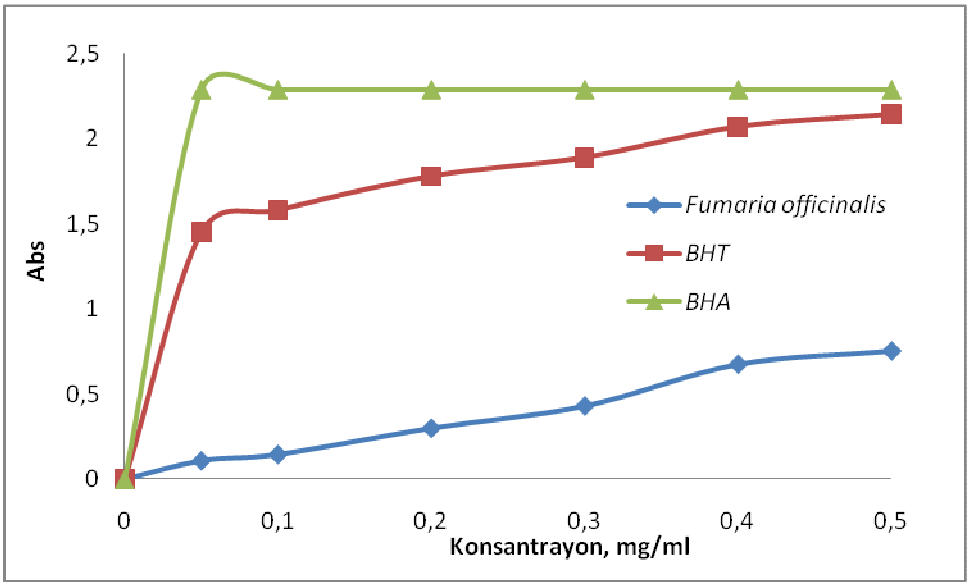
Oyaizu metoduna göre antioksidan madde varlığında ferriksiyanit (Fe^{3+}) kompleksi ferriksiyanit(Fe^{2+}) kompleksi olan ferröz formuna indirgenir. $K_3Fe(CN)_6$ kompleksi bu kompleks ilave edilen $FeCl_3$ ile Perl's prussian mavisi $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$ kompleksi oluşarak 700 nm'de maksimum absorbans verir (Ak, 2006). Bununla birlikte çözeltinin sarı rengi ortamda bulunan antioksidan maddelerin indirgenme aktivitelerinden dolayı farklı tonlardaki yeşil rengine dönüşmektedir (Gülçin, 2006; Gülçin ve ark., 2006).

$$3\ K_3Fe(CN)_6 + 4\ FeCl_3 + (AH)n \longrightarrow Fe_4[Fe(CN)_6]_3 + 9\ KCl + 3\ HCl + A^{\cdot} \quad (3.6)$$

Çalışmada kullanılan indirgeme kapasitesi de radikal süpürmesi gibi *Fumaria officinalis* konsantrasyonunun artması ile doğru orantılı olarak artmaktadır. İndirgeme kuvveti 4-0,25 mg/ml konsantrasyonundaki metanol çözeltilerinin absorbansları ölçülerek belirlenmiştir. Aşağıdaki tabloda metanol ekstraktı ile BHA, BHT ve tokoferolün indirgeme gücünü gösteren absorbsiyon grafiği Şekil 3.10'da verilmiştir.



Şekil 3.10. İndirgeme gücü (FRAP) yöntemi uygulanarak elde edilen troloksun kalibrasyon grafiği, (□=450 nm)



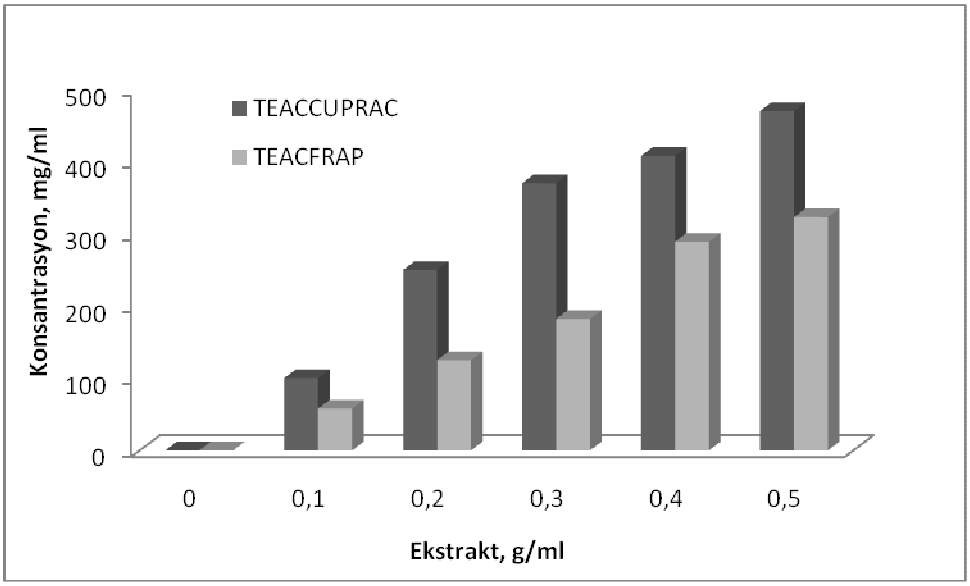
Şekil 3.11. Farklı konsantrasyonlardaki *Fumaria officinalis*.ekstraktının indirgeme kuvvetlerinin absorbans olarak (□=700) birer standart antioksidan olan BHT, BHA ve α-tokoferol ile karşılaştırılması

Grafikten görüldüğü gibi *Fumaria officinalis*'in metanol ekstraktı standart antioksidan olan BHT, BHA ve α-tokoferol'den daha düşük bir antioksidan etki (indirgeme kapasitesi) göstermiştir. Şekil 3.10'da gösterilen troloksun kalibrasyon eğrisinden 0,5 g/ml konsantrasyonda indirgeme kuvvetinin metanol ekstraktında 7,01 mg troloksa eşdeğer olduğu gözlenmiştir (Çizelge 3.6). Şekil 3.11'da görüldüğü gibi bitki konsantrasyonuna bağlı olarak artan absorbans indirgeme gücündeki artışı göstermiştir. Sonuç olarak ekstraktın indirgeme gücü BHT ve BHA'dan daha düşüktür.

Şekil 3.12'de gösterilen farklı ekstrakt konsantrasyonlarında troloksa eşdeğer CUPRAC ve FRAP değerlerine ilişkin grafikten troloksa eşdeğer CUPRAC değerinin daha fazla olduğu gözlemlenmiştir.

Çizelge 3.6. *Fumaria officinalis* ekstraktların troloksa eşdeğer miktarları ($FRAP_{TEAC}$ değerleri)

Bitki, mg	**TEAC, mg**
100	58.49
200	125.71
300	182.45
400	289.39
500	323.44



Şekil 3.12. Farklı ekstrakt konsantrasyonlarında troloksa eşdeğer CUPRAC ve FRAP değerleri

3.6. Metal Şelatlama

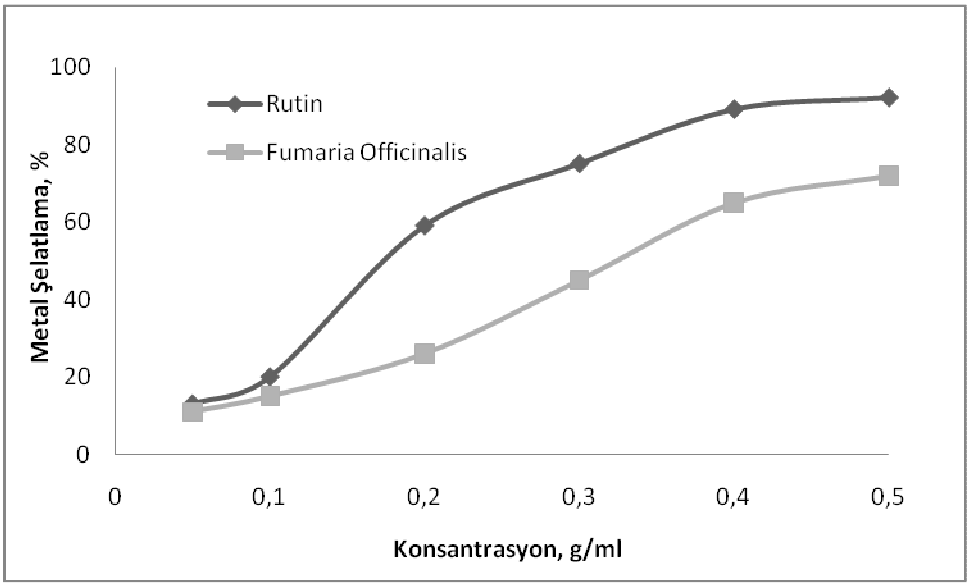
Geçiş metalleri arasında demir yüksek reaktivitesinden dolayı lipitleri oksitleyen en önemli oksitleyici metal olarak bilinir. Fenton tipi reaksiyonlarda peroksitlerin ortamda bulunmaları esnasında ferrik iyonları (Fe^{+3}) meydana gelebilir, fakat ferröz iyonlarının (Fe^{+2}), ferrik iyonlarından (Fe^{+3}) on kat daha fazla reaktif oldukları bilinmektir (Miller, 1996). Ferrozin, ferröz iyonları gibi 2+ değerlikli metal iyonları ile kantitatif miktarda bile kompleks oluşturmaktadır. Oluşan renkli ferrozin-metal

kompleksi ise 562 nm'de maksimum absorbans sergilemektedir. Metal şelatlayıcı ajanların varlığında ferrozin-metal kompleksi oluşmaz. Dolayısıyla 562 nm'de absorbansta meydana gelen azalma metal şelasyonunun göstergesidir.

Bu metodla rutin ve *Fumaria officinalis* ekstraktının metal şelatlama kapasiteleri Şekil 3.13'te karşılaştırılmış ve ekstraktın rutine göre daha düşük sonuçlar verdiği gözlenmiştir.

Çizelge 3.7. *Fumaria officinalis* ekstraktlarının rutine eşdeğer konsantrasyonlarıyla karşılaştırılması

Bitki, mg	**Rutin, mg**	**Ekstrak, mg**
100	13	15
200	20	26
300	59	45
400	75	65
500	89	72



Şekil 3.13. Rutin ve *Fumaria officinalis* ekstraktının metal şelatlama kapasitelerinin karşılaştırılması

3.7. GC-MS ile Yağ Asidi Analizi

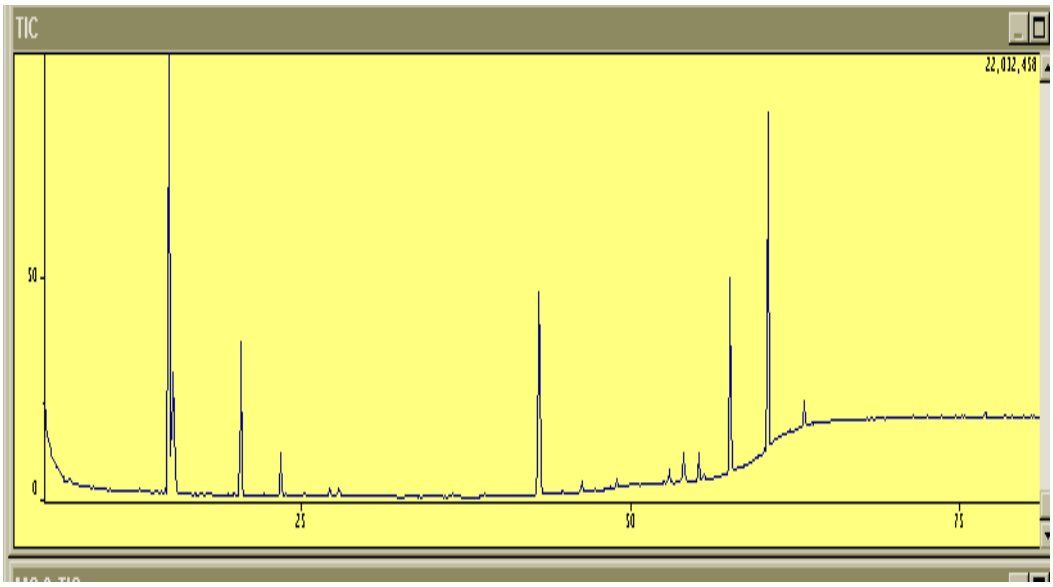
Fumaria officinalis ekstraktlarında bulunan yağ asitleri ve diğer bazı kimyasal bileşimi gaz kromatografisi kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir (Şekil 3.14). Bu amaçla yapılan analizden elde edilen sonuçlardan yağ asitlerinin karbon bileşimi 16-18 arasında değişiklik göstermiştir. Bununla birlikte yağ asitleri doymuş, doymamış tekli ve doymamış çoklu çift bağları da belirlenerek her birinin total miktarları da % oran şeklinde Çizelge 3.8'de verilmiştir. Tüm ekstraktlarda yüksek oranda C 16:0 ve daha az oranda C 18:0 oleik asite rastlanmıştır.

Doymuş yağ asitleri (SFA) bakımından en zengin ekstrakt % 25.40 oranıyla oldukça zengindir. Ancak çoklu doymamış yağ asidi % 40.09 değeriyle doymuş yağ asitlerinden çok daha fazladır. Ekstrakt az miktarda da tekli doymamış yağ asidi (MUFA) % 2.55 içerir.

Çizelge 3.8. *Fumaria officinalis* ekstraktlarının yağ asidi kompozisyonu (%)

Yağ Asitleri	Metanol Ekstraktı
C 12:0	-
C 14:0	-
C 16:0	22.69±1.04
C 18:0	2.71±0.21
Σ SFA**	25.40
C 16:1	-
C 18:1	2.55±0.49
Σ MUFA**	2.55
C 18:2	15.32 ±1.08
C 18:3	24.67±1.32
Σ PUFA**	40.09

SFA; Doymuş yağ asitleri, **MUFA;** Tekli doymamış yağ asitleri, **PUFA;** çoklu doymamış yağ asitleri



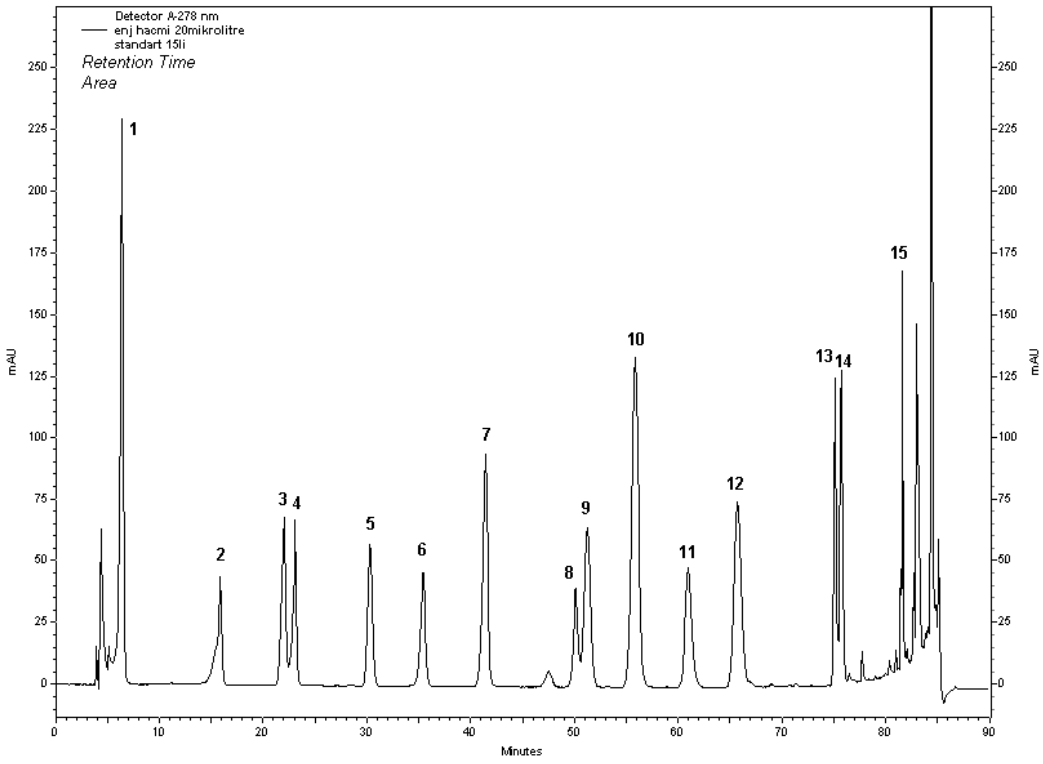
Şekil 3.14. *Fumaria officinalis*'in yağ asidi bileşimine ilşkin kromotogram

Çizelge 3.9. *Fumaria officinalis* ekstraktlarının ihtiva ettiği fenolik maddeler ve miktarları (µg/ml)

Bileşen	Metanol Ekstraktı
Gallik asit	-
Kateşin hidrat	-
Kafeik asit	165.9±2.9
Epikateşin	-
p-Kumarik asit	157.0±2.2
Ferulik asit	150.4±2.3
Viteksin	1395.5±9.1
Rutin	-
Naringin	-
Hesperidin	-
Rosmarinik asit	29.7±1.6
Eriodiktiol	6.0±0.9
Kuersetin	144.4±2.3
Naringenin	-
Karvakrol	-
Σ Toplam	**2048.9**

3.8. HPLC ile Fenolik Madde Tayini

Antioksidan kapasitesi çeşitli metodlarla belirlenen *Fumaria officinalis* ekstraktlarına antioksidan özellik sağlayan fenolik bileşikleri ve flavonoidlerden bazıları yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile kalitatif ve kantitatif olarak tayin edilmiştir. Analizi yapılan bu bileşenler ve bu bileşenlerin metanol ekstraktının her birinde ne kadar bulunduğu Çizelge 3.9'da verilmiştir. Tüm standartların analizine ilişkin kromatogram ise Şekil 3.15'de verilmiştir. Sonuç olarak *Fumaria officinalis* ekstraktlarında analizlenen tüm antioksidan özellik gösteren standartlar, *Fumaria officinalis* ekstraktlarının antioksidan kapasitesine katkıda bulunmuştur. En büyük katkı ise yüksek oranda bulunan viteksinle birlikte kafeik asit, p-kumarik asit, ferulik asit ve kuersetin'dir. Ancak bu standartlardan gallik asit, kateşin hidrat, epikateşin, rutin, hesperidin, naringin, karvakrol ve naringenine hiçbir ekstraktta rastlanmamıştır.



Şekil 3.15. Tüm standartların analizine dair kromotogram
1:Gallik asit 2:Kateşin 3:Kafeik asit 4:Epikateşin 5:p-Kumarik asit 6:Ferulik asit 7:Viteksin 8:Rutin 9:Naringin 10:Hesperidin 11:Rosmarinik asit 12:Eriodiktiol 13:Kuersetin 14:Naringenin 15:Karvakrol

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mevcut çalışmamızda toplam fenolik madde miktarı tayini, DPPH• radikalinin süpürme etkisi, β-karoten lineolik asit emülsiyon sistemi, CUPRAC yöntemi, indirgeme gücü aktiviteleri farklı konsantrasyonlarda ve metanol çözücüsünde ayrı ayrı belirlendi. Bütün bu antioksidan ve antiradikal yöntemlerde bulunan aktiviteler çok yüksek antioksidan, antiradikal ve yüksek indirgeme gücüne sahip ve aynı zamanda birer sentetik antioksidan olan BHA, BHT ve suda çözünen troloks ile kıyaslamalar yapıldı.

Fumaria officinalis'in metanolde ve 0,05-0,5 mg/ml aralığındaki konsantrasyonlarda toplam fenol miktarının hesaplamaları gösterdi ki *Fumaria officinalis*'in toplam fenolik madde miktarı 500 mg/ml konsantrasyonda 125 mg gallik asite eşdeğerdir. Toplam flavonoid madde miktarının ise yine 500 mg/ml de 95 mg kuersetine eşdeğer olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlara göre toplam fenolik maddenin, toplam flavonoid maddeden fazla olduğu gözlemlenmiştir.

Fumaria officinalis'in metanolde 0,05- 0,5 mg/ml konsantrasyon aralığında artan konsantrasyon ile DPPH• radikalinde süpürülme oranının arttığı görülmüştür. *Fumaria officinalis* ekstraktları ile BHA ve BHT standartları şu şekilde DPPH• radikali giderme aktivitesi sergilediler; BHT >ekstrakt >BHA. Bu değerler sırasıyla %90, %89 ve %88 olarak hesaplandı. *Fumaria officinalis*'in metanol ekstraktının standart antioksidanlara eşdeğer radikal giderme aktivitesi gösterdiği gözlendi.

CUPRAC yöntemi, bir başka deyişle bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini sonuçlarına bakıldığında *Fumaria officinalis*'in 500 mg/ml metanoldeki çözeltisi troloks ile kıyaslandı ve troloksa eşdeğer madde miktarı 407,01 mg/ml olarak bulundu.

β-karoten lineolik asit emülsiyon sistemi yönteminin sonuçlarına bakıldığında 2 mg/ml *Fumaria officinalis* ekstraktı, BHT ve BHA ile kıyaslandı. Bu deneyde saptanan değerler sırasıyla; *Fumaria officinalis* ekstraktı, %85,4; BHT,% 84,2; BHA, %81,4 olarak bulunmuştur. Antioksidan aktivite değerleri karşılaştırıldığında *Fumaria officinalis*'in standart olan sentetik antioksidanlardan yüksek bir sonuç verdiği görülmektedir.

Demir indirgeme Gücü Oyaizu Metodu sonuçlarını incelediğimizde kullanılan *Fumaria officinalis* indirgeme kapasitesi olarak standart antioksidan olan BHT ve BHA daha düşük bir antioksidan etki göstermiştir. 500 mg/ml konsantrasyonda indirgeme kuvvetinin metanol ekstraktında 323,44 mg troloksa eşdeğer olduğu gözlenmiştir.

Fumaria officinalis'in indirgeme kapasitesinde artan konsantrasyona bağlı olarak azaldığı gözlemlenmektedir. İndirgeme gücü bir bileşiğin antioksidan aktivite sergilemesinde önemli bir etken olabilir (Meir ve ark., 1995; Uğuzlar, 2009). Ancak herhangi bir saf maddenin antioksidan özelliği farklı mekanizmalar üzerinde gidebilir. Özetle antioksidan bileşikler antioksidatif özelliklerini geçiş metallerini bağlama peroksitleri parçalama, radikal giderme gibi değişik mekanizmalar ile ortaya koyabilirler (Diplock, 1997; Uğuzlar, 2009).

Yapılan bu araştırmada *Fumaria officinalis*'in metanolik ekstraktının antioksidan kapasiteleri farklı metotlarla incelendi. Bu metotlar toplam fenol miktarı, DPPH•, CUPRAC metodu, β-karoten lineolik asit yöntemi, FRAP indirgeme gücü yöntemi ve toplam flavonoid metodudur. Bu yöntemlerde DPPH•, indirgeme gücü ve CUPRAC metodu elektron transferi esaslıdır, β-karoten lineolik asit yöntemi ise hidrojen atom transferi esaslıdır. Elektron transfer esasına dayanan yöntemler, indirgendiğinde renk değiştiren yükseltgenlerin indirgenmesi sonucu antioksidanların kapasitesini ölçerler. Bu olay bir absorbans artışı veya azalışı şeklinde olabilir. Renk değişiminin derecesi, başlangıç örneğindeki toplam antioksidan konsantrasyonu ile ilişkilidir. Gerçekte hidrojen atomu transferi ve elektron transferi esaslı reaksiyonlar bir anlamda içiçedir ve aralarında aşılmaz sınırlar yoktur.

Bilindiği gibi fenolik ve flavonoid maddelerin varlığında antioksidan özelliklerinin artığı görülmektedir. Fenolik ve flavonoid bileşiklerin HO- gruplarının polaritesi yüksek olduğundan polaritesi yüksek olan çözücülerde daha fazla çözüneceği anlamına gelir. Bizim kullandığımız metanolün, aseton ve hekzan gibi çözücü moleküllerine bakıldığında polaritesinin daha yüksek olduğunu anlayabiliriz. Bu sebeplerden dolayı metanol daha fazla fenol ve flavonoid madde ekstrakte etmektedir. Yapılan bazı çalışmalardan da anlaşıldığı üzere antioksidan aktivitesi ve indirgeme gücünü polariteleriyle orantılı olarak metanol > aseton > hekzan bu sırayla göstermektedir (Uğuzlar, 2009).

Sonuç olarak *Fumaria officinalis*'in metanolde ve farklı konsantrasyonlarda toplam fenol miktarı, β-karoten lineolik asit emülsiyon yöntemi, CUPRAC yöntemi, FRAP indirgeme gücü, toplam flavonoid yöntemi ve DPPH radikal giderme aktiviteri belirlendi. Sonuçları standartlarla kıyasladığında bir doğal antioksidan olan α-tokoferolün suda çözünen analogu olan trolokstan daha düşük olduğu saptandı. Yapılan bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar bir bitki olan *Fumaria officinalis*'in tıp,

farmasötik ve gıda sanayinde bir potansiyel antioksidan olarak kullanılabilirliğini ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

Ak, 2006. Curcumin'in Antioksidan ve Antiradikal Özelliklerinin İncelenmesi. *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum, 1-16.

Altuğ, T., 2001. Gıda Katkı Maddeleri. Meta Basım., Bornova, İzmir.

Ames, B.M., Shigena, M.K. and Hagen, T.M., 1993. Oxidants, antiaxidants and the degenerative diseases of ageing. *Proceedings of National Academy of Sciences* USA, 90, 7915-7922.

Amin, I., S.H., 2002. Antioxidant aactivity of selected commercial seaweeds, Mal J nutr, 8:2. 167-177.

Angelo, A. J. S. 1996. Lipid Oxidation in Foods. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 36(3): 175–224.

Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S.E., Bektaşoğlu, Ber K.I., Özyurt, D., 2007. Comparative evaluation of varius total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the KUPRAK assay. Molecules, 12, 1496-1547.

Aruoma, O. I., Murcia, A., Butler, J. and Halliwell, B., 1993. Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives. J. Agric. Food Chem., 41, 1880-1885.

Aruoma, O. I., 1993. Free radicals and foods. Chem.Br., 29, 210-214.

Aruoma, O.I., 1996. Characterisation of drugs as antioxidant prophlactics. Free Rad. Biol. Med., 20, 675-705.

Aruoma, O. L., Cuppet, S. L., 1997, Antioxidant Methodology in vivo and in vitro Concept. AOCS Press, Champaign, Illinois, p 241.

Baykal, Y., Gök, F., Erikçi, S., 2002. Demir, serbest radikaller ve oksidatif hasar. *Sendrom Aylık Tıp Dergisi*, 14 (1):94-100.

Berköz M., Yalın S., Güler G. V., Yalçın A., 2008. Akut Lösemilerde Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Enzim Aktivitesi, *Erciyes Tıp Dergisi (Erciyes Medical Journal);*30(3):157-162.

Block, G., Pattersen, B. and Subar, A., 1992. Vegetables and cancer preventation: A review of the epidemiological evidence. Nutr. Cancer, 18, 1-29.

Branen, A.L., 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. J. Am. Oil. Chem. Soc. 52: 59-63.

Cadogan, J. I. G., 1973. Prınciples of free radicals chemistry. The Chemical Society, London.

Carr, A. C., Van Der Berg, J. J. M. and Winterbourn, C. C., 1996. Chlorination of cholesterolin cell membranes by hypochlorous acid. Arch. Biochem. Biophys, 332, 63-69.

Cerruti, P. A., 1985. Pro-oxidant states and tumor activation. Science, 227, 375-381.

Cheeseman, K.H., 1993. Lipid peroxidation and cancer, in DNA and free radicals, edited by B. Halliwel and O. I. Aruoma.pp, 109-144, Ellis Horwoord, London.

Cross, E., Halliwel, B., Borich, E., Pryor, W., Ames, B., Saul, B., McCord, J. and Harman, D., 1987. Oxygen radicals and human disease. *Annals of Internal Medicines*, 107, 526-545.

Çakatay U, Kayalı R, 2006. Serbest Radikal Biyokimyasının Tarihsel Süreçteki Gelişimi, *Cerrahpaşa tıp dergisi*, 37, 162-167.

Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T, 1997. Reaktif oksijen partikülleri veAntioksidan savunma, *Türk Nefroloji ve Transplantasyon Dergisi*, 3-4, 92-95.

Dennis, W. H.Oliveieri, V. P. and Kruse, C. V., 1979. The reaction of nucleotides with oqueous hypoclrous acid, Water Res., 13, 357, 362.

Çetintaş, G., 2005. Fındık Yağı İşleme Aşamalarında Kalite Kriterlerinde ve Aflatoksin Konsantrasyonunda Olan Değişimler, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, 15-16.

Diplock, A. T. 1997**.** Will the 'Good Fairies' please prove to us that vitamin E lessens human degenerative disease. Free Rad. Res. 26:565-583.

Duthie,S. J., Ma, A., Ross, M. A. and Collin, A. R., 1996. Antioxidant suplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. Cancer Res., 56, 1291-1295.

Elitok, E. 1996. Et Teknolojisinde Antioksidantların Kullanımı. *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Semineri, Ankara.

Eryiğit, F., 2006. Mentha pulegium L. Ve Salvia tomentosa Miller Bitkilerinin Metanol Özütlerinin in vitro Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, 14.

Eskin, N. A. M., Pryzbylski, R. 2001.Antioxidants and Shelf Life of Foods. Food Shelf Life Stability. (Eskin, N. A., Robinson, D. S. eds.) 175–209 CRC Press, USA.

Esterbauer, H., Gebieki J., Puhl, H. and Juergens, G., 1992. The role of lipid peroksidation and antioksidant on oksidativ modification of LDL. Free Radical Biol. Med. 13, 341-390.

Floyd R., 1990. Role of Oxygen Free Radicals in Carcinogenesis and Brain iscchemia Fased J. 4., 2587-2597.

Frankel, E. N., 1980. Lipit oxidation Prog. Lipid Res.,19,1-22.

Frankel, S., Robinson, G. E. and Berenbaum, M. R., 1998. Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys. Jour. Apicult. Res., 37 (1),27-31.

Fridovich, I., 1976. Biological effects of superoxide radical. Archives of biochemistry and Biophsics,247, 1-11.

Gomberg, M., 1900. An incidence of trivalent carbon trimethylphenyl, J. Am Chem. Soc. 22, 757-771.

Gordon, M. H. 2003. The devolopment of oxidative rancidity in foods. Antioxidants in food. (Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M.-eds.) 7-21, CRS Press, Cambridge, England.

Gould, J. P. and Hay, T. R., 1982. The nature of reactions between chlorine and purine and pyrimidine bases: Products and kinetics.Wat. Res. Tec., 14, 629-640.

Gökalp, H. Y. ve Çakmakçı, S., 1992. Gıdalarda kısaca oksidasyon: Antioksidantlar ve gıda sanayinde kullanımları. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, *Dergi*, 23(2), 174-192.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 1989. Free radicals in Biology and Medicine. Clarendon press, Oxford, 238-240.

Halliwell, B., 1997. Antioxidant and human disease: A general introduction. Nutr. Rev.,55, 544-552.

Hey, D.H. and Waters, W. A., 1973. Some organic reaction involvingthe occurence of free radicals in solution. Chem. Rev., 21,169-208.

Hudson BJF, 1990. Food Antioxidants. Elsevier Applied Science Publishers, New York. *Elsevier*, New York, pp. 253–307.

Ignarro, L. J., Buga, G. M.wood, K. S., Byrns, R. E. and Chandhuri, G., 1987. Endhotelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 9265- 9269.

Ito, N., Fukushima, S., Hasegawa, A., Shibata, M. and Ogiso, T., 1983. Carcinogenicity of buthylated hydroxianisole in F344 rats. *J. Natl. Cancer Inst.,* 70, 343-347.

Josse, R., 1987, Food oxidation and its prevention with the use of naturel antioxidants, The First International Symposium on Food Industry “Food Additives”, 363-382.

Kanofsky, J. R. and Sima, P., 1991. Singlet oxiygen production from the reaction of ozone with biological molecules. J. Biol. Chem., 266, 9039-9042.

Karademir, S. E., 2005. Bazı Polifenolik Bileşiklerin Antioksidan Aktivitelerinin Tayini, *İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, 5-21.

Keskin, H., Erkmen, G., 1987, Besin Kimyası, Güryay Matbaacılık, Beşinci basım, İstanbul, 25-35.

Kohno, Y., Egawa, Y., Itoh, S., Nagagaoka, S., Takahashi, M. and Mukai, K., 1995. Kinetic study of qunеching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in n-butanol. Biochem Biophys Acta., 1256 (1), 52-56.

Köylüoğlu, C. ve Yurteri, Ö., 2000, Yemeklik yağların stabilizasyonu ve antioksidanlar, Gıda Bilimi Tekn. 13-14.

Maddox, D.N., 1976, Role of the gallates as food stuff antioxidants, Flavours, May/June, 117-119.

McCord, J.M. and Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocuperin (Hemocuprein), J. Biol. Chem., 224,6049-6055.

Meir, S., Kanner, J., Akiri, B. and Hadas, S. P., 1995. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. J. Agric. Food Chem., 43, 1813.

Michelson, A.M., McCord, J.M. and Fridovich, I., 1977. Superoxide and Superoxide dismutasees, Academic Press. London, 351-365.

Miguel J,Fleming J:Antioxidation, metabolic rate and aging in Drosophila, Arch Geron Geriatr 1982;1-159.

Miller, D.D. 1996. Minerals. In "Food Chemistry", O.R. Fennema (Ed), pp: 617-649. Marcel Dekker, New York.

Moad, G. and Solomon, D.H., 1995. The chmistry of free radical poliymerization. Pergamon, Oxford.

Mukhopadhyay, M. 2000. Naturel exracts using supercritical carbon dioxide, CRC Press Murray MT., 1996. Encyclopedia of Nutritional Supplements. California, Prima Publishing, 1, 320-331.

Murray, M.T., 1996. Encyclopedia of Nutritional Supplements. California, Prima Publishing, 1, 320-331.

Mustafa, M.G., 1990. Biochemical basis of ozone toxicty, Free Rad. Biol. Med., 9, 245-265.

Nawar, W., 1996. Lipids in Food Chemistry, 4th Ed. O. R. Fennema (Ed), Marcel Dekker, Inc, New York, 1067s, USA.

Nisihina, A., Kuboto, K., Kameoka, H. and Osawa, T., 1991. Antioxidizing component musizini in Rumex Japanice Houtt J., AM. Oil. Chem. Soc., 68,735-739.

Osowa , T. and Namiki, M.A.A., 1981. Novel type of antioxidant isolated from leaf wax of eucalyptus leavas. Agric. Biol. Chem., 45, 735-739.

Oyaizu, M., 1986. Studies on Product of Browing Reaction Prepared from Glucose amine, Japan of Nutrition 44: 307-315.

Özçelik, 2003. Oxidant and antioxidant status of cadmium administired rats, Journal de physique 107, 1309-1312.

Özyürek, M., 2005. Bazı İçeceklerin Antioksidan Aktivitelerinin Tayininde Yeni Bir Yöntem Geliştirilmesi, *İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, 3-4.

Palmer, R.M.J., Ashton, D.S. and Moncada, S., 1988. Vascular endothelium cell synthesise nitric oxide from L-Arginine. Nature, 333, 664-666.

Papas, A.M., 1993. Oil-soluble antioxidantsin foods. Toxicol. Ind. Health, 9, 123-149.

Papas, A.M., 1996. Determinants of antioxidant status in humans. Lipits, 31, 77-82.

Perkins, M.J., 1996. Radical Chemistry, Ellis Horwood,London.

Peto, R., Doll, R., Buckley, J.D. and Sporn, M.B., 1981. Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates?, Nature, 290, 201-208.

Pezzuto,J.M., 1997. Planderived anticancer agents. Biocem Pharmacol. 53,121-133.

Pryor, W.A., 1994. Mechanism of radical formation from reactions of ozone with target molecules in the lung, Ibid, 17, 451-465.

Rice-Evans, C.,A., Miller, N. J., Paganga, G., 1997, Antioxidant properties of phenolic compounds, Trends in Plant Science, 2, 152-159.

Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F., 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols, *Journal of Science Food Agricultere*, 76, 270-276.

Schwartz, J., Shklar, G., Reid, S. and Trickler, D., 1988. Prevention of orral cancerpy extracts of Spirulino-Dunalielio alga. Nutrition and Cancer, 11, 127-134.

Sezgin, N., 2004. Adaçayı (Salvia spp.) Bitkisinde Antioksidan Maddelerin Araştırılması, *İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, 6.

Shahidi, F. 2000. Antioxidants in Food and Food Antioxidants, Nahrung, 44,158-163.

Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods in Enzymology, 299, 152–178.

Sneddon, J.W. and Vane, J.R., 1988. Endothelium-derived relaxing factor reduces platelet adhesion to bovine endothelium cells. Ibid, 85, 1341-1344.

Srivastava, A., Harish S. R. And T. Shivanandappa, 2006. Shivanandappa Antioxidant activity of the roots of Decalepis hamiltonii (Wight & Arn.) *Food Science and* Technology 39(10), 1059-1065.

Stokinger, H.E., 1965. Ozone toxicology, Arch.Environ. Healt., 10,719-731.

Surai, P.F., Ionov, I.A., Kuchmistova, E.F., Noble R.C. and Speake, B.K., 1998. The relatiomship between the levels of α-tocopherol and carotenoids in the maternal feed, yolk and neonatal tissues: Comparision the chicken, turkey, duck and goose. *J. Sci. Food Agric*., 76, 593-598.

Tanaka, M., Kuei, C. W., Nagashima, Y., Taguchi, T., 1998. Application of antioxidative maillrad reaction products from histidine and glucose to sardine products. Nippon Suisan Gakkaishi, 54, 1409-1414.

Temur N., 2006, Çam, Kavak,Söğüt ve Armut Ağaçlarının Üzerinde Yetişen Ökse Otu Bitkilerinin Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, 18, 19,20.

Tunalıer Z, Öztürk N, Koşar M, Başer KHC, Duman H, Kırımer N, 2002. Bazı sideritis türlerinin antioksidan etki ve fenolik bileşikler yönünden incelenmesi, Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı.

Uğuzlar, H., 2009. Antalya'da yetişen A*raceae arum*'un antioksidan aktivitesi ve toplam fenolik madde tayini, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, 1-28, 45-49, 70-73.

Uluçay, C., 2007. Preeklampside endotel disfonksiyonu ve iskemi modifiye albümin düzeyleri, *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 11.

Waters, W.A., 1943. Achemical interpretation of the mechanism of oxidation by dehydrogenase enzymes, Trans. Faraday Soc. 39,140-151.

Weiss, L., 1935. Investigation of free radical H_2O in solution, Trans. FaradaySoc., 31, 668-681.

Yanishlieva NV, Pokomy J, Gordon, M. 2001. Inhibiting Oxidation in Antioxidants in Food: Practical Applications., CRC press LLC and Woodhead Publishing Ltd, New York, USA, 288s.

Yanishlieva, N. V., Marinova, E. M. 2001. Satbilisation of edible oils with naturalantioxidants. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 103: 752–767.

Yanishlieva, N., Gordon, M., 2001. Antioxidants in Food, CRC Pres, USA.

Yarıktaş, M., Döner, F., Doğru, H., Aynalı, G., Yönden, Z., Delibaş, N., 2003. Baş-boyun malign tümörlerinde malondialdehit düzeyleri ve antioksidan enzim aktiviteleri. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, Isparta, 2003:10-(4) / 65 – 67.

Yen, G. C., Duh, P. D., Tsai, C. L., 1993. Relationship between antioxidant activity and maturity of peanut hulls. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 41, 67-70.

Yen Duh, 1993. Changes in antioxidant activity and components of methanolic exracts of peanut hulls irradiated with ultraviolet light. Department of Food Science, 127-131.

Zhou, K. and Yu, L. 2006. Total phenolic contents and antioxidant properties of commonly consumed vegetables grown in Colorado. Food Science and Technology, 39(10), 1155-1162.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	Berna Özenç
Uyruğu	**:**	T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	Çatalca/ 24.03.1986
Telefon	**:**	0(212) 774 21 06
Faks	**:**	
e-mail	**:**	b.ozenc09@gmail.com

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	**Özel İhlas Karma Lisesi, B.Çekmece, İstanbul**	**2004**
Üniversite	:	**Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, Konya**	**2008**
Yüksek Lisans	:	**Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, Konya**	**-**

YABANCI DİLLER: İngilizce

İLGİ ALANLARI: Gezmek, spor yapmak, doğa yürüyüşü yapmak, fotoğraf çekmek; kitap, kişisel gelişim ve bilimsel dergileri okumak, organizasyon yapmak.