ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ANTALYA'DA YETİŞEN *ARECEAE ARUM DİOSCORİDES* TOHUMLARININ ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİ VE TOPLAM FENOLİK MADDE TAYİNİ

Hüseyin UĞUZLAR

Selçuk Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Salih YILDIZ

2009, 80

Jüri:

Prof.Dr. Salih YILDIZ

Bu çalışmada *Arum D.*'nin antioksidan aktivitesi ve toplam fenolik madde tayini'ni değerlendirmek için toplam fenolik madde tayini, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) radikal giderme aktivitesi, cuprak yöntemi, β-karoten lineloik asit emülsiyon, indirgeme gücü ve kromatografik analizler GS-MS ve HPLC çalışıldı. Ayrıca α-tokoferol, troloks, bütilendirilmiş hidroksitoluen (BHT), bütillendirilmiş hidroksianisol (BHA) referans antioksidan bileşikler olarak kullanıldı. *Arum D.* ekstraktları ile BHA ve BHT standartları şu şekilde DPPH• radikal giderme aktivitesi sergilediler; metanol ekst.>BHT>BHA>aseton ekst.>hekzan ekst. Bu değerler sırasıyla %96, %95, %91, %35, %33 olarak hesaplandı. *Arum D.* metanol ve aseton 2 mg/mL konsantrasyonunda sırasıyla %78, %52 linoleik asit emülsiyonunun lipit peroksidastonunu inhibe ettiği gözlendi. Referans olan BHT ve BHA sırasıyla %78, %87 linoleik asit emülsiyonunun lipit peroksidastonunu inhibe ettiği gözlendi. Aynı şekilde diğer yöntemlerde benzer özellik göstermiştir. Sonuç olarak bu bitki bir doğal antioksidan kaynağı olarak ümit vericidir.

Anahtar Kelimeler: *Arum D.*, yılan burçağı, Antioksidan aktivite, Radikal giderme,

ABSTRACT

MSc. Thesis

Antioxidant Activity and Total Phenolic Content

of *Areceae Arum Dioscorides* Seed Grown in Antalya

Hüseyin UĞUZLAR

Selçuk University

Graduate School of Natural and Applied Science

Department of Chemistry

Supervisor: Prof.Dr. Salih Yıldız

Assoc. 2009, 82

Jury:

Prof.Dr. Salih YILDIZ

In this study, total phenolic amount determination technique, free radicals scavenging activity of 1.1-diphenyl-2-picryl-hydarzyl (DPPH), cuprac method, emulsion of β-carotene lineloic acid, reducing power and chromatographic analyses which are GC-MS and HPLC, methods were worked to evaluate antioxidant activity of *Arum D* and total phenolic amount. α-tocopherol, trolox, butylirized hydroxytoulene (BHT), and butylirized hydroxyanisol (BHA) were also used as reference antioxidant compounds. In the free radical scavenging acivity experiments, *Arum D* extracts and BHA and BHT standards gave results as metanol extracts > BHT standards > BHA standards > acetone extracts > hexane extracts. These values were calculated as 96%, 95%, 91%, 35%, 33% relatively. In the 2 mg/mL concentrations of *Arum D* methanol and acetone extracts, *Arum D* methanol and acetone extracts inhibited lipid peroxidation at 78% and 52% relatively in the lineloic acid emulsion

experiment. BHT and BHA which were used as reference matters, inhibited lipid peroxidation at 78% and 87% in the same experiment. The similar results were observed after the other methods were applied. As a result, this plant is promising us to be used as a natural antioxidant source.

Key Words: Antixidant, Free radicals scavenging, *Arum Dioscorides*

1.GİRİŞ

Antioksidanların öyküsü serbest radikallerle başlar. Bu serbest radikaller yüksek aktiviteye sahip türlerdir, kirli havada, sigara dumanında, radyasyon ortamında, bitki koruma ilaçlarında, bozulmuş gıdalarda ve normal vücut metabolizmasında (metabolik süreçte) bulunurlar. Serbest radikaller vücuttaki hücrelere saldırır ve tahrip eder. İlk saldırıda öncelikli olarak yeni bir serbest radikal oluşur ve kontrol edilemeyen zincirleme bir reaksiyon başlar.

Serbest radikaller ile ilgili çalışmalar Gomberg'in 1900'larda trifenilmetil radikalinin ($Ph_3C^{\cdot}$) varlığı ispatlanmasıyla başladı (Gomberg, 1900). Serbest radikal, bir orbitalde sadece bir veya birden fazla ortaklanmamış elektron bulunduran kimyasal türlerdir. Radikallerin aktiviteleri 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). 1960'ların başlarında süperoksidin, ksantin oksidaz dahil birçok enzim ile ilgisi olduğu belirlendi. Ayrıca 1968'de selüler toksisitiye sebep olan süperoksidin, çözeltilerde mevcut olduğu da bulundu (McCord 1969; Michelson 1977; Aruoma 1993). Tıpta, biyolojide, toksikolojide ve gıda ile farmasotik sanayinde serbest radikaller gittikçe artan yoğun 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 klinisiyenler 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).

Diğer bir deyişle serbest radikal çiftlenmemiş tek elektronlu atomik ya da moleküler yapılara verilen isimdir. Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine girebilen bu moleküllere ‘’oksidan moleküller’’ veya reaktif oksijen partiküller de denilmektedir (Çavdar**,** Sifil ve Çamsarı, 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 hasar'ın 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 arkadaşları, 2002)**.** İnsanoğlu hayatı boyunca yaşamın beraberinde getirdiği stres ve benzeri zorlukları aşmak ve hastalıklardan korunmak için, yaşamak için gerekli olmazsa olmazların yanında, takviye kuvvetler almalıdır. Bu tür koruyucu engelleyici maddelere genellikle son zamanlarda önemi gittikçe artan antioksidan maddeler denir. 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 asitdir (Yanishlieva**,** 2001; Hudson**,** 1990 ve Shahıdi**,** 2000). Bitkilere renklerini veren de büyük ölçüde bu polifenolik yapılı flavonoidir 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 herhengi 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

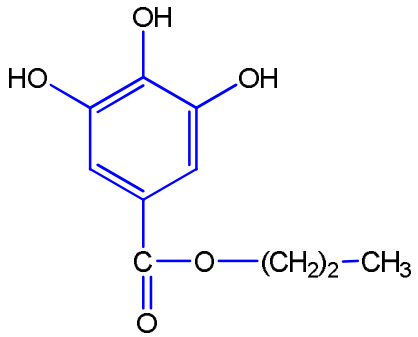
gelebilecek bir yetersizlik, farklı hastalık türlerini meydana getirir. Hücrelerde çok sayıda savunma mekanizması bulunur. Organizmanın normal oksijen metabolizmasının toksik etkilerine karşı kendisini korunması için bu mekanizmalar gereklidir (Fridovich 1976; Mead 1976). Bu bakımdan biyolojik sistemlerde antioksidatif savunma mekanizmasının araştırılması ile ilgili çalışmalar son derece önem kazanmıştır (Ramarathnam 1988). Son zamanlarda tıp alanında, bir yandan hastalıkların tedavisinde yeni yöntemler araştırılırken, öte yandan da sağlıklı bir hayat sürdürme ve hastalıkları önleme yolunda yoğun çabalar sarf edilmektedir. Bu kapsamda özellikle bu günlerde gerek görsel basında gerekse yazılı basında üzerinde en çok durulan ve konuşulan konulardan biri de doğal antioksidanlar'dır. Teknolojinin gelişmesi, oluşan çevre kirliliği ve diğer pek çok etken çeşitli toksik maddelere maruz kalmamıza neden olmaktadır. Bu toksik maddelerden dolayı insanlarda oluşan hastalıkların (kalp, kanser, erken yaşlanma vb. gibi) sayısı da her geçen gün artmaktadır. Bu hastalıklara çözüm getirmek, öncelikle bu hastalıkların oluşumunu tetikleyen etkenlerin başlıca sorumluları olan serbest radikallerin kontrol edilmesiyle gerçekleşebilir. Yaş ilerledikçe insanların savunma mekanizmaları zayıfladığından, vücudun serbest radikal dengesi bozulmaktadır. Çünkü vücudun doğal antioksidanları olan endogenaz enzimlerin üretim miktarı azalmaktadır. Bu yüzden dengenin yeniden sağlanması için antioksidan içerikli doğal besinlerin alınması önem kazanmaktadır. Doğal yollardan aldığımız besinlerde bulunan ve antioksidan özelliğe sahip olan maddeler (doğal antioksidanlar), serbest radikallerin etkilerini azaltarak, kanser ve kalp hastalıkları gibi toplumda erken ölümlerin başlıca nedenleri olan hastalıkları ve erken yaşlanmaya neden olan zincir reaksiyonlarının oluşumunu önlemekte veya geciktirmektedir (Floyd, 1990). Son yıllarda sentetik antioksidanların kendilerinin ya da bulundurdukları ortamda oluşturdukları yan ürünlerinin kanserojen olduğu veya negatif sağlık etkilerine neden olduğu pek çok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Namiki, 1990; Pokorny, 1991). Bunun doğal sonucu olarak da doğal kaynaklı antioksidanlara olan eğilim gittikçe artmaktadır. Ülkemizin bitki florası yönünden önemli bir potansiyele sahip olması ve özellikle de endemik türlerin çokluğu bu talebe paralellik arz etmektedir.

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).

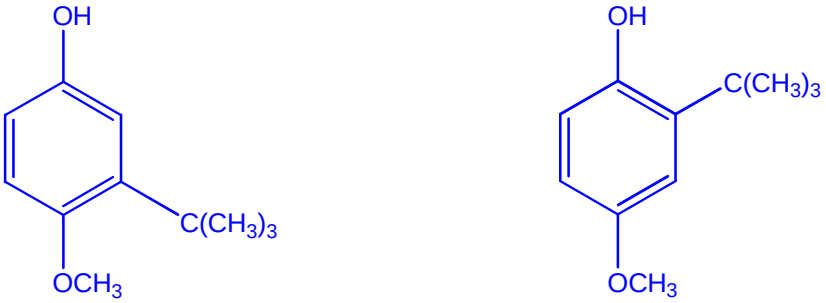
Günümüze kadar kullanıla gelen antioksidanlar, gıdaların raf ömrünü korumanın yanı sıra serbest radikallerin olumsuz etkilerine karşı vücudun savunma mekanizmasına yardımcı olmaları nedeniyle sağlık açısından da büyük önem arz etmektedir. Sağlık ve gıda alanında son derece önemli olan bu bileşikleri sentetik ve doğal antioksidanlar olmak üzere iki grup altında toplayabiliriz.

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).



Şekil 1.1 Propil Gallatın molekül yapısı

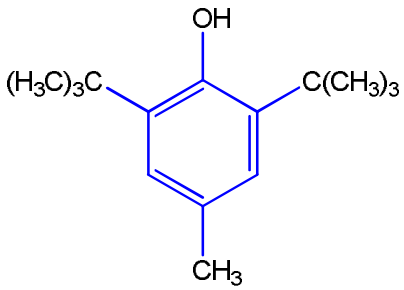
PG(propil gallat): Gallik asitin esteri olan ve beyaz renkte katı kristaller halindeki propil gallat, hayvansal ve bitkisel yağlarda en çok kullanılan sentetik antioksidandır (Gökalp ve Çakmakçı, 1992).



%15 **%85**

Şekil 1.2. BHA (Bütillendirilmiş hidroksi anisol**)** molekül yapısı

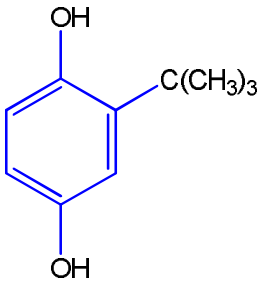
BHA: Bu antioksidan, ticari olarak 3-tersiyerbutil-4-hidroksianisol (%85) ile 2-tersiyerbutil-4-hidroksianisol (%15) izomerlerinin karışımı halindedir. Beyaz mumsu katı bir yapıya sahip olup, bitkisel ve hayvansal yağlarda kullanılmaktadır. Bitkisel yağlardaki antioksidatif etkisi, hayvansal yağlardaki etkisine göre daha azdır (Nawar, 1996).



BHT

Şekil 1.3. Bütillendirilmiş hidroksi toluenin molekül yapısı

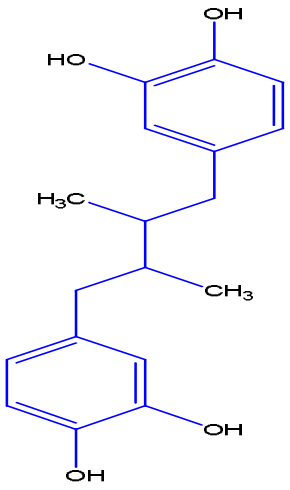
BHT: BHT (2,6-ditersiyer bütil-4-metil fenol); beyaz renkli kristal yapıdadır. Bu antioksidan da BHA gibi ısıya oldukça dayanıklıdır. Bu yüzden fırında pişirme ve kızartma gibi işlemlerde daha fazla ortamda kalır ve gıdaya dayanıklılık kazandırır. BHA ile sinerjist etki gösterirken, PG ile göstermez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



TBHQ

Şekil 1.4. TBHQ (tersiyerbütilhidrokinon)

TBHQ: TBHQ, beyaz ile açık kahverengi arası renkte kristal yapıda olup bitkisel yağlar için çok etkili bir antioksidandır. Birçok uygulamada diğer antioksidanlara kıyasla en iyi etkiyi gösterdiği belirtilmektedir (Yanishlieva, 2001 ve Altuğ, 2001).



NDGA(Nordihidroguairatik asit)

Şekil 1.5. NDGA (Nordihidroguairatik asit**)**

NDGA: Bu madde bir çöl bitkisi olan Larrea divaricata'dan doğal olarak ekstrakte edilebildiği gibi sentetik olarakta 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 ve Altuğ, 2001).

Yapılan bazı araştırmalara göre sentetik antioksidanların, bazı yan etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Branen 1975; Mida et al. 1983). Bu yüzden tüketiciler bunların sağlık açısındaki güvenilirleri hakkında ciddi endişeler taşımaktadır (Branen 1975; Ito et al. 1983). Örneğin BHT non-toksik olmakla beraber, karaciğerde sitokrom P-450 sistemine hasar verdiğine dair bazı kanıtlar ve çalışmalar mevcuttur. Fareler yüksek dozlarda verildiğinde ise karaciğerde hasara sebep olduğu görülmüştür. Ayrıca Amerikan halkı üzerinde yapılan araştırmalarda, BHT gibi sentetik antioksidanarın fazla alınması durumunda vücutdan atılamayıp adipoz dokuda depolandığı da saptanmıştır (Halliwel and Gutteridge 1989). Sentetik antioksidanlar geniş piyasada sahip olmalarına rağmen, bu istenmeyen yan etkilerinden dolayı son zamanlarda kullanım alanları ciddi şekilde sınırlandılmıştır. Bu sebeplerden dolayı birer doğal antioksidan olan α-tokoferol ve askorbik asit; BHA, BHT, PG ve TBHQ gibi sentetik antioksidanlardan daha düşük aktiviteye sahip olmalarına rağmen, yağlı maddelerin üretiminde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Nisihina et al. 1991; Osawa and Namiki 1981). Bazı sentetik antioksidanların insan sağlığı açısından zararlı olması insanları doğal antioksidan ihtiva eden bitkilere doğru yöneltmiştir.

1.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, hücre zarındaki yağlardan birine saldırdığında yağ molekülü değişime uğrar. Bu değişim bitkisel yağların acılaşmasına sebep olan küçük bir değişikliktir. 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. Serbest radikallerin dokulardaki zararının, damar sertliği ve kalp hastalıklarının başlıca nedeni olduğu düşünülmektedir. Oksidatif zararla parçalanmış

kan hücrelerinin (platelet olarak) arter (atardamar) duvarlarına yapışması ve kolesterolün yükselmesi atardamarlara zarar verir (Ak Tuba., 2006). Bu oluşumların tümü damar sertliğinin ilerlemesine sebep olur. Daha ileri safhalar ise; kardiyovasküler hastalıklar, kalp ile beyine giden kan ve oksijenin azalmasıdır. Oksijenden mahrum kalan dokular; hastalığın gelişmesini hızlandıran ve kişilerin kalp krizi geçirme riskini arttıran serbest radikal etkisi gösterir. Serbest radikaller aynı zamanda; hücrelerin genetik kodunu içinde taşıyan; hücrenin üretimini ve büyümesini sağlayan nükleik asitlere (DNA) de etki eder. Hücreler genetik kodları değiştiğinde ölebilirler, çünkü ana hücreden gelen mesajı uzun süreli olarak okuyamazlar. Aşırı hücre ölümü erken yaşlanmaya yol açar ve öte yandan hücreler değişime uğrar, kanser ve benzeri hastalıkları destekleyen hücre dizinleri oluşur. Hücredeki enerji üretim merkezi (*mitekondri*), serbest radikallerin saldırısı ile zedelenir. Bu merkezdeki oksidatif zarar enerji üretimi ve protein sentezinin durmasına sebep olur. Hücre, sadece bir kalıntı olarak yaşamaya devam eder ve yavaş yavaş ölür. Dokulardaki hücre yaşlanması; serbest radikallerin zararları sonucu dokuların erken yaşlanması ile oluşan hücre kalıntılarının çoğalmasıdır. Serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türleri insan vücudunda sürekli meydana gelmektedir. Örneğin süperoksitler ($O\bullet^-_2$) ve H_2O_2 in beyin ve sinir sisteminde meydana geldiği bilinmektedir. İnsan beyninin bazı bölgeleri demir bakımından zengindir, bu durumda serbest radikal reaksiyonları kolayca uyarılabilen bir formda mobilize olurlar. Antioksidan savunma mekanizması, mevcut ($O\bullet^-_2$) ve H_2O_2 giderilebilir. Süperoksit dismutaz hızlı bir şekilde $O\bullet^-_2$ ve H_2O_2 'e çevirebilir. Peroksizomlarda ise katalaz H_2O_2'i su ve oksijene kolayca çevirilebilmektedir (Tuba AK, 2006). Bu organellerde lokalize halde bulunan oksidaz enzimleri, oksidasyon sonucu meydana gelen H_2O_2'in atılmasına yardım eder. İnsan hücrelerinde diğer önemli H_2O_2 giderici enzimler ise glutation peroksidazlardır. Reaktif oksijen türleri ihtiyaçtan fazla üretildiğinde dokulara hasar verebilir. Bunun yanı sıra doku hasarı sonucu, reaktif oksijen türleri kendiliğinden meydana gelebilir. Örneğin hasar gören hücrelerden fagositlerin veya ilgili geçiş metal iyonlarının uyarılması durumunda da reaktif oksijen türleri kendiliğnden meydana gelebilmektedir. Biyomoleküllerin oksidatif hasarı; DNA, lipit veya proteinlerin oksidatif hasara uğraması sonucu oluşan ürünlerinden çıkarılarak hesaplanabilir. Çünkü, DNA'ların oksidasyonu

sonucu 8-hidroksideoksiganinizin, lipitlerin oksidasyonu sonucu izoprostanlar ve proteinlerin oksidasyonu sonucu ise yapıları değişmiş amino asitler meydana gelir (Tuba Ak, 2006).

Reaktif oksijen türleri ve AO defans sistemlerinin dengesizliği, biyolojik olarak ilgili makromoleküllerde kimyasal değişikliklerle sonuçlanabilir. Bu dengesizlik, pek çok hastalığın başlanğıç ve gelişimi için uygun ortam sağlar. Fenolik AO'lar serbest radikal sonlandırıcı ve metal şelatörler gibi fonksiyon görürler. Fenolik bileşikler ve onların bazı türleri otooksidasyonu önlemesinde çok etkilidirler. Bazı bitki fenolikleri son zamanlarda AO olarak kabul edilmekte ve ticari olarak üretilmektedir. Bu açıdan diyette koruyucu etki sağlayan bu AO'ların gıdalardaki biyolojik mevcudiyetinin ve alınması gereken düzeylerinin bilinmesi görülmektedir.

Serbest radikaller vücudun hastalıklara karşı direncini vücudu saran organizmaları yok ederek arttırır. Buna karşın fazla üretildiğinde vücuttaki bazı yerlerede hasara neden olarak hastalıklara yol açar. Serbest radikal reaksiyonlarının neden olduğu hastalıklarda giderek bir artış olmaktadır. Bunları üç grupda toplayabiliriz.

1- Genetiğe bağlı (Fanconi's anemia, bloom syndrome)
2- Çevresel bileşenler (iş hastalıkları, virus ve bakteriyal enfeksiyonlar)
3- Hem genetik hem çevresel (bronşial astım, diabetes mellitus, kanser, kardiovasküler hastalıklar)

Tablo 1.1. 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 $0_2^{\bullet -}$

	, H_20_2 ve HCLO üretimi
Parkinson hastalığı	Hücrelerdeki yapısal bozunmalar
Down sentromu	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 $0_2•^-$, H_20_2 üretimi
Romatizmal artirit	Aktifleşmiş fagositik hücrelerin aşırı $0_2•^-$, H_20_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 $0_2•^-$, H_20_2 üretimi
Yetişkin solunum stresi solunumu	Aktifleşmiş fagositik hücrelerin aşırı $0_2•^-$, H_20_2 üretimi
Radyosyon hasarları	
Zedelenme (reperfusyon)	Anormal substrat oksidasyonu veya oksijen konsantrasyonundaki değişim
Deri bozuklukları	
Solar radyosyon zehirlenmesi	Yüksek veya düşük radyosyon 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, Kraciğer, Akçiğer, Lösemi, Deri, Prostat

Canlılarda hidroksil OH• , süperoksit O_2•$^-$,nitrik oksit NO• ve peroksit ROO• gibi serbest radikaller oldukça önemlidir. Tıp ve biyolojide serbest radikallerin rolü ve önemi ile ilgili çalışmalar bir hayli fazladır (Halliwel and Gutteridge 1989; Weiss 1989; Aruoma 1991). Oksidatif stresin memeli hücrelerinde serbest Ca^{2+} ve demir düzeyinde artışa yol açtığı gözlemlenmiştir (Orrenius 1989; Bast 1993). Orrenius ve arkadaşları intraselüler serbest Ca^{2+} 'nın aşırı artışı sonucu aktifleşmiş endonükleazlar tarafından DNA'nın parçanabileceğini öne sürmüşler. Oksidatif stres hasarları, moleküler hedefe, stresin şiddeti ve mekanizmasına, oksidatif strese, Fenton kimyasına, travmaya, NO• sentez gibi enzim aktivasyonlarına ve nitrik oksijen türlerinin aktivitelerine bağlıdır. Canlı metabolizmasında bu derece hasara sebep olan başlıca reaktif oksijen türleri şunlardır (Ak Tuba, 2006).

1.2. Reaktif Oksijen Türleri

Antioksidan bileşiklerin etkinliği, lipit substratlarına, uygulanan test sistemine, antioksidan bileşiklerin konsantrasyonuna, oksidasyon süresine ve kullanılan metoda göre değişiklik arz eder (Chipalut et al. 1955; Lee and Ward 1959; Porter 1980; Pryor et al. 1988; Frankel et al. 1994; Huang et al. 1994). Örneğin bu etkinlik için çözücü sistemini ele alalım. Antioksidanlar farklı çözücü sistemlerde farklı aktiviteler sergilemektedir. Örneğin troloks, α-tokoferolun suda çözünen analoğudur ve trigiliseritlerde tokoferolden daha aktif iken, suda-yağ emilsiyonlarında tokoferolden daha az akivite göstermektedir (Frankel et al. 1994).

Bu sonuçlara göre lipit peroksidasyonunda kullanılan farklı metodlar ve farklı deney koşullarından dolayı belirli bir yorumun yapılması oldukça zordur. Antioksidanlar sisteminin özelliğine bağlı olarak farklı aktivite gösterirler. Polar antioksidanlar yağlı sistemlerde, apolar antioksidanlar ise yağ-su emülsiyon sistemlerinde daha iyi antioksidan etki gösterirler (Porter et al. 1989; Frankel et al. 1994; Mavi 2000). Ayrıca aynı antioksidanların kullanıldığı emülsiyon sisteminde, emülsilferin anyonik veya katyonik özelliğine bağlı olarak da antioksidan aktivitelerde farlılık gözlenebilir. Negatif yüklü emülsilferin kullanıldığı sistemlerdekine göre daha hızlı meydana gelebilmektedir. Anyonik emülsiferler, ortamda bulunabilecek eser miktarda geçiş metallerini ki bunlar pozitif yüklüdür ve elektrostatik olarak çekerek onların yağ fazında konsantre olmasına ve sonuçta Fenton reaksiyonunun katkısı ile oksidasyon hızında belirgin bir artmaya neden olur. Ancak katyonik emülsiferler geçiş metallerini iterek yağ fazında konsantre olmalarını engeller ve bu nedenle de bu tür sistemlerde oksidasyon hızı daha düşüktür (Mei et al. 1998 a,b; Mavi 2000).

Antioksidanların yükü de aktiviteleri üzerine etki eder. Fizyolojik pH'da negatif yüklü olan askorbik asidin antioksidan aktivitesi, pozitif yüklü lipit misellerinin varlığında daha da artmaktadır (Pryor et al. 1993). Benzer şekilde fizyolojik pH'da pozitif yüklü olan spermin'in antioksidan aktivitesi ise negatif yüklü fosfolipitlerin varlığında artmaktadır (Kogure et al. 1993).

Gıda sektöründe trigiliseritler lipitlerin ana grubunu oluşturulmasına 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. Tablo 1.2 ve 1.3'de gösterilen reaktif oksijen ve reaktif azot türleri oksidatif strese en çok sebep olan önemli faktörlerdendir (Aruoma and Cuppett 1997).

Tablo 1.2. Reaktif oksijen türleri (Ak Tuba, 2006)

Reaktif Oksijen Türleri			
Radikaller	**Formülü**	**Nonradikaller**	**Formülü**
Süperoksit	$O_2^{\bullet -}$	Hidrojenperksit	H_2O_2
Hidroksi	OH•	Hipoklorikasit	HOCl
Peroksi	ROO•	Hipobromikasit	HOBr
Alkoksi	RO•	Ozon	O_3
Hidroperoksi	HOO•	Singlet oksijen	ΔO_2

Tablo 1.3. Reaktif Azot Türleri (Ak Tuba, 2006)

Reaktif Azot Türleri			
Radikaller	**Formülü**	**Nonradikaller**	**Formülü**
Nitrikoksit	NO•	Nitrözasit	HNO_2
Nitrojen dioksit	NOO•	Nitrozil katyonu	NO^+
		Nitroksil anyonu	NO^-
		Dinitrojen tetraoksit	N_2O_4
		Peroksinitrit	$ONOO^-$
		Peroksinitroz asit	ONOOH
		Nitronyum katyonu	NO_2^+
		Alkilperoksi nitritler	ROONO

Reaktif oksijen ve azot türleri insan vücudunda farklı şekillerde meydana gelir. Bazıları biyokimyasal döngü içerisinde olmaması gereken kimyasal reaksiyonlar neticesinde oluşur. Örneğin; süperoksit ve hidrojen peroksit miktarı, adrenalin, dopamin, tetrahidrofolat, mitokondrial ve stokrom P450 elektron transport zincirlerinin bileşikleri gibi bazı biyomoleküllerin oksijen tarafından doğrudan oksidasyonuyla artabilir (Fridovich 1986; Halliwell 1994). Ayrıca insanlar çoğu zaman farklı kaynaklardan radyosyona maruz kalmaktadır. Böyle durumlarda düşük dalga boyundaki elektromagnetik ışınlar suyu parçalayarak reaktif hidroksi radikallerini oluşturabilir (Von Sonntag 1987). Su, enerjiye maruz bırakıldığı zaman $10^{-16ı}$ sn'de uyarılmış hale $(H_20)^*$ geçer. Böylece bir sulu çözeltinin uyarılmasıyla üç farklı radikal oluşur. Bunlar hidrojen radikali (H•) ve hidratlaşmış elektron (e^-_{aq}) dur (Halliwell and Gutteridge 1989). Reaktif oksijen türleri canlı organizmada sigara içilmesi durumlarında olduğu gibi dışarıdan da alınabilir. Sigara dumanının ana bileşiği NO_2• dir. NO_2• 'in sigara olefinleri ile reaksiyona girmesi sonucu karbon merkezli radikallerin oluştuğu öne sürülmektedir. Ayrıca sigara içimi nötrofilleri aktive ederek dolaylı olarak da serbest radikal üretimini artırabilir (Papas, 1996). 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, biyomolekülerin modifikasyonuna sebep olur. Hayatımızın vazgecilmez bir öğesi olan oksijen gazının da bir diradikal olmasıda aerobik canlılar için bir dezavantajdır. Bu sebeple aerobik canlılarda biyolojik sistem oksidasyona doğru giderken, oksidasyon önleyici veya geciktirici sistemler oksidasyonu durdurma veya yavaşlatma yönünde haraket ederek sürekli bir denge oluştururlar. Gıda maddeleri özellikle de yağ ihtiva eden ürünler, işlenme ambalajlanma esnasında oksijenden uzak tutmakta ya da antioksidanlar araçılığı ile oksidasyondan korunmaya çalışılmaktadır. (Ak Tuba, 2006).

1.2.1. Hidrojenperoksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi ya da süperoksitlerin enzimatik ve non-enzimatik dismutasyonu tepkimeleri sonucu

oluşur (Ak Tuba, 2006). Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özelliği taşımaz, reaktif bir tür değildir. Hidrojen peroksidin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni, demir, bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalinin öncülü olarak davranmasıdır (Ak Tuba, 2006). Hidrojen peroksit özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Oksitleyici özelliği nedeniyle, biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 nin derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz enzimleri yerine getirir (Ak Tuba, 2006).

1.2.2 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 radyosyonuna karşı önemli bir koruyucu olarak hizmet vermektedir. Dünyanın yüzeyine yakın olan ozon, istenmeyen bir oksidandır. Bir toksik hava kirleticisi olarak da görülmektedir (Stokinger, 1965; Tuba Ak, 2006). Ozon, yüksek UV ışın üreten lambalara sahip olan cihazların olduğu laboratuarlar da ve yerleşim merkezlerinde fotokimyasal reaksiyonlar ve hava kirliliğin 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 Tuba, 2006).

1.2.3. 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 patofizyolojide önemli bir rol oynayan çözünebilir, serbest radikal gazıdır. Vazodilatör mesajı endotelyumdan düz kasa taşıyan bir enerji aktarıcısı olarak, sentral ve periferal sinirsel aktarımda ve bağışıklıkta aktif rol alır. Sonuçta hücrede ve hücre dışında taşınan NO• miktarı çok hassastır. Damar endotelyumları tarafından üretilen endotelyum türevli gevşetici

faktörler tarafından üretildiği düşünülmektedir (Ignarro 1987; Palmer 1988; Sneddon 1988; Ak Tuba, 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, kardiyovasküler hastalıklar, akut inflmasyon, kanser, nörodejeneratif ve şeker hastalığı gibi hastalıklarlada ilgisinin ispatlanmıştır. NO• hücre fonksiyonlarının regülasyonunda 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 toksititeye de sahip olduğu tahmin edilmektedir (Ak Tuba, 2006). Ayn zamanda NO• vucüt metabolizması için gerekmektedir araştırmalar gösteriyorki NO• kan basınçını düşürdüğü, kan dolaşımını düzenlediği, damar sertliği başlangıcını veya ilerlemesini geçiktirdiği, olası felçleri, kalp krizini riskini azaltığı bilinmekedir.

1.2.4. Peroksi Radikalleri (ROO•)

Peroksi radikalleri çoklu doymamış yağ asitlerin oksidasyonu esnasında meydana gelen ara ürünlerdir. Lipit peroksidasyonu, membranda bulunan aradişonik asit veya linoleik asit gibi çoklu doymamış yağ asitlerinin yan zincirinden bir hidrojen atomunu koparacak kadar reaktiviteye sahip olan herhangi bileşik tarafından meydana getirilebilir. Araşidonik asit, prostagladin, tromboksan ve lökotrienlerin ön bileşiğidir, özellikle hidrojen atomu koparılmaya meyilli olan birçok çift bağ içerir (Esterbauer 1992). Lipit peroksidasyonun biyolojik önemi ve mekanizması hakkında bircok makale olmasına rağmen, ölçülmeyle ilgili metotlar için bir görüş birliği yok gibi görünüyor. DNA tamiri, proto-onkojen aktivasyon ve lipit peroksidasyonunun son ürünlerinin bazı özellikler arasındaki bağlantı, büyük ölçüde kanser promotörü olarak değerlendirilir (Cerruti 1985; Cheeseman 1993).

1.2.5. Hipoklorik Asit (HOCl)

Hipoklorik asit bir serbest radikal olmamakla beraber potansiyel bir klorlama ve oksitleme ajanıdır. Son zamanlarda hücre lisizleri ve ölüme yol açan, hücre membranlarının bozulmasını sağlayan ve kolestrol klorohidrinlerinin formasyonuna katıldığı tahmin edilmektedir (Carr, 1996). HOCl diğer birçok biyolojik moleküllerede saldırabilmektedir. Örneğin, protelitik bir inhibitör olan alfa-1-antiproteinaz (α_1AP), insan plazmasından elastaz gibi proteolitik enzimlerin inhibitörüdür. α_1AP insan serumundan bulunan elastaz %90'na yakın inhibe etmektedir (Travis, 1983). HOCl ayrıca primer aminlere, proteinlerin sülfhidril guruplarına da saldırmakta ve DNA'da pürin bazlarını kolayca klorlayabilmektedir (Dennis, 1979; Gould, 1982; Ak Tuba, 2006)). Kozumbo ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada HOCl'nin fizyolojik düzeyinin sübstitüe olmuş aril aminleri etkileyerek DNA'yı bağlayabilen ve insan hücrelerinde genotoksisite uzun ömürlü ürünler meydana getirdiğini ispatlamışlardır. HOCl fagositin hücrelerin bakterileri öldürmesinde önemli rol oynarlar. Radikal üretimi bakterilerin öldürülmesinde önemli rol oynarlar. Özellikle nötrofiller içerdikleri miyeloperoksitaz enzimi aracılığıyla O_2 dismutazıyla oluşan H_2O_2 molekülü Cl iyonuyla birleşerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan HOCl'e dönüşür. Bu durum gronülomatozlu hastalarda şu şekilde açıklanmıştır: gronülomatoz hastalığı doğuştan olan bir durumdur ve fagositlerinde $O_2\bullet^-$ üreten sistem olan NADPH-oksitaz sistemi çalışmamaktadır. Bununla birlikte bu hastaların fagositleri bakterileri fagositoz yoluyla bünyelerine alabilmekte, fakat $O_2\bullet^-$ üretilemediği, dolayısıyla da H_2O_2 ve HOCl oluşamadığı için bakteriler ölmemekte ve fagosit hücreleri yıkıldığı zaman yaşayan bakteriler tekrar ortama salınmakta ve hasta devamlı enfeksiyona maruz kalmaktadır (Gürbüz A. Kemal, 2007).

1.2.6. Süperoksit Radikalleri ($O_2\bullet^-$)

Süperoksit radikalleri biyolojik olarak oldukça toksittir ve mikrooganizmalara saldırarak öldürür. Fagositlerde patojenlerin savunma mekanizmalarını yok etmek için NADH oksidaz enzimi tarafından fazla miktarda üretilir. Ksantin oksidaz gibi diğer birçok enzim tarafından üretilmesinin yanı sıra solunum zincirindeki

reaksiyonlar sonucunda bol miktarda meydana gelebilmektedir. Süperoksit radikalleri birçok enzim tarafından meydana getirebildiği gibi nonenzimatik elektron transferleri sonucu da oluşabilmektedir. Süperoksit anyon radikalleri selektif reaktiviteli oksijen merkezli radikallerdir. Süperksit radikalleri sulu çözeltilerde askorbik asiti oksitleyebilir. Ayrıca sitokrom c ve ferriketilendiamintetraasetik asit (Fe_3EDTA) gibi belirli demir komplekslerini de indirgeyebilir. Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi, $O_2\bullet^-$' in peroksit ve oksijene dönüşümünü katalizlerler (Ak Tuba, 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.

$$2O_2\bullet^- + 2H^+ + SOD \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

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 hidrojenperoksit (H_2O_2) oluşturur. Bu radikal de çok reaktif olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonunu başlatabilir ve antioksidanları oksitleyebilir.

1.2.7. Hidroksil Radikali (OH•)

Hidroksil radikali oldukça reaktif olmamalarına rağmen, kısa ömürlüdür. Hikroksil 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-pridinetyonun fotolizi sonucu da oluşabilmektedir. OH• membran ve DNA dahil olmak üzere hemen hemen bütün biyolojik moleküllere saldırırlar. OH• Fenton tipi reaksiyonlarda oluşması durumunda OH• oluşumunun büyüklüğü büyük bir ölçüde katalizör olan metal iyonlarının varlığına ve bulunduğu duruma bağlıdır. Fenton reaksiyonuna örnek;

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH\bullet + OH^-$$

Lipit peroksidasyonu sonucu membranı parçalanan ve stabilitesi bozulan hücreler, akciğer rahatsızlıklarına, böbrek hasarlarına, damar tıkanıklığına yaşlanmaya ve kansere sebep olduğu da bilinmektedir (Rice-Evans and Burdon 1993). Bunun yanısıra dışardan diyetle alınan veya çevrede bulunan pro-oksidant bileşiklerin de DNA hasarlarına (Holmes et el. 1992; Ames 1993) yaşlanma ile ilgili patalojik durumlara (Peto et al. 1981; Cros et al. 1987; Schwartz et al.1988) sebep olduğunu bildirilmiştir. Bunların aksine antioksidan bileşikler ise bazı kanser türlerini ve damar hastalıklarının gelişmesini engellemede önemli rol oynamakta ve yukarıda sayılan toksik etkileri hem azaltılabilmektedir ve hem de ortamda bulunan oksijen radikallerini indirgeyebilmektedir (Ak Tuba, 2006). Toksik etkilerin varlığında ise tedavi amaçlı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Frankel et al. 19988). Kısaca serbest oksijen radikalleri bütün bu istenmeyen durumlara sebep olurken ve antioksidanlar bunların aksine terapötik ajan olarak yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Cros et al. 1987; Halliwel 1997). Askorbik asit, süperoksit gibi indirgeyici bileşiklerin de bulunduğu ortamda oksitlenen metal iyonu tekrar indirgendiğinden H_2O_2' den OH• yapımı sürekli bir duruma gelir.

$$H_2O_2 + \text{Askorbat (veya } O_2\bullet^-) \rightarrow OH\bullet + \text{semidehidroaskorbat}$$

Haber-Weiss tepkimesi ya da fenton tepkimesi olarak adlandırılan bu tepkime ile OH• oluşması vücutta üretilen H_2O_2 derişimi ve serbest metal iyonunun varlığına bağlıdır. Süperoksit hem H_2O_2' nin öncülü hem de metalleri indirgeyici bir tür olduğundan; süperoksit proteinlere bağlı metallerin indirgenip serbest kalmasına da neden olabildiğinden, biyolojik koşullarda süperoksit oluşumunun arttığı ortamda OH• üretimi kaçınılmazdır. Fenton tepkimesini katalizleyen en aktif metal iyonları demir ve bakırdır. Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan OH•, su dahil ortamda rastladığı her biyomolekülle tepkimeye girer. Hidroksil radikalinin tepkimeleri başlıca:

a) Elektron transfer tepkimeleri,

b) Hidrojen çıkarma epkimeleri,

c) Katılma tepkimeleri

Bütün bu tepkimeler, OH•' ın paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır. Katılma tepkimeleri, özellikle elektronca zengin moleküllerle (pürin ve primidin bazları, aromatik amino asitler gibi) gerçekleşir. Hidroksil radikalinin organik moleküllerden hidrojen atomu alarak suya indirgendiği tepkime, hidrojen çıkarma tepkimesi olarak bilinir. Hidroksil radikali ile oluşan en iyi tanımlanmış biyolojik hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur. Her tür biyolojik molekül OH•' ın bir hedefi ise de özellikle elektronca zengin bileşikler tercihli hedeflerdir. Nükleik asitler, proteinler ve lipidlerde başlatılan radikalik tepkimelerde binlerce farklı ara ürünler oluşabilir. DNA ile tepkimesi sonucu baz modifikasyonları, baz delesyonları, zincir kırılmaları gerçekleşebilir. İleri derecedeki DNA hasarları tamir edilemediğinden hücre ölümüne neden olur. Proteinler üzerinde oluşan oksidasyonlar yapı değişimine neden olacağından proteinleri proteolitik yıkıma götürür. Hücre zarı su içermediğinden OH•' ın başlıca hedefi yağ asididir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp yine hücre ölümüne neden olabilir. Özellikle OH• yapımını katalizlemelerindeki etkileri nedeniyle, canlılarda metal iyonların radikal hasarlarından birinci derecede sorumludurlar ve bu etkiye sahip olamadıkları formda (proteine bağlı) tutulmalıdır (Yurdagül Zafer, 2003).

1.2.8. Singlet oksijen

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

a. Pigmentlerin (örneğin flavin içeren nükleotidler, retinal, bilirubin) oksijenli ortamda ışığı absorblamasıyla
b. Hidroperoksitlerin metal varlığında yıkımı
c. Kendiliğinden dismitasyon tepkimeleri sırasında
d. Prostaglandin endoperoksit sentaz, sitokrom p450 tepkimeleri myelo/kloro/laktoperoksidaz enzimlerinin etkisi sırasında

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 (Yurdagül Zafer, 2003). Skualen ise bir serbest radikal gidericisi olmakla beraber, singlet oksijen söndürücü olarak da görev yapmaktadır (Kohno et al. 1995).

1.3. SERBEST RADİKALLERİN ETKİLERİ

1.3.1. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri

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

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.

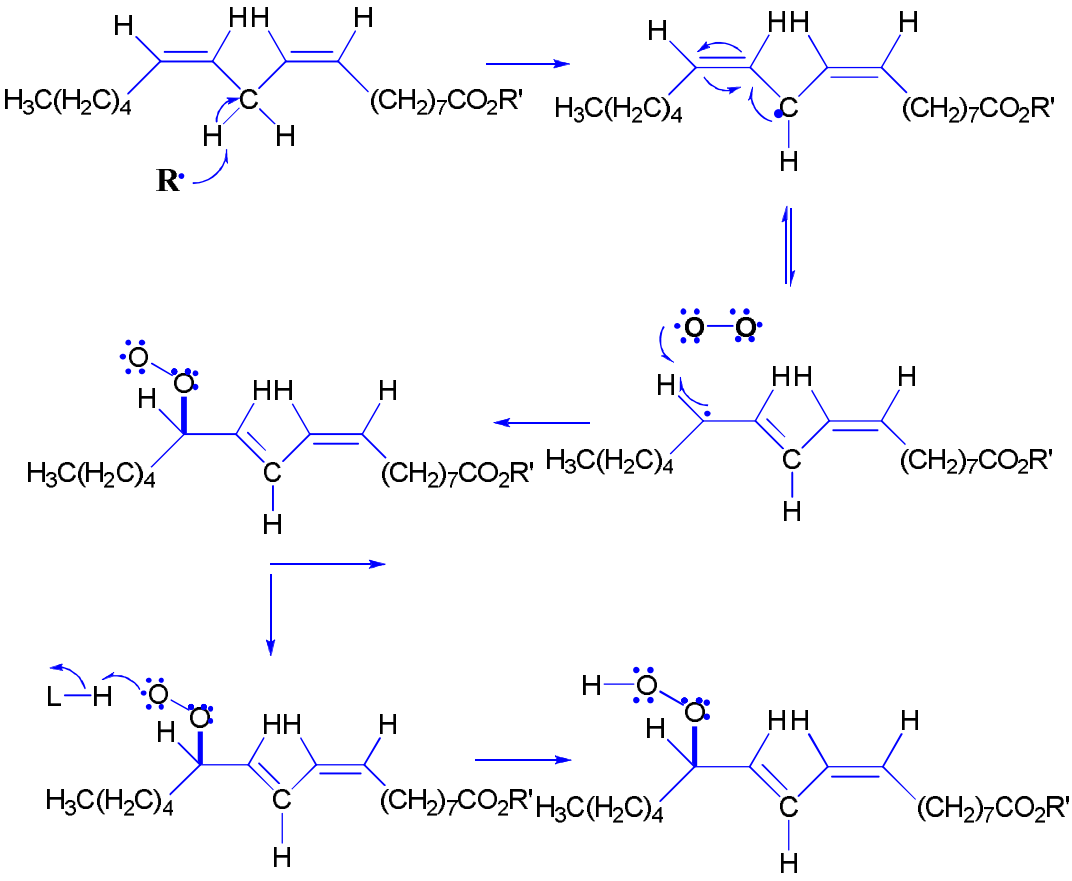
Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri (L•) ve lipid peroksit radikallerinin (LOO•) oluşması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) 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. Lipid peroksit radikalleri (LOO•), membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipidperoksitlerine (LOOH) dönüşürler ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder.

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid peroksitlerinin (LOOH) 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 hidrojen peroksitten (H_2O_2) Fenton reaksiyonu sonucu hidroksil radikali (OH•) oluşması zincir reaksiyonunu başlatabilir. Lipid peroksitleri (LOOH) 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.

Malondialdehit (MDA) kanda ve idrarda ortaya çıkar, yağ asidi oksidasyonunun spesifik yada kantitatif bir indikatörü olmamakla beraber lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik materyalde malondialdehit (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.



Şekil 1.6. Lineoleik asidin otoksidasyon reaksiyon şeması

1.3. 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 reaktif oksijen türleri (ROS) üreten reaksiyonlara maruz kaldıklarında nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilirler. Hemoglobin gibi hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin süperoksit radikali ($O_2•^-$) veya hidrojen peroksitle (H_2O_2) reaksiyonu methemoglobin oluşumuna neden olur.

1.3.3. Serbest Radikallerin Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Hidroksil radikali (OH•) deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit (H_2O_2) membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Süperokside ($O_2•^-$) 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.

1.3.4. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri

Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisiyle çeşitli ürünler meydana gelir ve bunlar, çeşitli patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar.

Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının gelişimi, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, psöriyazis, romatoit artrit, 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.

1.4. SERBEST RADİKALLERE KARŞI SAVUNMA SİSTEMLERİ

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler.

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler;

1) Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme toplayıcı etkidir. Antioksidan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküller bu tip etki gösterirler.

2) Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme bastırıcı etkidir. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.

3) Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki zincir kırıcı etkidir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.

4) Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması onarıcı etkidir.

Serbest radikallerdeki aşırı yüklenme vücut için tehlike oluşturur. Ancak vücudun işlevlerini görebilmesi ve hastalıklardan korunabilmesi için de gereklidirler. Serbest radikaller vücutta çok hassas bir dengeyle kontrol edilmektedirler:

1.4.1. Serbest Radikalleri Yok Eden Enzimler

Süperoksit dismutaz: Hücre içinde mitokondride doğal olarak bulunan bir enzimdir. Süperoksit radikallerini daha az reaktif olan hidrojen peroksit formuna çevirirler.

$$2O_2\bullet^- + 2H^+ + SOD \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Katalaz: İnsan hücrelerindeki peroksizomlarda bulunurlar. Hidroksil radikallerinin oluşumunu önlemek için H_2O_2 suya ayrıştırır.

$$2H_2O_2 + CAT \rightarrow H_2O + O_2$$

Glutatyon peroksidaz: Glutatyon peroksidaz, hidrojen peroksit ve büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerinin indirgenmesinden sorumludur. Sitozilde yerleşmiş, 4 selenyum atamu içeren tetramerik yapıda bir enzimdir. Karaçiğerde en yüksek, kalp, akciğer ve beyinde orta, kasta düşük aktivitede bulunur. GPx, aşırı hidrojen peroksit varlığında glutatyonun (GSH) okside glutatyona (GSGS, glutatyon disülfit) oksidasyonunu katalize eder; bu arada H_2O_2 da detoksifiye edilmiş olur.

$$H_2O_2 + 2GSH + GPx \rightarrow GSSG + 2H_2O$$

Sülfhidril proteinleri ve diğer serum proteinleri: Organik peroksitleri ve hidroksilradikallerini zararsız kimyasallara dönüştürürler. Antioksidanlar, endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olabilirler.

Mitokondriyal sitokrom oksidaz: Solunum zincirinin son enzimidir ve süperoksidi ($O_2\bullet^-$) detoksifiye eder.

$$O_2\bullet^- + 4H^+ 4e^- \rightarrow 2H_2O$$

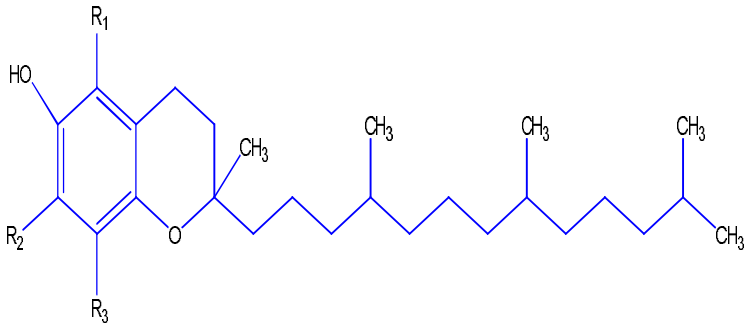
Bu reaksiyon fizyolojik şartlarda sürekli devam eden normal bir reaksiyondur, bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol miktarda enerji üretimi (ATP) sağlanır. Ancak çoğu zaman süperoksit ($O_2\bullet^-$) üretimi mitokondriyal sitokrom oksidaz enziminin kapasitesini aşar ve bu durumda diğer antioksidan enzimler devreye girerek süperoksidin ($O_2\bullet^-$) zararlı etkilerine engel olurlar.

1.4.2. Serbest Radikallere Karşı Nonenzimatik Korunma

Doğal antioksidanlar hemen hemen tüm bitkilerde, meyvelerde, sebzelerde, mikroorganizmalarda, mantarlarda ve hatta hayvansal dokularda dahi bulunmakta olup çoğunlukla polifenolik yapısındaki maddelerdir. Bu antioksidanların en önemlileri; tokoferoller, sesamol, sesamolin, karnosik asit, rosmarinik asit, flavonoidler, karotenoidler ve askorbik asit'dir (Yanishlieva, 2001;Hudson, 1990 ve Shahidi, 2000).

Tokoferoller doğal antioksidanların en önemli grubunu oluşturmaktadır. Genellikle E vitamini (α-tokoferol) olarak bilinen monofenolik yapısındaki antioksidanlar olup güçlü biyolojik antioksidatif aktiviteleri sayesinde gıda, ilaç ve kozmetik alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. E vitamini 1922'de beslenme ile doğurganlık arasındaki ilişkiyi araştıran Evans ve Bishop tarafından bulundu. Aylarca E vitamini olmayan beslenmeye tabi tutulan dişi fareler fetus emiliminden dolayı doğurganlık kaybına uğradılar. Bu beslenmelerine az miktarda taze hıyar, beyaz tohum ve alfalfa yaprakları eklenerek önlendi. Başlangıçta E vitamini terimi, doğurganlığı sürdürmek için gerekli olan ve bitkilerden elde edilen bir lipit eksraktını tarif ediyordu. Sonraları E vitamini ektisi gösteren 4-tokoferol ve 4-tokotrienolden ibaret sekiz bileşik bulundu. Tokoferoller izole edildi ve ilkkez 1930'ların sonlarında tanımlandılar; tokotrienoller yaklaşık 25 yıl sonra tanımlandılar.

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. Epidemiyolojik ve sınırlı ara çalışmalar, E vitamininin kardiyovasküler hastalıkların, bazı kanserlerin ve öteki kronik hastalıkların riskini azalttığını belirlemektedir. Bazı büyük klinik deneylerle E vitamininin sağlığa yararları daha derinlemesine değerlendirilmektedir. Tokollerin (tokoferol ve tokotrienol) farklı bileşikleri E vitamini aktivitesi gösterir. En aktifi alfa-tokoferoldür. Geçmişte asıl olarak α-tokoferol üzerinde yoğunlaşılmışken, bugün öteki tokoferoller ve tokotrienoller daha fazla ilgi çekmektedir. İlk sonuçlara göre bunlar, α-tokoferolden farklı antioksidan ve diğer fonksiyonlara sahiptir. En fazla soya ve buğday da en düşük ise Hindistan cevizinde bulunur. Tokoferoller; metil grubunun aromatik tokol halkası üzerindeki pozisyonuna bağlı olarak, α-,β-,γ-,δ-tokoferol olarak dört temel isim alır *(*Mukhopadhyay, 2000). 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 çalmalar 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).



α-> β - > γ ->δ-Tokoferol

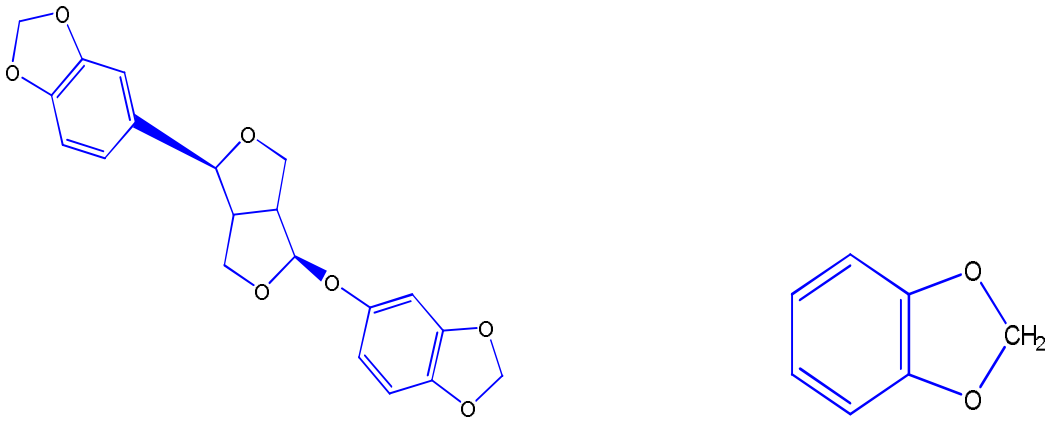
Şekil 1.7. α-> β - > γ ->δ-Tokoferolün molekül yapısı

Tablo 1.4. α-β-γ-δ Tokoferolün sübstientleri

	R_1	**R_2**	**R_3**
α	**CH3**	**CH3**	**CH3**
β	**CH3**	**H**	**CH3**
γ	**CH3**	**CH3**	**CH3**
δ	**H**	**H**	**H**

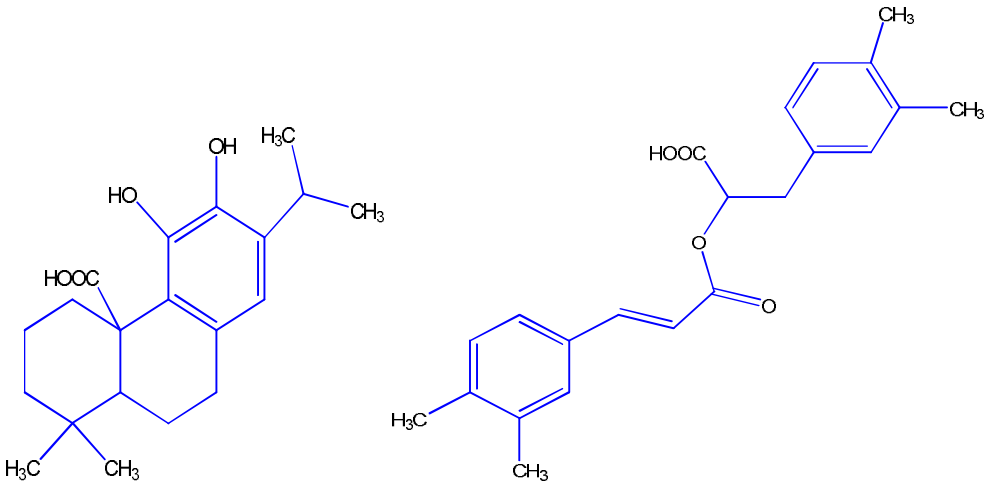
Tokoferol ve karotenoidler gibi doğal antioksidanların depolandığı temel organ karaciğerdir. Bunun yanısıra adipoz dokuda, akçiğer ve böbreklerde de depolandığı belirtilmiştir (Surai et el. 1998). Bitkilerde farklı antioksidan bileşiklerin meydana geldiği bilinmektedir (Larson 1988; Ramarahman et al. 1988). Doğal

antioksidanlar bitkilerin yaprak, gövde, ve tohumları başta olmak üzere bütün dokularında meydana gelebilmektedir. Bunun yanısıra sebzelerde, kabuklu ve kabuksuz meyvelerde, tohumlarda, yapraklarda, çiçeklerde, köklerde ve kabuklarda bol miktarda bulunmaktadır (Pratt et al. 1990). Yapılan araştırmalarda bol miktarda sebze meyve tüketimi sonucu, hastalıklara yakalanma riskinin azaldığı, kalp-damar hastalıklarında, kanser vakalarında ve ölüm oranlarında kayde değer azalmalar olduğu (Ames et al. 1993; Dragsted et al. 1993) bildirilmiştir. Baharatlar ve şifalı bitkiler geleneksel olarak gıdaların tadını artırmak ve raf ömrünü korumak amacıyla yıllardan beri kullanılmaktadır. Baharatlar ve şifalı bitkiler arasında en fazla kendine yer edinenler biberiye, kekik ve ada çayıdır. Karnosik asit ve Rosmarinik asit biberiyenin en etkili fenolik antioksidan bileşenleridir (Frankel, 1999). Ada çayı ve biberiye ekstraktlarında yaygın olarak bulunan bu rosmarinik asit ve türevlerinin süperoksit bağlama etkisinin trolox (sentetik bir antioksidan)'a kıyasla 15-20 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Lu ve Foo, 2001). Yapılan bir başka çalışmada ise biberiye ekstraktının soya yağında peroksit oluşum hızını yavaşlattığı ve lezzet stabilitesini artırdığı tespit edilmiştir (Altuğ, 2001). Yalnızca susam bitkisinin tohumlarından elde edilen bu antioksidanlar, sıvı ve katı yağlara katıldıklarında, çok yüksek antioksidatif etki gösterirler (Kayahan, 1998).



Sesamolin **Sesamol**

Şekil 1.7 Sesamolin ve Sesamol molekül yapıları



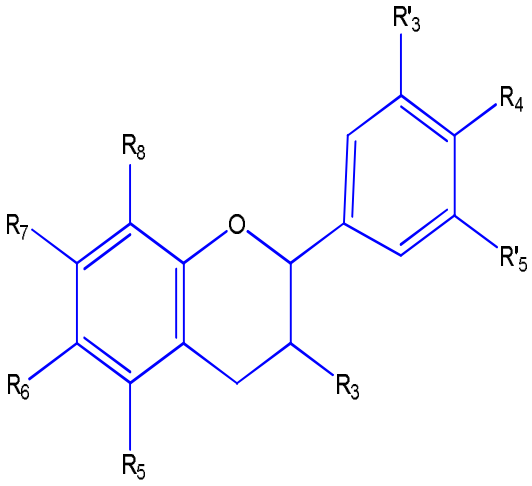
Karnosik asit **Rosmarinik asit**

Şekil 1.8. Karnosik asit ve Rosmarinik asitin molekül yapısı

1.4.2.1. Flavonoidler ve Fenolik Asitler

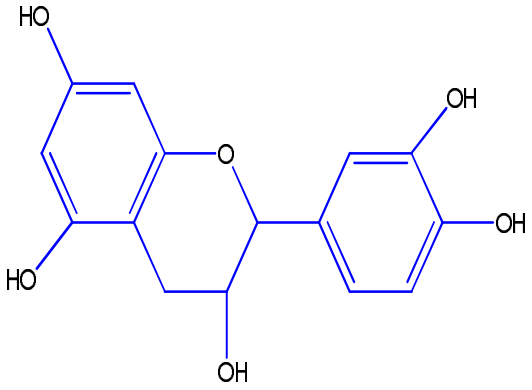
1- Flavonol
2- Flavanon
3- Flavon
4- İzoflavonlar
5- Antosiyaninler şeklinde gruplara ayrılırlar.

Flavonoidler polifenolik yapıda olup birçok bitki, meyve ve sebzede bol miktarda bulunmaktadır. Son zamanlarda hakkında en çok araştırma yapılan doğal antioksidan gruplarından biridir. Antosiyanin, kateşinler, izoflavonlar ve flavonoller gibi türleri vardır (Hertog ve ark., 1992). Yapılan araştırmalar sonucunda bu grup antioksidanların başta kalp-damar hastalıkları olmak üzere daha birçok hastalığın oluşumunun önlenmesinde olumlu etkiler sağladığı tespit edilmiştir (Pratt ve Hudson, 1990).



Şekil 1.9 Flavonoidin genel molekül yapısı

1.4.2.1.1. Antosiyanin; kuvvetli flavonoid grubu antioksidan olup üzüm, çilek, erik, elma, kiraz, lahana, pancar ve patlıcan gibi birçok sebze ve meyvede bulunmaktadır.

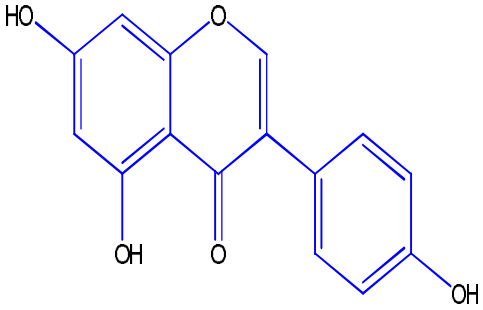


Antosiyanin

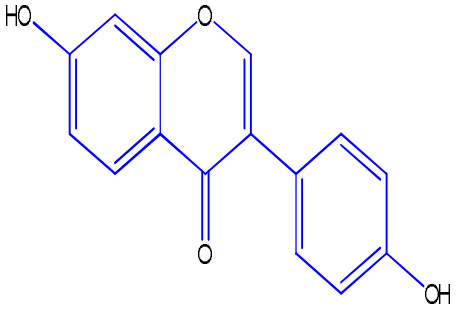
Şekil 1.10. Antosiyanin molekül yapısı

Michigan Üniversitesi'nde kiraz üzerine yapılan bir araştırmada, kirazda bulunan ve ‘Antosiyanin' olarak bilinen kırmızı renkteki maddenin ağrı kesici etki yaptığı belirlenmiştir. 20 tane kirazda 12-25 miligram arasında Antosiyanin bulunduğu ve etkisinin Aspirin'den 10 kat daha fazla olduğu ve aynı zamanda E ve C vitaminlerine benzer antioksidatif etki gösterdiği belirlenmiştir (Wang ve ark.,1999).

1.4.2.1.2. İzoflavonlar; bitkilerden elde edilen (bitkisel österojenler) polifenolik yapıdaki bileşiklerdir. Flavonoidler arasında en yüksek österojenik aktiviteyi izoflavonlar gösterir ve en zengin kaynakları soya ve Dong Quai (Angelica Sinensis) bitkisidir. En önemli isoflavonlar; genistein ve daidzein'dir. Vücut bu maddeleri kendisi oluşturmadığı için besinlerle dışarıdan alması gerekir. Yapılan araştırmalar bu maddelerin menopoz döneminde kemik yoğunluğunun korunması yönünde yararlar sağladığını ortaya koymuştur. Günlük tavsiye edilen izoflavon dozu 40 mg'dır (Fotsis ve ark.,1993).



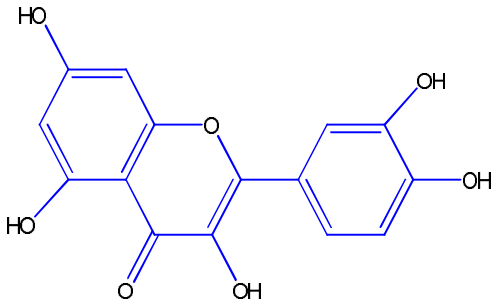
Genistein



Daidzein

Şekil 1.11. Genistein ve Daidzein molekül yapısı

Flavonoidlerin diğer bir önemli grubu ise flavonollerdir. En önemli olanı, narenciye, patates, domates, ıspanak, baklagiller, sarımsak ve deniz yosunundan elde edilen kuersetin'dir. kuersetin çok güçlü antioksidan olup, bu antioksidanın yemek borusu, mide ve deri kanseri gibi birçok hastalıklara karşı koruyucu, kolesterolü düşürücü, pıhtılaşmayı azaltıcı, kalp ve damar sistemi hastalıklarını önleyici etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Slimestad, 1998).



Kuersetin

Şekil 1.12. Kuersetinin molekül yapısı

Flavonoidler ve diğer bitki fenoliklerinin süperoksit ($O_2•^-$), lipit alkoksil (RO•) ve peroksit (ROO•), nitrik oksit (NO•) radikal temizleme, demir ve bakır şelasyonu, α-tokoferol rejenerasyonu fonksiyonlarına ek olarak; vazodilatatör, immünstimülan, antiallerjik, östrojenik, antiviral (HSV, HIV, infuenza ve virüslere karşı) etkileri de sözkonusudur (M. Burak,Y. Çimen, 1999).

Flavonoidler, glikozitler gibi canlı hücrelerde ortaya çıkarlar, sıcak asit ve enzimlerle sırasıyla aglikon ve şekerlere parçalanabilirler (M. Burak Y. Çimen, 1999). Fenolik AO, lipit radikallere, hızla H^+ vermesi şeklinde lipit oksidasyonu ile etkileşir. Görevi lipit peroksi (ROO•) ve alkoksil (RO•) radikalini parçalamak ve böylece lipit peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırmaktadır. Reaksiyon mekanizması;

$$ROO• + AH \rightarrow ROOH + A•$$
$$RO• + AH \rightarrow ROH + A•$$
$$ROO• + A• \rightarrow ROOA$$
$$RO• + A• \rightarrow ROA$$

şeklinde gerçekleşir (Apak ve Ark, 2007).

Sonuçda oluşan fenoksi radikali yeni bir serbest radikal oluşumunu başlatmamalı veya zincir reaksiyonu ile hızlı bir oksidasyona maruz kalmamalıdır. Bu yönden fenolik AO' lar mükemmel H^+ ve e^- donörleridir. Oluşan fenoksi radikali aromatik halka etrafında çiftleşmemiş elektronların lokalizasyon değişikleri ile dengelenir. Bir fenolün orta veya para pozisyonundaki 2, OH^- grubu onun antioksidan aktivitesini artırır. (M. Burak Y. Çimen, 1999). Diğer halkadaki (B halkası) hidroksilasyon, antioksidan aktiviteye katkıda bulunur. Tüm flavonoidler, 3-4' dihidroksi konfigürasyonu ile AOA'ye sahiptir. B halkasındaki hidroksilasyonu antioksidan aktivite için önemlidir.

İnsanlarda flavonoidlerin adsorbsiyon ve metabolizması ile ilgili farklı farmakokinetik özelliklerin varlığı düşünülmekredir. Kateşinler, oral alımı takiben bağırsaklarda adsorbe edilir. Flavonoidlerin bakır iyonlarıyla kompleks oluşturma kabiliyeti gösterilmiştir. Bu kompleks oluşumu, AO etkilerine bağlıdır. Metal iyon şelasyonu katalitik olarak inaktivasyon sağlar. (M. Burak Y. Çimen, 1999).

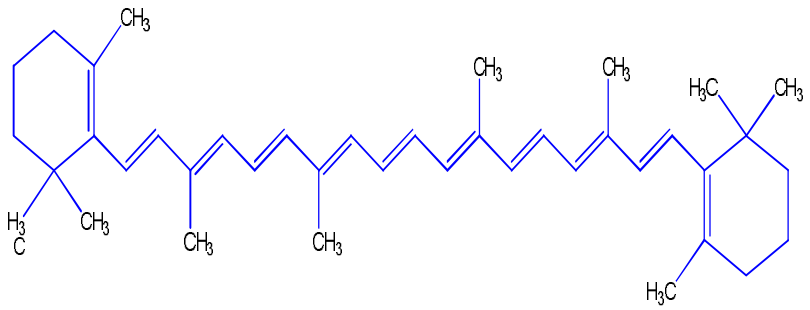
1.4.2.2. Karotenoidler: Karotenoid bitkilerde ve bazı diğer fotosentetik mikroorganizmalarda (yosunlar, bazı mantarlar va bazı bakterilerde) bulunan pigmenttir. Karotenler tetraterpenlerdir yani kuyruk kuyruğa bağlanmış diterpenlerden oluşurlar. (Terpenler hidrokarbonların geniş ve çeşitli bir sınıfıdır, başlıca bitkiler, özellikle iğne yapraklılar, tarafından üretilmekle beraber bazı böceklerde de (örneğin; *Papilionidae* cinsindeki kelebekler) osmeteriyumlarında terpenler salgılarlar. Reçinenin ve ondan elde edilen terebentinin ana bileşkesidir. Terpen sözcüğü ‘’terebentin’’ sözcüğünden türetilmiştir. Terpenler kimyasal olarak değişime uğradıklarında örneğin; yükseltgenme veya karbon iskeletinnin düzenlenmesi ile, meydana gelen bileşiklere genel olarak terpenoid olarak değinilir. Bazı yazarlar terpen sözcüğünü terpenoidleri kapsayacak şekilde kullanırlar. Terpen ve terpenoidler, çoğu bitki ve çiçekteki esans yağlarının başlıca bileşikleridir. Esans yağları gıdalara tatlandırıcı katkısı olarak, parfümeride, aromaterpide, ayrıca geleneksel ve alternatif tıpta kullanılırlar. Doğal terpenlerin sentetik değişiklikleri ve türevleri, parfümeride gıda tatlandırıcı katkı maddelerindeki çeşitliliği çok artırmıştır.

Altı yüzün üzerinde bilinen karetonoid vardır; ksantofiller ve karotenler olarak iki sınıfa ayrılır. Karetonoidler, C_{40} çoklu doymamış (polyunsaturated) hidrokarbonların (karotenler) ve bunların oksitlenmiş türevlerinin (ksantfiller) bir sınıfını oluşturur. Bu bileşikler, yağa zengin bir portakal rengi-kırmızı renk verir. Ham hurma yağı en zengin bitkisel karoten kaynaklarından. Havuca göre15, domatese göre 300 kat daha fazla retinol eşdeğerine sahiptir. Analizler, α- ve β-karotenlerin toplam karotenoid muhtevasının yaklaşık %90’ını oluşturduğunu gösterir; geri kalanı ile γ-karoten α ve β-karoten, fitofluen, fitoen, zeakaroten, likopen, neurosporen ve α-ve β-zeakarotenlerdir.

Karotenoidler, tetraterpenoidlerin bir kategorisidir. Yapısal olarak polien zincirlerinden oluşurlar bunlar bazen halkalar ile sonlanabilir. Oksijen atomu bulunduranlar (lutein ve zeaksantin) ksantofiller olarak adlandırırlar. Oksijensiz karotenoidler (alfa karoten, beta karoten ve likopen gibi). Karetonoidlerin en iyi bilineni kuşkusuz havuçlarda bulunan karotendir. Açık sarıdan parlak turuncu ve kırmızıya kadar değişen renkleri kimyasal yapılarına bağlıdır. Ksantofiller genelde sarıdırlar, karbon-karbon çift bağları konjugasyon ile birbiriyle etkileşir, böylece moleküldeki elektronlar bu bölgelerde serbestçe dolaşabilirler. Çift bağların sayısı

artıkça bu konjuge sistemlerdeki elektronların daha fazla hareket serbesisesi olur ve enerji seviyelerini değiştirmek için daha az enerjiye gerek duyarlar. Böylece molekül tarafından soğurulan ışığın enerjisi azalır. Görünür spektrumum mavi kısmından daha fazla enerji soğuruldukça bu bileşiklerin renkleride kırmızılaşır. Fotosentetik sistemlerde karotenoidler fotosentetik tepkime merkezinde önemli bir rol oynarlar. Ya enerji transferine katılırlar, ya da reaksiyon merkezini otooksidasyondan korurlar. Fotosentez yapmayan organizmalarda karotenoidlerin oksidasyondan korunma mekanizmalarıyla ilişkilidirler.

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 akçiğer kanser riskinin anlamlı ölçüde azaldığı bulunmuştur. Öte yandan sigara kullananların yüksek dozda beta-karoten kullanılmasının kanser riski artırdığı bulunmuştur. Bir olasılıkla aşırı miktardaki beta-karotenin yıkım ürünleri plazmadaki A vitamini azaltıp, sigara dumanının neden olduğu akçiğer hücrelerindeki çoğalmayı kötüleştirmmektedir. Ayrıca turuncu renkli ve A vitaminin öncüsü olan β-karoten, genellikle eşit renklendirme oluşturmak için gıda maddelerine katılır (Mukhopadhyay, 2000). Aynı zamanda β-karoten, vücutta A vitaminine dönüşür. A vitaminin bütün fonksiyonlarının yanı sıra serbest radikalleri etkisiz hale getirerek yaşlanmayı geçiktiricidir, cildi güzelleştirir, güneşin zararlı etkilerinden cildi koruyarak cilt kanseri oluşumunu önler (Albanes ve ark, 1996).



β- karoten

Şekil 1.13. β-karotenin molekül yapısı

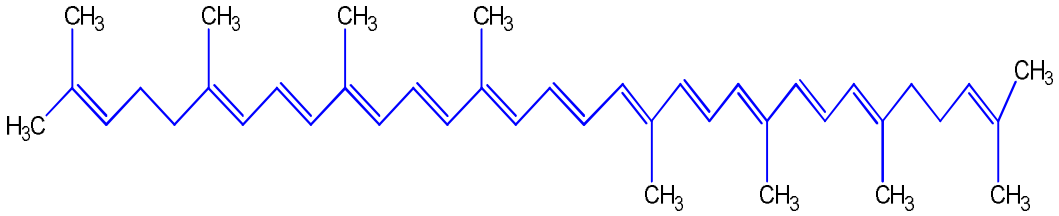
Karotenler, karaçiğerde enzimler yardımı ile A vitaminine dönüşürler (Karotenler A vitaminin ön maddesidir). A vitamini; görme, büyüme, çilt sağlığı için gereklidir. Hemen hemen tüm yeşil bitkilerde bulunmaktadır.

Hayvanlar karotenoidleri sentezleyemezler ve onları beslenme yoluyla elde etmek zorundadırlar. Buna rağmen bu bileşikleri yaygın olarak ve genelde gösteriş amaçlı kullanılırlar. Örneğin, flamingo ve somon balıklarının pembe renkleri, istakozların kırmızı renkleri karetonoidlere bağlıdır. Karotenoidler gösteriş amaçlı kullanılırlar çünkü onların; fizyolojik ve kimyasal özellikleri göz önüne alınırsa, bireysel sağlığın samimi bir göstergesidirler ve hayvanların kendilerine potansiyel bir eş bulmalarına yarar. En yaygın karetonoidler likopen ve A vitaminin öncülü olan β-karotendir. Bitkilerde ksantofil lutein en bol karetenoiddir. Bitkilerin yapraklarında bulunan lutein ve diğer karetonoidler bariz değildir çünkü klorofil gibi diğer pigmentler tarafından maskelenir.

Bitkilerdeki karetonoid profilini belirlemek için çeşitli analitik metodlar kullanılmaktadır. Farklı adsorbanlar ile yapılan çalışmalarda kolon kromatoğrafisi kullanılabilir ve reverse-phase yüksek performanslı sıvı kromatoğrafisi (HPLC), karetonoidlerin yağdan ayrılmasını sağlamada pekçok avantaj sağlar.

1.4.2.3. Likopen: Likopen sekiz izoprenden meydana gelmiş bir terpendir. Likopennin rengi onun eşlenik (konjuge) karbon çift bağlarından kaynaklanır. Her bir çift bağ elektronların bir üst enerji seviyesine çıkmaları için gereken enerjiyi azaltır, böylece molekülün gittikçe daha büyük dalga boylarında görünür ışık soğurabilmesini sağlar. Likopen görünür spektrumunun çoğunu soğurduğu için kırmızı görünür. Likopen yükseltgenirse (oksitlenirse) karbon atomlarının arasındaki çift bağlar parçalanır, molekül daha küçük parçalara bölünür, her biri bir oksijen atomuyla çift bağ kurmuş olur. Bu C=O bağları da ışığı soğursalar da soğurdukları ışığın dalga boyu bu moleküllerin renkli görünmesi için yeterli değillerdir. Likopen indirgendiği zaman da benzer bir sonuç olur, indirgenme sonucu çift bağlar tek bağa dönüştüğü için görünür ışığı soğurmazlar (http://wikipedia.org/wiki/likopen).

Likopeni yüksek meyve sebzeler arasında domates, karpuz, greyfurt, pembe guava ve kuşburnu bulunur.



Likopen

Şekil 1.14. Likopenin molekül yapısı

Domatesin pişirilmesi sonucu kullanılabilir likopen oranı artar. Likopen suda çözünmediği için ve bitkisel liflere bağlı durumda olduğu için yemek için hazırlanması (parçalanması, yağ ile karıştırılması, pişirilmesi) likopenin vücut tarafından kullanılabilirliğini artıtırır. Likopen yağda çözündüğü için yağ onun sindirim sistemi tarafından emilmesini büyük ölçüde artırır. Likopen güçlü karotenoiddir (Di Mascio P, Kaiser S, Sies H. 1989). Mor ötesi ışınların meydana getirdiği tekli oksijen deri yaşlanmasının başlıca nedenidir (Bowen P, Chen L, Stacewicz-Sapuntzakis M, Duncan C, Sharifi R, ve ark. 2002).

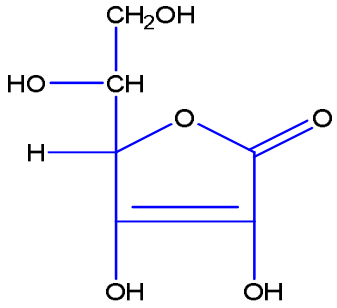
Likopenin sık kullanımının kalp damar hastalığı, kanser (özellikle prostat kanseri), diyabet, osteoporoz ve hatta erkeklerde kısırlık riskini azaltdığı yönünde bulgular vardır (Bowen P. ve ark 2002). Likopenin özofgus, kolorektal ve ağız kanseri riskinde azalmayla ilgili olabilir.

Likopenin doğada yaygın olarak bulunmasından dolayı bir gıda boyası olarak kullanılmasına izin verilmiştir. Likopen suda çözünmez ve çoğu porlu malzemeyi ve çoğu plastiği hemen boyar. Domates lekesi çoğu kumaştan kolaylıkla çıkarılabilse de (eğer leke yeni olmuşsa), likopen plastiklerin içine geçişir ve bu yüzden sabun veya deterjanla çıkarılamaz (ama çamaşır suyu likopeni yok eder). Plastikler özellikle daha evvel ısıtılmış, çizilmiş, yağlanmış ve oyulmuşlarsa (asit etkisiyle), lekelenmeye çok müsaitlerdir. İnsan vücudu likopen'i üretemez. Domates, kavun, greyfurt ve portakal da diğerlerine göre en fazla miktarda bulunmaktadır. Ancak likopen'in % 85'i domates ve domates ürünlerinde bulunmaktadır (Pastori ve ark., 1998).

Şu ana kadar domatesin içerisindeki likopen maddesiyle ilgili olarak yapılan çalışmalar, likopen'in prostat, akçiğer, mide, pankreas, kolon, rektum, yemek borusu,

ağız boşluğu, göğüs ve rahim kanserleriyle ilgili koruyucu etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Giovannucci, 1999).

1.4.2.4. Askorbik Asit (C vitamini): C vitamini, Askorbik asit olarak da bilinir, suda eritebilen ve birçok görevi olan vitamindir. Çoğu hayvanlar ve bitkiler, kendi C vitaminlerini glukozdan üretebilirler. İnsanlar, bazı meyva yarasaları, hint domuzu ve insan benzeri primatlar C vitamini üretemediklerinden bunu besinlerden almak zorundadırlar. Bütün taze sebze, meyve ve etler bir miktar C vitamini içerirler. Ancak C vitamini ısıya hassas olduğundan pişirme esnasında hızla bozunur.



Askorbikasit (C vitamini)

Şekil 1.15. Askorbikasidin molekül yapısı

Askorbik asit kimyasal olarak tanınmadan önce hastalıklarda olan ilişkisi bilinmekteydi. Askorbik asidin yetersizliğine bağlı skorbüt hastalığını Hipokrates M.Ö. 450 yıllarında diş etlerinin kangreni, diş kaybı ve askerlerin ayaklarında şiddetli ağrılar gibi belirtilerle tanımlanmıştır. İskoçyalı bir doktor olan James Lind 1753'te portakal ve limonla askerlerdeki skorbüt hastalığının önlendiğine dair deneme ve gözlemlerini yayınlamışlardır.

Askorbik asit üzerinde ilk bilimsel çalışmayı 1907'de Holst ve Frolich tarafından deneylerle başlar. Araştırmalarını sürdüren Holst ve Frolich birçok besin maddesinin ve bu arada özellikle yeşil sebze ve meyvelerin skorbüt hastlığını önleyici etkileri olduğunu bulmuşlardır. C. Funk 1912'de skorbüt hastalığının besinlerde bulunan bir faktörün eksikliği sonucu oluştuğu düşüncesini ortaya koymuş ve bu maddeye antiskobütik vitamin vermiştir. Daha sonra Drummond 1920'de antiskorbüt vitamini için vitamin C adını kullanmıştır. Zilva ve arkadaşaları (1918-1929) limondan antiskorbütik faktörünü yoğunlaştırma üzerinde yoğunlaşmışlar ve

hemen hemen saf Askorbik asit bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri belirlenerek izole edilmiştir. Zilva bu çalışmaları esnasında 2,6-diklorofenolindofenolün (2,6-DCPIP) vitamin çözeltisi tarafından indirgendiğini de bulmuştur. Zilva deneyleri sürdürürken Szent-Gyorki 1928 yılında dek bu maddenin antiskobüt vitamini olduğunu anlayamamıştır. Buluşunu yayımlamadan King bu araştırmadan habersiz heksuronik asit ile aynı olduğunu kabul ettikleri kristal maddenin limon suyundan izolasyonunu bildirmiştir. Bundan sonra birçok bağımsız araştırmacılar özellikle Tillmans, Vedder, Nelson, Harris ve Von Vargha vitaminin kimliğini saptamışlar ve glikozdan sentezini gerçekleştirmişlerdir. Askopik asit ismi Szent-Gyorki'e izafeten verilmiştir (http://wikipedia.org/wiki/C vitamini).

Askorbik asit ve vitamin C, L-ksiloAskorbik asidin günümüzde yaygın olarak kullanılan iki ismidir. Bununla beraber tarihsel gelişimi sırasında C vitamik asit, antiskorbütik vitamin, heksuronik asit, skorbutamin ve redokson olarak adlandırılmışlardır (http://wikipedia.org/wiki/C vitamini).

Askorbik asit bir monosakkarit türevi olup yapıca glikoza ve diğer altı karbonlu monosakkaritlere benzer. Renksiz, beyaz, dikdörtgen kristallerdir. Polarize ışığı sağa çevirir. Asetonda çok zor çözünür. Eter, petrol eteri, benzen, kloroform ve yağlarda çözünmez. C vitamini kimyasal olarak Askorbik asidin ışığı sola döndüren enantiyomeridir. Ticari C vitamini genelde Askorbik asit kristallerinden veya Askorbik asidin kalsiyum veya sodyum tuzlarından oluşmaktadır.

C vitamini (Askorbik asit) omurilik, akçiğer ve göz gibi pek çok hayvansal dokunun sulu bölümlerinde oldukça yüksek yoğunlukta (milimolar ve üstü) bulunur. Bazı meyveler % 1'den fazla (6 mM) içerebilir. İnsan kanı plazmasında normal olarak 0,1 mM düzeyinde bulunur. Çoğu organizma C vitaminini sentezleyebilmesine rağmen, insanlar dahil birkaçı onu diyetle almak zorundadırlar. Endiol yapısından ötürü, hayli düşük bir ilk pKa sergiler (4,2 civarında) ve buna bağlı olarak da çoğu dokularda nonanyon olarak var olur. 3-pozisyonundaki hidrojende ki en asidik olanıdır, tek elektronlu oksidasyon reaksiyonlarında çıkarılan hidrojen atomudur (http://wikipedia.org/wiki/C vitamini).

C vitaminin kesin ölçümü hem onun biyokimyasal hem de farmokokinetik özellikleri için zorunludur. Biyolojik sistemlerde askorbik asidin rolü, C vitaminin in vivo fonksiyon ve gerekleri iki faktörle birlikte ele alınmalıdır. Birincisi, C vitaminin

hem antioksidan hem de bir enzim kofaktörü olarak hareket etme yeteneği dahil biyokimyasal özellikleridir. İkincisi, bağırsakta emilmeyi, serum konsantrasyonunu, hücresel dağılımı, kullanım ve dışarı atılımı içeren farmokokinetiğidir. Askorbik asit bütün canlı dokularda bulunur. Doğada çok yaygın bulunan bu vitaminin en zengin kaynaklarını taze meyve ve sebzeler oluşturur. Meyveler arasında en çok askorbik asit içerenler; limon, portakal, greyfurt, kivi, ananas, çilek ve frenk üzümüdür. Elma, armut ve erik ise bunlara göre daha az miktarda askorbik asit içerir. Bu meyvelerden özellikle sitrus meyveleri (limon, portakal, greyfurt), kivi ve domatesin dış kısımları (kabuk) askorbik asit bakımından zengindir (http://wikipedia.org/wiki/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. Ayrıca çabuk soğutularak dondurulmuş meyveler erime sırasında doğal renk ve kokularını yitirir. Bunları dondurmadan önce saf Askorbik asit katmakla bu sakıncalar önlenebilmektedir. Bu şekilde dondurulmuş kayısı, şeftali, elma, üzüm, muz, armut, ananas gibi meyvelerde 25 yıldan beri Askorbik asit antioksidan olarak yeğlenerek kullanılır ve yaygın biçimde de gıda sanayiinde kullanılır. Sadece tek tek yanlı zincir hidroksil grubunun konfigürasyonun da değişiklik gösteren sentetik izomer eritorbik asit de kuvvetli bir antioksidandır fakat tam tersine pek az vitamin aktivitesi vardır. Bundan başka Askorbik asit birçok preparatlarında, besin ve içeçeklerin vitamince zenginleştirilmesinde kullanılır (http://wikipedia.org/wiki/C vitamini).

Askorbik asit kuvvetli bir indirgeyici ajandır; 280 mV'lik düşük bir redoks potansiyelie sahip olması onun hemen tüm diğer okside olan serbest radikallerle reaksiyona girmek termodinamik potansiyelinin varolduğu anlamına gelir.

Askorbik asit tipik peroksil radikallerle suda tepkimeye girer; daha aktif triklorometilperoksil radikaliyle 100 kat daha hızlı tepkimeye girer (Aruoma, 1993). C vitamininin vücudun çoğu dokusuna sağlamlığını veren kolajenin üretiminden alyuvarların işlemesine yol açar. Bu hastalık, halsizlik, kolayca kanayan diş etleri, ciltte morluklara neden olan deri altında küçük kanamalar, saçların kıvrılması, hiperkeratosis, eklem ağrısı, nefes darlığı ve letarji (uyuşukluk) şeklinde kendini gösterir. C vitamini eksikliğinin önemli bir erken belirtisi de bitkinliktir (http://wikipedia.org/wiki/C vitamini).

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Arum D. asırlardan beri halk arasında kullanılan bir bitkidir birçok türü bulunmaktadır ve onun iyileştirici özellikleri kanıtlanmasada Anadolu'da nefes darlığı, astım, bronşit'de göğsü yumuşatmada, balgam söktürmeye, barsak tembelliğine, sindirim sistemine, kabakulaga, yılancık hastalığına, mesane, idrar yolları hastalıklarına, sıtmaya ve özellikle basur hastalıklarına karşı kullanılmaktadır. Ülkemizin Ege, Akdeniz, Maramara, Karadeniz ve Güney Anadolu bölgelerindeki tarla ve bahçelerde, yol kenarlarında ve boş arazilerde kendiliğinden yabani olarak yetişir. 30-50 cm büyüklüğündedir. Yaprakları ok biçiminde, uzun saplı ve koyu yeşil renktedir. Baharda açan çiçekleri külah biçiminde, dişi çiçekleri alt kısımdan, erkek çiçekleri üst kısımdadır. Yaz sonunda oluşan nohut büyüklüğündeki tohumları toplu halde ve mısır kocanına benzer şekildedir. Doğu akdeniz bölgesinde *Arum D.* bitkisinin yapraklarının yemeğide yapılmaktadır. Bu bitkinin yaprakları acı bir tada sahip olup bu acı tadı gidermek için yaprakları kaynatılıp, süzülüp ve ondan sonra pişime hazırlanır. Bazı bölgelerde ise zehirli diye tüketilmemektedir (Baytop, 2002).

Bitkiler içerdikleri maddelerle insan ve hayvan sağlığı yönünden önem taşırlar. Günümüzde insan ve hayvanların tedavisinde birçok ilaç sentetik olarak üretilmekte, buna karşılık son 30-40 yılda endüstrileşmiş ülkelerde bitkisel ilaçlara doğru büyük bir yöneliş görülmektedir (Baytop, 2002). Tedavi amacıyla kullanılan bitkilerin miktarı, antik çağdan beri devamlı artış göstermektedir. Mezopotamya uygarlığı döneminde kullanılan bitkisel drog miktarı 250 civarında iken 19. asrın başlarında bilinen tipbi bitki miktarı 13000 sayısına erişmiştir. 1979 yılında Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) tarafından yapılan araştırmanın sonuçlarına göre, farmakopelerde kayıtlı olan beş ülkeden fazla ülkede kullanılan ve ticaretde bulunabilen bitkisel drogların miktarı 1900 olarak saptanmıştır. Aynı kurumun 91 ülkenin farmakopenilerine ve tıbbi bitkileri üzerinde yapılmış olan bazı yayınlara dayanarak hazırlandığı bir araştırmaya göre de tedavi amacıyla kullanılan tibbi bitkilerin toplam miktarı 20000 civarındadır (Baytop, 1999). Bitkilerin tedavi amacıyla kullanılışlarını tarif eden en eski eserler Çinlilere aittir. Shen-Nung'un ''Materia Medica'' adlı eseri M.Ö. 3217 yılında yazılmıştır. Kitapta 200'ün üzerinde tibbi bitkiden söz etmektedir (Baytop, 2002). Anadolu insanı yontmataş (Paleotilik)

çağından (M.Ö. 5000) beri bitkileri tedavi maksadıyla kullanılmaktadır. Hakkarinin hemen güneyinde yer alan Sanidar mağarası'nda ortaya çıkarılan neandertal mezarları içinde bulunan bitki örnekleri bu varsayımın sağlam kanıtlarıdır. Mezopotamya uygarlığı döneminde bilinen bitkisel drogların miktarı 250 civarındadır. Tabletlerdeki reçetelerde nane, rezene, safran, kekik, kitre, haşhaş, eğir kökü gibi droglara rastlanmaktadır (Baytop, 1999). İlaçlar ve tedaviyle ilgili en önemlisi M.Ö. 1550 yıllarında yazıldığı tahmin edilen Ebers papirüsüdür. Ebers papirüsü 77 kadar bitkisel, hayvansal ve madensel drog ve 800'den fazla reçete taşımaktadır. Acı marul, adasoğanı, ardıç meyvesi, banotu, çiğdem, hardal, incir, keten tohumu, pelinotu, safran, tarçın gibi reçetelerde ismi geçen bitkisel droglardır. Hititler M.Ö. 1500 yıllarında Orta Anadolu'da yerleşerek bir uygarlık kurmuşlardır. Hitit Devleti'nin baş sehri olan Boğazköy' de bulunan Hitit tabletlerinde kayıtlı reçetelerde adamotu, badem, haşhaş, defne, meyankökü, alıç gibi bitkiler bulunur (Baytop, 1999). Eski Yunan döneminde tedavi ve bitkisel droglar hakkında çok önemli eserler yazılmış ve bu eserler yüzlerce yıl İslam Ülkeleri ve Avrupa'yı etkilemiştir. Bu dönemde yaşayan ve hekimlerin babası olarak kabul edilen Hippocrate (M.Ö. 460-377)'in eserlerinde bulunan drogların miktarı 400 kadar olup, bunların çoğunu bitkisel kökenliler oluşturmaktadır (Baytop, 1999). Botaniğin babası olarak bilinen Theophratus'un (M.Ö, 370-287) ''Historia Plantarum'' isimli kitabında çavdar, afyon, eğrelti otu, kitre zamkı gibi bitkilere ait droglar yer almıştır (Baytop, 2002). Roma ve Bizans döneminde yaşayan Dioscorides (20-79)'in ''Materia Medica'' adlı kitabı 1500 yıl kadar tedavi alanında ve tedavi kitapları yazarlarınca ana kaynak olarak kullanılmıştır. Dioscorides'in bu eseri 5 kitapdan ibaret olup, bu eserde 500 tibbi bitkinin tarifi verilmekte ve tedavi özellikleri anlatılmaktadır. İslam yazarı tarafından Clainos ismiyle tanılan Romalı hekim Galen (130-201) hekim olduğu kadar eczacı olarak kabul edilmektedir. 500 kadar hayvansal, bitkisel ve mineral droğun tarifini yapmış ve etkilerini belirlemiştir (Baytop, 1999). İslam döneminde yaşamış olan Biruni (973-1051) Kitap al Saydada fi al-Tıp (Tıp müfreatı hakkında kitap) adlı kitabını hayatının sonuna doğru tamamlamış olup, eczacılık, droglar ve drogların müftelip dillerindeki isimleri hakkında bilgiler vermektedir. Biruni'nin bu kitabında 200 kadar bitkisel drog kayıtlıdır (karabiber, mahlep, oğulotu, sinameki gibi) (Baytop, 1999). Batı dünyasında ''Avicenna''

ismiyle tanılan 980-1037 yılları arasında yaşamış, büyük bir alim, filozof ve hekim olan İbni Sinan'ın en önemli eserlerinden biri ''Kanun Fit Tıp''dır. Bu kitap 12. yüzyılda Latince'ye çevrilmiş (Canon Mediciane Avicennae) 15. ve 16. yüzyıllarda da 36 defa basılmış, 17. yüzyılın ortalarına kadar tıp okullarında ders kitabı olarak okutulmuş ve birçok hekim yazara kaynak olmuştur. Bu kitapda 785 kadar bitkisel, hayvansal ve madensel drogun tarifi ve tibbi kullanılışları verilmiştir (Baytop,1999). Bunların ekseri kuvvetli, kokulu ve baharatlı droglardır. Kitapda ismi geçen droglar afyon, banotu, sarısabır, tarçın, demirhindi, karabiber, gibi bitkilerdir. Malagalı Ziya ettin İbn El Baytar(1197-1248)'in İspanya, Yunanistan ve Anadolu'yu gezdikten sonra yazdığı ''mufredat-ı İbni Bytar Fit-Tıp'' adlı eseri, doğuda o zaman kullanılmakta olan tibbi bitkiler hakkında çok kıymetli bitkileri ihtiva etmektedir. Eserde 1800 bitkisel ve 130 hayvansal drog bulunmaktadır (Özyurt 1986; Öztürk 1992; Baytop, 1999; Kara 2002). Amerika'nın keşfinden sonra tibbi bitkiler yeni bir takım bitkilerin ilavesiyle daha da zenginleşmiştir. Bunlar arasında, Koka (Erytroxylon coca Lam.), Kinin ağacı (Cinchona succirubra Pav.), Kakoa ağacı (Theobrama cacao L.), Hidrastis (Hydrastis canadensis L.), Senega-sütotu (Polygala senega L.) bitkileri sayılabilir. Avrupa'nın uyanış devrinde, meşhur ilim adamı Parselez bitkilerin kimyevi terkiplerini incelemeye, ihtiva ettikleri maddeyi araştırmaya başlamıştır. 19. yüzyılda ise tıbbi bitkiler üzerinde incelemeler yoğunlaşmış ve birçok ilaç sanayii kurulmuştur. Bu yüzyılda farmakognazi ilminin temelleri atılmıştır. 19. asrın ortalarında, fitokimyada hızlı ilerlemeler kaydedilirken, gilikozitler, saponinler, reçineler gibi bazı maddelerin keşifleri yapılmıştır (Baytop, 2002). (**Fitokimya:** bitkisel gıdaların içerdiği, insanın bağışıklık sistemini güçlendirdiği ve hatta dengeli beslenmeyle alındıgı taktirde çeşitli kanser risklerini azaltdığı idia edilen kimyevi maddelerin (antioksidan, vitamin, mineral, lif piğment) ortak ismidir. Bazıları; karetanoidler, e vitamini, c vitamini, selenyum, lif, likopen, izoflavon, flavonoid, resveratrol, apigenin, izotiyosiyanat, kateşin)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. 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, hekzan, aseton, $FeCl_3$, Fosfat tamponu, potasyum ferrosiyanat, trikloroasetikasit (TCA), $CuCl_2.2H_2O$, amonyum asetat, Troloks, α-Tokoferol Merck firmasından temin edildi.

3.1.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Analizlerde kullanılan cihazlar: Absorbsiyon ölçümleri için Shimadzu U.V. 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. Yağ asitlerinin analizi için Gaz kromotografik kütle spekroskopik analizleri QP Shimadzu marka 5050 model ,El (Electron Ionization detector) ve otomatik injektörlü gaz kromatografi kütle spektometresi ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada fenolik madde tayini için kullanılan cihaz DAD dedektörlü (λ_{max}=278), SLC-10 Avp Sistem kontrolörlü ve SIL-10AD vp otosampler ve LC-10 ADvp pompa sistemine sahip Shimadzu marka, kolon ise Agilent Eclipse (240x4,60 mm) 5 mikrondur.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması

Bitkiler Antalya'da toplanıp, gölgede kurutulup, değirmende toz haline getirildi ve her birinden yaklaşık 15 g alınıp sokslet kartuşuna yerleştirildi. 30 ^{o}C de metanol, aseton ve hekzan ile ayrı ayrı bu çözücülerde 6 saat ekstra edildi. Elde edilen ekstrelerin çözücülerini uzaklaştırmak için evaperatörde vakum altında 40 ^{o}C ye tabi tutuldu. Evaperasyondan sonra liyofilize edildi ve analiz yapılmak üzere 4 ^{o}C de saklandı.

3.2.2. Toplam Fenolik Madde Konsantrasyonu

Toplam fenolik madde tayini Folin-Ciocaltaeu metoduna göre yapıldı. (Singleton, Orthoter, Lamuela-Raventos, 1999). Standart olarak kullanılan gallik asit ve bitki ekstraktlarının çözeltileri metanol ve aseton içerisinde hazırlandı. Gallik asit kalibrasyon eğrisi için, gallik asidin 5 farklı konsantrasyon da (0,01-0,6 mg/mL) metanol, aseton çözeltileri hazırlandı. Bitki ekstrakların konsantrasyonu ise metanol ve asetonda mg/mL olacak şekilde hazırlandı ve her bir deney tüpüne bitki ekstrelerinden 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. Bu süre sonunda UV cihazında 750 nm'de çözeltilerin absorbansları okundu. Aynı işlemler kalibrasyon eğrisi için hazırlanmış farklı konsantrasyonlardaki gallik asit çözeltilerine de uygulandı. Ekstrakt çözeltilerinin absorbansları, çizilen gallik asit kalibrasyon eğrisinden okunarak toplam fenolik madde konsantrasyonunu eşdeğer gallik asit olarak hesaplandı (mg/mL GAE).

3.2.3. DPPH• (1,1-Diphenly-2-picrylhydrazyl) Radikal Süpürme Etkisi

Sanchez-Moreno (1998) metodu esas alınarak yapılmıştır. Ekstre edilmiş droglarından ve sentetik antioksidan BHT ve BHA ile metanol de, asetonda ve hekzanda (2-0,001 mg/mL) 12 farklı ekstrakt çözeltileri hazırlandı. DPPH'ın

kalibrasyon eğrisi için farklı konsantrasyonlarda (6.10^{-5}-$0,25.10^{-7}$ M), metanol, aseton ve hekzanda çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan drog çözeltilerinden 0,5 mL alınarak her birinin üzerine 3 mL DPPH çözeltisi (6.10^{-5} M) ilave edildi. Kuvvetlice karıştırılıp ağzı kapatıldıktan sonra 30 dk. süre ile karanlıkta bekletildi. Bu sürenin sonunda her bir karışımın absorbansları spektrofotometrede 517 nm'de okundu. Her bir bitkinin ayrı ayrı inhibisyon değerleri aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı;

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

Bu değerlerden ve DPPH'ın kalibrasyon eğrisinden yararlanarak her bir bitki için DPPH serbest radikalinin yarısının süpürüldüğü andaki bitki ekstresi konsantrasyonu (IC_{50}) değerleri hesaplandı. Sentetik antioksidan olan BHT ve BHA ile kıyaslandı.

3.2.4. CUPRAC Metodu ile Antioksidan Aktivite Tayini

Bu analiz Apak ve ark. (2006) yöntemine göre yapılmıştır. İçerisine sırasıyla 1 mL 10^{-2} M $CuCl_2$, 1 mL $7,5x10^{-3}$ M Nc ve 1 mL 1 M NH_4Ac konulup çalkalanan tüplere, bitki ekstrelerinden (0,1 mg/mL)(duruma göre eğer yüksek absorbans verirse ona göre bitki ekstrelerine gerekli seyreltme yapılmalı) 0,5 mL eklenip üzerine (Bitki ekstrelerinden alınacak hacmi çok yüksek absorbans değeri vermeyecek şekilde seçiyorsunuz, 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. Troloksun metanol ve asetonda kalibrasyon grafiği çizildi (0,01-0,5 mg/mL). Ardından her bitkinin troloks eşdeğeri cinsinden antioksidan kapasiteleri grafikteki denklemden hesaplandı (TEAK mg/mg bitki esk.).

3.2.5. 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 uzklaştırıldı. 100 mL deiyonize suda çözüldü. Şiddetli şekilde karıştırıldı. Kontrol çözeltisi içinde aynı işlemleri tekrarlandı. Numunelerin ve karıştırılmak üzere hazırlanan sentetik antioksidan konsantrasyonu 2 mg/mL olacak şekilde metanol ve aseton 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)/120

Burada; ln=doğal logaritma, a= başlangıc absorbansı, b= 120 dakika inlübasyondan sonraki absorbansı

AA; antioksidan aktivite eşitliği

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

3.2.6. İndirgeme Gücü

Arum D. indirgeme gücü Oyaizu (1986) metodu ile belirlendi. Drogların 5 farklı konsantrasyon da metonol ve aseton çözeltileri hazırlandı (4-0,25 mg/mL). Hazırlanan her bir çözeltiden deney tüplerine 2,5 mL numune alındı. Her birinin üzerine 200 mM 2,5 mL fosfat tamponu ve 2,5 mL %1'lik potasyum ferrosiyonad çözeltisi ilave edildi. Tüpler 45 ^{0}C'de 20 dk. boyunca su banyosunda inkübe edildi. Daha sonra 2,5 mL %10'luk trikloroasetikasit (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. 1 mL %0,1'lik $FeCl_3$ ilave edildikten sonra oluşan yeşil renkli çözeltilerin absorbansı spekrofotometride 700 nm' de ölçüldü.

3.3. Kromatografik Analizler

3.3.1. Bitki Ekstraklarındaki Yağ Asitlerinin Bileşiminin GC-MS Analizi

Arum D. ekstraklarından 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 proğramı 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 kromotoğrafin taşıyıcı gaz olan helyumun akış hızı 10 psi/dak., olarak ayarlanmıştır. Kütle analizleri için kütüphane taramaları Wiley, Nist, Tutor programları ile gerçekleştirilmiştir.

3.3.2. Bitki Ekstraklarındaki Fenolik Bileşiklerin HPLC Analizi

3.3.2.1. Materyal

Çalışmada kullanılan standart fenolik maddeler, Gallik asit, kateşin, kafeik asit, epikateşin, p-kumarik asit, ferulik asit, viteksin, rutin, naringin, hesperidin,

apigenin-glukozit, rosmarik asit, eriodiktiol, kuersetin, naringenin, luteolin, apigenin ve karvakrolün her biri sigma Aldrich firmasından temin edildi. Analizde kullanılan cihaz DAD dedektörlü ($_{max}$: 278), SCL-10Avp Sistem kontrolörlü ve SIL-10AD vp otosampler ve LC-10Advp pompa sistemine sahip Shimadzu marka, kolon ise Agilent Eclipse XDB (240x4,60 mm) 5 mikrondur.

3.3.2.2. Yöntem

Bitki ekstraklarındaki fenolik bileşiklerin HPLC analizi için öncelikle 15 farklı fenolik bileşikler 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. Mobil faz olarak iki farklı çözücü kullanıldı. A: %3 asetik asit, B: Metanol, Akış hızı: 0,8 mL/dakika ve kolon sıcaklığı 30 ^{0}C'dir. Öncelikle standart fenolik maddelerin enjeksiyonu yapıldı. Elde edilen standard kromatograma bağlı olarak numune injeksiyonları yapıldı. Analiz 75 dakikada gerçekleştirildi. Sonuçlar mikrogram/gram olarak %95 güven aralığı ile verildi.

4. DENEYSEL SONUÇLAR

Geçtiğimiz yüzyılın sonlarına doğru tekrardan bitki ve meyvelerin öneminin artması ile bu konuda pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların artmasına paralel olarak bitki ve meyvelerin tedavi amaçlı kullanımında da artış gözlendi. Bitkilerin bu tedavi edici özelliği antioksidan madde ihtiva etmelerindendir. Çünkü antioksidanlar insan metabolizmasında oluşan radikallerin süpürülmesinde kullanılmaktadır. Bu nedenle gıda sanayinde de son derece önemli maddelerdir ancak son yıllarda sentetik antioksidanların insan metabolizması için zararları tespit edilmiş ve başka zarar vermeyen moleküller aranmaya başlanmıştır. Bunların arasında özellikle bitkisel ve meyve kaynaklı flavonoid, karatenoid ve fenolik bileşiklere vardır. Son yıllarda bitkilerin ihtiva ettikleri bileşiklere tanımlanması için çeşitli spektrokskopik ve kromotografik yöntemler geliştirilmiş ve kateşin, gallik asit, rutin, kuersetin gibi pek çok antioksidan madde tayin edilmiştir. Ancak bu yöntemler pahalıdır ve moleküller tanımlandıktan sonra kuvvetli antioksidan özellik gösterip göstermeyyeceği tam olarak belirlenemez. Çünkü bazı antioksidanlar bitkinin ihtiva ettiği diğer moleküllerle etkileşime girerek sinerji etkisi oluşturur ve antioksidan aktivitesini değiştirir. Bu yöntemlerin yanı sıra daha ucuz, kolay ve kesin sonuç veren toplam antioksidan aktivite tayini, toplam indirgeme kapasitesi, $DPPH^{\cdot}$, β-karoten yöntemi, Cuprak yöntemi, toplam flavonoid ve buna benzer yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır. Bu tez araştırmasında da yukarıda sayılan metotlar kullanıldı ve sonuçlar kuvvetli antioksidan özellik gösteren BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks gibi antioksidan ve antiradikal aktiviteleri bilinen standart antioksidanlar ile karşılaştırıldı.

4.1. Toplam Fenolik Madde Tayini

Fenolik yapılı maddeler en önemli antioksidan bileşiklerdir. Fenollerin yapısı bakımından bakıldığında fonksiyonel grupların etkinliğinden dolayı elektron ve hidrojen verebilirler bu da radikalleri ve oksitliyici grupları elimine eder. Fenolik gruplar OH grubunca zengindir, bu gruplar ona polar olma özelliği katar ve antioksidan özelliğini artırır. Daha önce yapılan çalışmalarda fenolik bileşiklerin lipit

peroksidasyonunu stabilize edilmesinde önemli etkileri olduğu saptanmıştır (Yen ve ark., 1993). Fenolik bileşikli gıdalarla beslenmek kalp rahatsızlığı riskini azaltdığı gibi aterosklerosiz (damar tıkanıklığı) oluşum sürecini atioksidan aktivite göstererek yavaşlattığı bazı çalışmalarda tespit edilmiştir.

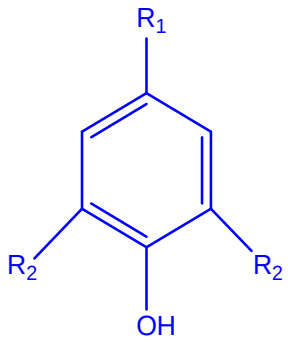
Toplam fenolik madde tayininde Folin ($(PMoW_{11}O_{40})^{4-}$, Molibdo-fosfo-tunstat) reaktifinin 1 elektron alması sonucu Mo(VI), Mo(V)'e indirgenerek mavi renkli türler oluşur. Reaksiyonda basit olarak burada elektronun Mo(VI)'e aktarıldığı düşünülür:

$$Mo(VI)\ (sarı) + e^- \rightarrow Mo(V)\ (mavi)$$

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

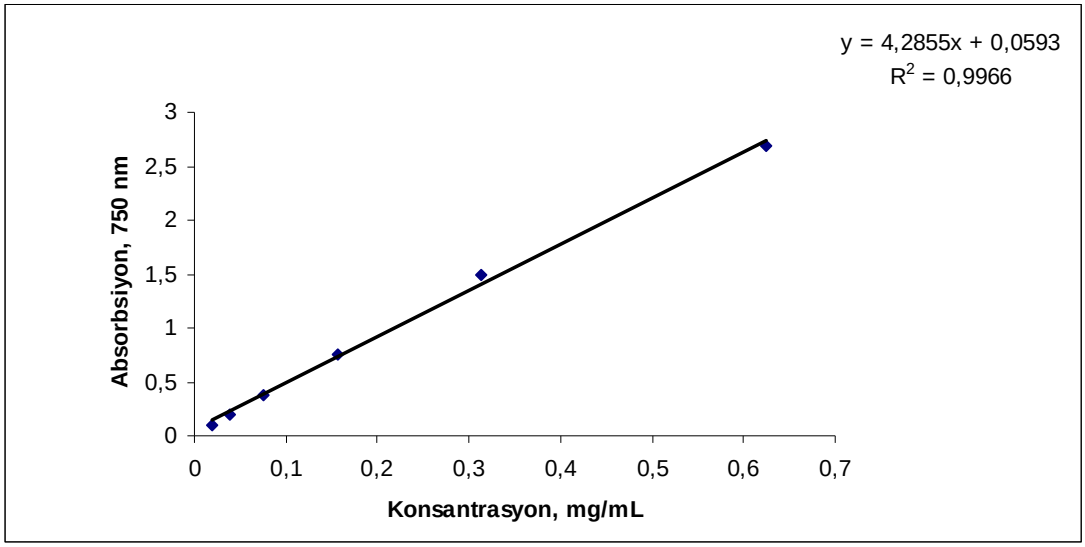
$$Ar\text{-}OH \rightarrow Ar\text{-}O(-) + H^+$$

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



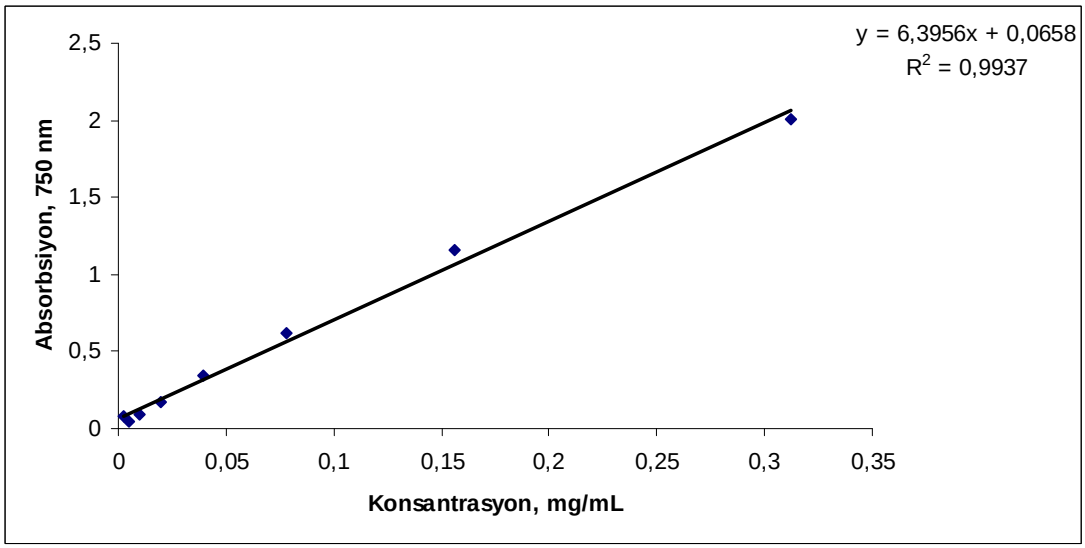
Şekil 4.1. Gallik asit: R_1= -COOH, R_2,R_3= - OH

Toplam fenolik madde tayini Folin-Ciocaltaeu metoduna göre yapıldı. Standart olarak kullanılan gallik asit ve bitki ekstraklarının çözeltileri metanol ve aseton içerisinde hazırlandı. Gallik asit kalibrasyon eğrisi için, gallik asidin beş farklı konsantrasyonda metanol ve aseton çözeltileri hazırlandı.



Şekil 4.2. Metanollü eşdeğer gallik asit kalibrasyon eğrisi grafiği.

Arum D. ekstraktlarında bulunan toplam fenolik bileşiklerin konsantrasyonları Şekil 4.2 ve 4.3 de verilen gallik asitin metanol ve aseton çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerinden elde edilen grafik denklemlerinden gallik asite eşdeğer olarak hesaplandı. Elde edilen grafiğin denklemi metanol çözeltisinde y = 4,2855x +0,0593 iken aseton çözeltisinde eğri denklemi y = 6,3956x + 0,0658 olarak bulundu.



Şekil 4.3. Aseton'lu eşdeğer gallik asit kalibrasyon eğrisi grafiği.

Tablo 4.1. de verilen sonuçlara göre *Arum D.* metanol ekstraktratı aseton ekstraktına yüksek miktarda fenolik madde içerdiği gözlendi. Bunun sebebi metanolün yüksek polaritesi bitkiden yüksek derecede fenolik bileşiğin ve flavonoid madde ekstrakte edilmesini sağladı. Aseton ise metanolden daha düşük polariteye sahip olmasından dolayı daha düşük miktarda fenol ve flavonoid ekstraksiyonu ile sonuçlandı. Toplam fenolik madde tayini yöntemi *Arum D.*'nin metanol ve aseton ekstraktları için olumlu sonuç verirken hekzan ekstraktı sistemde bulununan su ile faz oluşturduğu için hekzan ekstraktı ile çalışılamamıştır.

Tablo 4.1. *Arum D.* ekstraktlarının (mg/mL) gallik aside eşdeğer konsantrasyonları

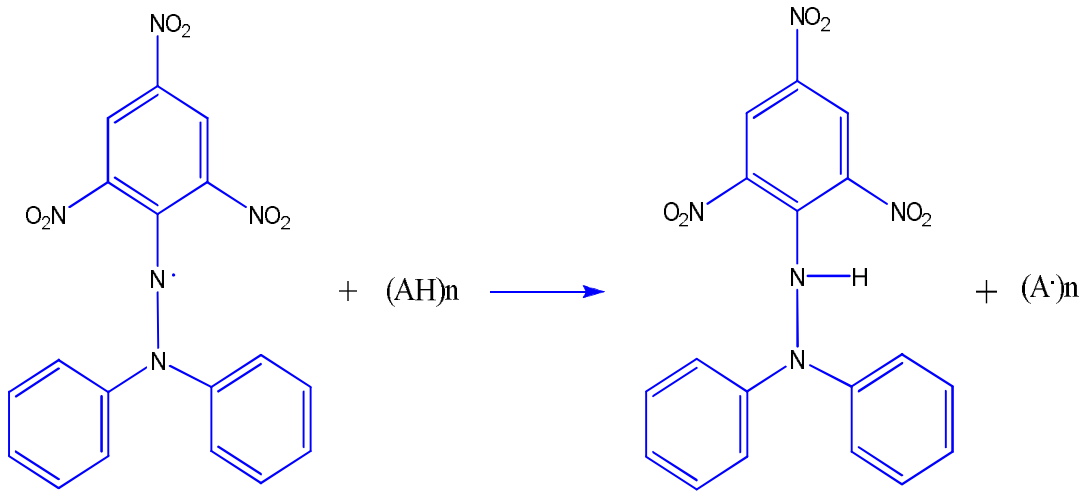
Bitki	**Metanol ekstraktı**	**Aseton ekstraktı**
mg/ml GAE	0,05	0,033

4.2. DPPH• Serbest Radikal Giderme Aktivitesi Sonuçları

Antioksidan bileşiklerinin, radikal giderme aktiviteleri biyolojik sistem ve gıda sanayi açısından büyük öneme sahiptir. Serbest radikallerin fazla oluşumu özellikle lipit peroksidasyonunu hızlandırır. Buda gıdalarda istenmeyen bir durum insanda bazı hastalıklara sebep olur. Bu hastalıkların başında erken yaşlanma, kanser, unutkanlık ve birçok hastalığın kaynağıdır. Bu nedenle pekçok hastalığa neden olan serbest radikalleri etkisiz hale getirdiği için antioksidan maddelerin önemi çok büyüktür.

DPPH• radikali uzun ömürlü bir azot radikalidir. Antioksidan maddelerin radikal giderme aktivitelerini belirtmek için en sık kullanılan bileşiklerdendir (Özçelik ve ark., 2003). Bu metotda DPPH• radikalinin indirgenmeden önce rengi koyu mor renkde olup antioksidan maddeler tarafından indirgendiğinde ise açık pempemsi renge dönmektedir. Buda 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 absorbsiyon vermekte iken indirgendiği zaman 517 nm'den kayma gösterirken antioksidan miktarına bağlı olarak absorbsiyonda düzenli bir azalma meydana gelir. Şekil 4.4. verilen reaksiyonda gösterildiği gibi radikal gideren antioksidan veya antiradikal türlerin $(AH)_n$ varlığında DPPH• radikali DPPPH-H formuna dönüştürülmüştür. Ancak DPPH• yöntemi basit olmasına karşın bazı dez avantajları vardır. Birçok antioksidan bileşik lipit peroksidasyonunda rol oynayan peroksil radikalleri ile çok hızlı tepkime vermektedir, ancak DPPH• ile yavaş tepkime vermektedir.



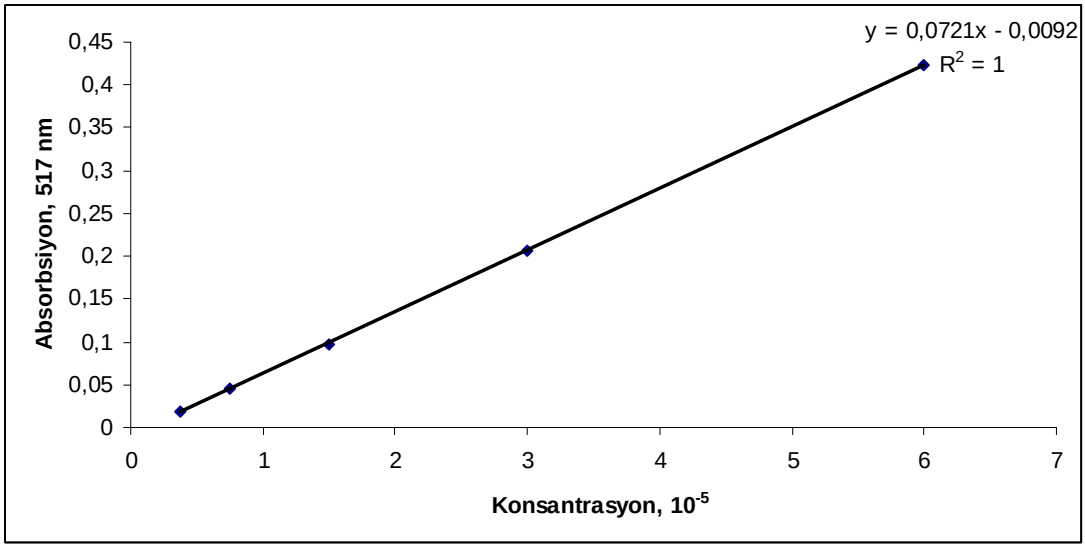
DPPH· DPPH-H

Şekil 4.4. Bir antioksidan tarafından DPPH• radikalinin indirgenmesi

*Arum D.*nin metanol, aseton ve hekzan ekstrakstları ile BHA ve BHT gibi standart antioksidan bileşiklerin DPPH• radikal giderme aktivite tayini için DPPH'in farklı çözücülerde kalibrasyon eğrileri çizildi (Şekil 4.5.). Elde edilen grafikler denklemleri metanol, aseton ve hekzan için de aynı olmakla birlikte denklem y = 0,0721x – 0,0092'dir. DPPH'in kalibrasyon eğrisinden *Arum D.*nin metanol, aseton ve hekzan ekstrakstları ile BHA ve BHT'nin IC_{50} değeri olarak ifade edilen DPPH radikal konsantrasyonunun yarıya düşüren ekstrakt yada standardın miktarı hesaplandı ve her biri için IC_{50} değerleri Tablo 4.2.' de verildi.

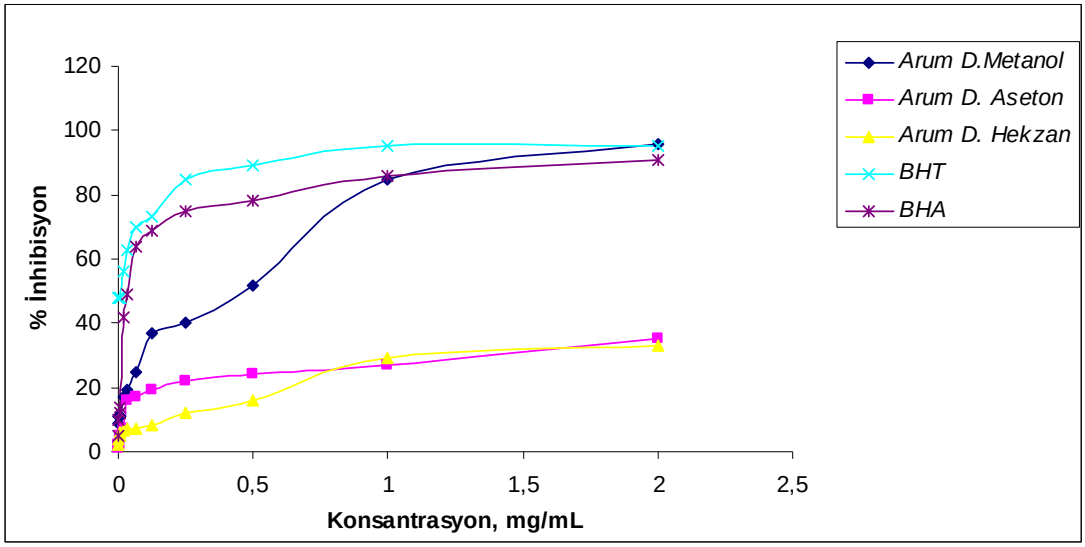
Tablo 4.2. *Arum D.* ekstraktaları ile sentetik antioksidanlara (BHA ve BHT) ilişkin IC50 değerleri

Mg/ml	Metanol ekstraktı	Aseton ekstraktı	Hekzan ekstraktı	BHA	BHT
IC_{50}	0,5	2,85	3,03	0,035	0,015



Şekil 4.5. DPPH radikalinin metanol, aseton ve hekzandaki ortak kalibrasyon eğrisi

*Arum D.*nin metanol, aseton ve hekzan ekstrakstları ile BHA ve BHT'nin farklı konsantrasyonları (0,1-2 mg/ml aralığında) için DPPH radikalini süpürme aktivitesi belirlendi. Bu amaçla elde edilen absorbsiyon değerlerinden her bir konsantrasyondaki inhibisyon değerleri hesaplanarak konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlardaki metanol'de çözünmüş *Arum D.* (2-0.001 mg/mL) DPPH serbest radikal giderme aktivitelerinin birer standart olan antioksidan olan BHA ve BHT ile kıyaslanması (λ = 517 nm' maksimum).

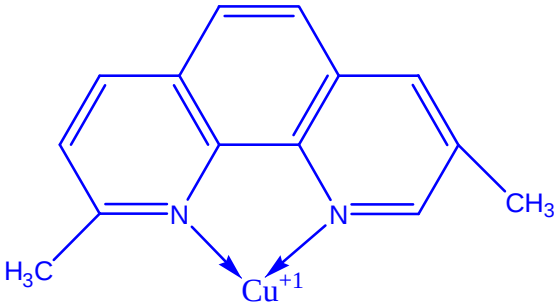
Arum D. nin metanol, aseton ve hekzan ekstraktının DPPH radikal giderme aktivitesi Şekil 4.6.'da görüldüğü gibi konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artmaktadır. DPPH radikal giderme aktivite değerleri metanol ekstraktının aseton ve hekzan ekstraktıyla kıyaslandığında büyük fark görülmektedir

Şekil 4.6.' daki standartların 2 mg/mL konsantrasyondaki DPPH radikalinini giderme yüzdelerinden (% inhibisyon) anlaşıldığı gibi *Arum D.* ekstraktları ile BHA ve BHT standartları şu şekilde DPPH• radikali giderme aktivitesi sergilediler; metanol ekst.>BHT>BHA>aseton ekst.>hekzan ekst. Bu değerler sırasıyla %96, %95, %91, %35, %33 olarak hesaplandı. *Arum D.*'nin metanol ekstraktı hem standart antioksidanlardan hem de diğer ekstraktlardan daha yüksek radikal giderme aktivitesi gösterirken hekzan ve aseton ekstraktı düşük aktivite göstermekle birlikte birbirine yakın değerde % inhibisyon değeri verdi.

Arum D. nin ekstraktları arasında en yüksek aktivite gösteren metanol ekstraktı olduğu belirlendi. Metanol, aseton ve hekzana göre daha güçlü polar bir çözücü olduğu için hekzan ve asetonun çözebileceğinden daha fazla flavonoid ve polifenol bileşiği çözündüğünden dolayı yüksek radikal süpürme etkisi gösterdi. İkinci yüksek aktivite gösteren metanolden daha az polar ancak hekzandan az da olsa daha polar olan aseton oldu. Polaritesine bağlı olarak hekzan ise en düşük radikal giderme aktivitesi gösterdi.

4.3. Cuprac Yöntemi Sonuçları (Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Tayini Sonuçları)

Cu(I)-Nc "bakır(I)-neokuproin şelatı" , Cu(II)-Nc reaktifinin indirgenmesi sonucu oluşur (Şekil 4.7).



Cu(I)-Nc

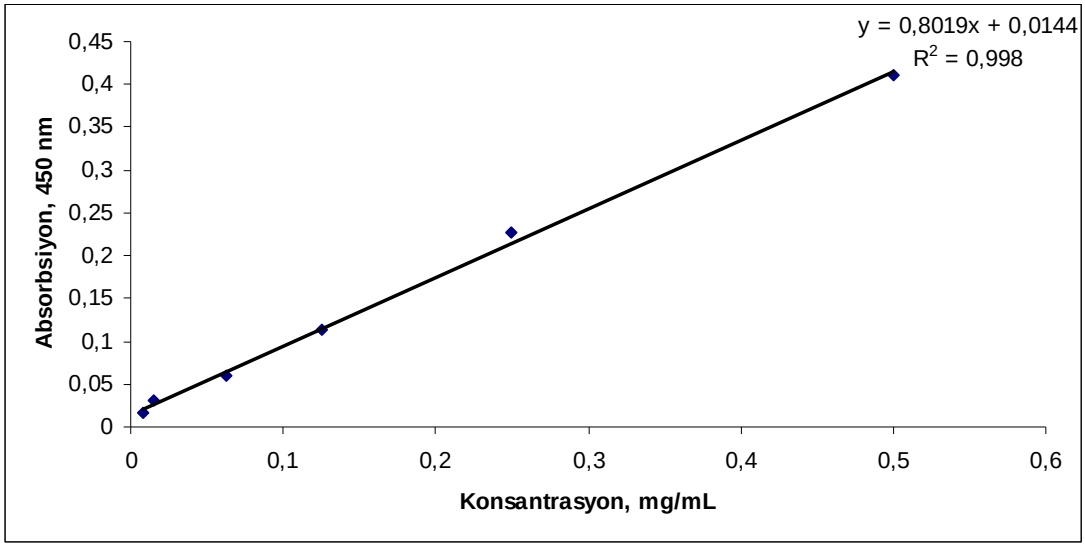
Şekil 4.7. Bakır(I)-neokuproin şelatı

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

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

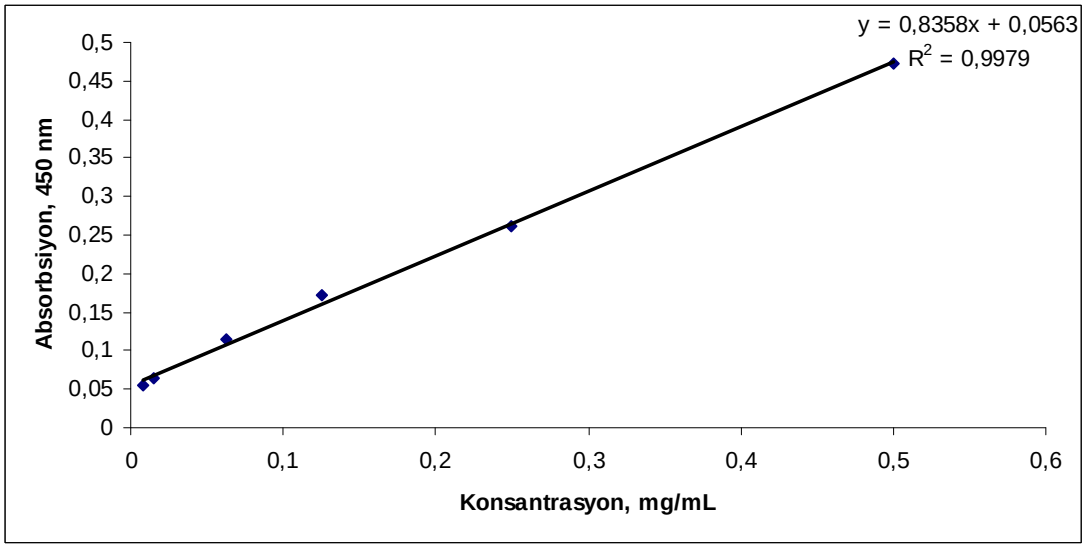
Bu reaksiyonda $Ar(=O)_n$, hidroksi grubu içeren antioksidan polifenolden oluşan kinonu ifade etmektedir. Tepkime sonunda 2 proton açığa çıkmakta ve $Ar(OH)_n$ grubu antioksidan bileşikler kinona dönüşmektedir.

Cu(II) klorür çözeltisi, neokuproin çözeltisi ve amonyum asetat (pH=7 tamponu) çözeltilerinin karıştırılmasından sonra, üzerine tayin edilecek antioksidan çözeltisi (direkt veya asit 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 oluşuyla birlikte Cu(I)-Nc kelatına dönüşmektedir. Bu reaksiyonda, n-OH grublu antioksidan bileşik 2n e^- donör olarak hareket etmektedir (Apak ve ark., 2004).



Şekil 4.8. Cuprac yöntemi ile elde edilen metanol'lü standart troloksun kalibrasyon grafiği, (λ = 450 nm' maksimum).

Cuprac yönteminin *Arum D.* ekstraktlarında bulunan toplam fenolik bileşiklerin konsantrasyonları Şekil 4.8. ve 4.9.' de verilen troloksun 450 nm'deki metanol ve aseton çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerinden elde edilen grafik denklemlerinden troloksa eşdeğer olarak hesaplandı. Elde edilen grafiğin denklemi metanol çözeltisinde y = 0,8019x + 0,0144 iken aseton çözeltisinde eğri denklemi y = 0,8358x + 0,0563 olarak bulundu.



Şekil 4.9. Cuprac yöntemi ile elde edilen aseton'lu standart troloksun kalibrasyon grafiği, (λ = 450 nm' maksimum).

Tablo 4.3. de verilen sonuçlara göre *Arum D.* metanol ekstraktraktı aseton ekstraktına yüksek miktarda fenolik madde içerdiğinden daha fazla kuprik iyonunu kupröze indirgeyerek TEAC miktarının metanolde asetona göre yüksek olduğu gözlenmiştir

Tablo 4.3. *Arum D.* ekstraktların troloksa eşdeğer konsantrasyonlarının ($CUPRAC_{TEAK}$ değerleri) karşılaştırılması

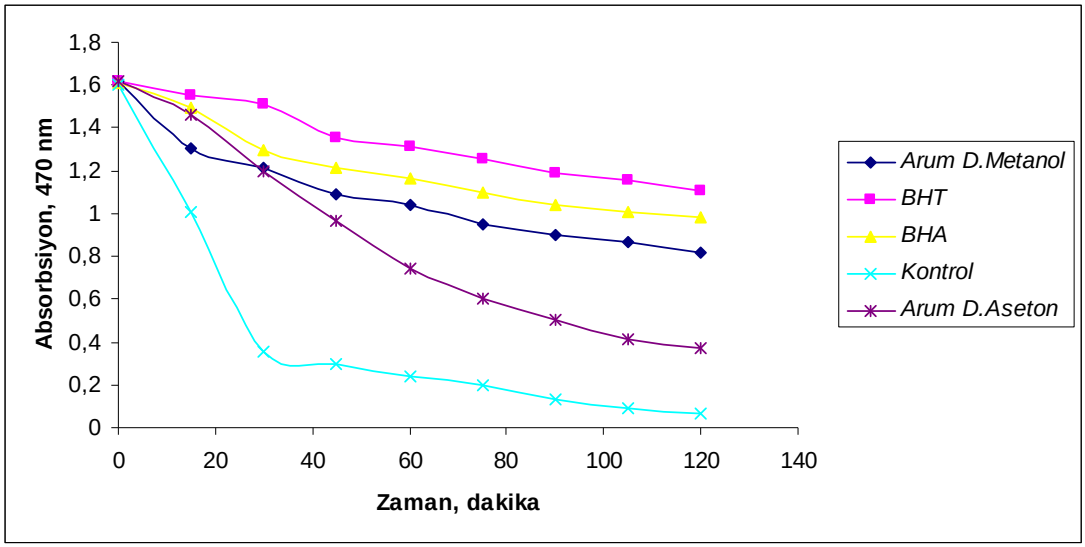
Konsantrasyon (mg/ml)	**Metanol ekstraktı ($CUPRAC_{TEAK}$)**	**Aseton ekstraktı ($CUPRAC_{TEAK}$)**
1 mg	1,55	1,36

Cuprac yöntemi *Arum D.*'nin metanol ve aseton ekstraktları için olumlu sonuç verirken hekzan ekstraktı sistemde bulununan su ile faz oluşturduğu için hekzan ekstraktı ile çalışılamamıştır. Yapılan diğer antioksidan aktivite ve deneylerde diğer uyguladığımız yöntemlerin sonuçlarına göre parelel sonuçlar gözlenmiştir.

4.4. 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, 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 (Kulisic ve ark., 2004). β-karoten lineolik asit sisteminde test süresi 120 dakika boyunca sarı rengin solmasını önlenmesi yüksek potansiyel antioksidan varlığını göstermektedir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. β-karoten lineoleik asit emülsiyon sistemindeki 2 mg/mL metanollü ve asetonlu *Arum D,* BHA ve BHT zaman karşı absorbsiyon değişim grafiği. (λ=450 max.)

Bu yöntemle *Arum D.*'nin metanol, aseton estraktlarının antioksidan aktiviteleri ölçülüp, sentetik antioksidan olan BHA, BHT'nin antioksidan aktiviteleri ile karşılaştırıldı. Bu amaçla aşağıdaki formülü kullanılarak herbir ekstrakt ve standart için AA değerleri hesaplandı.

R= ln(a/b)/120 dak.

$$AA=\left[\frac{R_{kontrol}-R_{numune}}{R_{kontrol}}\right]X100$$

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

Tablo 4.4. *Arum D.* ekstraktaları ile sentetik antioksidanlara (BHA ve BHT) ilişkin % inhibisyon değerleri ve absorbans değişim oranları

	Metanol ekstraktı	**Aseton ekstraktı**	**BHA**	**BHT**
AA değerleri	78	52	84	87

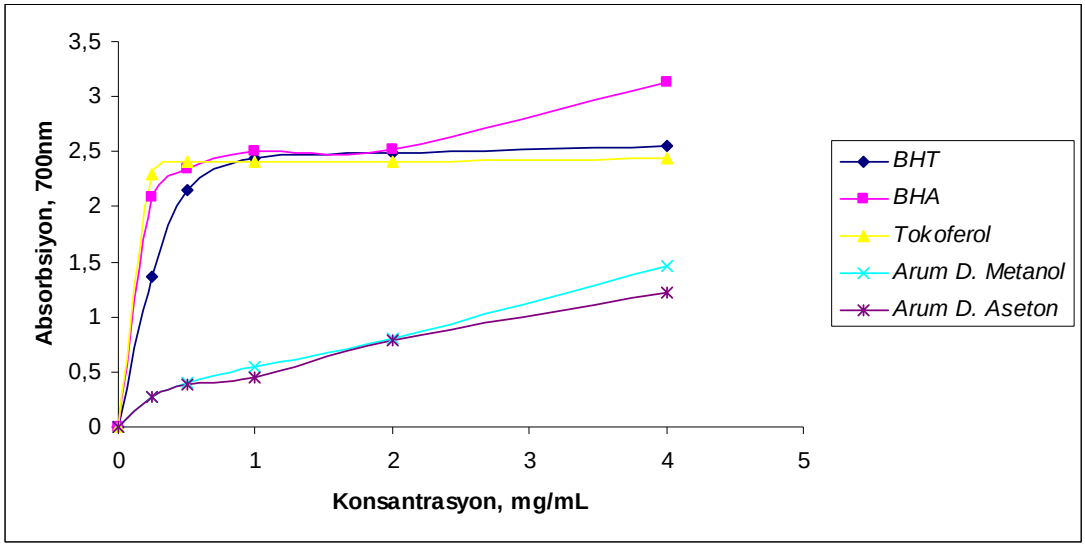
Yapılan β-karoten lineoleik asit emülsiyon sistemi yönteminde *Arum D.*'nin metanol ekstraktı asetona göre yüksek antioksidan aktivite gösterdi. Bu sonuç bize metanol daha yüksek antioksidan molekül içerdiği yönde fikir verir. Ekstraksiyon sırasında metanolün daha çok antioksidan molekülü ekstra etdiği, asetonun ise daha az antioksidan molekül ekstra ettiği görüldü ($\beta eta_{metanol} > \beta eta_{aseton}$). β-karoten lineolik asit emulsiyon sisteminde hekzan ekstraktının çözücüsü olan hekzan sistemdeki su ile karışmadığı için analiz gerçekleştirilememiştir.

4.5. İndirgeme Gücü Oyaizu Metodu

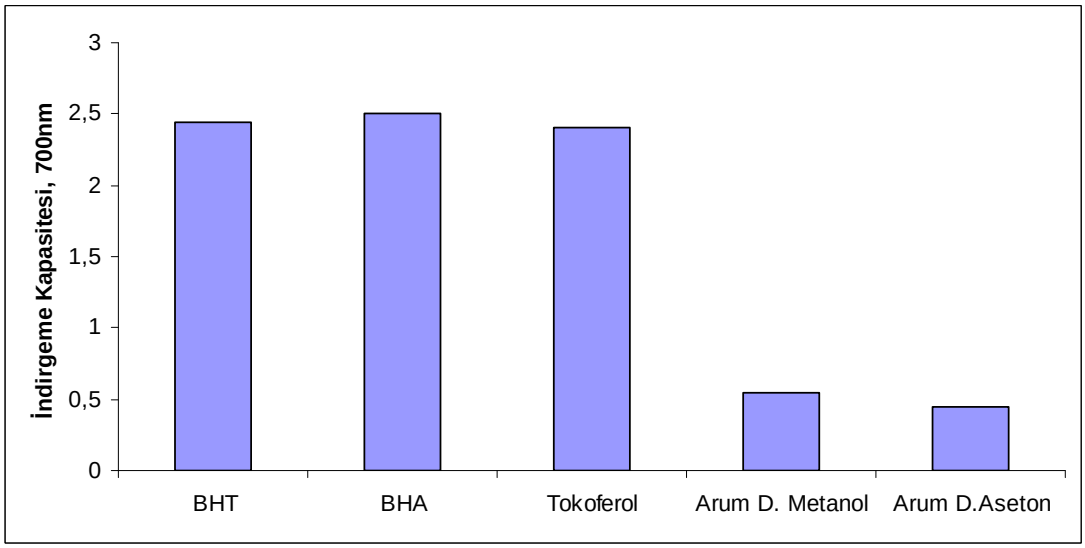
Oyaizu metodunda çözeltinin sarı rengi ortamda bulunan antioksidan maddelerin indirgenme aktivitelerinden dolayı farklı tonlardaki yeşil rengine dönüşmektedir (Gülçin 2006; Gülçin ve ark., 2006). Antioksidan madde varlığında ferriksiyanit (Fe^{3+}) kompleksi ferriksiyanit(Fe^{2+}) kompleksi olan ferröz 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 Tuba, 2006).

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

Çalışmada kullanılan *Arum D.* indirgeme kapasitesi de radikal süpürmesi gibi *Arum D.* konsantrasyonun artması ile doğru orantılı olarak artmaktadır. İndirgeme kuvveti metanol ve asetonda 4-0,25 mg/mL konsantrasyonundaki çözeltilerin absorbansları ölçülerek belirlenmiştir (Şekil 4.11). Aşağıdaki taploda metanol ve aseton ekstraktları ile BHA, BHT ve tokoferol'ün indirgeme gücünü gösteren absorbsiyon grafiği şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.11. Farklı konsantrasyonlardaki metanollü ve asetonlu *Arum D.* ekstraktının(4-0,25 mg/mL) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan BHT, BHA ve α-tokoferol ile karşılaştırılması.



Şekil 4.12. *Arum D.* nin metanol ve aseton ekstraklarının BHT, BHA ve Tokoferolle indirgeme kapasitesinin kıyaslanması (2 mg/mL).

Şekil 4.12.'de görüldüğü gibi *Arum D.* ekstraktları standart antioksidan olan BHT, BHA ve α-tokoferol'den daha düşük bir antioksidan etki (indirgeme kapasitesi) göstermiştir. Bunun metanol ve asetonun ekstraktı karşılaştırıldığında 2 mg/mL konsantrasyonda indirgeme kuvvetinin metanol ekstraktında asetona göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Yine hekzan ekstraktı ile indirgeme kuvveti tayin deneyi gerçekleştirilememiştir.

4.6. GC-MS ile Yağ Asidi Analizi

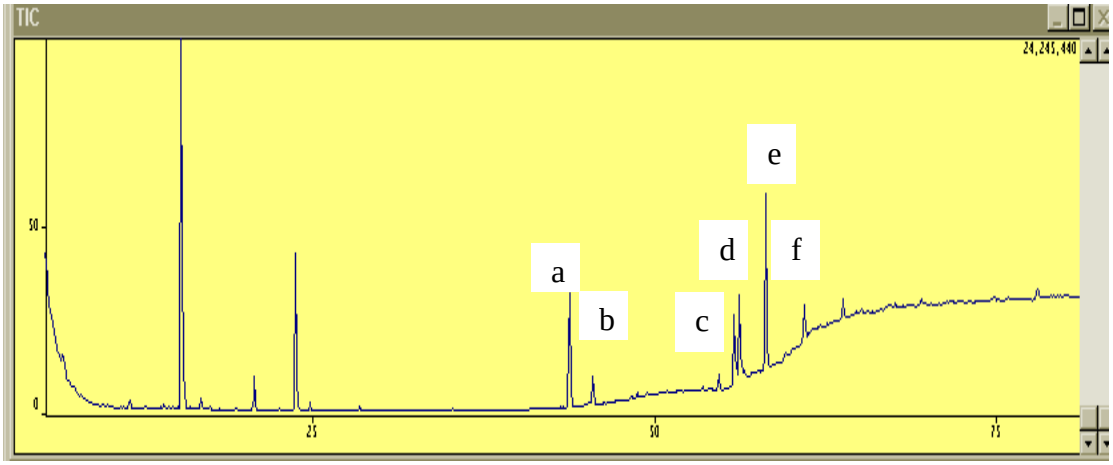
Arum D. ekstraktlarında bulunan yağ asitleri ve diğer bazı kimyasal bileşimi gaz kromatografisi kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir (Şekil 4.13; 4.14; 4.15). Bu amaçla yapılan analizden elde edilen sonuçlardan yağ asitlerinin karbon bileşimi 10-18 arasında değişiklik göstermiştir. Bununla birlikte yağ asitleri doymuş, doymamış tekli ve doymamış çoklu çift bağlarıda belirlenerek her birinin total miktarları da % oran şeklinde Tablo 4. 5 ve 4.6'da verilmiştir. Tüm ekstraktlarda yüksek oranda C 16:0 ve C 18:2 linoleik asite rastlanmıştır. En az ise C 14:0 mistirik asit, C 10:0 ve C 12:0 yağ asit'tir.

Doymuş yağ asitleri (SFA) bakımından en zengin ekstrakt % 28,08 oranıyla aseton, tekli doymamış yağ asidi (MUFA) bakımından en zengin % 17,03 hekzan ve çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) bakımından metanol, aseton ve hekzan birbirlerine yakın miktarda yağ asidi tayin edildi. (sırasıyla 21,15, 26,2, 33,46). Hekzan ekstraktı ise % 13,06 oranıyla tekli doymamış yağ asidi bakımından zengindir. Analiz esnasında gerçekleştirilen kütle kütüphane taramasında elde edilen piklerden yağ asitlerinin dışında farklı asitlere daha rastlandı. Bunlardan yalnızca hekzan ekstraktında etanedioik asit dimetilester, propanedioik asit dimetil ester ve diğer metanol ve aseton ekstraktta da levulinik asit metil ester, hepta 2,4-dieonic asit metil ester, Bütanedioic asit dimetil ester ve sadece aseton esraktında bulunan hekzadecanoik asit 2- hidroksimetil ester tayin edildi (Tablo 4.5).

Araştırılan *Arum D.*'nin metanol, aseton ve hekzan ekstraklarında yağ asidi bileşiminde 9 farklı yağ asidinin bulunduğu belirlenmiştir. Bileşimlerdeki yağ asitlerinin karbon sayıları 10-18 arasında değişiklik göstermektedir (Tablo 4.6). *Arum D.* ekstraklarını yağ asidi bileşimleri incelendiğinde en yüksek yüzdeye sahip, yağ asidinin hekzan estraktında olduğu C 18:2 (linoleik asit) ve %27,02 olduğu tesppit edilmiştir. C 18:2 (linoleik asit) aseton estraktında % 21,90, metanol estraktında ise %18,03 olarak belirlenmiştir.

Arum D. türünün ikinci en büyük yüzdeye sahip yağ asidi palmitik asittir (C 16:0). Palmitik asidin metanol, aseton ve hekzan estraklarındaki yüzdeleri sırasıyla %16,11, %23,60, %24,53 olarak belirlenmiştir.

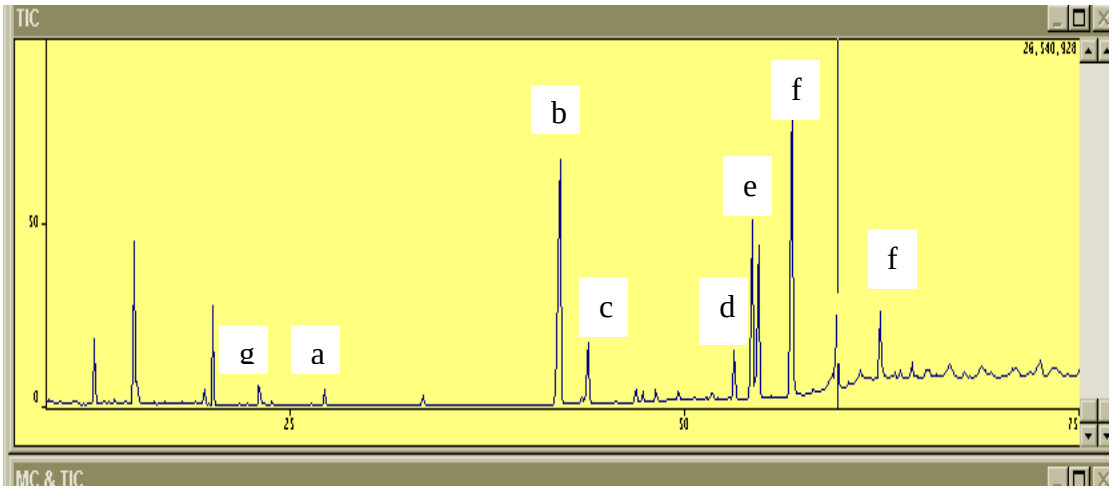
Arum D. üçüncü en yüksek yüzdeye sahip yağ asidi olan C 18:1 oleik asit olduğu tespit edilmiştir. (C 18:1) Oleik asit metanol estraktında % 8,18, aseton ekstraktında %12,39, hekzan ekstraktında %13,06 olduğu tespit edilmiştir.



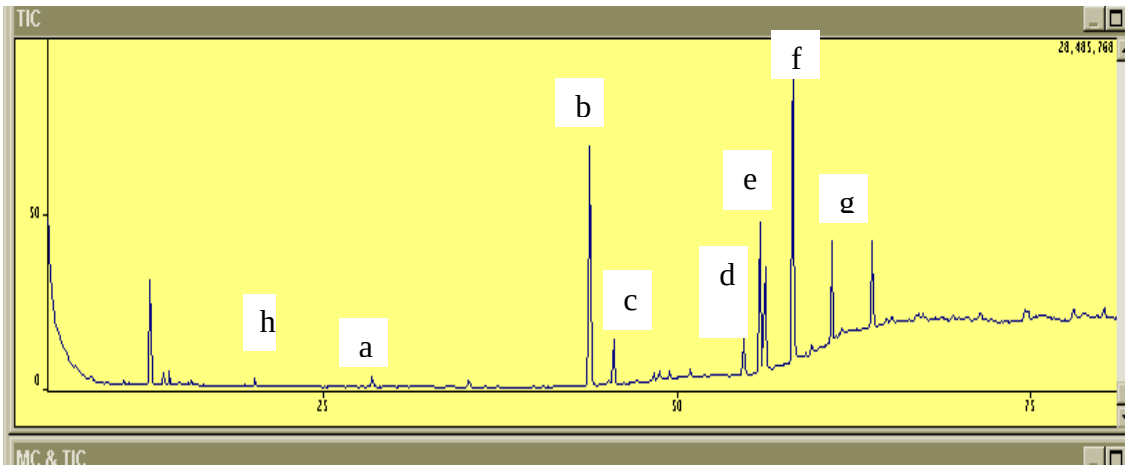
Şekil 4.13. *Arum D.* metanol estraktına ait kromatogram, **a:** C 16:0, **b:** C16:1, **c:** C18:0, **d:** 18:1, **e:** C 18:2, **f:** C 18:3

Tablo 4.5. *Arum D.* ekstraktlarının kompozisyonu (%)

Bileşen	Metanol Ekstraktı	Aseton Ekstrakt	HekzanEkstraktı
Hexadecanoic acid 2-Hydroxy ME	-	4,50	-
Ethanedioic acid Dimethyl Ester	-	-	3,32
Levulinic acid Metil Ester	19,58	4,65	-
Hepta 2,4 – Dieonic acid Metil Ester	16,16	1,00	-
Butanedioic acid Methyl Dimethyl Ester	2,02	0,78	-
Propanedioic acid Dimethyl Ester	-	-	0,40



Şekil 4.14. *Arum D.* aseton ekstraktına ait kromatogram, **a:** C 14:0, **b:** 16:0, **c:** C 16:1, **d:** C:18:0, **e:** C 18:1, **f:** C 18:2 **g:** C 12:0



Şekil 4.15. *Arum D.* hekzan ekstraktına ait kromatogram, **a:** C 14:0, **b:** C 16:0, **c:** C16:2, **d:** C 18:0 **e:** C 18:1, **f:** C 18:2, **g:** C 18:3, **h:** C 10:0

Arum D. en düşük yüzdeye sahip olan yağ asidi hekzan estraktında (C 10:0) kaprikasit tespit edilmiştir.

Arum D. 'nin metanol estraklarında yağ asidi bileşimi C 16:0 (palmitik asit), C 18:0 (Sterarik asit), C 16:1 (palmit oleik asit), C 18:1 (oleik asit), C 18:2 (linoleik asit), C 18:3 (linolenik asit) tespit edilmiştir.

Arum D.'nin aseton estraktında yağ asidi bileşimi C 12:0 (laurik asit), C 14:0 (miristik asit), C 16:0 (palmitik asit), C 18:0 (sterarik asit), C 16:1 (palmit oleik asit), C 18:1 (oleik asit), C 18:2 (linoleik asit), C 18:3 (linolenik asit) tespit edilmiştir.

Arum D.'nin hekzan estraktında yağ asidi bileşimi C 10:0 (kaprik asit), C 14:0 (miristik asit), C 16:0 (palmitik asit), C 18:0 (Sterarik asit), C 16:1 (palmit oleik asit), C 18:1 (oleik asit), C 18:2 (linoleik asit), C 18:3 (linolenik asit) tespit edilmiştir.

Tablo 4.6. *Arum D.* ekstraktlarının yağ asidi kompozisyonu (%)

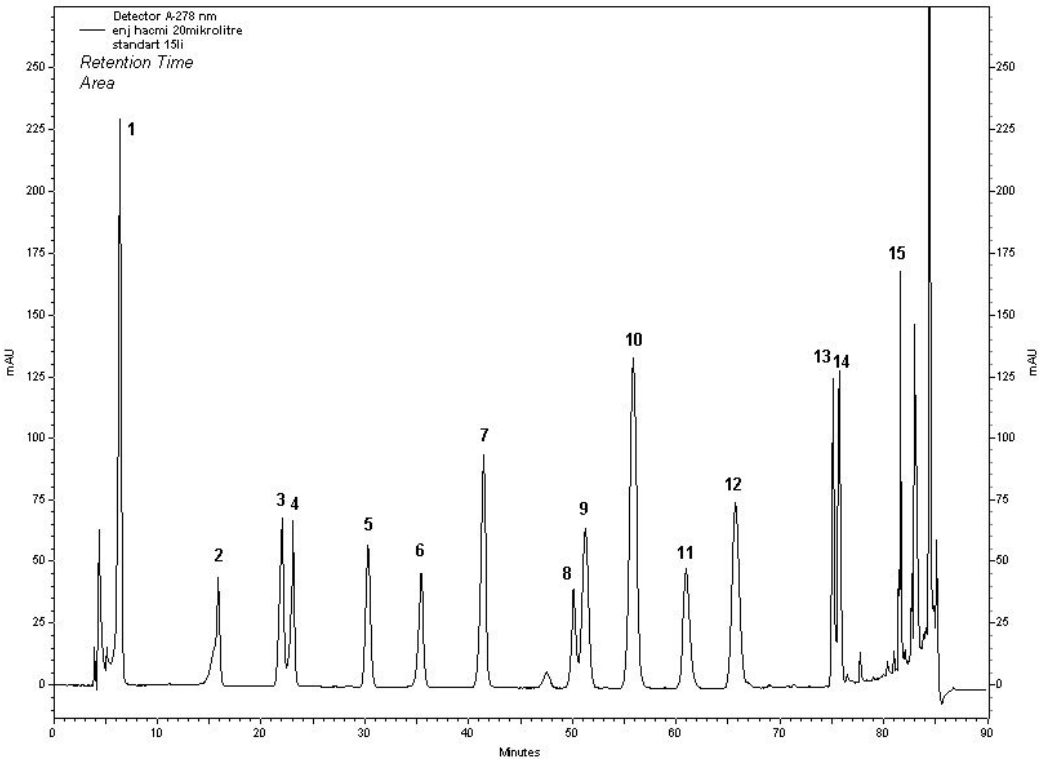
Yağ Asitleri	Metanol Ekstraktı	Aseton Ekstraktı	HekzanEkstraktı	Tutulma Zamanı
C 8:0	-	-	-	-
C 10:0	-	-	0,40	20,1
C 11:0	-	-	-	-
C 12:0	-	0,46	-	19,5
C 13:0	-	-	-	-
C 14:0	-	0,90	0,78	28,4
C 15:0	-	-	-	-
C 16:0	16,11	23,60	24,53	43,8
C 17:0	-	-	-	-
C 18:0	1,70	3,12	3,25	54,7
C 20:0	-	-	-	-
Σ SFA**	**17,81**	**28,08**	**25,71**	
C 14:1	-	-	-	-
C 15:1	-	-	-	-
C 16:1	3,31	4,15	3,43	45,4
C 17:1	-	-	-	-
C 18:1	8,18	12,39	13,06	56,0
Σ MUFA**	**11,49**	**16,54**	**17,03**	
C 18:2	18,03	21,90	27,02	58,1
C 18:3	3,12	4,30	6,44	60,09
Σ PUFA**	**21,15**	**26,2**	**33,46**	

SFA; Doymuş yağ asitleri, MUFA; Tekli doymamaış yağ asitleri, PUFA; Çoklu doymamış yağ asitleri

4.7. HPLC ile Fenolik Madde Tayini

Antioksidan kapasitesi çeşitli metodlarla belirlenen *Arum D.* ekstraktlarına antioksidan özellik sağlayan fenolik bileşikleri ve flavonoidlerden bazıları yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile kalitatif ve kanatitatif olarak tayin edilmiştir.

Analizi yapılan bu bileşenler ve bu bileşenlerin metanol, aseton ve hekzan ekstraktının her birinden ne kadar bulunduğu Tablo 4.7.'de verilmiştir. Tüm standartların analizine ilişkin kromatogram ise Şekil 4.16'de verilmiştir. Sonuç olarak *Arum D.* ekstraktlarında analizlenen tüm antioksidan özellik gösteren standartlar *Arum D.* ekstraktlarının antioksidan kapasitesine katkıda bulunmuştur. En büyük katkı ise yüksek oranda bulunan viteksin, p-koum, naringin, eriodiktiol ve ferulik'dır. Ancak bu standartlardan gallik asit, kateşin hidrat, epicatechin, rutin, hesperidin naringin, hesperidin, rosmarinik asit, karvakrol, naringenin hiçbir ekstraktta rastlanmamıştır. Bununla birlikte her bir ekstraktta analiz edilemeyen bazı antioksidan maddelerin de bulunması muhtemeldir.



Şekil 4.16 1:Gallik asit 2:kateşin 3:kaffeik asit 4:epikateşin 5:p-kumarik acit 6:ferulik 7:viteksin 8:rutin 9:naringin 10:hesperidin 11:rosmarinik asit 12:eriodiktiol standartların kromatogramları.

Tablo 4.7. *Arum D.* ekstraktlarının ihtiva ettiği fenolik maddeler ve miktarları (µg/ml)

Bileşen	Metanol Ekstraktı	Aseton Ekstraktı	Hekzan Ekstraktı	**Σ Toplam**
Gallik asit	-	-	-	-
Kateşhin hidrat	-	-	-	-
Kafeik asit	-	-	5,6	5,6
Epikateşhin	-	-	-	-
p-koum	5,4	5,6	-	11
Ferulik	325,5	255,9	-	581,4
Viteksin	1125,0	1411,6	23,4	2560
Rutin	-	-	-	-
Naringin	98,4	98,4	-	196,8
Hesperidin	-	-	-	-
Rosmarinik asit	-	-	-	-
Eriodiktiol	43,7	55,0	5,2	103,9
Kuersetin	-	-	-	-
Naringenin	-	-	-	-
Karvakrol	-	-	-	-
Σ Toplam	**1598**	**1826,5**	**34,2**	

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Antalya'da yetişen *Arum Discorides* tohumlarının metanol, hekzan ve aseton ekstraktlarının analizine yönelik yapılan bu çalışmada ekstraktların toplam fenolik madde miktarı tayini, DPPH• radikalinin süpürme etkisi, β-karoten lineolik asit emilsiyon sistemi, CUPRAC yöntemi, demiri indirgeme gücü aktiviteleri farklı ayrı ayrı belirlendi. Bütün *Arum D.*'nin bu antioksidan ve antiradikal yöntemler uygulanarak belirlenen antioksidan aktiviteleri çok yüksek antioksidan aktiviteye sahip ve aynı zamanda birer sentetik antioksidan olan BHA, BHT, troloks ile farmasötik ve gıda sanayinde yaygın olarak kullanılan α-Tokoferolün antioksidan özellikleri ile karşılaştırıldı

Arum D.'nin mg/mL metanol ve aseton ekstraktlarının ihtiva ettiği fenol miktarını gallik aside eşdeğer olarak hesaplandığında metanol (0,05 mg GAE/mg) ekstraktının asetondan (0,033 mg GAE/mg) daha fazla miktarda fenol ihtiva ettiği gözlendi.

Arum D. ekstraktlarının 2-0,001 mg/mL konsantrasyon aralığında DPPH• radikalinde süpürülme oranınları yüzde olarak hesaplanarak elde edilen sonuçlarda DPPH radikalinin % 50'ni söndüren ekstrakt miktarları (IC_{50}) belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre aynı zamanda DPPH• metodunda *Arum D.*'nin metanol ekstraktının (2 mg/mL) kıyaslanan BHT ve BHA'nın aktivitelerinden daha yüksek olduğu görüldü. DPPH radikalini süpürme aktivitesinin sırasıyla metanol > BHT > BHA > aseton > hekzan olduğu görülmüştür. 2 mg/mL'deki *Arum D.* metanol, aseton ve hekzandaki DPPH• inhibisyonu sırasıyla %96, %95, %91, %35, %33 gözlendi. IC_{50} değerleri ise sırasıyla 0,5 (metanol), 2,85 (aseton), 3,03 (hekzan), 0.035 (BHA), 0,015 (BHT) mg/mL' dır.

Cuprac yöntemi Cu(II) iyonunu Cu(I)'e indirgeyici antioksidan kapasite tayini sonuçlarına bakıldığında 2 mg/mL *Arum D'nin* metanol ve aseton ekstrastı aynı miktarda troloks ile kıyaslandı ve metanol ekstraktının asetondan Cu(II) iyonunu indirgeyici antioksidan kapasitenin daha yüksek çıktığı saptandı. Cuprac metoduna göre mg/mL' deki *Arum D.*'nin metanol ve aseton ekstraktlarının troloksa eşdeğer miktarı sırasıyla 1,55 TEAC/mg ve 1,36 TEAC/mg olduğu saptandı.

β-karoten lineolik asit emülsiyon sistemi yöntemin sonuçlarına bakıldığında 2 mg/mL *Arum D'nin* metanol ve aseton ekstrastı BHT ve BHA ile kıyaslandı. Bu deneyde bulunan değerler metanol ekstraktının aseton ekstraktından daha yüksek olduğu gözlendi. Antioksidan değerlerine metanol ve aseton ekstraktlarının yüzde inhibisyon değerlerine sırasıyla %78 (metanol), %52 (aseton) ve %84 (BHA), %87 (BHT)'dir. Buna göre metanol ekstraktı asetondan daha yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir.

İndirgeme gücü Oyaizu metodu sonuçları incelendiğinde *Arum D.*'nin indirgeme kapasitesi de radikal süpürmesi gibi *Arum D.* konsantrasyonunun artması ile doğru orantılı olarak artmaktadır. İndirgeme kuvveti metanol ve aseton ekstraktının 2-0,25 mg konsantrasyon aralığında BHT, BHA ve α-tokoferolle kıyaslandı. İndirgeme gücü kapasitesinde 2 mg/mL de BHA, BHT ve α-tokoferol birbirine yakın değerler verdi. Ancak, metanol ve aseton ekstraktlarının indirgeme gücü sentetik antioksidanlar olan BHA, BHT ve α-tokoferolden daha düşük olduğu gözlendi. Metanol ve aseton ekstraktlarınını kıyasladığımızda ise metanol ekstraktının daha yüksek indirgeme gücüne sahiptir.

Arum D. ekstraktlarının antioksidan özellikleri ile indirgeme kapasiteleri arasında korelasyon olduğu görüldü. Bunula birlikte total fenolik madde miktarının artışı ile ekstraktların antioksidan kapasitesini arttığı gözlendi. Bunun nedeni fenolik bileşikler ve flavonoidler hidroksil gruplarında hidrojenini kolaylıkla verebilir. Fenolik bileşiklerdeki oksijen ile hidrojen arasındaki bağ, oluşacak fenol radikalinin kararlılığından dolayı kolaylıkla homolotik olarak parçalanabilir ve üzerinde bir tane elektron bulunduran hidrojeni verebilir. Böylece radikali söndürüken kendisi daha kararlı bir radikale dönüşmektedir.

Arum D. estraklarının antioksidan aktivitede olduğu gibi indirgeme kapasitesinde de artan konsantrasyona bağlı olarak artığı gözlemlenmiştir. İndirgeme gücü bir bileşiğin antioksidan aktvite göstermesinde önemli bir etken olabilir (Meir ve ark., 1995). 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).

β-karoten lineolik asit yöntemi ise hidrojen atom transferi esaslıdır. Elektron transfer esasına dayanan yöntemler, indirgendiğinde renk değiştiren yükseltgenlerin indirgenmesi sonucu antioksidanların kapasitesini ölçer. Bu olay bir absorbans artışı veya azalışı şeklinde olabilir. Renk değişiminin derecesi, numunenin toplam antioksidan konsantrasyonu ile ilişkilidir. Gerçekte hidrojen atomu transferi ve elektron transferi esaslı reaksiyonlar bir anlamda içiçedir ve aralarında aşılmaz sınırlar yoktur.

Bu metotlarda metanol, aseton ve hekzan ekstraktlarının tüm antioksidan kapasite tayinleri sonucu en yüksek aktiviteye sahip olan ekstraktın metanol olduğu belirlendi. Bu yüksek antioksidan değeri özellikle ihtiva ettiği fenolik madde miktarına atfedilir. Bunu doğrulayan diğer bir yaklaşımsa ise *Arum D.* ekstraktlarının yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile fenolik madde ve flavonoid bileşiminin analizinde elde edilen sonuçlardır. Ancak literatürlerde 4000 den fazla fenolik ve flavonoid madde tanımlanmıştır. Ancak tüm bu antioksidanlarda yalnızca 15 adedi *Arum D.* ekstraklarında analizlenebilmiştir. Bu nedenle yalnızca elde sonuçlara göre yorum yapmak yanlıştır. Ayrıca bazı antioksidan maddelerin bir arada bulunduklarında birleri ile olan etkilşeimleri sinerji etkisi oluşturarak antioksidan kapasitesine katkıda bulunur (Dapkevicius ve ark., 1998).

Bu çalışmada yapılan HPLC analizi ile ekstraktlarda Gallik asit kateşin kaffeik asit, epikateşin, p-kumarik asit, ferulik, vitexin, rutin naringin, hesperidin, rosmarinik asit, eriodiktiol, kuersetin, naringenin, karvakrol, viteksin kalitatif ve kantitatif olarak tayin edilmiştir. Elde edilen kromatogramlardan metanol ekstraktında total miktarı ile en fazla viteksin (1125 µg/mL) ve ardından ferulik asit (325 µg/mL) takip etmektedir. Aseton ekstraktında total miktarı ile en fazla viteksin (1411,6 µg/mL) ve ferulik asit(255,9 µg/mL) takip etmektedir. Hekzan ekstraktında ise total miktarı ile en fazla viteksin(23,4 µg/mL) ve kafeik asit (5,6 µg/mL) oluşturmaktadır.

Antioksidan analizleri ve HPLC ile bazı fenolik madde içerikleri belirlenen *Arum D.* ektraktlarının ön esterleştirme işlemi gerçekletirildikten sonra uçucu hale getirilen yağ asitleri de gaz kromatografisi kütle spektrometresi ile tanımlanmıştır. Buna göre metanol ekstraktında SFA: Doymuş asitleri %17,81, MUFA: Tekli doymamış yağ asidi %11,46, PUFA: Çoklu doymamış yağ asitleri %21,15’ dir.

Aseton esktraktında SFA: Doymuş asitleri %28,08, MUFA: Tekli doymamış yağ asidi %16,54, PUFA: Çoklu doymamış yağ asitleri %26,2' dır.

Hekzan esktraktında SFA: Doymuş asitleri %25,71, MUFA: Tekli doymamış yağ asidi %17,03, PUFA: Çoklu doymamış yağ asitleri %33,46' dır.

Bilindiği gibi fenolik ve flavonoid maddelerin antioksidan özelliklerinin artığı görülmektedir. Fenolik ve flavonoid bileşiklerin OH- gruplarının polaritesi yüksek olduğundan polaritesi yüksek olan çözücülerde daha fazla çözünür. Bu çalışmada kullanılan metanol, aseton ve hekzanın polariteri incelendiğinde metanolün asetondan, asetonun ise hekzandan daha yüksek polariteye sahipdir. Bu nedenle metanol daha fazla fenol ve flavonoid madde çözerek ekstre etmektedir. Aseton ise polardır ancak metanol kadar değildir. Öte yandan aseton hekzandan daha yüksek polariteye sahiptir. Polaritelerine bağlı olarak bu çözücülerle ekstrakte edilen *Arum D.*'nin antioksidan aktivite ve indirgeme gücü sırasıyla metanol>aseton > hekzan'dır.

Sonuç olarak *Arum D.* farklı çözücülerde ve farklı konsantrasyonlar da toplam fenol miktarı, β-karoten lineolik asit emilsiyon yöntemi, Cuprac yöntemi, indirgeme gücü, toplam flavonoid yöntemi ve DPPH radikal giderme aktiviteri belirlendi. Sonuçları standartlarla kıyasladığında birer doğal antioksidan olan α-tokoferol ve onun suda çözünen analogu olan trolokstan daha düşük olduğu saptandı. bu çalışmadan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde *Arum D.* bitkisinin tohumlarının tıp, farmasötik ve gıda sanayinde bir potansiyel antioksidan olarak kullanılabilirliğini ortaya koymaktadır.

6. KAYNAKLAR

Ak, Tuba, 2006. Curcuminin antioksidan ve antiradikal özelliklerinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstütüsü, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum

Albanes, D., Heinone, O.P., Taylor, P.R., et al. 1996. Alpha-tocopherol and beta-carotene supplements and lung cancer incidence in the Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study: effects of -Bowen *P, Chen L, Stacewicz-Sapuntzakis M,* Duncan C, Sharifi R, Ghosh L, Kim HS, Christov-Tzelkov K, van Breemen R (2002).

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

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

Ames, B.M., Shigena, M.K. and Hogen, T.M., 1993. Oxidants, Antioxidants and the Degenerative Disease 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

Andreas M. Papas 1999. Antioxidant Status, Diet, Nutrition and Health, Boca raton CRC Press

Aruoma, O.I. and Cuppett, s.l., 1997. Antioxidant Methodology in vivo and in vitro Concept. AOCS pres, Champaign, Illinois, p 241

Apak, R., Güçlü, K, Demirata, B., özyürek, M., Çelik, S.E., Bektaşoğlu., Ber K.I., Özyurt, D., 2007. Comparative evaluation of varius totalantioxidant capacityassays applied to phenolic compounds with the cuprac assay. Moleculs, 12,1496-1547

Baytop, T. Türkçe Bitki Adları Sözlüğü(A dictionary of vernacular names of wild plants of Turkey) (No: 578, 512 pp)

Baytop, T., Kadıoğlu D., 2002. İstanbul Bölgesi'nin Tıbbi Bitkileri, 14. İstanbuBitkisel ilaç Hammaddeleri Toplantısı, Eskişehir, 29-31

Baytop, T., 1999. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün), Nobel Tıp

Kitapevleri, 2. Baskı, l

Baytop, T., Kadıoğlu D., 2002. İstanbul Bölgesi'nin Tıbbi Bitkileri, 14. İstanbuBitkisel ilaç Hammaddeleri Toplantısı, Eskişehir, 29-31mulation and modulation of biomarker of carncinogenesis. Exp Biol Med, 227 886-893.

Bowen P., 2002. Tomato souce supplementation and prostate cancer; lycopene accu

Burton, G. W. and Ingold, K. V., 1984. β-Carotene; An Annusual Type of Lipit Oxidant. Science, 224, 569

Carr, A. C., Van Der. Berg, J.J. M. And Winterrbourn, C.C., 1996. Chlorinotion of Cholestrolin Cell membranes by Hypoclorous Acid. Arch Biochem. Biophy. 332, 63-69,

Chandhuri, G., 1987. Endhotclium-Derived Relaxing Factor Produced and Released from Artery and Vein is Nitric Oxide

Cheeseman, K.H., 1993. Lipit Peroxidation and Cancer in DNA and Free Radicals, Edited by halliwel and O.l aruoma pp. 109-144, Ellis Horwoord, London

Cerrutti, P.A., 1985. Pro-Oxidant States and Tumor Activation Science. 38, 425-456

Cross, E., Hallwell, B, Borich, E., Pyrory. W., Ames, B., Soul, B., Mccord J. and Harman, D., 1987. Oxygen Radicals and Human Disease. Annals of İnternal Medicines, 107, 526-545

Çavdar C., Sifil A., Taner Çamsarı, 1998. Reactive Oxygen Particles and Antioxidant Defence. Office Journal of the Turkish Nephrology, Association, 2-4: 92-95

Dapkevicius, A., Venskutonis, R., A., Beek, T., Linssen, J.P.H., 1999. Antioxidant activity of exracts obtained by diffrent isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania, Journal of the Science of Food and Agricultere, 77, 140-146

Decker, E.A., Mei, L., 1996. Antioxidant mechanisms and applicationin muscle foods. Proceedings of the reciprocal meat conference 49, pp. 64-72

Dennis, W.H., Olieieri, V.P. and Kruse, C.V., 1979. The Reaction of Nucleotites wih Oqueous Hypoclrous acid. Water Res. 13, 357-362

Di Mascio P, Kaiser S, Sies H (1989). Lycopene as the most efficient biologial carotenoid singlet oxygen quencher Archives of biochemistry and Biophysics 274: 532-538

Diplock, A. T., 1997. WillThe good faries please prove us that vitamin E lesssens

Dragsted, L.O., Strube, M. And Larsen, J.C., 1993. Cancer-protective factors in fruits and vegetables: Biochemical background. Pharmacol. Toxicol., 72, 116-135

Elitok, E. 1996. Et. Teknolojisinde Antioksidanntların kullanımı. Ankara Üniversitesi fen bilimleri Enstitüsü Yüksek lisans Semineri, Ankara

Esterbaver, h., Janusz, G., Pulh, H. and Jurgens, G., 1992. The Role of Lipit Peroxidation and Antioxidants Inantioxidative Modification of LDL. Free Radicals Biol. Med., 13, 341-390 Lipoprotein, Antioxidant Protection, and Atherosclerosis, Adv. Phormacol., 38, 425-456

Esterbover, H., Schmidt, R. and Hayn M., 1997. Relationships among Oxidation of low density

Fereidoo Shaihidi, 1997. Natural Antioxidant: Chemistry, Health Effects and Applications, Champaigh, III AOCS Prees

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

Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, et al. 1993.Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis. Proc Natl Acad Sci USA. 90:2690-2694

Frankel, E.N., Huang, S-W, Konner, J., and German J.B. 1994. Interfacial Phenomena in the Evolutaion of Antioxidants bulk oils v ersus emülsions. J, agric. Food Chem: 44, 1054-1059

Fridovich, Mead, 1976. In Free Radical İn Biology: Pryol, W.A. Ed; Academic; Newyork Vol 1, 239-271

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

Frankel, E. N., 1995. Natural and biologial antioxidants in food and biologial systems. Their mechanism of action, applications and implications. Lipit technol., 7, 77-80

Frankel, E. N., kanner, J., German, J.B., Parks, E. And Kinsella, J. E., 1993. Inhibition of human low-density lipoprotein by phenolic substances in

red wine. Lancet, 341, 454-457

Frankel, E. N., Waterhouse, A. Li and teissedre, P.L., 1995. Principal phenolic 27-phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. J. Agric. Food Chem., 43, 890-894.

Frankel, S., Robinson, G. E. And Berrenbaum, M. R., 1998. Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 uniflorial honeys. Jour. Apicult. Res., 37, 31

Fridovich, I., 1986. Süperoxide Dismutases. Meth. Enzymol., 58, 61-97

Fridovich, I., 1986. Biological effects of superoxide radical. Archives of biochemistry and Biophsics, 247, 1-11

G. Milliaujos, P.R., Veriskutonis, 2002. Antioxidant and free radicals scavenging activities of eight salvia species. Chem, Nat comp., 38, 198-200

Giavonnucci ve ark, 1999. Tomatoes- tomato-based products, lycopene and cancer rewiew of the epdidemiologic literature J. Natl. Cancer Inst 91, 317-331

Gould, J. P. and Hay., T.R., 1982. The Nature of Relaction between Chlorine and Purine and Pyrimidine bases: Products and Kınetics Wat. Res. Tec., 14, 629-640

Gökalp, H. Y., Çakmakcı, S. 1992. Gıdalarda kısaca Oksidasyon: Antioksidantlar ve Gıda Sanayinde Kullanımları. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergi, 23(2), 174-192

Halliwell, B., 1997. Antioxidant and human Disease: A Geneal İntroduction Nutr. Rev., 55, 544-552

Halliwell B. And Gutteridge J.M.C., 1984. Oxygen toxicology, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochemical Journal, 219, 1-4

Halliwell, B. And Gutteridge, J. M. C., 1989. Free radicals in biology and medicine Clarendon Press Oxford Antioxidants: A Personal View. Nutr. Rev., 52, 253-265

Halliwell, B., 1994. Free Radicals and antioxidants: A Personal View. Nutr. Rev., 52., 253-265

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

Halliwell, B. And gutteridge, JMC., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview, methods Enzymol. 186, 1-85

Hertog, M. G. L., hollman, P. C. H., & Katan, M. B. 1992. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40: 2379-2383

Holmes, G.E., Bernstein, C. And Berstain, H., 1995. Oxidative and Other DNA Damage as the Basis of Ageing a Rewiev. Mutation Research, 275, 305-315

http://wikipedia.org/wiki/C vitamini).

http://wikipedia.org/wiki/likopen).

Huang, H.C., Jan, T.R. and Yeh, S.F., 1992. Inhibitory effect of curcumin, an antiinflammatory agent, on vascular smooth muscle cell proliferation European of Phoronocology, 221(2-3), 381-384

Hudson, BJF., 1990. Food Antioxidants Elsevier Applied Science, London and Newyork, 1-316

Inarro, 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

Kayalı R., Çakatay U., 2004. Basic Mechanisms of Protein Oxidation. Cerrahpaşa Tıp Dergisi 35 (2) : 83-89

Kayahan, M., 1998 Lipitler, Gıda Kimyası, İ. Saklamlı (Ed), Hacettepe üniversitesi Basımevi, 5275, Ankara

Kogure, K., Fukuzawa, K., kawano, H. and Tereda, H., 1993. Spermine accelerates iron- induced lipit peroxidation in mitochondria by modification of membrane

Kulisic, 2004. Antioxidant properties of thyme (*Thyme vulgaris L.*) and wild thyme (*Thyme serpyllum L.*) essential oils, Italian Journalof Food Science 17(3):315-324

Larson, R.A., 1988. The Antioxidants of Higer plants. Pytochemistry, 27 (4), 969-978

Lu. Y. and Food, L.Y. 2001. Antioxidant Activities of Polyphenols from sage. food

Chem., 75, 197-202

Mavi, A., 2005. İnsan Eritrosit ve Lokositlerinden Süperoksit Dismutaz Enzim Üzerine etkilerinin İncelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 52-53

M. Burak Y. Çimen 1999; Flavonoidler ve Antioksidan özellikler. Journal of medical sciences 19-5.

Mccord 1969; Michelson 1977; Aruoma 1993. Free radicals, oxidative stress, and antioxidant in human health and diseasa. Aruoma- Journal of the American oil chemists society, 198 – springer 199-212

Mei, L., McClements, D.J., and Decker, E.A., 1998. Evidence of Iron Ossociation with Emülsion Draplets and Its İmpact on Lipit Oxidation. J. Agric Food. Chem. 46, 5072-5077

Mei, L., McClements, D.J., and Decker, E.A., 1998. Iron-catalyzed LipitOxidation in Emülsion as Affected by Surfactant, pH and NaCl. Food Chem, 61, 307-312

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

M.G., Mustafa, 1990. Biochemical Basis of ozone Toxicty, Free Radical Biol. Med., 9,245-265

Mukhopadhyay, M. 2000. Naturel Exracts Using Supercritical Carbon Dioxide,CRC Press

Namiki, Pokorny, 1991. Antioxidants Antimutagens in Food Critical Reviews inFood Science, Nutrition 29, pp. 273-300

Nisihina A., Kuboto, K., Kameoka, H. and Osawa, T., 1991. Antioxidizing component Musizini in Rumex Japanice Houtt J, Am. Oil. Chem. Soc., 68, 7535-739

Osowa, T. and Namiki, M.A.A., 1981. Novel Type of Antixidant Isoloted 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, et., 2003. Oxidant and antioxidant status of cadmium administered rats,

Journal de physıque 107: 1309-1312

Palmer, R.M.J., ashton, D.s., and Moncoda, s., 1988. Vascular Endothelium cell Synthesis 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

Peta, R., Doll R., Buckley, J.D. and Sporn, M.B., 1981. Can Dietary β-Carotene Materially Reduce Human Cancer rates? Nature, 20, 201-208

Picea abies: Variations between provenances. Biochemical Systematics and Ecology, 26(2), 225-238

Porter, W.L., Block, E.D. and Drolet, A.M. 1989. Use of Polyamide Oxidative Fluorescence Test on Lipit Emülsions: Contrast in relative effectiveness of antioxidants in bulk versus dispersed systems. J. Agric. Food Chem., 37, 615-624

Pratt, D.E., Hudson, B.J.F., 1990. Natural antioxidants not expoited commerciaally in food antioxxidants: Hudson B.J.F.: ED: Elsevier: Amsterdam, 17-192

Pryor, WA., 1982. Free Radicals Biology: Xenobiotics, Cancer and Ageing. Ann. N. Y. Acad. Scr. 393, 1-22

Pryor, W.A., 1994. Mechanism of Radical Formation from reactions of Ozone with Target molecules in the lung. 17, 451-465

Ramarathman, N., Osawa, T., namiki, M. And kawakishi, S., 1988. Chemical studies on novel rice hull antioxidants. Isolation, fractionation, and partial characterization. J. agric. Food Chem., 36, 732-737

Richard A. Larson, 1997. Naturally Occuring Antioxidants, Boca Raton, Lewis Publishers

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.,Shklor, G., Rend, S. and Trickler, D., 1988. Prevention of Orral Cancergy Extracts of Sprirulina-Dunalielia Alga. Nutrition and Cancer, 11, 127-134

Sezgin M., Tekeli Y., 2007. *Centuarea carduiformis* Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi. Süleyman Demirel Ü. Fen Edebiyat Fakültesi, Fen Dergisi

(E-Dergi) 204-209

Slimestad, R. 1998. Amount of flavonols and stilbenes during needle development of Antioksidant

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 nd carotenoids in the maternal feed, yolk and neonatal tissues: comparision the chicken, Turkey, Duck and goose. J. Sci. Food Agric., 76, 593-598

Tekeli, Y. 2008 Konya bölgesinde bazı *centaurea* türlerinin bazı kimyasal ve biyolojik özelliklerinin belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, Konya

Travis, J. And Salvesen, G.S., 1983. Human Plasma Proteinase Inhibitors. Annu. Rev. Biochem, 52, 665-709

Von Sonntag, C., 1987. The Chemical basis of Radiation Biology. Taylor, Francis, London

Wang, H., Nair, M. G., Strasburg, G. M., Chang, Y. C., Booren, A. M., & Gray, J. I. 1999. Antioxidant polyphenols from tart cherries (Prunus cerasus). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47: 840-844

Yanishlieva, N., Gordon, M., 2001. Antixidants in Food, CRC Press, USA

Yen Duh, 1993. Changes in antioxidant activity and components of methoalic extracts of peanut hulls irradiated with ultraviolet light. Depertment of Food Science, 127-131.