TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YAPRAKLARI SALATA-BAHARAT OLARAK TÜKETİLEN BAZI BİTKİLERİN ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Arş.Gör. Şebnem SELEN İŞBİLİR
DOKTORA TEZİ

Danışman
Doç. Dr. Ayten SAĞIROĞLU
EDİRNE-2008

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YAPRAKLARI SALATA-BAHARAT OLARAK TÜKETİLEN BAZI BİTKİLERİN ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Arş Gör. Şebnem SELEN İŞBİLİR

DOKTORA TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Ayten SAĞIROĞLU

EDİRNE-2008

ÖZET

Bu çalışmada dereotu (*Anethum graveolens* L.), kuzukulağı (*Rumex acetosella* L.), gelincik (*Papaver rhoeas* L.), roka (*Eruca sativa* Mill.) ve tere (*Lepidium sativum* subsp. sativum) bitkilerinin antioksidan aktiviteleri çeşitli metodlarla incelenmiştir. Bu amaçla bitkiler kurutulup öğütüldükten sonra su, etanol ve aseton çözücüleri kullanılarak ekstraksiyonları yapıldı. Herbir ekstraktın Folin-Ciocalteu ayıracı ile toplam fenolik madde içeriği, DPPH serbest radikali giderme aktivitesi, ferrik tiyosiyanat (FTC) metodu ile toplam antioksidan aktivitesi, metal iyonlarını şelatlama kapasitesi, süperoksit radikali giderme aktivitesi ve indirgeme kapasitesi tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar α-tokoferol, askorbik asit, BHT ve BHA standart maddeleriyle kıyaslanarak değerlendirilmiştir.

Su, etanol ve aseton çözücüleriyle gerçekleştirilen ekstraksiyonlar sonucunda, çalışılan tüm bitkilerin ekstrakte edilebilen madde miktarları 21,66-488,35 mg/g kurutulmuş bitki materyali arasında bulundu. En yüksek ekstraksiyon verimleri su ekstraktlarında gözlendi.

Toplam fenolik madde tayini sonucu, ekstraktların toplam fenolik madde miktarlarının gallik asit eşdeğeri olarak 49,63±2,5-127,55±14,48 mg/g aralığında; kateşol eşdeğeri olarak 24,08±1,67-76,03±9,66 mg/g aralığında değiştiği belirlendi. En yüksek miktarlar kuzukulağı ve gelincik ekstraktlarında tayin edildi.

Serbest radikal giderme aktivitesinden elde edilen verilere göre kuzukulağının etanol ekstraktı, dereotu ve gelinciğin etanol ve su ekstraktları standart maddelerle karşılaştırılabilir düzeyde DPPH giderme aktivitesi gösterdi.

Bitki ekstraktlarının toplam antioksidan aktivitesi linoleik asit emülsiyonunda değerlendirildi. Elde edilen sonuçlara göre dereotunun su ekstraktı, kuzukulağı, gelincik, roka ve terenin su ekstraktlarının 100 μg/mL konsantrasyonları haricindeki tüm ekstraktlar etkili ve yüksek oranlarda antioksidan aktivite gösterdiler.

Metal şelatlama aktivitesi tayininde Fe^{2+} çözeltisi kullanıldı, sonuçlar EDTA ile kıyaslandı. Dereotu, gelincik ve terenin su ekstraktları, kuzukulağı ve rokanın etanol ekstraktı diğer ekstraktlara göre yüksek metal şelatlama aktivitesi gösterdi.

Süperoksit radikali giderme aktivitesinde PMS/NADH/O_2 sisteminde $O_2^{\bullet -}$ radikali oluşturuldu ve ekstraktların bu radikali giderebilme kapasiteleri incelendi. Çalışılan ekstraktlardan sadece su ekstraktlarında; kuzukulağı>gelincik>dereotu> roka>tere sıralamasına göre aktivite gözlendi.

H_2O_2 giderme aktivitesinde, ekstraktların 250 µg/mL ve 400 µg/mL konsantrasyonlarında aktivite tayin edildi. En yüksek H_2O_2 giderme oranları kuzukulağı etanol, dereotu su ve roka aseton ekstraktlarında belirlendi.

İndirgeme kapasitesi tayini yönünden; bütün bitki ekstraktlarının standartlarla kıyaslandığında yüksek aktiviteye sahip olmadığı gözlendi. İndirgeme kapasitesi yetenekleri gelincik>kuzukulağı>dereotu>roka>tere şeklinde sıralama gösterdi.

Anahtar kelimeler: *Anethum graveolens* L., *Rumex acetosella* L., *Papaver rhoeas* L., *Eruca sativa* Mill., *Lepidium sativum* subsp. sativum, antioksidan aktivite, DPPH, fenolik madde.

ABSTRACT

In this study, the antioxidant activities of dill (*Anethum graveolens* L.), sorrel leaf (*Rumex acetosella* L.), corn poppy (*Papaver rhoeas* L.), rocket (*Eruca sativa* Mill.) and cress (*Lepidium sativum* subsp. sativum) were investigated by using different methods. For this purpose, after the plants were dried and ground to fine powder, their extractions were done by water, ethanol and acetone as solvent. The antioxidant activities of all extracts were assayed with the various methods including total phenolic compound contents by Folin-Ciocalteu reagent (FCR), DPPH free radical scavenging activity, total antioxidant activity by using ferric thiocyanate (FTC) method, metal chelating capacity, superoxide anion scavenging activity, and reducing power. The obtained results were compared by using α-tocopherol, ascorbic acid, BHT and BHA as standard.

The extractable compound of all studied plants were found in the range of 21,66-488,35 mg/g dried plant at the and of the extractions carried out by water, ethanol and acetone as solvent. The best extraction yield was observed in water extracts.

In the total phenolic compound assay, total phenolic compound amounts of extracts were determined to be 49,63±2,5-127,55±14,48 mg/g as gallic acid equivalent; 24,08±1,67-76,03±9,66 mg/g as catechol equivalent. The highest amounts were found in the sorrel leaf and corn poopy extracts.

According to obtained results from the assay of free radical scavenging activity, the ethanol extract of dill, the water and ethanol extracts of dill and corn poppy showed DPPH scavenging activity, which is comparable with standard compounds.

Total antioxidant activities of plant extracts were assayed by using linoleic acid emulsion. According to obtained results; all of extracts exhibited effective and high antioxidant activity except of the water extracts of dill, and the water extracts of corn poppy, sorrel leaf, rocket and cress at 100 µg/mL concentration.

Metal chelating effect of samples were carried out by using Fe^{2+} solution, and the results were compared with EDTA. The water extracts of dill, corn poppy, and cress, the ethanol extracts of sorrel leaf and rocket showed the higher chelating activity Fe^{2+} ions than the other extracts.

For measurement of superoxide anion scavenging activity, $O_2^{\bullet-}$ radical was generated by PMS/NADH/O_2 system, and the abilities of all extracts to scavenge $O_2^{\bullet-}$ activity were determined. It was observed the activity only in the water extracts. $O_2^{\bullet-}$

radical scavenging activity of those samples followed the order: sorrel leaf>corn poppy >dill>rocket>cress.

In the H_2O_2 scavenging activity assay, the scavenging activities of extracts determined at concentrations of 250 µg/mL and 400 µg/mL. The high H_2O_2 scavenging effects were observed the ethanol extract of sorrel leaf, the water extract of dill and the acetone extract of rocket.

When the reductive capabilities of all samples were compared to reference compounds, it was observed they haven't high activities. The reducing capacity of all extracts followed the order: corn poppy >sorrel leaf >dill>rocket>cress.

Key words: *Anethum graveolens* L., *Rumex acetosella* L., *Papaver rhoeas* L., *Eruca sativa* Mill., *Lepidium sativum* subsp. sativum, antioxidant activity, DPPH, phenolic compound.

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim süresinde, tezimin planlanması ve yürütülmesinde her zaman bilgi ve tecrübesini esirgemeyen Sayın Hocam Doç. Dr. Ayten SAĞIROĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmamın başlangıcından bitimine kadar her aşamada yakın ilgisini gördüğüm, çalışmalarım boyunca katkılarını ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Hülya YAĞAR'a, Bölümümde görev yapan ve desteklerini gördüğüm tüm arkadaşlarıma, laboratuvar çalışmalarım ve analizler sırasında yardımlarını esirgemeyen Yüksek Lisans öğrencimiz Gülçin AKAGÜN'e, çalışmada kullanılan bitkilerin tür tanımlamalarını yapan T.Ü. Fen–Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Elemanı Arş. Gör. Dr. Necmettin GÜLER'e çok teşekkür ederim.

Beni her zaman içtenlikle destekleyen aileme, sabırları ve hoşgörüleri için eşim ve çocuklarıma sonsuz teşekkürler...

Bu çalışma T.Ü. Bilimsel Araştırma Fonu tarafından desteklenen "Yaprakları Salata-Baharat Olarak Tüketilen Bazı Bitkilerin Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi" başlıklı TÜBAP-660 no'lu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

***ÖZET*…… i**

***ABSTRACT*…….. iii**

***TEŞEKKÜR*…….. v**

***İÇİNDEKİLER*…… vi**

***ŞEKİLLER DİZİNİ*…….. ix**

***TABLOLAR DİZİNİ*…… xi**

***KISALTMALAR*…….. xii**

***1. GİRİŞ*…… 1**

***2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI*…….. 4**

2.1. Serbest Radikaller……... 4

2.1.1. Oksijen ve Reaktif Oksijen Türleri (ROT)……. 5

2.1.1.1. Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$)…… 8

2.1.1.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2)……. 9

2.1.1.3. Hidroksil radikali ($^{\bullet}OH$)…….. 11

2.1.1.4. Singlet oksijen ($^1O_2$)…… 11

2.1.1.5. Hipoklorik asit (HOCl)…… 12

2.1.1.6. Nitrik oksit ($NO^{\bullet}$)…… 12

2.1.2. Hücredeki Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynakları……. 13

2.1.2.1. Biyolojik kaynakları…… 13

2.1.2.2. İntrasellüler kaynakları…… 15

2.1.3. Serbest Radikallerin Etkileri……... 16

2.1.3.1. Serbest radikallerin lipidlere etkileri……... 17

2.1.3.2. Serbest radikallerin proteinlere etkileri……... 18

2.1.3.3. Serbest radikallerin nükleikasitlere ve DNA'ya etkileri …… 18

2.1.3.4. Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisi……. 19

2.2. Antioksidanlar……. 21

2.2.1. Antioksidanların sınıflandırılması…….. 22

2.2.1.1. Enzimler…….. 23
2.2.1.2. Yağda ve suda çözünen radikal tutucular…… 25
2.2.1.3. Metal iyonlarını bağlayan proteinler……... 31
2.2.2. Eksojen antioksidanlar…… 32
2.3. Gıdalar ve Antioksidanlar……. 32
2.3.1.Gıdalarda doğal olarak bulunan antioksidan maddeler……... 32
2.3.2. Gıdalara ilave edilen sentetik antioksidanlar……. 34
2.4. Antioksidan Aktivite Tayin Metodları…….. 37
2.4.1. HAT-temelli metodlar…….…... 39
2.4.2. ET-temelli metodlar…… 41
2.4.3. Lipid oksidasyon markerlerini ölçen metodlar……... 43
2.4.4. Diğer ROS giderici kapasiteleri ölçen metodlar……. 44
2.5. Çalışmada Kullanılan Bitkiler ve Özellikleri…… 45
2.5.1. Dereotu (*Anethum graveolens* L)…… 45
2.5.2. Gelincik (*Papaver rhoeas* L.)……. 46
2.5.3. Kuzukulağı (*Rumex acetosella* L.)……. 47
2.5.4. Roka (*Eruca sativa* Mill.)…….. 48
2.5.5. Tere (*Lepidium sativum* subsp. sativum)…… 48

***3. MATERYAL VE METOD*……... 50**
3.1.Materyal…… 50
3.1.1. Bitki Örnekleri…… 50
3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Ekipmanlar…… 50
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Çözeltiler…….…. 51
3.2. Metod ……... 53
3.2.1. Ekstraktların Hazırlanışı……. 53
3.2.2. Toplam Fenolik Madde (TPC) Tayini…… 54
3.2.3. DPPH Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini……... 55
3.2.4. Linoleik Asit Sisteminde Ferrik Tiyosiyanat (FTC) Metodu ile Toplam Antioksidan Aktivite Tayini……. 56
3.2.5. Demir (II) İyonlarını Şelatlama Aktivitesinin Tayini……. 57
3.2.6. Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini…… 57

3.2.7. H_2O_2 Giderme Aktivitesinin Tayini…… 58
3.2.8. İndirgeme Kapasitesi Tayini……... 59
3.2.9. Değerlendirme…… 59

***4. ARAŞTIRMA BULGULARI*……... 60**
4.1. FCR ile Toplam Fenolik Bileşik Tayini…… 60
4.2. DPPH Radikali Giderme Aktivitesi……... 63
4.3. Linoleik Asit Sisteminde Ferrik Tiyosiyanat Metodu ile Toplam Antioksidan Aktivite Tayini…… 68
4.4. Demir (II) İyonlarını Şelatlama Aktivitesinin Tayini…… 80
4.5. Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini……... 84
4.6. H_2O_2 Giderme Aktivitesinin Tayini…….. 85
4.7. İndirgeme Kapasitesi Tayini…….. 87

***5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA*……... 91**

***6. KAYNAKLAR*……. 105**

***ÖZGEÇMİŞ* …… 117**

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa No
Şekil 2.1	Oksijenin suya indirgenmesi ve diğer oksijen türlerinin oluşumu	6
Şekil 2.2	Fagositik solunumsal patlamada oluşan reaktif oksijen türleri	14
Şekil 2.3	Serbest radikallerin hücresel hedefleri	16
Şekil 2.4	Lipid peroksidasyonunun temel reaksiyonları	18
Şekil 2.5	Purin ve pirimidin bazları üzerine $^{\bullet}$OH radikalinin etkisiyle oluşan ürünler	19
Şekil 2.6	Oksidatif strese karşı enzimatik savunma mekanizmaları	25
Şekil 2.7.	Gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılan bazı sentetik antioksidanların formülleri	34
Şekil 2.8.	Dereotu bitkisi	46
Şekil 2.9.	Gelincik bitkisi	47
Şekil 2.10.	Kuzukulağı bitkisi	48
Şekil 2.11.	Roka bitkisi	48
Şekil 2.12.	Tere bitkisi	49
Şekil 4.1	Gallik asit standart grafiği	61
Şekil 4.2	Kateşol standart grafiği	61
Şekil 4.3	Bitki ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri olan fenolik madde içerikleri	62
Şekil 4.4	Bitki ekstraktlarının kateşol eşdeğeri olan fenolik madde içerikleri	62
Şekil 4.5	Dereotu ekstraktlarının DPPH radikali giderme aktivitesi	63
Şekil 4.6	Gelincik ekstraktlarının DPPH radikali giderme aktivitesi	64
Şekil 4.7	Kuzukulağı ekstraktlarının DPPH radikali giderme aktivitesi	64
Şekil 4.8	Roka ekstraktlarının DPPH radikali giderme aktivitesi	65
Şekil 4.9	Tere ekstraktlarının DPPH radikali giderme aktivitesi	65
Şekil 4.10	Linoleik asit peroksidasyonunda dereotu aseton (A), etanol (B), su (C) ekstraktlarının etkisi	69
Şekil 4.11	Linoleik asit peroksidasyonunda gelincik aseton (A), etanol (B), su (C) ekstraktlarının etkisi	70
Şekil 4.12	Linoleik asit peroksidasyonunda kuzukulağı aseton (A), etanol (B), su (C) ekstraktlarının etkisi	71
Şekil 4.13	Linoleik asit peroksidasyonunda roka aseton (A), etanol (B), su (C) ekstraktlarının etkisi	72
Şekil 4.14	Linoleik asit peroksidasyonunda tere aseton (A), etanol (B), su (C) ekstraktlarının etkisi	73
Şekil 4.15	Linoleik asit peroksidasyonunda sentetik antioksidan olan BHA (A) ve BHT (B)'nin etkisi	75

Şekil 4.16	Linoleik asit peroksidasyonunda E vitamini (A) ve C vitamini (B)'nin etkisi	76
Şekil 4.17	Dereotu ekstraktlarının total antioksidan aktivitesi	78
Şekil 4.18	Gelincik ekstraktlarının total antioksidan aktivitesi	78
Şekil 4.19	Kuzukulağı ekstraktlarının total antioksidan aktivitesi	79
Şekil 4.20	Roka ekstraktlarının total antioksidan aktivitesi	79
Şekil 4.21	Tere ekstraktlarının total antioksidan aktivitesi	80
Şekil 4.22	Dereotu ekstraktlarının metal şelatlama kapasitesi	81
Şekil 4.23	Gelincik ekstraktlarının metal şelatlama kapasitesi	81
Şekil 4.24	Kuzukulağı ekstraktlarının metal şelatlama kapasitesi	82
Şekil 4.25	Roka ekstraktlarının metal şelatlama kapasitesi	82
Şekil 4.26	Tere ekstraktlarının metal şelatlama kapasitesi	83
Şekil 4.27	Bitki ekstraktlarının EDTA eşdeğeri olarak metal şelatlama kapasiteleri	84
Şekil 4.28	Su ekstraktlarının süperoksit radikalini giderme aktivitesi	85
Şekil 4.29	Dereotu ekstraklarının Fe^{+3}'ü Fe^{+2}'ye indirgeme kapasitesi	87
Şekil 4.30	Gelincik ekstraklarının Fe^{+3}'ü Fe^{+2}'ye indirgeme kapasitesi	88
Şekil 4.21	Kuzukulağı ekstraklarının Fe^{+3}'ü Fe^{+2}'ye indirgeme kapasitesi	88
Şekil 4.32	Roka ekstraktlarının Fe^{+3}'ü Fe^{+2}'ye indirgeme kapasitesi	89
Şekil 4.33	Tere ekstraktlarının Fe^{+3}'ü Fe^{+2}'ye indirgeme kapasitesi	89

TABLOLAR DİZİNİ

		Sayfa No
Tablo 2.1.	Bazı serbest radikal türleri	7
Tablo 2.2.	Organizmada bulunan temel antioksidan savunma sistemleri	22
Tablo 2.3.	Gıdaları korumada kullanılan bazı sentetik antioksidanlar	36
Tablo 2.4.	In vitro koşullarda uygulanan antioksidan aktivite tayin metodları	39
Tablo 2.5.	Deneyde kullanılan bitkiler	45
Tablo 4.1.	Kurutulmuş bitkilerden ekstrakte edilen bileşiklerin verimleri	60
Tablo 4.2	Çalışılan bitki ekstraktlarının ve standartların DPPH radikali giderme aktivitesi sonuçlarından elde edilen EC_{50} değerleri	67
Tablo 4.3.	Ekstraktların ve standartların lipid peroksidasyonunu inhibe etme oranları	77
Tablo 4.4	Bitki ekstraktları ve standartların H_2O_2 giderme aktiviteleri	86

KISALTMALAR

ABTS	2,2'-Azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat)
BHA	Bütillendirilmiş hidroksianisol
BHT	Bütillendirilmiş hidroksitoluen
DA	Dereotu aseton ekstraktı
DE	Dereotu etanol ekstraktı
DPPH	1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil
DS	Dereotu su ekstraktı
FCR	Folin-Ciocalteu reaktifi
FRAP	Demir (III)iyonu indirgeme gücü
FTC	Ferrik tiyosiyanat
GA	Gelincik aseton ekstraktı
GAE	Gallik asit eşdeğeri
GE	Gelincik etanol ekstraktı
GS	Gelincik su ekstraktı
G-SH	Glutatyon
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
GSH-Red	Glutatyon redüktaz
GST	Glutatyon-S-transferaz
KA	Kuzukulağı aseton ekstraktı
KE	Kuzukulağı etanol ekstraktı
KS	Kuzukulağı su ekstraktı
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
MDA	Malondialdehit
NADH	Nikotinamidadenindinükleotid
NBT	Nitroblue tetrazolyum
ORAC	Oksijen radikalini absorblama kapasitesi
PG	Propil gallat
PMS	Fenazin metasülfat
RA	Roka aseton ekstraktı

RE	Roka etanol ekstraktı
ROT	Reaktif oksijen türleri
RS	Roka su ekstraktı
SOD	Süperoksit dismutaz
TA	Tere aseton ekstraktı
TBHQ	t-Bütil hidroksikinon
TE	Tere etanol ekstraktı
TEAC	Trolox ekivalenti antioksidan kapasite
TPC	Toplam fenolik madde
TRAP	Toplam radikal tutma parametresi
TS	Tere su ekstraktı

1. GİRİŞ

Organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında veya çevresel ajanlar (pestisidler, aromatik hidrokarbonlar, toksinler, çözücüler vb.), stres, radyasyon gibi çeşitli dış faktörlerin etkisiyle serbest radikaller meydana gelmektedir. Serbest radikaller dış orbitallerinde ortaklanmamış elektron bulunduran, kısa ömürlü, reaktif moleküllerdir. Serbest radikallerin en önemlileri süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$), hidroksil radikali ($^{\bullet}OH$), singlet oksijen ($^1O_2$) ve radikalik olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) ve peroksinitrit ($ONOO^-$) olup "reaktif oksijen türleri (ROT)" olarak bilinirler. ROT'lar organizmada lipidler, nükleik asitler, proteinler ve karbonhidratlar gibi biyolojik moleküllerle kolayca reaksiyona girebilirler. Bu yüzden yaşlanma, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, immün sistem hastalıkları, katarakt, diyabet, böbrek ve karaciğer hastalıkları gibi pekçok hastalıktan sorumlu tutulurlar (Halliwell ve Gutteridge, 1990).

Endüstri ve gıda teknolojisi açısından bakıldığında; özellikle birden fazla doymamış bağ içeren yağ asitleri ve yağca zengin ürünler oksidasyona oldukça açıktır. Bu yüzden gıdaların korunması ve depolanması sırasında meydana gelen en büyük problemlerden biri lipid peroksidasyonudur. Lipid peroksidasyonu sıvı ve katı yağlarda acılaşmaya (ransidleşme), yağ içeren diğer gıdalarda ise renk, tat, aroma, tekstür ve kıvamda bozulmalara ve besinsel kalitenin azalmasına neden olmaktadır (Şenköylü, 2001). Bu nedenle oksidasyon kararlılığını arttırmak için yağlarda uzun süredir bütillendirilmiş hidroksianisol (BHA), bütillendirilmiş hidroksitoluen (BHT), t-bütil hidrokinon (TBHQ) ve propil gallat (PG) gibi sentetik antioksidanlar gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır.

Antioksidanlar serbest radikallerin etkilerini yokedici sistemlerdir. Vücutta ROT'ların oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek üzere enzimatik veya enzimatik olmayan birçok endojen antioksidan savunma mekanizması bulunmaktadır. Bunun yanında bazı ilaçlar, vitaminler ve sentetik gıda antioksidanları

da eksojen antioksidanlar olarak değerlendirilebilir. Serbest radikal oluşumunu geciktiren veya tamamen durduran koruyucu antioksidanlar (enzimler, metal şelatörleri) veya lipid peroksidasyonunun ilerlemesini engelleyen zincir kırıcı antioksidanlar (askorbik asit, α-tokoferol, flavonoidler) olarak etki gösterirler.

İnsan vücudunu serbest oksijen radikallerine karşı korumada doğal ve fenolik bileşiklerce zengin meyve ve sebzelerin yararlı olduğu bilinmektedir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarla reaktif oksijen türlerine karşı bitkisel kaynaklardaki fitonutrientlerin yararlı olduğu; meyve ve sebzelerin koruyucu etkilerinin içerdikleri askorbik asit (C vitamini), α-tokoferol (E vitamini), karotenoidler, glutatyon, flavonoidler ve fenolik asitler gibi doğal bileşiklerden dolayı olduğu bildirilmiştir (Halvorsen vd., 2002). Vücudun endojen savunma sisteminin düzenli ve dengeli bir diyetle alınacak antioksidan bileşikler ile desteklenmesi gerekmektedir. Bu yüzden diyetle antioksidan alımında artma veya antioksidanlarla zenginleştirilmiş gıdalar giderek önem kazanmaktadır.

Gıda sanayinde yağların ve yağ içeren diğer ürünlerin korunması ve raf ömrünün uzatılması için genellikle bütillendirilmiş hidroksitoluen (BHT) ve bütillendirilmiş hidroksianisol (BHA) kullanılmaktadır. Ancak yapılan araştırmalar bu bileşiklerin toksiditesinden bahsederek, onların karsinojenik olma riskini ortaya koyar niteliktedir (Ito vd., 1986). Bu sebeple, tüketiciler tercihlerini doğal tarımsal ürünlere yöneltmiş ve işlenmiş gıdalarda da sağlık, kalite ve güvenlik arayışlarını ön plana çıkarmıştır. Doğal biyoaktif bileşiklerle ilgilenen özellikle farmasötik ve gıda endüstrilerinden gelen talep üzerine, doğal bileşiklerin antioksidan aktiviteleri araştırmacılar tarafından yoğun şekilde çalışılmaktadır. Geniş bir çeşitlilik ve dağılım gösteren bitkisel kaynaklar hem vücutta, hem de işlenmiş gıdalarda meydana gelen oksidatif hasara karşı koruma sağlayabilecek daha güvenilir ve daha sağlıklı antioksidanlar sunabilir. Bu yüzden de araştırmacılar doğal kaynaklardan elde edilebilen yüksek antioksidan aktiviteli ekstraktları sentetik antioksidanların yerine kullanmayı hedeflemektedirler.

Endüstriyel uygulamalarda kullanılmak üzere; meyve, sebze, aromatik bitki ve özellikle çeşitli baharatların tohum, meyve, yaprak, kök, kabuk gibi kısımları

kullanılarak antioksidanca zengin ekstraktlar tanımlamak üzere yapılmış çok sayıda çalışma vardır (Karpinska vd., 2001, Tepe vd., 2006, Chen vd., 2007). Ancak yapılan literatür taramasında dereotu, gelincik, kuzukulağı, roka ve tere bitkilerinin antioksidan aktivitelerinin tayinine yönelik çok az sayıda araştırmaya rastlanmıştır.

Çalışmamızda günlük beslenmede sıklıkla yer alan ve yaprakları salata-baharat olarak tüketilen dereotu, gelincik, kuzukulağı, roka ve tere bitkilerinin çeşitli metodlarla antioksidan aktiviteleri ve bu bitki ekstraktlarının sentetik antioksidanlara alternatif olabilecek doğal antioksidan kaynağı olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Bitkilerin etanol, su ve aseton ekstraktları alınarak, her bir ekstraktın toplam fenolik madde miktarı, metal iyonlarını şelatlama kapasitesi, FTC metodu ile toplam antioksidan aktivitesi, indirgeme kapasitesi, DPPH serbest radikali giderme aktivitesi, süperoksit radikali giderme aktivitesi ve H_2O_2 giderme aktivitesi tayin edilmiştir. Sonuçlar α-tokoferol, askorbik asit, BHT ve BHA gibi çeşitli standart maddeler ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Serbest Radikaller

Atom veya moleküllerdeki elektronlar çekirdeğin etrafında orbital olarak tanımlanan bölgelerde hareket ederler. Her yörüngede birbirine zıt yönde hareket eden en fazla iki elektron bulunur. Bir atom veya molekül dış orbitallerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektron bulunduruyorsa "serbest radikal (SR)" olarak tanımlanır. Bu tip moleküller, ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftirler (Halliwell ve Gutteridge, 1990). En basit serbest radikal bir elektron ve bir protonu olan hidrojen atomudur. Serbest radikallerde eşleşmemiş elektron, atom veya molekülün üst kısmına konulan bir nokta ile belirtilir.

Çeşitli fiziksel etkenler ve kimyasal olaylar nedeniyle çevrede ve hücresel koşullarda devamlı bir radikal yapımı vardır. Serbest radikaller üç temel yolla oluşur (Akkuş, 1995, Onat vd., 2002):

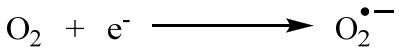
a) Kovalent bağların homolitik kırılması ile: Kovalent bağın kopması sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalır.

$$X{:}Y \longrightarrow X^{\bullet} + Y^{\bullet}$$

b) Normal bir molekülün elektron kaybetmesi ile: Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde eşleşmemiş elektron kalıyorsa radikal formu oluşur. Örneğin, askorbik asit ve tokoferol gibi hücresel antioksidanlar, radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formu oluşur.

c) Normal bir moleküle tek bir elektron transferi ile: Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde eşleşmemiş elektron oluşuyorsa bu tür

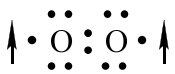
indirgenme radikal oluşumuna sebep olabilir. Örneğin, moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan süperoksidi oluşturur.



Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu oluşurlar. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya nötral olabilirler. Biyolojik sistemlerde en önemli radikaller, serbest oksijen radikalleri (SOR) olmakla beraber; C, N, S türevi olan radikaller ve inorganik moleküller de vardır. Cu^{2+}, Fe^{3+}, Mn^{2+}, Mo^{5+} gibi geçiş metallerinin de ortaklanmamış elektronları olduğu halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Fakat bu iyonlar reaksiyonları katalizlediklerinden dolayı serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar (Akkuş, 1995).

2.1.1. Oksijen ve Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Moleküler oksijen (O_2), iki kovalent bağ yapmasına rağmen, molekülün paramanyetik özellikte olması eşleşmemiş elektron içerdiğini gösterir. Dış orbitallerinde bulunan iki elektron, spinleri aynı yönde ve farklı orbitallerde iken molekül minimum enerji seviyesindedir (Lee, 1991). Serbest radikal tanımına göre oksijen bir "diradikal" olarak değerlendirilir. Diradikal oksijen, spin kısıtlanmasından dolayı radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde, diğer serbest radikaller ile kolayca reaksiyona girer (Akkuş, 1995, http://www.mustafaaltinisik.org).

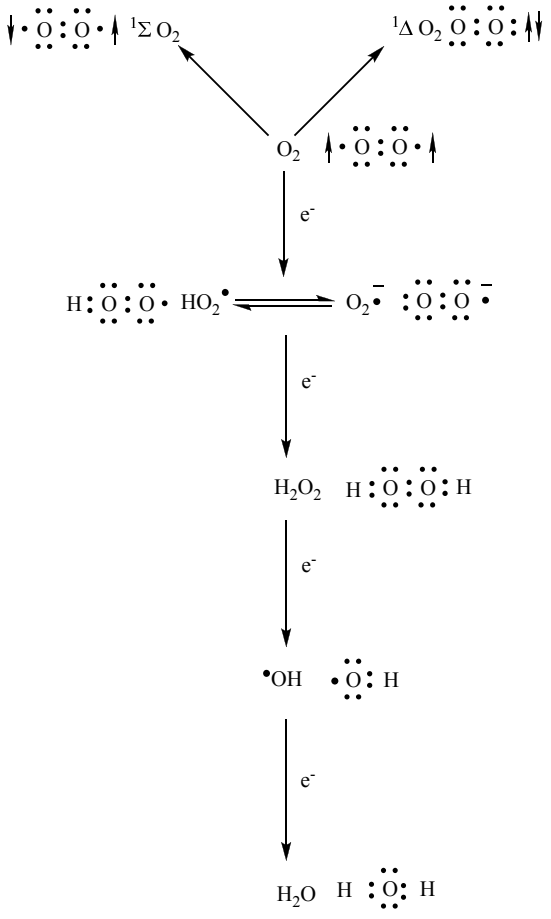


Moleküler O_2

Organizmada, pek çok oksidaz ve oksijenazın aktif merkezlerinde bulunan geçiş metalleri (Cu^{2+}, Fe^{3+} gibi) vasıtasıyla moleküler oksijene tek elektron transferi suretiyle oksijenin spin kısıtlaması aşılabilir.

O_2'nin reaktivitesini arttırmak için spin kısıtlamasını aşmanın diğer bir yolu, enerji absorbsiyonu ile oksijenin uyarılmış hale geçmesidir (Halliwell ve Gutteridge, 1990). Bunun sonucu singlet oksijen oluşur.

Oksijen bulunan bir ortamda fiziksel ve kimyasal etkenlerle, zorunlu metabolik reaksiyonlar sonucu oksijen radikalleri üretilir. Oksijen radikalleri biyolojik sistemlerde bulunan en önemli serbest radikallerdir. Bunlar arasında süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$), hidroksil radikali ($^{\bullet}OH$) ve radikal olmayan hidrojen peroksitin (H_2O_2) özel yerleri vardır ve "reaktif oksijen türleri (ROT)" olarak bilinirler.



Şekil 2.1. Oksijenin suya indirgenmesi ve diğer oksijen türlerinin oluşumu

Reaktif oksijen türleri, çeşitli serbest radikallerin oluştuğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli organik radikaller ($R^{\bullet}$), peroksil (peroksi) radikalleri ($ROO^{\bullet}$), alkoksil (alkoksi) radikalleri ($RO^{\bullet}$), tiyil radikalleri ($RS^{\bullet}$) gibi önemli serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar. Tiyil radikalleri oksijenle tekrar reaksiyona girip sülfenil ($RSO^{\bullet}$) veya tiyil peroksil ($RSO_2^{\bullet}$) gibi radikalleri de meydana getirebilirler (Akkuş, 1995, http://www.mustafaaltinisik.org).

Tablo 2.1. Bazı serbest radikal türleri (Halliwell, 1994)

Adı	Formülü	Tanımı
Hidrojen atomu	$H^{\bullet}$	En basit serbest radikal
Süperoksit	$O_2^{\bullet -}$	Oksijen merkezli radikal, seçimli reaktif
Hidroksil	$^{\bullet}OH$	En fazla reaktif oksijen radikali. İnsan vücudundaki tüm moleküllere saldırır.
Triklorometil	$CCl_3^{\bullet}$	C merkezli radikal, CCl_4 metabolizması sonucu üretilir ve genellikle O_2 ile hızla reaksiyona girer.
Tiyil	$RS^{\bullet}$	Kükürt üzerinde eşleşmemiş elektron bulunduran türlerin genel adı
Peroksil, Alkoksil	$RO_2^{\cdot}$, $RO^{\cdot}$	Organik peroksitlerin yıkımı sırasında oluşan oksijen merkezli radikaller.
Nitrik oksit	$NO^{\bullet}$	L-arginin amino asidinden in vivo koşullarda üretilir.
Azotdioksit	$NO_2^{\bullet}$	$NO^{\bullet}$'nun O_2 ile reaksiyonunda oluşur. Kirli hava, sigara dumanında vb. bulunur.
Hidrojen peroksit	H_2O_2	Reaktivitesi en düşük, moleküler hasar yeteneği düşük.
Singlet oksijen	$^1O_2$	Oksijenin güçlü oksidatif formu

Reaktivite radikale ve ortamda bulunan moleküle bağlıdır. İki serbest radikal karşılaştığında eşleşmemiş elektronları kovalent bağ yaparak birleşir. Ancak bunun sonucunda oluşan türler de reaktif olabilir. Buna örnek $NO^{\bullet}$ ve $O_2^{\bullet -}$'in çok hızlı reaksiyonu ile bir nonradikal ürün olan peroksinitritin oluşumu verilebilir:

$$O_2^{\bullet -} + NO\bullet \longrightarrow ONOO^-$$

Bununla birlikte bir serbest radikal, radikal olmayan bir madde ile reaksiyona girerek yeni bir radikal oluşturabilir. Biyolojik moleküllerin büyük bir kısmı radikal olmadığı için, in vivo şartlarda reaktif bir radikalin oluşumu, genellikle zincir reaksiyonunun başlamasına yol açabilir (Nehir El vd., 1999).

2.1.1.1. Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$)

Hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit radikali oluşur. Başlıca şu yollarla üretilmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1990, Halliwell, 1994):

1. Katekolaminler, hidrokinonlar, redükte flavinler, tiyoller, tetrahidrofolatlar gibi biyolojik moleküllerin aerobik ortamda otooksidasyonu sonucu süperoksit oluşur.

2. Aktive olmuş fagositik hücreler (nötrofiller, monositler, makrofajlar, eozinofiller), virüs veya bakteriyi inaktive etmek için bol miktarda süperoksit üretirler.

3. Mitokondriyal enerji metabolizması sırasında oluşan elektron sızıntısı sonucu kullanılan oksijenin %1-3'ü süperoksit radikali yapımı ile sonlanır.

4. İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu süperoksidi meydana getirebilir.

$$Cu^+ / Fe^{2+} + O_2 \longrightarrow Cu^{2+} / Fe^{3+} + O_2^{\bullet -}$$

Süperoksit radikalinin önemi H_2O_2 kaynağı olması ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Ayrıca hücresel koşullarda üretilen süperoksit hem oksitleyici

hem de indirgeyici olarak davranabilir. Örneğin; ferrisitokrom c ile reaksiyonunda indirgeyici olarak davranarak bir elektron kaybeder ve oksijene dönüşür. Epinefrin oksidasyonunda ise oksidan olarak davranarak bir elektron alır ve H_2O_2'ye indirgenir (Akkuş 1995). Süperoksit radikali düşük pH değerlerinde daha reaktiftir ve oksidan olan perhidroksil radikalini ($HO_2^{\bullet}$) oluşturmak üzere protonlanır. Süperoksit radikali ve perhidroksi radikali birbiriyle reaksiyona girince biri yükseltgenir, diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonu sonucu H_2O_2 oluşur.

$$HO_2^{\bullet} + O_2^{\bullet -} + H^{+} \longrightarrow O_2 + H_2O_2$$

Süperoksidin fizyolojik bir serbest radikal olan $NO^{\bullet}$ ile birleşmesi sonucu reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitrit meydana gelir. Bu şekilde $NO^{\bullet}$ normal etkisini inhibe eder, ayrıca peroksinitritler direkt proteinlere etki ederler.

$$O_2^{\bullet -} + NO\bullet \longrightarrow ONOO^{-}$$

2.1.1.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu H_2O_2 oluşur.

$$O_2 + 2\,e^{-} + 2\,H^{+} \longrightarrow H_2O_2$$

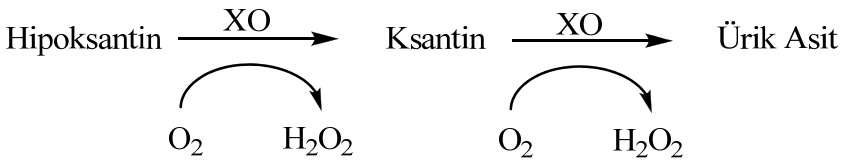
$$O_2^{\bullet -} + e^{-} + 2\,H^{+} \longrightarrow H_2O_2$$

Yapısında eşleşmemiş elektron içermediği için radikal değildir, ancak biyolojik membranları geçerek hücrelerin arasına veya içine kolayca difüze olabilir ve uzun ömürlü bir oksidandır (Halliwell ve Gutteridge, 1990, Halliwell, 1994).

Biyolojik sistemlerde H_2O_2'nin asıl üretimi süperoksidin nonenzimatik veya SOD katalizli dismutasyon reaksiyonu ile H_2O_2'ye dönüşmesiyle olur.

$$2\,O_2^{\bullet -} + 2\,H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2^{\bullet}$$

Ayrıca, aminoasit oksidaz, ksantin oksidaz (XO) gibi bazı oksidaz enzimlerinin faaliyeti sonucunda in vivo olarak H_2O_2 üretilir (Murray vd., 1996).



H_2O_2 bir radikal olmadığı halde, ROT içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli rol oynar. Çünkü geçiş metal iyonları varlığında Fenton reaksiyonu sonucu; süperoksit radikali varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve daha çok hasar verici olan hidroksil radikaline dönüşür (Halliwell vd., 2000).

Haber-Weiss reaksiyonu süperoksidin direkt olarak H_2O_2 ile reaksiyonudur, katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerler. Demirle katalizlenen ikinci şekli ise çok hızlıdır. Bu reaksiyonda önce ferri demir (Fe^{3+}) süperoksit tarafından ferro demire (Fe^{2+}) indirgenir. Sonra Fenton reaksiyonu ile H_2O_2'den $^{\bullet}OH$ ve ^{-}OH üretilir. Reaksiyon mekanizması aşağıdaki şekildedir:

1) $O_2^{\bullet -} + Fe^{3+} \longrightarrow O_2 + Fe^{2+}$

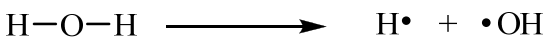
2) $H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow OH^- + {}^{\bullet}OH + Fe^{3+}$ (Fenton reaksiyonu)

Net $O_2^{\bullet -} + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + OH^- + {}^{\bullet}OH$ (Haber-Weiss Reaksiyonu)

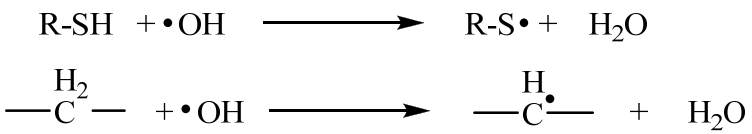
Süperoksit radikalinin lipidte çözünürlüğü sınırlı olduğu halde, H_2O_2 lipitte çözünebilir. Bu yüzden H_2O_2 kendisinin oluştuğu yerden uzakta olan ve Fe^{2+} içeren membranlarda hasar oluşturabilir.

2.1.1.3. Hidroksil radikali (•OH)

Hidroksil radikali geçiş metalleri varlığında H_2O_2'nin indirgenmesiyle (Fenton reaksiyonu) oluşur. Suyun yüksek enerjili iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalması sonucu da oluşur.



Biyolojik sistemlerdeki en reaktif ve hasar verici radikal türüdür. Yarılanma ömrü çok kısa olmasına rağmen ortamda rastladığı her biyomolekülle tepkimeye girer ve oluştuğu yerde büyük hasara sebep olur (Akkuş, 1995, Halliwell ve Gutteridge, 1990). Tiyoller ve yağ asitleri gibi moleküllerden bir proton koparak tiyil radikalleri ($RS^{\bullet}$), C merkezli organik radikaller ($R^{\bullet}$), organik peroksitler ($RCOO^{\bullet}$) gibi yeni radikallerin oluşmasına sebep olur.



Her tür biyolojik molekülle reaksiyona girse de özellikle elektronca zengin bileşikler tercihli hedefleridir, nükleik asitler (pürin ve pirimidin bazları) ve proteinler (aromatik amino asitler) ile çeşitli radikalik tepkimeler verir.

2.1.1.4. Singlet oksijen ($^1O_2$)

Moleküler oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle singlet oksijen oluşur. Singlet oksijen ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal değildir. Oksijenin ortaklanmamış elektronları paralel spinli olduğundan oksijendeki spin kısıtlaması singlet oksijende yoktur ve oldukça reaktif bir oksijen bileşiğidir (Akkuş, 1995,

http://www.mustafaaltinisik.org). Delta ve sigma olmak üzere iki şekli vardır. Delta şekli daha düşük enerjili (92 kj) olduğundan sigma şekline (155 kj) göre daha uzun yarıömürlüdür (Cotton ve Wilkinson, 1988).



$^1\Delta\ O_2$ $^1\Sigma\ O_2$

Singlet Oksijen ($^1O_2$)

Vücutta, pigmentlerin (flavin içeren nükleotidler, retinal, bilirubin) oksijenli ortamda ışığı absorblamasıyla, $O_2^{\bullet -}$'nin dismutasyon tepkimesi sırasında, porfirya gibi porfirin metabolizması hastalıklarında oluşabilir (Halliwell ve Gutteridge, 1990).

2.1.1.5. Hipoklorik asit (HOCl)

Doku makrofajları gibi fagositik hücreler, nötrofil, eozinofil gibi granülositler mikroorganizmaları öldürmek için klorlanmış oksidanlar üretebilir (Murray vd., 1996, Meram ve Aktaran, 2002). HOCl miyeloperoksidaz enzimi tarafından H_2O_2 ve Cl^- iyonunun birleşmesi sonucu oluşur. Dokularda hasar oluşturan güçlü bir oksidandır.

$$H_2O_2 + Cl^- + H^+ \xrightarrow{MP} HOCl + H_2O$$

2.1.1.6. Nitrik oksit ($NO^\bullet$)

$NO^\bullet$ hem fizyolojik hem patofizyolojik süreçlerde önemli bir role sahip serbest radikaldir. Nitrik oksit çeşitli reseptörlerin aktivasyonu sonucu L-arginin ve oksijenden nitrik oksit sentaz (NOS) etkisiyle sentezlenir. Vasküler endoteliyal hücrelerde oluşturulan önemli bir vazodilatördür, önemli bir nörotransmitterdir, inflamasyon ve

enfeksiyon durumlarında sitokinler ve endotoksinler tarafından indüklenerek bol miktarda üretilir ve parazitlerin öldürülmesinde rol oynar (Halliwell, 1994, Murray, 1996).

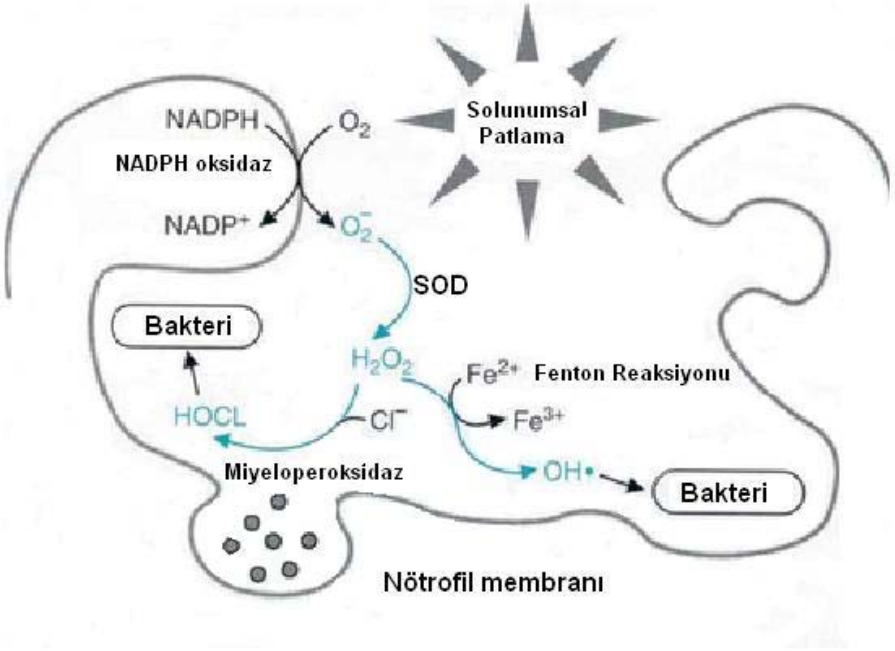
$NO^{\bullet}$ insan metabolizmasında yararlıdır, fakat fazlası sitotoksik olabilir. Nitrik oksidin süperoksit radikaliyle etkileşmesi sonucu oluşan peroksinitrit ($ONOO^-$), nitrik oksitin toksisitesinden sorumlu başlıca bileşiktir. Proteinlerdeki –SH gruplarını oksitleyerek direkt zarar verebilir. Ayrıca fizyolojik pH'da protonlanabilir ve güçlü bir lipid peroksidasyon başlatıcısı olan azotdioksiti ($NO_2^{\bullet}$), hidroksil radikalini ($^{\bullet}OH$), fenilalanin, tirozin gibi aromatik halkaları nitrolama ajanı olan nitronyum iyonunu (NO_2^+) oluşturabilir (Halliwell, 1994, Murray, 1996).

2.1.2. Hücredeki Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynakları

Serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türleri organizmada özel metabolik olaylar için veya "kazara" üretilirler.

2.1.2.1. Biyolojik kaynakları

a) Solunumsal Patlama: Aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller, eozinofiller ve fagositik lökositler çeşitli biyolojik hedeflerin parçalanmasını sağlayan ve enfeksiyona karşı vücudun hücresel cevabını başlatan hücrelerdir. Fagositik solunumsal patlama sırasında çeşitli serbest oksijen radikalleri (süperoksit anyonu, H_2O_2, hidroksil radikali ve hipoklorik asit) oluşur. Fagosite edilmiş mikroorganizma, bakteri bu ürünlerin etkisiyle öldürülür. Ancak bu oksidan ürünler hücrelerin antioksidan savunma güçlerini aştığında normal konakçı hücrelerine zarar verirler ve çeşitli hastalıkların patogenezinde rol oynarlar. Örneğin romatoit artritli (RA) hastaların diz eklemlerinde fazla miktarda nötrofil birikir ve bunlardan ortalama salınan serbest radikaller eklem hasarını hızlandırır.



Şekil 2.2. Fagositik solunumsal patlamada oluşan reaktif oksijen türleri (http://www.mustafaaltinisik.org)

b) Radyasyon ve çevresel ajanlar (hava kirliliği, pestisidler, sigara dumanı, çözücüler, anestezikler, aromatik hidrokarbonlar) serbest radikal oluşumuna neden olmaktadır.

c) Antineoplastik ajanlar (nitrofurantoin, bleomisin, doxorubicin, adrioxmicine): Antikarsinojen bir ajan olan doxorubicin hücrenin DNA replikasyonu inhibe eder. Bu sırada H_2O_2 ve $O_2^{\bullet -}$ oluşumuna ve sonuçta lipid peroksidasyonunun başlamasına yol açar (Winterbourn vd., 1985, Weijl vd., 1997).

d) Stres: Sinirsel uyarılar katekolaminlerin sentezinde artış yapar (Murray vd., 1996). Katekolaminlerin oksidasyonu ise serbest radikal kaynağıdır. Bu olay stresin hastalıkların patogenezindeki rolünün serbest radikal üretimiyle ilgili olabileceğini göstermesi bakımından önemlidir (Akkuş, 1995).

2.1.2.2. İntrasellüler kaynakları

a) Normalde hücrelerde en büyük serbest oksijen radikali kaynağı mitokondriyal elektron taşıma zincirinden sızıntıdır. Hücrelerde kullanılan oksijen büyük bir kısmı (yaklaşık % 95) mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri ile dört elektron alarak suya indirgenir. Bu sistemde olan elektron sızıntısı sonucu oksijenin % 1-3'ü süperoksit radikalini üretebilir (Halliwell, 1994).

b) Endoplazmik retikulum ve nükleer membranlarda serbest radikal üretimi, membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır.

c) Küçük moleküllerin otooksidasyonu: Tiyoller, katekolaminler, tetrahidrofolatlar, flavinler gibi bazı bileşiklerin otooksidasyonu da süperoksit radikali kaynağıdır.

d) Birçok enzimin (ksantin oksidaz, aldehit oksidaz, flavoprotein dehidrogenaz, aminoasit oksidaz, triptofon dioksijenaz gibi) katalitik döngüsü sırasında H_2O_2 ve $O_2^{\bullet -}$ ortaya çıkar (Murray vd., 1996)

e) Özellikle demir ve bakır gibi geçiş metalleri, fizyolojik şartlarda oksidoredüksiyon reaksiyonlarında yer alırlar. Bu özelliklerinden dolayı serbest radikal reaksiyonlarını hızlandıran katalizörler olarak iş görürler. Demir ve bakır özellikle tiyollerden tiyil sentezini, H_2O_2 ve $O_2^{\bullet -}$den $^{\bullet}OH$ sentezini katalizler (http://www.mustafaaltinisik.org).

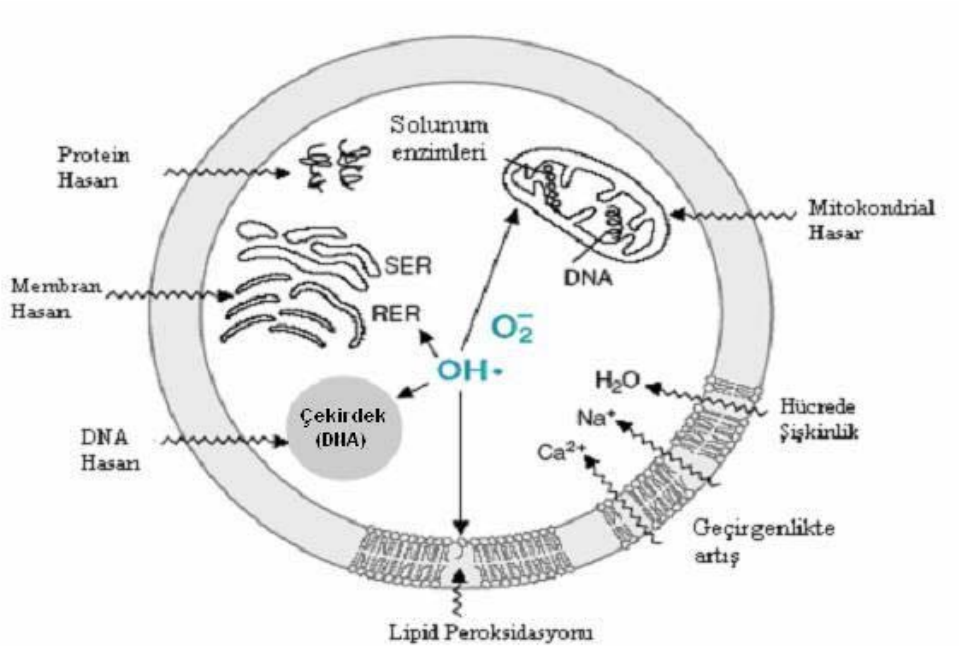
f) Toksik maddeler çeşitli etkilerle hücrede serbest radikal üretimini arttırırlar; toksinin kendisi bir serbest radikaldir, toksin bir serbest radikale metabolize olabilir veya toksinin metabolizması sonucu serbest oksijen radikali meydana gelir.

g) Araşidonik asit metabolizması da reaktif oksijen metabolitlerinin önemli bir kaynağıdır. Araşidonik asit, membran yapısında bulunan, önemli fizyolojik fonksiyonları olan eikazonoidler ailesinin sentezinde başlangıç maddesi olan 20

karbonlu çoklu doymamış bir yağ asididir. Fagositik hücrelerin uyarılması sonucu plazma membranındaki araşidonik asit serbestleşir ve enzimatik oksidasyonla çeşitli serbest radikal ana ürünleri meydana gelir (Akkuş, 1995).

2.1.3. Serbest Radikallerin Etkileri

Güçlü reaktif özelliğe sahip olan serbest radikaller tüm hücre bileşenleriyle kolayca etkileşebilirler. Hücrenin savunma mekanizmaları ile ortadan kaldırılmazlarsa, biyolojik moleküllerle reaksiyona girerek yeni serbest radikallerin oluştuğu zincirleme bir reaksiyon başlatır.



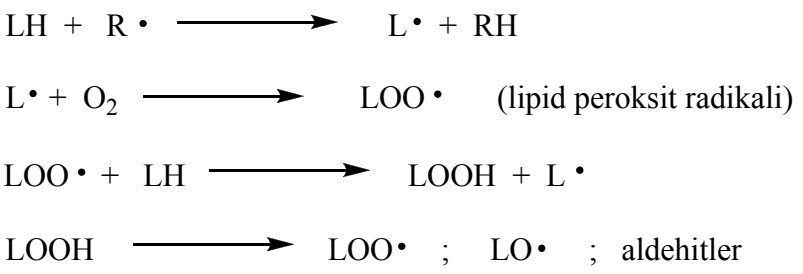
Şekil 2.3. Serbest radikallerin hücresel hedefleri (Onat vd., 2002)

2.1.3.1. Serbest radikallerin lipidlere etkileri

Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki ve gıdalardaki kolesterol ve yağ asitleri serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikaller etkisi ile oksidatif yıkımı **nonenzimatik lipid peroksidasyonu** olarak bilinir ve zincir reaksiyonu şeklinde ilerler.

Lipid peroksidasyonu organizmada oluşan serbest radikallerin özellikle $^{\bullet}OH$'in, membran yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerindeki (PUFA) konjuge çift bağlardan bir H atomu çıkarmasıyla başlar (radikalik reaksiyonun başlama aşaması). Bunun sonucunda yağ asidi zinciri bir lipid radikali ($L^{\bullet}$) niteliği kazanır. Molekül içi bir düzenlenme ile daha kararlı olan konjuge dienler oluşur. Aerobik şartlarda, konjuge dienin moleküler oksijenle birleşmesi sonucu lipid peroksil radikalleri ($LOO^{\bullet}$) oluşur. $LOO^{\bullet}$ oluşumu önemlidir, çünkü membran yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek, yeni lipid radikallerinin ($L^{\bullet}$) oluşumuna yol açar. Kendisi de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid peroksitlere (LOOH) dönüşür. Ayrıca membran proteinlerine de saldırabilir. Böylece reaksiyon otokatalitik olarak devam eder. Bu lipid peroksidasyonunun ilerleme aşamasıdır (Halliwell ve Gutteridge, 1990).

Lipid peroksidasyonu lipid peroksidlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklerine yıkılması ile sona erer (sonlanma basamağı). Yıkıldıklarında, çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metobolize edilir veya ilk atak bölgesinden hücreye difüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu; lipid peroksidasyon seviyesinin indikatörü olarak kabul edilen malondialdehit (MDA) oluşur. Lipid peroksidasyonu, membran yapısına direk ve oluşturduğu reaktif aldehitlerle diğer hücre bileşenlerine indirek olarak zarar veren geri dönüşümsüz bir olaydır (Onat vd., 2002).



Şekil 2.4. Lipid peroksidasyonunun temel reaksiyonları

Hücre membranındaki ve intrasellüler membranlardaki lipid peroksidasyonu serbest radikallerin hepsiyle uyarılabilir ve redoks katalisti olarak görev yapan geçiş metallerinin varlığında artar.

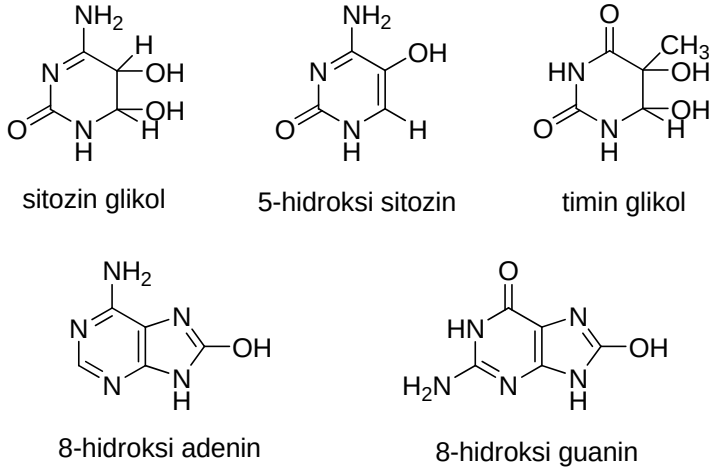
2.1.3.2. Serbest radikallerin proteinlere etkileri

Proteinler serbest radikallere karşı çoklu doymamış yağ asitlerinden daha az hassastır, ancak proteinin aminoasit içeriğine göre radikalik hasardan etkilenme derecesi değişir. Triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi doymamış bağ içeren ve metiyonin, sistein gibi kükürt bulunduran aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenir (Van Der Vliet vd., 1994). Bunun sonucunda karbon merkezli organik radikaller ve sülfür radikalleri oluşur. Bu reaksiyonlar sonucu albümin ve immunoglobin G (IgG) gibi fazla sayıda disülfit bağı bulunduran proteinlerin tersiyer yapısı bozulur. Hemoglobinin ferro demiri (Fe^{+2}) süperoksit ve diğer oksitleyici ajanlarla oksitlenmeye duyarlı olup, bunun sonucunda oksijen taşımayan methemoglobin oluşur (Murray vd., 1996).

2.1.3.3. Serbest radikallerin nükleik asitlere ve DNA'ya etkileri

DNA serbest radikallerden kolay etkilenen bir hedeftir. İyonize edici radyasyonla oluşan radikaller, DNA'yı etkileyerek hücre mutasyonuna ve ölümüne yol

açabilirler. Aktive olmuş nötrofillerden salınan H_2O_2 membranlardan kolayca geçebildiği için hücre çekirdeğine kadar ulaşır burada oluşan hidroksil radikali dört DNA bazıyla kolayca reaksiyona girerek baz modifikasyonlarına yol açar (Halliwell, 1994). DNA hasarı onarılmazsa hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir.



Şekil 2.5. Pürin ve pirimidin bazları üzerine •OH radikalinin etkisiyle oluşan ürünler

2.1.3.4. Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisi

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerinde polisakkarit depolimerizasyonu ve özellikle monosakkarit otooksidasyonu gibi etkileri vardır. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu meydana gelen süperoksitler ve okzalaldehitler diyabet ve sigara içimi ile ilgili patolojik olaylarda rol oynar. Okzaldehitler ayrıca DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece kanser ve yaşlanma olaylarında da rol oynarlar

Bağ dokunun önemli bir mukopolisakkaridi olan hiyalüronik asit sinoviyal sıvıda bol miktarda bulunmaktadır. Romatoit artrit gibi enflamatuar eklem

hastalıklarında hiyalüronik asidin oluşan serbest radikal tarafından parçalandığı gösterilmiştir (Hawkins ve Davies, 1998, McNeil vd., 1985).

Organizmada normal metabolizma sırasında ve patolojik proseslerde serbest radikaller üretilir. Bu serbest radikaller hücresel savunma mekanizmaları ile ortadan kaldırıldığı için, ROT üretimi antioksidan savunma sistemleri tarafından dengelenmektedir. Ancak bazen serbest radikallere metabolize olan toksinler, aşırı oksijen konsantrasyonuna maruz kalma, fagositik aktivasyondaki düzensizlikler, malnütrisyon sonucu diyetle antioksidan etkili bileşiklerin yetersiz alımı gibi sebeplerle hücrede daha fazla reaktif oksijen türleri oluşabilir. Hücresel savunma mekanizmaları vasıtasıyla ortadan kaldırılandan daha fazla ROT oluştuğunda "oksidatif stres" durumu ortaya çıkar. **Oksidatif stres** "oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar yönüne kayması ve hücre hasarına yol açması" olarak tanımlanır (Halliwell, 1994). Oksidatif stresin, ROT'ların neden olduğu hücre hasarları sonucu birçok hastalığa katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Yapılan pek çok çalışmada ülseratif kolit (Dağlı vd., 1997), iskemi/reperfüzyon hasarı (Cruthirds vd., 2003, Taşçı vd., 1995), ateroskleroz (Halliwell ve Gutteridge, 1990), yaşlanma (Hipkiss, 2007), diabetes mellitus (Akkuş, 1995), Alzheimer hastalığı; Parkinson hastalığı (Dauer ve Przedborski, 2003, Mosley vd., 2006), sigara kullanımı (Zalata vd., 2007, Kösecik vd., 2005) ve hava kirliliğinin (Tao vd., 2003) neden olduğu rahatsızlıklar ve KOAH (Bowler vd., 2004) gibi akciğer hastalıkları; çeşitli kanser türleri; felç; hipertansiyon; romatoit artrit ve multiple sklerosis gibi otoimmün hastalıklar; alerji; astım; septik şok; inflamasyon; akut pankreatit; yaşlanmaya bağlı maküler hastalıklar ve katarakt (Anderson, 2007, Halliwell, 1994, Halliwell ve Gutteridge, 1990) gibi klinik durumlara serbest oksijen radikallerinin katıldığı belirtilmiştir. Ancak serbest radikallerin hastalıklar üzerindeki önemi ve rolü incelenirken, serbest radikal oluşumunun hastalığın nedeni mi, yoksa sonucu mu olduğunun ayrımına varılmasının önemi vurgulanmaktadır.

2.2. Antioksidanlar

ROT oluşumu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler. Antioksidanlar serbest radikalleri nötralize etmek için karşılıklı etkileşim halinde olan endergonik ve ekzergonik kaynaklı, çok çeşitli bileşiklerdir. Bu bileşikler gıda kökenli antioksidanlar (C vitamini, E vitamini, karotenoidler, lipoik asit gibi), antioksidan enzimler (SOD, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz gibi), metal bağlayıcı proteinler (ferritin, albümin, laktoferrin, seruloplasmin gibi) ve bitkilerde yaygın şekilde bulunan çeşitli antioksidan fitonutrientlerdir.

"Antioksidan" terimi uluslararası kabul edilmiş herhangi bir tanım ile sınırlandırılmamıştır. Gıdalardaki antioksidanlar "yağlar gibi kolaylıkla okside olabilen materyallerin oksidasyonunu önleyebilen veya geciktirebilen küçük miktardaki maddeler" olarak tanımlanmıştır. Lipidlerin yanı sıra protein, DNA ve karbonhidrat gibi okside olabilen diğer tüm bileşikleri de içeren diğer bir tanım "okside olabilen substratlara kıyasla düşük konsantrasyonlarda bulunan ve substratların oksidasyonunu önleyen veya geciktiren maddeler" şeklindedir (Becker E.M. 2004). Antioksidanların oksidatif reaksiyonlara etkisi farklı şekillerde olabilir (Rice-Evans, 1999, Seven ve Candan, 1996):

a) ROT oluşmasını engelleyen sistemler: Demir ve bakır iyonlarını bağlayan metal şelatörleri, mitokondride doğal olarak oluşan ROT'ları indirgeyen mitokondriyal sitokrom oksidaz gibi.

b) ROT'ları yakalayıp nötralize eden antioksidanlar: Flavonoidler, α-tokoferol, askorbik asit, metiyonin, ürik asit, β-karoten, indirgenmiş glutatyon, mukus gibi. Bu tür antioksidanlar radikalik zincir reaksiyonunun başlamasını inhibe eder veya zincir reaksiyonunun ilerlemesine engel olarak radikalik reaksiyonu sona erdirirler.

c) Oluşan radikalleri detoksifiye eden sistemleri: ROT'ları daha az toksik ürünlere dönüştüren enzim sistemleridir. Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon-S-transferaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz.

2.2.1. Antioksidanların sınıflandırılması

Antioksidanların sınıflandırılması çeşitlilik göstermektedir. Doğal (endojen kaynaklı) ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olarak sınıflandırılabildiği (Akkuş, 1995) gibi enzim ve enzim olmayan antioksidanlar (Seven ve Candan, 1996) şeklinde sınıflandırmalar da mevcuttur. Vücudumuzdaki antioksidan savunma sisteminde yer alan başlıca elemanlar ise; enzimler, metal iyonlarını bağlayan proteinler ve suda ve yağda çözünen radikal tutucularıdır (Percival, 1998, Halliwell, 1994).

Tablo 2.2. Organizmada bulunan temel antioksidan savunma sistemleri

Enzimler	**Radikal** **Yağda çözünenler**	**Tutucular** **Suda çözünenler**	**Metal iyonlarını bağlayan proteinler**
Süperoksit dismutaz	E vitamini	C vitamini	Ferritin (Fe)
Katalaz	β- karoten	Glutatyon	Transferrin (Fe)
Glutatyon peroksidaz	Bilirubin	Ürikasit	Laktoferrin (Fe)
Glutatyon redüktaz	Ubikinon	Sistein	Albümin (Cu)
Glutatson S transferaz	Flavonoidler	Mannitol	Seruloplazmin (Cu)
Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz	Melatonin		Miyoglobin (Fe)
	Lipoik asit		

2.2.1.1. Enzimler

Süperoksit dismutaz (SOD): Serbest radikallere karşı organizmadaki ilk savunma SOD enzimiyle gerçekleşir. Enzimin fizyolojik fonksiyonu, oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikalinin zararlı etkilerine karşı korumaktadır. Süperoksidin daha az toksik olan H_2O_2'ye dönüşümünü katalizler.

$$2\,O_2^{\bullet -} + 2\,H^{+} \xrightarrow{\text{SOD}} H_2O_2 + O_2$$

SOD enzimi H_2O_2 ürettiği için H_2O_2 uzaklaştırıcı enzimlerle işbirliği içinde çalışır. Ökaryotik hücrelerde SOD'un 3 izoformu bulunmaktadır: Sitozolde bulunan dimerik, Cu ve Zn içeren CuZnSOD, mitokondride bulunan tetramerik, Mn içeren MnSOD ve hücredışı sıvılarda bulunan Cu ve Zn içeren ECSOD. SOD'un ektrasellüler aktivitesi çok düşüktür (Seven ve Candan, 1996, Akkuş, 1995, Halliwell, 1994).

Katalaz: Tüm hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan, özellikle peroksizomlarda lokalize dört alt birimden oluşan bir hemprotendir. H_2O_2'nin yıkılmasını sağlar. H_2O_2 oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda indirgeyici aktivite gösterir.

$$2\,H_2O_2 \xrightarrow{\text{katalaz}} 2\,H_2O + O_2$$

H_2O_2 oluşum hızının düşük olduğu veya yüksek konsantrasyonlarda elektron vericisi bulunduğu durumlarda peroksitatif aktivite gösterir (Murray vd., 1996, Onat vd., 2002).

$$H_2O_2 + AH_2 \longrightarrow 2\,H_2O + A$$

Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px): Normal koşullarda katalaz ve glutatyon peroksidaz hücrenin farklı yerlerinde yerleşmiş olmalarından dolayı, karaciğerde endojen oluşan H_2O_2 seviyesini düzenlemede birlikte etkinlik gösterirler.

Hücrede bulunan H_2O_2'in detoksifikasyonundan esas olarak GSH-Px sorumludur. Lipid peroksidasyonunun başlamasını ve gelişmesini engelleyici özellikte olan bir enzimdir. Sitozolde bulunur. Selenyuma bağımlı ve bağımsız olan iki tipi vardır. Selenyuma bağımlı olan; hem H_2O_2, hem lipid hidroperoksitlerini, selenyumdan bağımsız olan; sadece lipid hidroperoksitlerini metabolize edebilmektedir.

$$2\ \text{G-SH} + H_2O_2 \xrightarrow{\text{GSH-P}_x} \text{GSSG} + 2\ H_2O$$

$$2\ \text{G-SH} + \text{ROOH} \xrightarrow{\text{GSH-P}_x} \text{GSSG} + \text{ROH} + H_2O$$

Hücrelerde ayrıca sitozolik olan fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz (PLGSH-Px) enzimi de vardır. Membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkollere indirger.

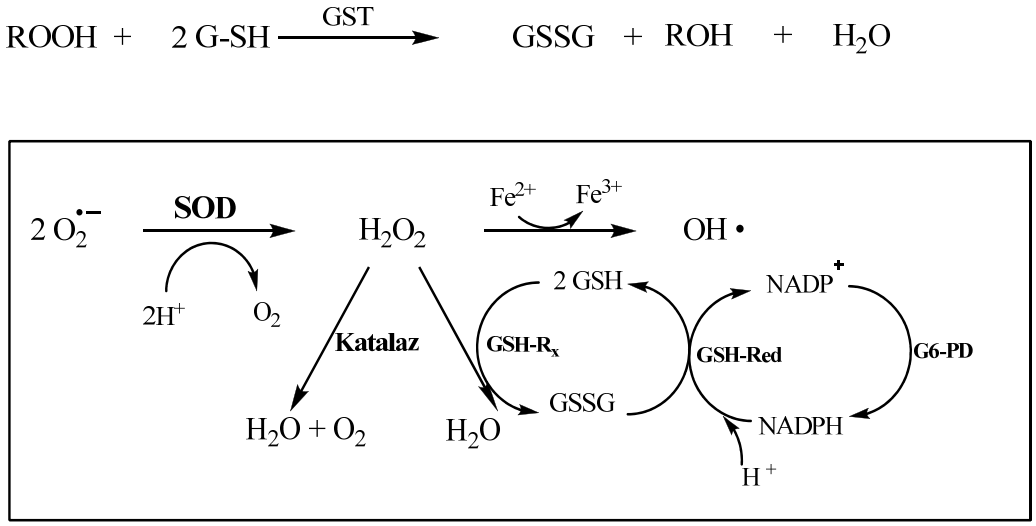
Reaksiyonlar sonucunda oksitlenmiş glutatyon GSSG oluşur. Antioksidan savunmanın etkinliğini sürdürebilmesi için oksitlenmiş glutatyonun tekrar indirgenmiş şekle (G-SH) dönüşmesi gerekir. GSSG konsantrasyonundaki artış oksidatif stresin bir göstergesidir (Seven ve Candan, 1996).

Glutatyon Redüktaz (GSH-Red): GSH-Red prostetik grubu flavin adenin dinükleotid (FAD) olan, dimerik yapıda sitozol ve mitokodride bulunan bir enzimdir (Halliwell, 1994). NADPH varlığında oksitlenmiş glutatyonun indirgenme reaksiyonunu katalizler.

$$\text{GSSG} + \text{NADPH} + H^+ \longrightarrow 2\ \text{G-SH} + \text{NADP}^+$$

Glutatyon-S-Transferazlar (GST): GST her biri iki alt birimden oluşmuş bir enzim ailesidir. Katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahiptirler.

Antioksidan savunma mekanizması açısından önemleri ksenobiyotiklerin (yabancı maddeler) biyotransformasyonu ve detoksifikasyonunda önemli rol almaları ve başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlere karşı selenyumdan bağımsız GSH-Px aktivitesi göstermeleridir (http://www.mustafaaltinisik.org, Akkuş, 1995).

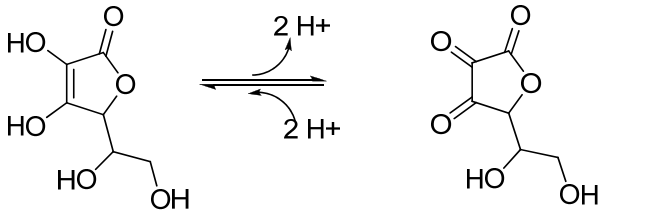


Şekil 2.6. Oksidatif strese karşı enzimatik savunma mekanizmaları (http://www.mustafaaltinisik.org)

2.2.1.2. Yağda ve suda çözünen radikal tutucular

Organizmadaki enzimatik savunma sistemlerine ek olarak, endojen olarak oluşan veya gıdalarla alınan antioksidan özelliği olan moleküller de vardır. Bu antioksidanlar ROT'ları doğrudan nötralize edebilirler.

C Vitamini (Askorbik asit): C vitamini suda çözünen bir vitamindir. Organizmada bir çok bileşik için indirgeyici ajan olarak görev yapar. Güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı aynı zamanda güçlü bir antioksidandır.

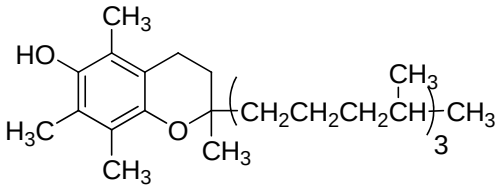


Askorbik Asit Dehidro Askorbik Asit

Askorbat etkili olarak H_2O_2, hipoklorit, süperoksit, hidroksil ve peroksil radikallerini ve singlet oksijeni tutar. Sıvı fazdaki tüm peroksil radikallerini plazma lipidlerine difüze olmadan tutar ve bu şekilde lipid peroksidasyonunun başlamasını engeller. Membranlarda oluşan α-tokoferol radikali ile reaksiyona girerek α-tokoferolün rejenerasyonunu sağlar (Akkuş, 1995, Halliwell, 1994). C vitamininin fagositoz için de önemli olduğu gösterilmiştir; aktive nötrofillerin sebep olduğu peroksidasyona karşı plazma lipidlerini korur ve güçlü bir hipoklorat gidericisidir (Seven ve Candan, 1996). Sigara dumanında bulunan reaktif oksijen türlerine karşı koruma sağlar, sigara içenlerde ve pasif içicilerde plazma C vitamini düzeyleri sigara içmeyenlere göre düşük bulunmuştur. Yapılan çeşitli çalışmalarda bazı gıdalarda ve sigara dumanında bulunan nitrozaminleri inaktive ederek, antitumörjenik rolü olduğu gösterilmiştir (Block, 1999, Anderson, 2007).

Askorbik asidin yüksek konsantrasyonlarda antioksidan aktivitesinin yanında, düşük konsantrasyonlarda prooksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Geçiş metalleri varlığında demiri indirgeyerek Fenton reaksiyonu ile $^{\bullet}OH$ radikali oluşumuna katkı sağlar. Sağlıklı organizmada geçiş metal iyonları proteinlere bağlı bulunduklarından, bu durum in vivo koşullarda çok sınırlıdır ve askorbik asidin antioksidan özelliği prooksidan özelliğinden daha baskındır (Halliwell, 1994).

α-tokoferol: Doğada yaygın olarak bulunan E vitamini ailesinin ana bileşenidir. Antioksidan aktivitesi yapısındaki fenolik hidroksil grubuna sahip aromatik halkadan kaynaklanır (Akkuş, 1995). Lipofilik özelliğinden dolayı lipid peroksidasyonuna karşı hücre membranlarının ve plazma lipoproteinlerinin en önemli zincir kırıcı antioksidanıdır. Peroksil radikallerini gidererek lipid peroksidasyonunu inhibe eder.



α-tokoferol

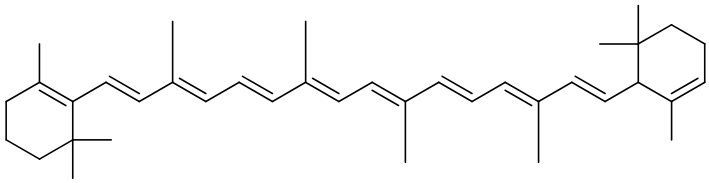
α-tokoferol radikali (αT•) nispeten stabil ve reaktivitesi az olan bir radikaldir. Glukuronikasit ile konjugasyona uğrayıp safra ile atılabilir. Okside olduktan sonra veya atılmadan önce askorbik asit ve glutatyon tarafından yeniden indirgenebilir. Böylece rejenere edilmiş olur.

In vivo ve in vitro çalışmalar α-tokoferol ile glutatyon peroksidazın serbest radikallere karşı birbirini tamamlayıcı etkisi olduğunu göstermiştir. GSH-Px oluşmuş peroksitleri ortadan kaldırırken, α-tokoferol peroksitlerin oluşumunu engeller (Seven ve Candan, 1996, Akkuş, 1995).

Son yıllarda aterosklerozun gelişiminde lipid peroksidasyonunun özellikle de LDL peroksidasyonunun etkili ve kritik bir rol oynadığı bildirilmektedir. α-tokoferol tarafından lipid peroksidasyonu yayılma basamağında engellenir. α-tokoferol alımıyla koroner kalp hastalıkları riskinin azaldığı deneysel olarak gösterilmiştir (Anderson, 2007).

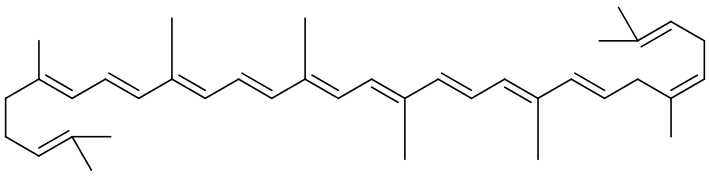
α-tokoferol nitritlerin nitrozaminlere dönüşümünü engelleyerek, antikarsinojen etki gösterir, iskemi/reperfüzyon ile ilişkili peroksidatif hasarı önlemede etkilidir, immüniteyi arttırır, eritrosit membranının stabilitesi için esansiyeldir. α-tokoferol selenyumun organizmadan kaybını önleyerek ve onu aktif halde tutarak selenyum metabolizmasında da önemli rol oynar (Seven ve Candan, 1996, Anderson, 2007).

Karotenoidler: Bitkilerde yaygın şekilde bulunan doğal renk pigmentleridir. Fotooksidatif proseslere karşı bitkileri korur. En bilineni A vitamini öncüsü olan β-karotendir.



β-karoten

Karotenoidler özellikle singlet oksijeni ($^1O_2$) ve peroksil radikallerini gideren etkili antioksidanlardır. Karotenoidler arasında en etkin $^1O_2$ tutucu; β-karotenin açık zincirli analoğu olan likopendir (Stahl ve Sies, 1999). LDL'yi oksidatif hasara karşı koruyarak ateroskleroz ve diğer koroner hastalıkların gelişmesini de engeller (Seven ve Candan,1996).

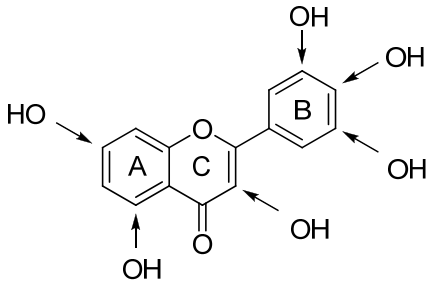


Likopen

Fotooksidatif proses göz ve deri gibi ışığa maruz kalan dokularda bazı hastalıklara neden olan bir olaydır ve ROT oluşumuna yol açar. Körlüğe neden olan yaşa bağımlı maküler hasarda, singlet oksijenden koruyucu pigmentler özellikle lutein ve zeaksantindir. Güneş yanıklarında görülen eriteme karşı koruyucu ve fotooksidatif hasarı önleyici pigment β-karotendir. Lipofilik özelliklerinden dolayı, oksidatif hasara karşı hücresel mebranları ve lipoproteinleri korumada önemli rol oynarlar. β-karoten reaktif azot türlerini gidermede C ve E vitaminleri ile sinerjik etki gösterir (Stahl ve Sies, 2003, Stahl ve Sies, 1999).

Flavonoidler: Bitkilerin sekonder metabolitleri olan polifenolik bileşiklerdir. Günümüzde bitkilerden izole edilen 4000'den fazla flavonoid bilinmektedir. Halka yapılarına göre flavonoller, flavonlar, flavanonlar, antosiyaninler, kateşinler ve izoflavonoidler olarak sınıflandırılır (Bilaloğlu ve Harmandar). Flavonoidler ve diğer bitki fenoliklerinin $O_2^{\bullet -}$, lipid alkoksil ($RO^{\bullet}$), lipid peroksil ($ROO^{\bullet}$) ve $NO^{\bullet}$ radikallerini temizleme, Fe ve Cu şelatlama, α-tokoferol rejenerasyonu gibi fonksiyonlara katıldığı

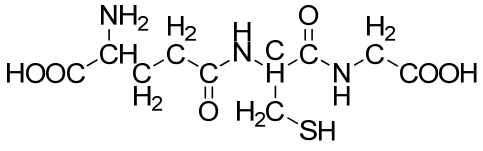
da bildirilmiştir (Miller ve Ruiz-Larrea, 2002, Ross ve Kasum, 2002, Rice-Evans, 1999).



temel flavonoid yapısı

Flavonoid ve fenolik antioksidanlar anomerik hidroksil grubundan lipid radikallerine bir hidrojen atomu vererek lipid oksidasyonunu engeller. Bileşiğin yapısı ile antioksidan kapasitesi ilişkilidir, fenolik bileşiklerde –OH grubu sayısı, flavonoidlerde B halkasının 5-OH, 3-OH ve 4-OH grupları olması antioksidan aktivite üzerinde etkilidir (Cotella vd., 1996, Çimen, 1999).

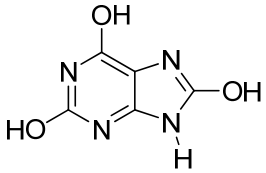
Glutatyon (G-SH): Organizmanın tüm hücrelerinde bulunan glutamikasit-sistein–glisinden oluşan bir tripeptidtir. Aminoasitlerin hücre içine taşınması görevinden başka, çeşitli metabolik fonksiyonları vardır (Onat vd., 2002). Suda çözünen önemli bir antioksidandır. H_2O_2, disülfitler, askorbat ve serbest radikalleri indirgeyebilir ve böylece hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Özellikle eritrosit membranını H_2O_2'den, lökositleri fagositozda üretilen oksidan maddelerden ve lens proteinlerini oksidatif hasardan korur. Glutatyon eritrositlerde hemoglobinin ve diğer proteinlerin tiyol gruplarını (-SH) indirgenmiş halde tutarak onları oksidasyona karşı korur. Böylece hemoglobinin methemoglobine dönüşümünü, fonksiyonel protein ve enzimlerin de inaktivasyonunu engeller.



Glutatyon (G-SH)

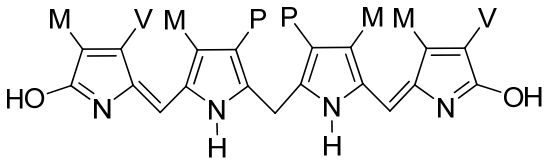
Ürik asit: Purin metabolizmasının son ürünü olan ürat plazmada bulunan ve suda çözünen bir maddedir. Normal plazma konsantrasyonlarında bulunan ürat (160-450 μM/L) hidroksil, süperoksit, peroksit radikalleri ve singlet oksijeni giderir. Fakat lipid radikalleri üzerinde etkisizdir (Akkuş, 1995).

Ürik asidin plazmada askorbik asidi stabilize etme fonksiyonu direk antioksidan aktivitesinden daha önemli bulunmaktadır (Keaney ve Frei, 1994).



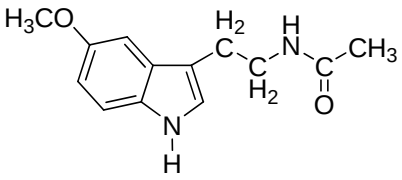
Ürik Asit

Bilirubin: HEM metabolizmasının memelilerdeki son ürünlerinden biri olan bilirubin ürat ve askorbat ile birlikte plazmanın üç temel antioksidanından biridir (Stryer, 1995, Seven ve Candan, 1996). Suda çözünen peroksitlere karşı koruma sağlamada askorbat kadar etkilidir. In vitro koşullarda düşük konsantrasyonlarda lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Yeşilkaya vd., 1998).



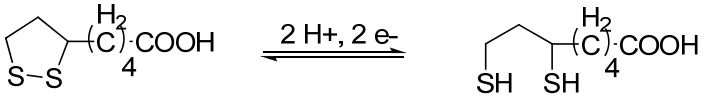
Bilirubin

Melatonin: Melatonin immünite, uyku, üreme ve sirkadien ritmin (yaz-kış, uzun gün-kısa gün, aydınlık-karanlık döngüsünün) düzenlenmesi gibi birçok biyolojik fonksiyonda rol oynayan bir hormondur (Reiter, 1998). Literatürde ilk kez antioksidan etkili olarak 1991'de yer almış ve daha sonra in vitro ve in vivo çalışmalarla desteklenmiştir. $^{\bullet}OH$, H_2O_2, $^1O_2$, HOCl, $NO^{\bullet}$,$ONOO^-$ gibi serbest radikalleri detoksifiye ettiği bilinmektedir. Hem suda hem lipid fazda çözünebildiğinden, geniş bir alanda antioksidan aktivite gösteren güçlü bir antioksidandır (Yazıcı ve Köse, 2004).



Melatonin

***α-Lipoik Asit*:** Kükürt içeren, endojen bir antioksidandır. •OH radikali ve H_2O_2'i nötralize eder. Hem lipid hem sulu fazda serbest radikalleri giderir. Prooksidan metalleri şelatlayarak da antioksidan etki gösterebilir (Percival, 1998, Packer vd., 1995, Scott vd., 1994).



Lipoik Asit Dihidrolipoik asit

2.2.1.3. Metal iyonlarını bağlayan proteinler

Geçiş metallerinin önemi; oksidan hasarını dolaylı yoldan hızlandırmalarıdır. Demir ve bakır iyonları in vivo koşullarda bazı az reaktif bileşiklerin çok kısa sürede daha reaktif şekillerine dönüşmelerini sağlayabilirler. Bu yüzden organizmada taşıyıcı protein ve depo proteinlerine bağlı halde tutulurlar (Halliwell, 1994, Onat vd., 2002).

Vücuttaki demirin 2/3'ü hemoglobinde, az bir kısmı miyoglobinde, çeşitli enzimlerde, demir taşıyıcı protein transferrinde ve kalan kısmı da ferritindedir. Ferritin dokulardaki demiri bağlayıp depolar. Laktoferrin ve transferrin dolaşımdaki serbest demiri bağlarlar. Albümin miyoloperoksidaz kataliziyle oluşan HOCl'nin giderilmesinde etkilidir, ayrıca bakırı da bağlar (Halliwell ve Gutteridge, 1990). Seruloplazmin plazmadaki bakırı bağlayan bir proteindir ve ekstrasellüler antioksidan savunmaya katkı sağlar. Seruloplazmin enzimatik tarz bir mekanizma ile Fe^{2+}'yı Fe^{3+}'ya yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu ve dolayısıyla •OH oluşumunu inhibe eder (Gutteridge vd., 1980).

2.2.2. Eksojen antioksidanlar

Eksojen antioksidanlar vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olarak sınıflandırılabilir. α-tokoferol (E vitamini), β-karoten, askorbik asit (C vitamini), folik asit vitamin olan eksojen antioksidanlardır.

İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar şunlardır; ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, folikasit), NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar), rekombinant SOD, Trolox C (E vitamini analoğu), endojen antioksidan aktiviteyi arttıranlar (GSH-Px aktivitesini arttıran ebselen ve asetilsistein), nonenzimatik radikal toplayıcılar (mannitol, albumin), sitokinler (TNF, IL-1), demir şelatörleri, demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin, seruloplazmin) (Onat vd., 2002).

2.3. Gıdalar ve Antioksidanlar

Organizmamızda doğal olarak bulunmalarının yanında antioksidan bileşiklerle günlük hayatımızda da sürekli etkileşim halindeyiz. Beslenmemizin büyük kısmını oluşturan meyve ve sebzeler ile doğal antioksidan etkili bileşikleri aldığımız gibi, işlenmiş gıdalar ve market ürünlerinin tüketimiyle de bu gıdalara katkı maddesi olarak eklenen sentetik antioksidanları almaktayız.

2.3.1. Gıdalarda doğal olarak bulunan antioksidan maddeler

Diyetle alınan taze meyve ve sebzelerin çeşitli hastalıklara karşı koruyucu etki gösterdiği bilinmektedir. Bu koruyucu etkinin besinlerde bulunan askorbik asit, α-tokoferol, β-karotenoidler, glutatyon, fitosteroller, flavonoidler, kumarinler, fenolik asitler, selenyum ve izotiyosiyanatlar gibi antioksidan özellikli bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu bileşikler detoksifikasyon enzimlerini indüklemek,

nitrozamin oluşumunu inhibe etmek, karsinojenleri bağlamak gibi çeşitli mekanizmalarla antioksidan aktive gösterirler (Pokorny, 1991, Steinmetz ve Potter, 1996, Vecchia vd., 2001). Yapılan epidiyomolojik çalışmalarla meyve ve sebzelerin içerdiği fitonutrientlerin diyabet, obesite, katarakt ve kardiovasküler hastalıkların ve özellikle bazı kanser türlerinin oluşma riskini azalttığı gösterilmiştir (Schröder, 2007, Tavani vd., 1996, Giugliano vd., 2006).

Sebze ve meyve tüketimi ile kanser riski arasındaki ilişkiyle ilgili pek çok araştırma yapılmaktadır. Bu bilimsel çalışmalardan 206 adet insan epidemiyolojik çalışması ve 22 adet hayvan denemesine ait bilimsel makale derlendiğinde; mide, yemek borusu, gırtlak, yutak, akciğer, pankreas, kolon ve endometrium kanserinde meyve ve sebze tüketiminin koruyucu etkisi olduğu kanıtlanmıştır. Kansere karşı koruyucu etkisi olan sebze ve meyve çeşitleri genellikle çiğ sebzeler, allium sebzeleri (soğan, sarımsak, pırasa), havuç, yeşil sebzeler, turpgiller (brokoli, Brüksel lahanası, lahana, karnabahar gibi) ve domatestir (Steinmetz ve Potter, 1996).

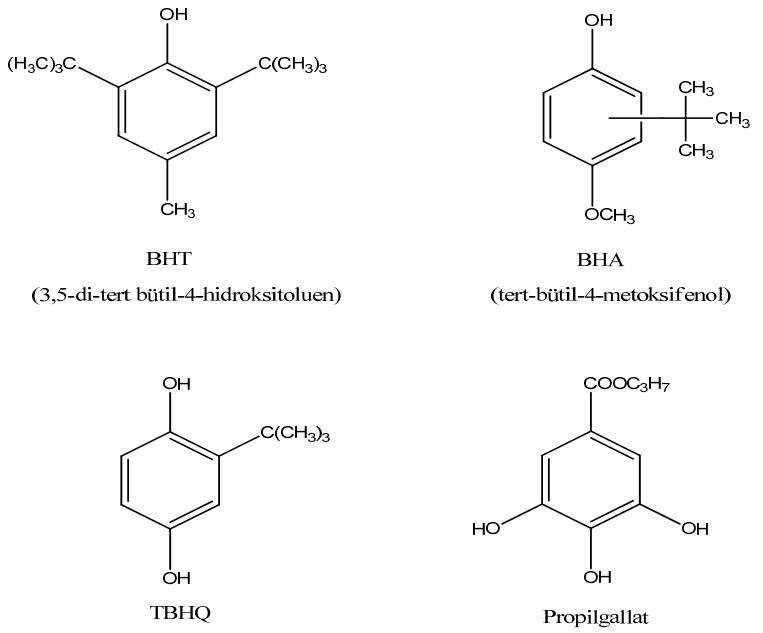
Benzer bir çalışma 1983-1999 yılları arasında İtalya'nın kuzey bölgesinde yapılmış olup sebze tüketiminin çeşitli kanser türlerinde güçlü koruyucu etkisi olduğu gözlenmiştir. Ayrıca; Akdeniz diyetinde çok tüketilen ve likopen içeriği yüksek olan domatesin, β-karoten, E vitamini gibi antioksidanların kanserle ilişkisi incelenmiştir (Vecchia vd., 2001).

Günlük beslenmemizde en az bir kaçını tükettiğimiz üzüm, nar, elma, üzümsü meyveler, adaçayı, biberiye, kekik, brokoli, domates, soğan, sarımsak, havuç, ıspanak, karnabahar, lahana, kereviz, çay, yeşilçay, şarap, siyah üzüm suyu (Prior, 1998, Nehir El vd., 1999, Frankel, 1999, Halvorsen, 2002, Opara ve Rockway, 2006, Orak, 2006, Özcan vd., 2007) gibi çeşitli meyve, sebze ve içeceklerle yapılan araştırmalarda, özellikle flavonoid ağırlıklı olmak üzere, içerdikleri fitorutrientlerin yüksek antioksidan aktiviteler gösterdiği bildirilmektedir. Bu nedenle vücudun endojen savunma sisteminin diyetle alınacak antioksidan bileşikler ile desteklenmesi gerektiği bildirilmektedir.

2.3.2. Gıdalara ilave edilen sentetik antioksidanlar

Gıdaların korunması ve depolanması sırasında meydana gelen en büyük problemlerden biri lipid oksidasyonu olup; yağlarda acılaşmaya (ransidleşme), yağ içeren diğer gıdalarda ise renk, tat, aroma, tekstür ve kıvamda bozulmalara ve besinsel kalitenin azalmasına neden olmaktadır. Gıda endüstrisinde lipid oksidasyonu engellemek veya azaltmak, toksik oksidasyon ürünlerinin oluşmasını engellemek, besinsel kaliteyi sürdürmek ve gıdanın raf ömrünü uzatmak amacıyla antioksidan kullanımı gereklidir (Finley ve Given, 1986). Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'ne göre de antioksidanlar "yağların acılaşması ve renk değişikliği gibi oksidasyonun neden olduğu bozulmaları önleyerek, gıdaların raf ömürlerinin uzatılmasını sağlayan maddeler olarak" tanımlanmaktadır (http://www.kkgm.gov.tr).

Bu amaçla gıda endüstrisinde yağlarda ve yağca zengin diğer gıdalarda bütillendirilmiş hidroksitoluen (BHT), bütillendirilmiş hidroksianisol (BHA), propil gallatlar (PG), tert-bütil hidroksikinon (TBHQ) gibi sentetik antioksidanları gıda katkı maddesi olarak yıllardan beri kullanılmaktadır. Aşağıda Şekil.2.7'de bu maddelerin formülleri verilmiştir.



Şekil 2.7. Gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılan bazı sentetik antioksidanların formülleri

Son yıllarda yapılan çalışmalar bu bileşiklerin toksiditesini ve karsinojenik özelliklerini ortaya koyar niteliktedir. Ayrıca günümüz toplumunda gelir düzeyi yükseldikçe ve beslenme konusundaki bilinç arttıkça sentetik ürünlere karşı duyulan kuşku artmış ve doğal ürünlere yönelme başlamıştır. Fare, hamster ve sıçanlarla yapılan in vivo çalışmalarda, sentetik antioksidanlardan özellikle BHA'nın bu kemirgenlerde mide ve mesane tümörü oluşumuna yol açtığı ve karsinojen oldukları gösterilmiştir (Ito vd., 1985, Ito vd., 1986, Hirose vd., 1997). Buna karşılık kemirgenlerde BHA'nın karsinojenik olmadığını gösteren çalışmalar da vardır (Conning ve Phillips, 1986). FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) normalde vücuda alınan düşük BHA düzeyinin insanlar için risk oluşturmadığını belirtmektedir (Blumenthal vd., 1986).

Sentetik antioksidanların insan sağlığı açısından potansiyel toksik olabileceğinin öne sürülmesi, özellikle günümüzde tüketici tercihlerini doğal tarımsal ürünlere yöneltmiş ve işlenmiş gıdalarda da sağlık, kalite ve güvenlik arayışlarını ön plana çıkarmıştır. Araştırmacılar ve gıda bilimcileri sentetik antioksidanların yerine geçebilecek "doğal antioksidanlar" araştırma gayreti içine girmişlerdir. Bu amaçla yeryüzünde geniş dağılım gösteren bitkisel kaynaklara yönelinmekte ve bu kaynaklardan elde edilecek doğal antioksidanların gıdaların işlenmesi sırasında sentetik antioksidanlar yerine gıdalara ilave edilmesi hedeflenmektedir. Özellikle kanser ve diyet arasındaki ilişkinin önemi düşünüldüğünde antioksidan aktiviteye sahip bitkisel kaynakların direk tüketimi veya bu materyallerden elde edilecek ekstraktların yemeklik yağlarda ve diğer gıda maddelerinde koruyucu olarak kullanımı giderek önem taşımaktadır.

Tablo 2.3. Gıdaları korumada kullanılan bazı sentetik antioksidanlar *

Antioksidan	Kodu	Kullanıldığı Gıdalar
Askorbik asit tuzları	E300-302	Bebek maması; emülsifiye hayvansal-bitkisel yağlar; reçel, jöle ,marmelat; şarap, süt-süttozu; işlenmiş, dondurulmuş veya konserve ürünler; ekmek, makarna; kıymadan hazırlanan et karışımları; meyve-sebze suları.
Sentetik tokoferoller (alfa-, beta-, gama-)	E307-309	Bebek maması; emülsifiye hayvansal-bitkisel yağlar; reçel, jöle, marmelat; şarap, süt-süttozu; işlenmiş, dondurulmuş veya konserve ürünler; ekmek, makarna; kıymadan hazırlanan et karışımları; rafine zeytinyağı; yağ içeren tahıl, bisküvi, gevrek.
Propil gallat BHA BHT TBHQ	E310 E320 E321 E319	Isıl işlem görmüş gıdalardaki katı-sıvı yağlar; Katı-sıvı kızartma yağları; Balık, sığır, koyun, kanatlı yağları; Sakız; tahıl bazlı çerez; hazır kek karışımı; kurutulmuş patates ve et; süttozu (otomatik makine için); toz çorba ve soslar; çeşni verici maddeler; çeşitli gıda takviyeleri; işlenmiş sert kabuklu meyveler.

*Türk Gıda Kodeksi'nin konuyla ilgili kısmından yararlanılarak hazırlanmıştır.

Özellikle baharatlar doğal antioksidan kaynağı olarak kabul görmüş ve bir çoğunun antioksidatif bileşikleri de izole edilmiştir (Madsen ve Bertelsen, 1995, Ho vd, 2000, Juliani ve Simon, 2002, Miyajima vd., 2004, Masuda vd., 2004). Biberiye, adaçayı, kekik, mercanköşk, zencefil ekstraktlarının mısır, balık, zeytin, fındık, ayçiçeği, soya yağları üzerindeki oksidasyon stabilitesi incelenmiş ve etkili sonuçlar bulunmuştur (Yanishlieva ve Marinova, 2001). Biberiye, adaçayı, kekik ve sarımsak ile yapılan bir başka çalışmada ise, bu baharatların etin ızgarada pişirilmesi sırasında

oluşan karsinojenik etkili heterosiklik aminlerin oluşumunu % 60 oranında azalttığı bildirilmiştir (Murkovic vd., 1998). Yüksek antioksidan aktivitesinden dolayı biberiye ekstraktı ticari olarak gıda stabilizasyonu ve et ürünlerinde kullanılmaktadır (Vazgeçer vd., 2005).

Doğal ve bitkisel kaynaklardan yeni antioksidan arayışı artarak devam ederken bu kaynakların ucuz, yenilebilir ve bol bulunur olması da önemli bir konudur. Düşük maliyetlerinden dolayı tarımsal ve endüstriyel atıkların doğal antioksidan kaynağı olarak kullanımı özellikle ilgi çekicidir. Patates kabuğu atıkları, üzüm kabuğu ve çekirdeği, zeytin küspesi, havuç pulpu atığı, yaşlı çay yaprakları, soya fasulyesi melası, narenciye çekirdeği ve kabukları ucuz antioksidan kaynağı olarak çalışılmış ve bazılarının polifenolik bileşikleri tanımlanmıştır (Muare vd., 2001, Jayaprakasha vd., 2003, Nandita ve Rajini, 2004,).

Bu tez kapsamında da yaprakları salata ve baharat olarak tüketilen dereotu, gelincik, kuzukulağı, roka ve tere gibi bitkilerin in vitro koşullarda antioksidan aktiviteleri çeşitli metodlarla belirlenmiştir. Yüksek antioksidan aktivite gösteren bitki ve ekstraktlarının doğal antioksidan olarak bu alanda değerlendirilmesi düşünülmektedir.

2.4. Antioksidan Aktivite Tayin Metodları

Diyet antioksidanlarının oksidatif stresle ilgili hastalıkların önlenmesindeki pozitif etkilerinden dolayı, antioksidanlar son yıllarda artan bir ilgi konusu haline gelmiştir. Antioksidanlar ve oksidatif stresle ilgili makale sayısı geçen on yılda (1993'ten 2003'e kadar) 4 katına çıkmıştır. Bu artış tüketilen gıdaların antioksidan kapasitesini ve bileşiklerini öğrenmek için beslenme, sağlık ve gıda bilimi uzmanlarının ve özellikle halkın artan ilgisinden dolayıdır.

Gıda bileşiminin kompleksliğinden gıdadaki antioksidan bileşiklerin multifonksiyonel olması ve sinerjistik etkileşimlerinden dolayı, gıdadaki her bir antioksidan bileşiğin özel olarak ayrılması ve çalışılması pahalı ve zordur. Antioksidan alanının kompleks bir konu olmasından dolayı araştırmacılar arasında antioksidanları değerlendirmede kullanılan metodlara ait fikir uyuşmazlıkları da bulunmaktadır. Bunu minimize etmek için standardize edilmiş testlere büyük ihtiyaç vardır. Bu yüzden araştırmacılar antioksidan etkinliğin hızlı, güvenilir biçimde ve bir kimyasal reaksiyon ile ölçülmesini sağlayabilecek metod geliştirme arzusundadırlar. Buna rağmen in vitro koşullarda antioksidan kapasiteyi ölçmeyi amaçlayan çok sayıda metod mevcuttur.

Ancak her bir değerlendirme farklı oksidasyon şartları altında ve farklı oksidasyon ürünlerini ölçmek için birkaç metod kullanarak yapılmalıdır (Frankel ve Meyer, 2000). Son zamanlarda toplam antioksidan kapasite veya toplam antioksidan aktiviteyi ölçmek için birkaç metod geliştirilmiştir. Trolox ekivalenti antioksidan kapasite (TEAC), toplam radikal tutma parametresi (TRAP), demir (III) iyonu indirgeme gücü (FRAP) ve oksijen radikalini absorblama kapasitesi (ORAC) bunlardan bazılarıdır.

Bu metodlar substrat, prob, reaksiyon şartları ve antioksidan etkinin hesaplanma şekline göre birbirinden farklıdır. Bu yüzden farklı metodlardan alınan sonuçları karşılaştırmak son derece zordur (Frankel ve Meyer, 2000).

Bu metodlar kimyasal reaksiyonlarına göre başlıca iki gruba ayrılırlar:

Hidrojen atomu transferine (HAT) dayanan metodlar ve bir tek elektron transferine (ET) dayanan metodlar. HAT- ve ET-temelli metodlar örneğin koruyucu antioksidan kapasitesi yerine radikal veya oksidan giderici kapasitesini ölçmeyi hedefler. Basit “lipidsiz” sistemlerde; antioksidandan serbest radikal molekülüne elektron transferi veya H^+ verilmesinin direk ölçümü yapılır. Bu metodlar ticari kit halinde de olup, yaygın şekilde kullanılırlar.

Tablo 2.4. In vitro koşullarda uygulanan antioksidan aktivite tayin metodları

HAT-temelli metodlar $ROO\bullet + AH \longrightarrow ROOH + A\bullet$ $ROO\bullet + LH \longrightarrow ROOH + L\bullet$	Oksijen radikalini absorblama kapasitesi (ORAC) Linoleik asit oksidasyonunun inhibisyonu (TRAP) LDL oksidasyonunun inhibisyonu (TRAP) Crocin ağartma metodu
ET-temelli metodlar $M^n + e^-$ (AH'den) $\longrightarrow AH\bullet + M^{(n-1}$	Trolox ekivalenti antioksidan kapasite (TEAC) Fe(III) iyonu indirgeme gücü (FRAP) DPPH radikali giderme aktivitesi FCR ile toplam fenolik bileşik tayini
Diğer metodlar	Tiyobarbitürikasit ile oksidasyon ürünlerinin tayini (TBARS) Peroksit değeri (POV) Ransimat metodu Çeşitli serbest radikalleri yakalama metodları

2.4.1. HAT-temelli metodlar

ORAC, TRAP gibi HAT-temelli metodlarda peroksil radikali ($ROO^\bullet$) üretmek üzere bir radikal başlatıcı kullanılır. Eklenen antioksidan radikaller için ortamdaki substrat ile yarışır. $ROO^\bullet$ tercihen antioksidandan bir hidrojen atomu alır. Sonuçta $ROO^\bullet$ ve hedef molekül arasındaki reaksiyon inhibe edilir veya geciktirilir (Ou vd., 2002, Huang vd., 2005).

ORAC (Oksijen Radikalini Absorblama Kapasitesi) metodu: Çeşitli ekstraktlar ve fitokimyasalların antioksidan aktivitesini ölçmek için kullanılır. Metodun ilk halinde prob olarak fluoresan bir protein olan β-fikoeritrin (β-PE) ile ve peroksil radikal başlatıcısı olarak AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihidroklorit) bileşiği ile çalışılmıştır. Ancak β-PE'nin fotostabil olmaması, polifenolik maddelerle etkileşimi ve

radikal başlatıcı eklenmediğinde bile fluoresansının azalması dezavantajlarıyla karşılaşılmış ve sonraları ORAC metodu, prob olarak β-PE yerine floressein kullanılarak geliştirilmiştir. Floressein (FL, 3',6'-dihidroksispiro [izobenzofuran-1[3H], 9'[9H]-ksanten]-3-on) protein olmayan sentetik bir probdur (Becker vd., 2004).

Bu metotta radikal başlatıcı olan AAPH, floressein veya β-PE'nin fluoresansında azalmaya neden olur. Reaksiyon ilerledikçe fluoressein veya β-PE tüketilir. Antioksidan varlığında AAPH radikalleri giderilir ve fluoresans azalması inhibe edilir (Tomer vd., 2007).

TRAP (Toplam Radikal Tuzaklayıcı Antioksidan Parametre) metodu: Plazma ve serumun "total antioksidan kapasitesi"ni ölçmek için geliştirilmiştir. Bu metod plazma antioksidanlarını okside etmek için ABAP (2,2'-azobis(2-amidinopropan) hidroklorit) radikal başlatıcısı tarafından peroksil radikallerinin üretilmesi ve meydana gelen oksidasyon sırasında tüketilen oksijenin ölçülerek izlenmesine dayanır. Daha sonra metod, oksitlenebilir bir lipid substratı olan linoleik asidin eklenmesiyle modifiye edilmiştir (Frankel ve Meyer, 2000). Modifiye metotta Cu^{2+} ya da bir azo başlatıcısı ile linoleik asit oksidasyonu yapay olarak indüklenir, otooksidasyonun ilerleyişi linoleik asit oksidasyonundan oluşan konjuge dienperoksitlerin absorbansının takibi ile izlenir (Huang vd., 2005).

Crocin ağartma metodu: Crocin doğal bir karotenoid türevidir. Metod serbest radikal başlatıcı AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihidroklorit) tarafından, crocinin ağarmasını önlemede antioksidanların inhibisyon kapasitesini ölçer. Crosin safrandan elde edilen doğal pigmentler karışımı olduğu için çok fazla çeşitliliğe sahiptir ve karotenoidler gibi diğer gıda pigmentleri aynı dalga boyunda (λ=450 nm) ışık absorblar. Bu da crocinin endüstriyel uygulamasını sınırlar (Huang vd., 2005).

2.4.2. ET-temelli metodlar

Antioksidanın, Fe^{3+}, $ABTS^{\bullet+}$ gibi bir oksidan tarafından yükseltgenmesi sonucunda bir elektron antioksidandan oksidana transfer edilir, bu da oksidanın renk değişimine neden olur. UV/VIS ile absorbans değişimi ölçülür. Bu absorbans değişiminin derecesi antioksidan konsantrasyonuyla orantılı olduğundan, antioksidanın indirgeyici kapasitesi tayininde kullanılır. FCR ile toplam fenolik bileşik tayini, Cu^{2+} indirgeme kapasitesi, TEAC ve FRAP metodları bu sınıfa girer.

FCR ile toplam fenolik bileşik tayini: Metod başlangıçta proteinlerde fenol grubu içeren tirozin kalıntısı ile Folin-Ciocalteu ayıracının (FCR) etkileşiminden dolayı protein analizi için düşünülmüştür. Daha sonraları daha genişletilerek toplam fenol metodu olarak kullanımı artmıştır. FCR Cu^{+}, C vitamini gibi fenolik olmayan bileşikler tarafından da indirgenebildiği için fenolik bileşiklere spesifik değildir. Ancak fenolik bileşikler sadece bazik şartlar altında (metotta pH~10 için karbonat çözeltisi kullanılır) FCR ile reaksiyon verir. Fenolik antioksidanların varlığında ayıraçtaki Mo(VI)'nın indirgenmesiyle renk sarıdan maviye döner ve 760 nm'de absorbans ölçülür.

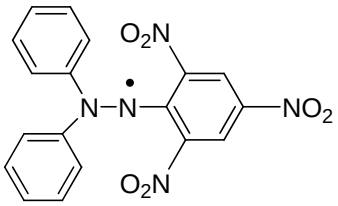
FCR örneğin indirgeyici kapasitesini ölçen bir metod olduğu için "antioksidan kapasite" ve FCR ile toplam fenol metodu arasında korelasyon bulunur. Basit ve tekrarlanabilir bir metod olduğundan, fenolik antioksidan çalışmalarında rutin olarak kullanılmaktadır (Huang vd., 2005).

TEAC (Trolox Ekivalenti Antioksidan Kapasite) metodu: İlk kez 1993 yılında bildirilen metod daha sonraları geliştirilmiştir. Bu metotta metmiyoglobin/H_2O_2 sisteminin oluşturduğu ferrilmiyoglobin radikali ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzothiazolin-6-sülfonat)) ile etkileşerek $ABTS^{\bullet+}$ katyonik radikalini üretir. Oluşan $ABTS^{\bullet+}$ radikalinin antioksidan tarafından giderilmesi 734 nm'de absorbansın azalmasıyla takip edilir (Frankel ve Meyer, 2000). Modifiye metotta ise $ABTS^{\bullet+}$ radikali, ABTS'nin potasyum persülfat oksidasyonuyla direk üretilir. Antioksidan kapasite suda çözünen E vitamini analoğu olan trolox konsantrasyonu (mM) olarak tayin edilir. TEAC, 1 mM troloxunkiyle aynı aktiviteyi göstermek için gerekli olan

antioksidan konsantrasyonunu ifede eder. Artan kullanımına rağmen bazı sınırlamaları vardır, en büyük dezavantajı sentetik $ABTS^{\bullet+}$ radikalinin biyolojik sistemlerde bulunmamasıdır (Becker vd., 2004, Huang vd., 2005).

FRAP (Fe(III) İyonu İndirgeme Gücü) metodu: Bu metotta düşük pH'da ferrik tripiridiltriazin kompleksi (Fe^{3+}-TPTZ) antioksidanların etkisiyle ferröz kompleksine (Fe^{2+}-TPTZ) indirgenir. Oluşan kompleksin 593 nm'de absorbansı ölçülür. Böylece elektron vermenin antioksidanların toplam indirgeme kapasitesiyle lineer olduğu varsayılır. Bu yaklaşımın ana dezavantajı, metod okside olabilen bir substrat içermediğinden antioksidanların koruyucu özellikleri hakkında bilgi sağlamamasıdır (Benzie ve Strain, 1996, Huang vd., 2005).

DPPH radikali giderme metodu: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikali ticari olarak mevcut, stabil radikallerden biridir. Fenolik antioksidanların aktiviteleri üzerinde yapı etkisini çalışmak için kullanılan ilk sentetik antioksidanlardan biridir. Etanoldeki çözeltisi mor renklidir ve 515 nm'de maksimum absorbans verir. Antioksidan tarafından indirgenince rengi solduğu için reaksiyonun ilerleyişi spektrofotometre ile izlenir. DPPH'in renginin solması antioksidan konsantrasyonu ile orantılıdır. Başlangıçtaki ilk DPPH konsantrasyonunu % 50 azaltmak için gerekli antioksidan miktarı "antiradikal etkinlik"i ifade eder ve EC_{50} (mg/ml) olarak isimlendirilir (Frankel ve Meyer, 2000). EC_{50} değeri antioksidan aktiviteyi ölçmek için daha yaygın olarak kullanılan bir parametredir.



DPPH

Oksidan olarak Cu^{2+} kullanan toplam antioksidan potansiyel metodu: Bu metoda dair az sayıda yayınlanmış bilgi vardır. Örnekte bulunan indirgenler (antioksidanlar) tarafından Cu^{2+} Cu^{+}'e indirgenir. Cu^{+} kromojenik bir reaktif olan

batokupronin (2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolin) ile kompleks oluşturur. 490 nm'de maksimum absorbans ölçülür (Huang vd., 2005).

2.4.3. Lipid oksidasyon markerlerini ölçen metodlar

Lipid model sistemlerinde reaktanların kaybı (oksijen, yağ asitleri), serbest radikal oluşumu ve primer ve sekonder oksidasyon ürünlerinin (hidroperoksitler, aldehitler, ketonlar, asitler) oluşumunun tayin edilmesi lipid oksidasyonunda en yaygın kullanılan indikatörlerdir. Peroksit değeri (POV), tiyobarbütirik asit reaktif türlerin (TBARS) tayini ve kısa zincirli yağ asitlerinden kaynaklanan iletkenliğin (Ransimat metodu) ölçümü lipid oksidasyonunun tayininde en sık kullanılan metodlardır.

POV tayininde iki farklı metodla lipid peroksitlerin oluşumu izlenir. Metodlardan biri olan iyodometrik yöntem; oluşan peroksitlerin iyodür (I^-) ile reaksiyona girerek iyot (I_2) oluşturması ve oluşan iyodun titrimetrik yöntemle tayin edilmesi esasına dayanır. Ferrik tiyosiyanat metodunun esası ise, oluşan peroksitlerin Fe^{2+} iyonlarını Fe^{3+}'e yükseltgemesi ve ortama eklenen tiyosiyanat ile oluşturulan kompleksin spektrofotometrik olarak tayinine dayanır (Pan vd., 2007).

TBARS tayini ile aldehitler, ketonlar, asitler ve hidrokarbonlar gibi sekonder oksidasyon ürünlerinin oluşumu tayin edilir. Sadece lipit peroksidayonunun son ürünü olan malondialdehite (MDA) spesifik olmayıp, diğer okso bileşiklerini de ölçer (Becker vd., 2004).

Ransimat yönteminde antioksidan aktivite yağlarda bulunan doymamış yağ asitlerinin yüksek sıcaklıkta peroksidasyonu sonucu oluşan bozunma ürünlerinin su içine absorbe edilerek, Ransimat cihazı ile suyun iletkenliği tayin edilir (Barrera-Arellano ve Esteves, 1992).

2.4.4. Diğer ROS giderici kapasiteleri ölçen metodlar

İnsan vücudunda oksidatif hasara neden olabilen $O_2^{\bullet -}$, H_2O_2, $^{\bullet}OH$, $^1O_2$ ve $ONOO^-$ gibi reaktif oksijen türleri olduğu bilinmektedir. $O_2^{\bullet -}$ SOD enzimi ve H_2O_2 katalaz enzimi ile zararsız türlere çevrilebilirken $^{\bullet}OH$, $^1O_2$ ve $ONOO^-$'i gidermek için enzimatik faaliyet bilinmemektedir. Bu yüzden örneklerin oksidan giderici kapasiteleri değerlendirilirken, metotlar bu reaktif oksijen türlerini de içerecek şekilde düzenlenmelidir. In vitro koşullarda çeşitli radikal üretici sistemler kullanılarak antioksidanların serbest radikal tuzaklama yeteneklerinin ölçümü için bazı metdlar kullanılmaktadır.

$O_2^{\bullet -}$ radikali giderme kapasitesi tayini: NADH/PMS/O_2 sistemi ile (Franke vd., 2004, Gülçin vd., 2003) ve riboflavin/metiyonin sisteminde flavinin fotokimyasal indirgenmesi ile non-enzimatik olarak (Dasgupta ve De, 2007) veya hipoksantin/ksantin oksidaz sistemi ile enzimatik olarak (Wood vd., 2003) süperoksit radikali üretilir. Radikal giderme aktivitesi substrat olarak kullanılan NBT'nin indirgenmesiyle tayin edilir. Bu metotta oluşturulan $O_2^{\bullet -}$ radikalleri sarı renkli NBT^{2+}'yi mavi renkli formazan türevine indirger. Ortamda antioksidan bileşik varsa mavi-mor NBT oluşumu inhibe edilir. Ancak NBT'nin direk antioksidan tarafından indirgenmesi de sözkonusudur.

$^{\bullet}OH$ radikali giderme kapasitesi tayini: Biyolojik olarak $^{\bullet}OH$ radikali büyük ölçüde Fenton reaksiyonu ile oluştuğu için in vitro koşullarda da Fe^{2+}/H_2O_2 sistemiyle üretilir ve antioksidanın $^{\bullet}OH$ radikalini giderebilme gücü ölçülür. Ancak pek çok antioksidan aynı zamanda metal şelatörü olduğu için Fe^{2+}'nin aktivitesini değiştirebilir. Bu yüzden değerlendirilen antioksidanın iyi bir metal şelatlayıcı mı veya $^{\bullet}OH$ radikali giderici mi olduğunun kesin anlaşılamaması metodun dezavantajıdır (Becker vd., 2004).

Peroksinitrit ($ONOO^-$) giderici kapasitenin tayini: $ONOO^-$ güçlü bir antioksidan değildir, ancak fizyolojik pH'da protonlanmış hali olan peroksinitröz asit (ONOOH) çok güçlü bir oksidandır. Özellikle protein hasarından sorumlu olduğu düşünülür. $ONOO^-$ giderici ölçümler genellikle $ONOO^-$ tarafından tirozinin

nitrolanmasının inhibisyonuna dayanır. Nitrozaminlerin HPLC ile ayrımına dayanan ve uzun süren bir metottur (Becker vd., 2004).

2.5. Çalışmada Kullanılan Bitkiler ve Özellikleri

Bitkiler insan beslenmesinde ve yaşamında önemli rol oynar. Özellikle yaprakları veya çeşitli kısımları sebze olarak tüketilen pek çok bitki, aynı zamanda halk arasında tedavi edici amaçlarla da kullanılmaktadır. Çalışmamızda kullanılan dereotu (*Anethum graveolens* L), gelincik (*Papaver rhoeas* L.), kuzukulağı (*Rumex acetosella* L.), roka (*Eruca sativa* Mill.) ve tere (*Lepidium sativum* subsp. sativum) tazesi sofralarımızda genellikle salata olarak tüketilen bitkilerdendir. Bu bitkilerin botanik adları ve familyaları Tablo 2.5'de sunulmaktadır.

Tablo 2.5. Deneyde kullanılan bitkiler*

Türkçe adı	Latince adı	Familyası	Kullanılan kısmı
Dereotu	*Anethum graveolens* L.	*Umbelliferae* (Maydanozgiller)	Yaprak
Gelincik	*Papaver rhoeas* L.	*Papaveraceae* (Gelincikgiller)	Yaprak
Kuzukulağı	*Rumex acetosella* L.	*Polygonaceae* (Çobandeğneğigiller)	Yaprak
Roka	*Eruca sativa* Mill.	*Cruciferae* (Turpgiller)	Yaprak
Tere	*Lepidium sativum* subsp. sativum	*Cruciferae* (Turpgiller)	Yaprak

*Davis'in sınıflandırmasına göre düzenlenmiştir.

2.5.1. Dereotu (*Anethum graveolens* L)

Umbelliferae (Apiaceae) familyasından, anavatanı Asya olan tek yıllık bir bitkidir. Ülkemizde yabani olarak bulunduğu gibi kültür bitkisi olarak yaygın biçimde bahçelerde tarımı da yapılmaktadır (Öztürk vd., 2004, http://tr.wikipedia.org). Dereotu

dik tüysüz yaprakları ipliksi parçalı ve keskin güçlü bir kokusu olan bitkidir. Kökleri iğ şeklinde ve beyazımsıdır. 60 cm'e kadar yükselebilen sapı yuvarlak, uzunlamasına çizgili ve mavimsi yeşildir. Alt tek yaprakları saplı, üst yaprakları sapsız, iplikli parçalıdır. Şemsiye görünümündeki çiçek salkımının çapı ortalama 20 cm civarındadır. Meyveleri elipsoid ve kanatlı, sarımsı kahve-kızıl kahve arasında değişen renklidir (Davis, 1965-1985).




Şekil 2.8: Dereotu bitkisi

Dereotunun taze yaprakları salatalarda,turşularda, genellikle et ve zeytinyağlı yemeklerde tat ve koku vermek için kullanılır. Özellikle karvonca zengin uçucu yağ, sabit yağ ve fenolik maddeler taşıyan meyveleri sakinleştirici, spazm çözücü, diüretik ve bebeklerde gaz giderici olarak kullanılır. Doğum sonrası annelerde süt salgısını arttırır (http://bitkisel-tedavi.com).

2.5.2. Gelincik (*Papaver rhoeas* L.)

Papaveraceae ailesinden, geniş bir yayılma alanına sahip bir yıllık bitkidir. Gövdesi dik ve tüylü, yaprakları mavimsi renklidir, boyu 90 cm'e kadar ulaşabilir. Dalların ucunda bulunan çiçeklerin genel rengi koyu kırmızıdır, dip kısmı siyah lekeli veya lekesizdir. Çiçekler döküldükten sonra kalan meyveleri tüysüz ve fıçı biçiminde çok tohumlu bir kapsüldür (Davis, 1965-1985).



Şekil 2.9: Gelincik bitkisi

Gelinciğin yeşil kısımlarından, tohumlarından ve kırmızı taç yapraklarından yararlanılır. Yeşil yaprakları kavrularak veya salata olarak tüketilir. Taç yapraklarından geleneksel olarak gelincik şerbeti yapılır. Nezle, bronşit ve soğuk algınlıklarında kullanılır, balgam sökücüdür, uykusuzluğa karşı etkili olur (Zeybek ve Zeybek, 2002, Kültür, 2007).

2.5.3. Kuzukulağı (*Rumex acetosella* L.)

Polygonaceae ailesinden, kırmızı dik ve tüysüz gövdeli 15-40 cm boyunda çok yıllık bir bitkidir. Nemli kırlarda doğal olarak yetişir. Ok biçiminde tüysüz yaprakları ve pembemsi renkli çiçekleri vardır. (Davis, 1965-1985). Bol miktarda oksalik asit içeren ekşi yaprakları salata olarak yenir. Ayrıca halk arasında yapraklarından hazırlanan lapalar çıban tedavisinde kullanılır (http://tr.wikipedia.org). Köklerinden yapılan droğu kuvvet verici, iştah açıcı ve müshil olarak da kullanılır (Zeybek ve Zeybek, 2002).



Şekil 2.10: Kuzukulağı bitkisi

2.5.4. Roka (*Eruca sativa* Mill.)

Cruciferae (Brassicaceae) ailesinden geniş yayılım gösteren bir yıllık otsu bitkidir. 10-50 cm boyunda, yaprakları dişli kenarlı, çiçekleri sapın ucunda beyazımtrak ve morumsu damarlıdır (Davis, 1965-1985).



Şekil 2.11: Roka bitkisi

Sebze olarak yetiştirilen roka İtalya, Yunanistan ve Türkiye gibi Akdeniz ülkelerinde salata olarak tüketilir. Bazı ülkelerde yemek olarak pişirilir (Slovenya'nın Koper bölgesinde peynirli börekte, İtalya Venedik'te pizza ve makarnada).

Yaprakları bol miktarda C vitamini ayrıca kersetin ve sinapik asit içerir. Taze yaprakları ve tohumları uyarıcı, öksürük kesici, diüretik olarak kullanılır. Afrodizyak özelliği vardır (Öztürk vd., 2004, Saçan vd., 2008).

2.5.5. Tere (*Lepidium sativum* subsp. sativum)

Cruciferae (Brassicaceae) ailesinden, dik gövdesi 20-50 cm boylarında, bir yıllık otsu bitkidir. Salata bitkisi olarak dünyanın pek çok yerinde kültürü yapılır (Davis, 1965-1985). İdrar söktürücü, bronş temizleyici, kan şekerini düşürücü, hazmı kolaylaştırıcı etkileri vardır. Suyu saç dökülmesini ve kepeklenmeyi önler (http://www.tarimziraat.com). Ayrıca bitkinin özsuyu ve tohumları halk hekimliğinde hipertiroidi tedavisinde kullanılır (Zeybek ve Zeybek, 2002).




Şekil 2.12: Tere bitkisi

Bu tez kapsamında günlük beslenmede tüketilen dereotu, gelincik, kuzukulağı, roka ve tere bitkilerinin in vitro koşullarda antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. Bu amaçla bitki ekstraktlarının radikal veya oksidan giderici kapasitelerinin ölçümü FCR ile toplam fenolik madde tayini, H_2O_2 giderme aktivitesi, indirgeme kapasitesi, DPPH radikali ve süperoksit radikali giderme aktivitesi deneyleri ile; bitki ekstraktlarının geçiş metallerini şelatlayarak koruyucu antioksidan etkileri Fe^{2+} iyonlarını şelatlama potansiyeli deneyi ile ve lipid peroksidasyonunu önleme etkileri linoleik asit emülsiyonunda peroksit oluşumunu engelleme derecelerinin tayini ile değerlendirilmiştir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1.Materyal

3.1.1. Bitki Örnekleri

Deneylerde kullanılan bitkisel materyallerden; dereotu (*Anethum graveolens* L.), tere (*Lepidium sativum* subsp. sativum) ve roka (*Eruca sativa* Mill.) yerel pazardan, gelincik (*Papaver rhoeas* L.) ve kuzukulağı (*Rumex acetosella* L.) ise Trakya Üniversitesi Güllapoğlu Yerleşkesi içindeki doğal alanlarda yabani olarak yetişen türlerden elde edildi. Temin edilen örneklerin yenilebilen kısımları kök ve saplarından ayıklandıktan sonra oda koşullarında ve gölgede kurutuldu. Analizlerde kullanılmak üzere renkli kavanozlarda muhafaza edildi.

3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Ekipmanlar

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıkta olup, Sigma, Aldrich ve Riedel-de Haen'den satın alındı.

Çalışmada rondo (Tefal 400W), çalkalamalı su banyosu (Clifton 100-400rpm; termostatlı), vortex (Fisons), evaporatör (Buchi R-200), spektrofotometre (Shimadzu UV-1601), inkübatör (EnoLab MB-80), pH-metre (WTW Ph 330i), analitik terazi (Gec Avery), santrifüj (Nüvefuge CN180), liyofilizatör (Edwars Freze Dryer Modulyo), ısıtıcı ve manyetik karıştırıcı (Chiltern HS31), dağıtıcı ve mikro pipetler (Eppendorf) kullanılan başlıca ekipmanlardır.

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Çözeltiler

Folin-Ciocalteu Reaktifi

Ticari olarak satın alındığı şekilde kullanıldı.

1 mM DPPH çözeltisi

0.0986 gr DPPH tartılarak etanolde çözüldü ve balon jojede 250 mL'ye tamamlandı.

0.1 mM DPPH çözeltisi

1 mM DPPH çözeltisinden 10 mL alınarak etanolle balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

% 30'luk NH_4SCN çözeltisi

30 gr NH_4SCN tartılarak destile suda çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

20 mM $FeCl_2$ çözeltisi

0.2535 gr $FeCl_2$ tartılarak % 3.5'luk HCl ile balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

% 3.5'luk HCl çözeltisi

9.46 mL der. HCl çözeltisinden pipetle alınarak içinde bir miktar destile su bulunan 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve çizgisine kadar destile su ile tamamlandı.

Linoleik asit emülsiyonu

175 mg Tween 20 ve 155 µL linoleik asit 0.04 M fosfat tamponu (pH=7.0) ile balon jojede 50 mL'ye tamamlandı.

0.04 M fosfat tamponu (pH=7.0)

KH_2PO_4 (5.44 g/L) ve $Na_2HPO_4.2H_2O$ (7.12 g/L) çözeltilerinin pH=7.0 olacak şekilde karıştırılması ile hazırlandı.

40 mM H_2O_2 çözeltisi

0.409 mL H_2O_2 otomatik pipetle çekilerek, balon jojede 0.1 M fosfat tamponu (pH=7.4) ile 100 mL'ye tamamlandı.

156 µM NBT çözeltisi

0.0255 gr NBT tartılarak 0.1 M fosfat tamponunda (pH=7.4) çözüldü ve balon jojede 200 mL'ye tamamlandı.

468 µM NADH çözeltisi

0.0694 gr NADH tartılarak 0.1 M fosfat tamponunda (pH=7.4) çözüldü ve balon jojede 200 mL'ye tamamlandı.

60 µM PMS çözeltisi

0.0018 gr PMS tartılarak 0.1 M fosfat tamponunda (pH=7.4) çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

0.1 M fosfat tamponu (pH=7.4)

KH_2PO_4 (13.609 g/L) ve $Na_2HPO_4.2H_2O$ (17.799 g/L) çözeltilerinin pH=7.4 olacak şekilde (yaklaşık 1:4 oranında) karıştırılması ile hazırlandı.

2 mM $FeCl_2$ çözeltisi

0.0254 gr $FeCl_2$ tartılarak destile suda çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

5 mM Ferrozin çözeltisi

0.0616 gr ferrozin tartılarak destile suda çözüldü ve balon jojede 25 mL'ye tamamlandı.

% 1'lik $K_3Fe(CN)_6$ çözeltisi

1 gr $K_3Fe(CN)_6$ tartılarak destile suda çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

% 10'luk TCA çözeltisi

10 gr TCA tartılarak destile suda çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

% 0.1'lik $FeCl_3$ çözeltisi

0.1 gr $FeCl_3$ tartılarak destile suda çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

0.2 M fosfat tamponu (pH=6.6)

KH_2PO_4 (27.218 g/L) ve $Na_2HPO_4.2H_2O$ (35.598 g/L) çözeltilerinin pH=6.6 olacak şekilde karıştırılması ile hazırlandı.

% 2'lik Na_2CO_3 çözeltisi

2 gr Na_2CO_3 tartılarak destile suda çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

% 75'lik Etanol

390.6 mL etanol alınarak destile su ile balon jojede 500 mL'ye tamamlandı.

3.2. Metod

3.2.1. Ekstraktların Hazırlanışı

Kurutulan bitki örnekleri ev tipi rondoda öğütüldükten sonra su, etanol ve aseton çözücüleri kullanılarak ekstraktlar hazırlandı.

Su infüzyonları için 15 g bitki örneği 300 mL kaynayan suda (katı:sıvı oranı 1:20) 30 dakika boyunca karıştırılarak ekstrakte edildi (Mata vd., 2007). Eksraktlar

süzgeç kağıdından süzüldü ve Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi'nde liyofilize edildi.

Etanol ve aseton ekstraksiyonu için 20'şer gram bitki örneği 400 mL çözücü ile oda koşullarında çalkalamalı su banyosunda 300 rpm'de 3 saat inkübe edildi (Tawaha, 2007). Süzgeç kağıdından süzüldü, süzüntülerin çözücüleri evaparatörde 40 ºC'de uçuruldu.

Bitkilerden ekstrakte edilebilen bileşiklerin miktar tayini için liyofilize ve evapore örneklerin tartımı alındı. Analiz edilinceye kadar renkli şişelerde +4 ºC'de muhafaza edildi.

Antioksidan aktivite denemelerinde çalışılacak konsantrasyonlar için liyofilize örnekler destile suda, aseton ve etanol ekstraktları ise etanolde 1000 µg/mL olacak şekilde çözüldü. Diğer konsantrasyonlar bu stok çözeltilerden seyreltilerek hazırlandı.

3.2.2. Toplam Fenolik Madde (TPC) Tayini

Tüm bitkilerin su, etanol ve aseton ekstraktlarındaki toplam çözünebilen fenolik maddeler Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile tayin edildi (Singleton ve Rossi, 1965). FC reaktifi fosfotungustik ($H_3PW_{12}O_{40}$) ve fosfomolibdik ($H_3PMo_{12}O_{40}$) asitlerin karışımı olup fenol oksidasyonu sırasında bu oksitler mavi renkli bileşiklere indirgenir. Bu renk değişimi polifenolik bileşik miktarı ile orantılı olup 760 nm'de spektofotometrede takip edilir. Polifenol miktarı genellikle gallik asit veya kateşol ekivalenti olarak ifade edilir.

Tüm bitkilerin 100-1000 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan su, aseton ve etanol ekstraktlarından 1 mL alındı. Destile su ile hacimler 46 mL'ye tamamlandıktan sonra 1 mL FCR eklendi. 3 dakika sonra % 2'lik Na_2CO_3 çözeltisi katılarak oda koşullarında 2 saat çalkantılı su banyosunda 250 rpm'de tutuldu. Örnek yerine destile su içeren kör denemeye karşı, 760 nm'de absorbanslar ölçüldü.

Değişik konsantrasyonlarda (50-500 µg/mL) hazırlanan gallik asit ve kateşol çözeltilerine FCR ile toplam fenolik madde tayini uygulandı. Okunan absorbanslar ile konsantrasyonlar arasında çizilen gallik asit ve kateşolden hazırlanan standart grafiklerin denklemlerinden, örneklerin toplam fenolik madde miktarları µg gallik asit (µg GAE/g ekstrakt) ve µg kateşol (µg KE/ g ekstrakt) eşdeğeri şeklinde hesaplandı.

3.2.3. DPPH Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini

Serbest radikal yakalama etkinliği deneyi 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikali kullanılarak Blois'in metoduna göre çalışıldı (Blois, 1958). Metod ekstraktların bir proton veya elektron verebilme yeteneğinin, mor renkli DPPH çözeltisinin rengini açması esasına dayanır. Reaksiyon karışımının absorbansının düşmesi yüksek serbest radikal giderme aktivitesinin göstergesidir.

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ekstraktlardan (100-1000 µg/mL) ve standart çözeltilerden (50-1000 µg/mL) 1'er mL alınarak, 4 mL 0,1 mM DPPH (etanolde) çözeltisi ilave edildi. Vortekslendikten sonra oda koşullarında karanlıkta 30 dakika bekletildi ve 517 nm'de absorbansları okundu. Örnek ve standart madde yerine 1 mL etanol kullanılarak aynı şartlarda kontrol de çalışıldı. Kontrolün absorbansı günlük ölçüldü.

EC_{50} değeri hesaplanmadan önce % DPPH radikali giderme aktivitesi aşağıda verilen formül ile hesaplandı:

$$\%\,\text{DPPH Radikali Giderme Aktivitesi} = \frac{\text{Kontrolün Absorbansı} - \text{Örnek Absorbansı}}{\text{Kontrol Absorbansı}} \text{ x } 100$$

DPPH'in % 50'sinin inhibisyonunu sağlayan eksratkt ve standart madde konsantrasyonu EC_{50} olarak tanımlanır. Bu değer çalışılan konsantrasyonlara karşı %

serbest radikal giderme aktivite değerlerinin yerleştirilmesi ile elde edilen grafik kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar EC_{50} = µg/mL olarak verildi.

3.2.4. Linoleik Asit Sisteminde Ferrik Tiyosiyanat (FTC) Metodu ile Antioksidan Aktivite Tayini

Antioksidan aktivite ferrik tiyosiyanat metodu kullanılarak (Pan vd., 2007) belirlendi. Bu metotta in vitro koşullarda linoleik asit oksidasyonu oluşturulur ve oksidasyon sırasında Fe^{2+} iyonları Fe^{3+} iyonlarına yükseltgenir. Belirli aralıklarla inkübasyondaki karışımdan örnek alınarak spektrofotometrik ölçüm ile peroksitlerin oluşumu takip edilir. Yüksek absorbans değeri yüksek peroksit konsantrasyonunu ifade eder.

Farklı konsantrasyonlardaki bitki ekstraktları (100-1000 µg/mL) ve standart madde çözeltilerinin (2,5-1000 µg/mL) 1 mL'sine 2,5 mL linoleik asit emülsiyonu ve 1,5 mL fosfat tamponu (0,04 M pH =7,0) eklendi. Linoleik asit emülsiyonu 175 mg Tween 20 ve 155 µL linoleik asidin fosfat tamponuyla (0,04 M pH=7,0) 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı. Ayrıca 2,5 mL fosfat tamponu ve 2,5 mL linoleik asit emülsiyonu içeren kontrol örneği hazırlandı. Vortekslenen çözeltiler inkübatörde 37 ºC'de inkübasyona bırakıldı. 120 saat boyunca 8 saatte bir inkübasyon çözeltisinden 0,1 mL alınarak 4,7 mL % 75'lik etil alkol ve 0,1 mL % 30'luk NH_4SCN eklendi. 3 dakika sonra reaksiyon karışımlarına; % 3,5'luk HCl'de hazırlanmış olan 20 µM $FeCl_2$ (0,1 mL) çözeltisi eklendi ve 5 dakika sonra oluşan kırmızı rengin absorbansı 500 nm'de ölçüldü.

Linoleik asit peroksidasyonunun % inhibisyonu aşağıdaki formül ile hesaplandı :

$$\% \text{ İnhibisyon} = 1 - \frac{500 \text{ nmde Örnek Absorbansı}}{500 \text{ nmde Kontrol Maksimum Absorbansı}} \text{ x } 100$$

3.2.5. Demir (II) İyonlarını Şelatlama Aktivitesinin Tayini

Farklı konsantrasyonlardaki (100-1000 µg/mL) bitki ekstraktlarının Fe^{+2} iyonlarını şelatlama aktivitesi Dinis ve ark. metoduna göre çalışıldı (Dinis vd., 1994). Metod Fe^{2+} iyonlarını bağlamak üzere, güçlü bir demir şelatlayıcı olan ferrozin reaktifi ile ortamda bulunan metal bağlayıcı bileşiklerin yarışmasına dayanır. Şelatlama gücü yüksekse kırmızı renkli Fe^{2+}/ferrozin kompleksinin oluşumu engellenir.

1 mL örneğe 3,7 mL deiyonize su ve 100 µL 2 mM $FeCl_2$ çözeltisi eklendi. Oda koşullarında 30 dakika inkübasyondan sonra 200 µL 5 mM ferrozin çözeltisi eklenerek vortekslendi. 10 dakika sonra karışımların absorbans değerleri 562 nm'de ölçüldü. Örnek yerine 1 mL deiyonize su kullanılarak kontrol çalışıldı. Standart olarak 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında EDTA çözeltileri kullanıldı. Ferrozin-Fe^{+2} kompleksinin inhibisyon yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\%\ \text{Şelatlama Aktivitesi} = 1 - \frac{562\ \text{nmde Örnek Absorbansı}}{562\ \text{nmde Kontrol Absorbansı}} \text{ x } 100$$

3.2.6. Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini

Süperoksit anyonu giderme aktivitesi Nishikimi ve ark. metoduna göre tayin edildi (Nishimiki vd., 1972). Deney koşullarında NADH/PMS/O_2 sistemi ile üretilen süperoksit radikali sarı renkli NBT'yi mavi-mor renkli formazon türevine indirger. Süperoksit radikali giderme aktivitesi olan bileşikler varlığında düşük absorbans değerleri elde edilir.

1 mL 156 µM NBT (0,1 M fosfat tamponunda, pH=7,4) ve 1 mL 468 µM NADH (0,1 M fosfat tamponunda, pH=7,4) çözeltilerine 1 mL değişik konsantrasyonlarda hazırlanan bitki ekstraktları (100-1000 µg/mL) veya 1 mL standart BHA çözeltisi (50-400 µg/mL) eklendi. Reaksiyon karışımlarına 100 µL 60 µM PMS

çözeltisi (0,1 M fosfat tamponu pH=7,4) katıldıktan sonra 25 ºC de 5 dakika bekletildi ve 560 nm'de absorbansları okundu. Aynı deney koşullarında 1 mL su kullanılarak kontrol ile de çalışıldı. Aşağıda verilen eşitlik kullanılarak süperoksit anyonu giderebilme aktiviteleri hesaplandı.

$$\%\ \text{Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi} = \frac{560\ \text{nmde Kontrol Absorbansı} - 560\ \text{nmde Örnek Absorbansı}}{560\ \text{nmde Kontrol Absorbansı}} \text{x } 100$$

3.2.7. H_2O_2 Giderme Aktivitesinin Tayini

Ekstraktların hidrojen peroksit giderme yeteneği Ruch ve ark. metoduna göre çalışıldı (Ruch vd., 1989). Bu metotta, reaksiyon ortamına eklenen belirli miktardaki hidrojen peroksit çözeltisinin bitki ekstraktı tarafından yıkılması 230 nm'deki absorbans değişimiyle izlenir.

Değişik konsantrasyonlarda hazırlanan bitki ekstraktlarının (100- 1000 µg/mL) ve standart çözeltilerin 1 mL'sine 2,4 mL fosfat tamponu (0,1 M pH=7,4) ve 0,6 mL 40 mM H_2O_2 çözeltisi eklendi. Ayrıca her bir örnek için ayrı ayrı 1 mL örnek ve 4 mL fosfat tamponundan oluşan ve H_2O_2 içermeyen numune körleri hazırlandı. Kontrol olarak 3,4 mL fosfat tamponu ve 0,6 mL 40 mM H_2O_2 çözeltisi hazırlandı. Tüpler vortekslendi ve oda koşullarında 30 dakika inkübasyondan sonra 230 nm'de absorbansları ölçüldü. Aşağıdaki denklem kullanılarak örneklerin H_2O_2 giderme etkinliği belirlendi.

$$\%\ \text{H}_2\text{O}_2\ \text{Giderme Aktivitesi} = 1 - \frac{230\ \text{nmde Örnek Absorbansı}}{230\ \text{nmde Kontrol Absorbansı}} \text{x } 100$$

3.2.8. İndirgeme Kapasitesi Tayini

Bitki ektraktlarının indirgeme kapasitesi Oyaizu metoduna göre tayin edildi (Oyaizu, 1986). Ortamdaki indirgen madde Fe^{3+} iyonlarını Fe^{2+} iyonlarına indirger ve $FeCl_3$ ilavesiyle oluşan Prusya mavisi rengindeki kompleksin absorbansı ölçülür. Yüksek absorbans değeri yüksek indirgeme kapasitesinin göstergesidir.

Çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan bitki ekstraktları (50-1000 µg/mL) ve standart madde çözeltilerinin (20-1000 µg/mL) 1 mL'sine, 2,5 mL fosfat tamponu (0,2 M, pH=6,6) ve 2,5 mL % 1'lik $K_3Fe(CN)_6$ eklendi. Karışımlar 50 ºC'de 20 dakika inkübe edildikten sonra 2,5 mL % 10'luk TCA eklendi ve 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası süpernatantlardan 2,5 mL alınarak eşit hacimde destile su ve 0,5 mL % 0,1'lik $FeCl_3$ çözeltisi ile karıştırıldı. 700 nm'de absorbanslar okundu.

3.2.9. Değerlendirme

Tüm deneylerde üç paralel ölçüm yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler olarak aritmetik ortalama±SS değerleri ile verildi. Grafikler GraphPad Prism 5 Demo programı kullanılarak çizildi. Hata çubukları grafiklerin üzerinde belirtildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Dereotu, gelincik, kuzukulağı, roka ve tere bitkileri kurutulup öğütüldükten sonra su, etanol ve aseton çözücüleri olmak üzere üç farklı çözücü kullanılarak ekstraksiyonları yapıldı. Elde edilen tüm ekstraktların antioksidan aktiviteleri çeşitli metodlarla incelendi. Gerçekleştirilen ekstraksiyonlar sonucu, bitkilerden ekstrakte edilebilen bileşiklerin miktarı 21,66-488,35 mg/g kurutulmuş bitki materyali aralığında değişmektedir. Bitkilerden ekstrakte edilebilen bileşiklerin ekstraksiyon verimleri Tablo 4.1'de görülmektedir. Tabloda görüldüğü gibi en yüksek ekstraksiyon verimi su ekstraktlarına aittir.

Tablo 4.1. Kurutulmuş bitkilerden ekstrakte edilen bileşiklerin verimleri

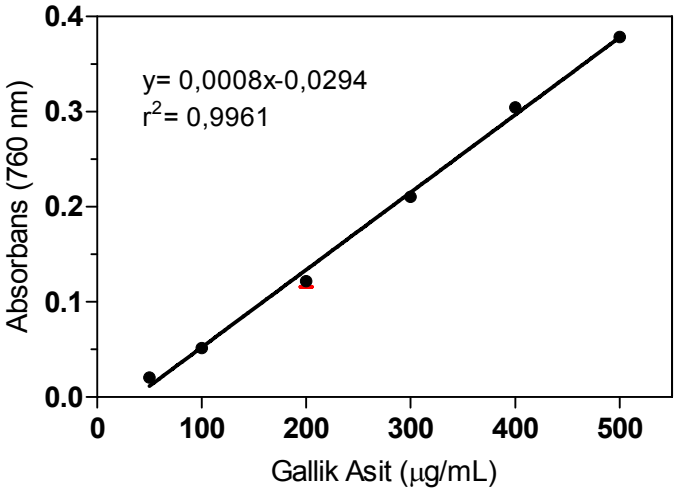
Ekstrakt	**Kurutulmuş bitki gramındaki mg ekstrakt verimi**				
	Dereotu	**Gelincik**	**Kuzukulağı**	**Roka**	**Tere**
Su ekstraktı	458,66	480,61	367,81	488,35	461,55
Etanol ekstraktı	44,03	46,66	42,66	73,33	132,60
Aseton ekstraktı	60,70	21,66	22,02	28,06	55,33

4.1. FCR ile Toplam Fenolik Bileşik Tayini

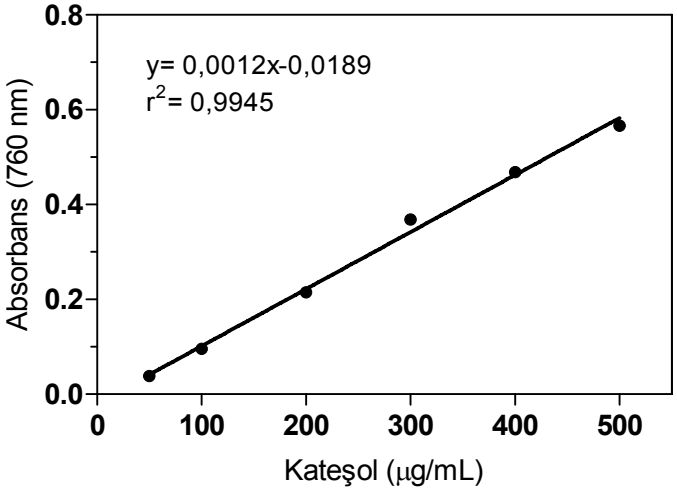
Tüm bitkilerin su, etanol ve aseton ekstraktlarındaki toplam çözünebilen fenolik maddeler Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile tayin edildi. Gallik asit ve kateşol kullanılarak standart grafikler hazırlandı (Şekil 4.1 ve 4.2). Bu standart grafikler

kullanılarak örneklerin toplam fenolik madde miktarları mg gallik asit (mg GAE/g ekstrakt) ve mg kateşol (mg KE/ g ekstrakt) eşdeğeri şeklinde hesaplandı.

Standart grafik denkleminden hesaplanan sonuçların gallik asit ekivalenti olarak 49,63±2,5-127,55±14,48 mg/g ve kateşol ekivalenti olarak 24,08±1,67-76,03±9,66 mg/g arasında değiştiği belirlendi.

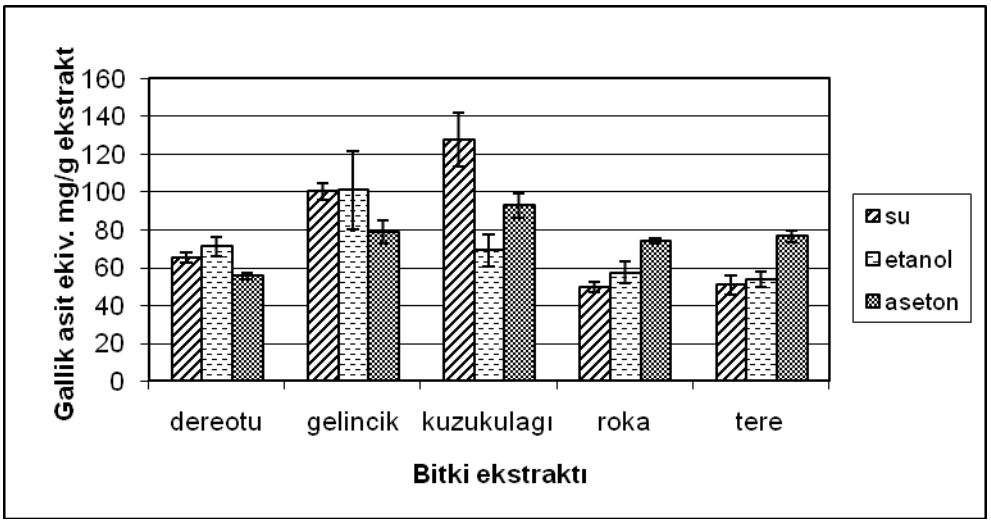


Şekil 4.1. Gallik asit standart grafiği

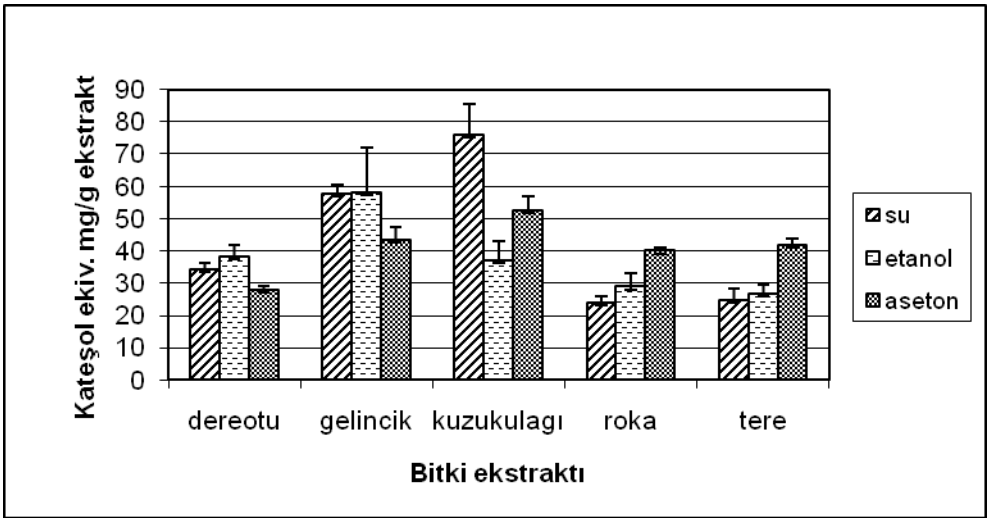


Şekil 4.2. Kateşol standart grafiği

Dereotu, gelincik, kuzukulağı, roka ve terenin su, etanol ve aseton ekstraktlarının gallik asit ve kateşol eşdeğeri olan fenolik madde miktarlarına ait değerler Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te verilmiştir. Bu grafiklerden görüldüğü üzere, çalışılan bitkilerin ekstrakte edilebilen toplam fenolik bileşik içerikleri karşılaştırıldığında; kuzukulağı ve gelinciğin en yüksek fenolik madde içerdiği, dereotu, roka ve terenin ise daha düşük olmak üzere birbirine yakın değerlerde fenolik madde içerdiği belirlenmiştir (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4).



Şekil 4.3. Bitki ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri olan fenolik madde içerikleri

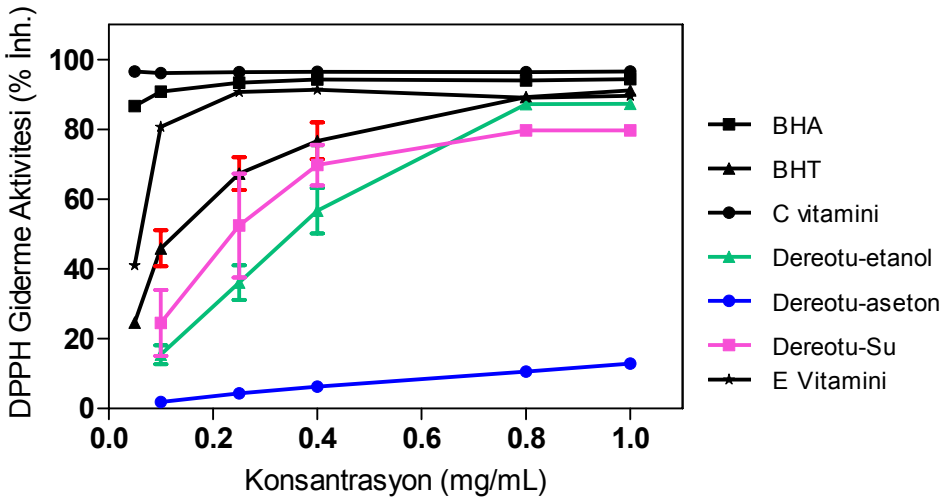


Şekil 4.4. Bitki ekstraktlarının kateşol eşdeğeri olan fenolik madde içerikleri

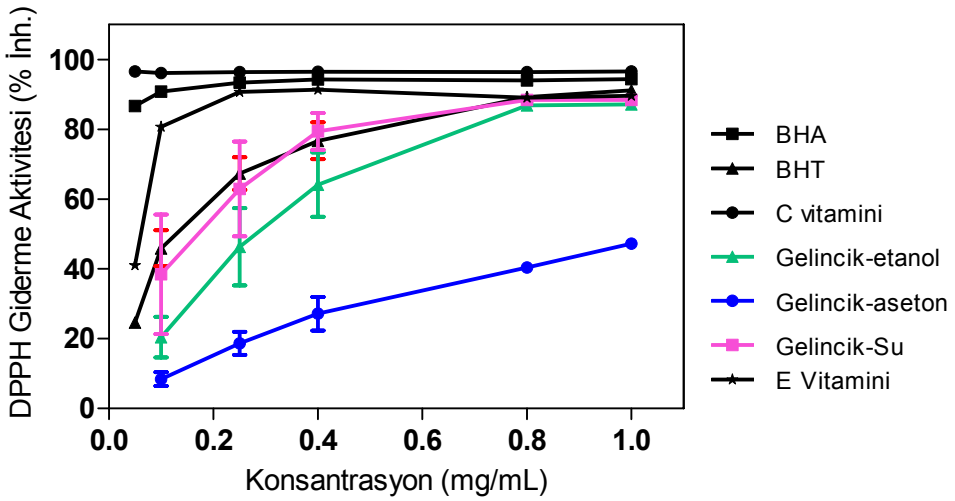
4.2. DPPH Radikali Giderme Aktivitesi

DPPH radikali doğal antioksidanların serbest radikal yakalama aktivitesini değerlendirmek için kullanılır. Çalışmada kullanılan her bir bitkiye ait ekstraktların serbest radikal giderici etkileri DPPH radikali üzerinden tayin edildi. Standart madde olarak BHT, BHA, C vitamini ve E vitamini kullanıldı.

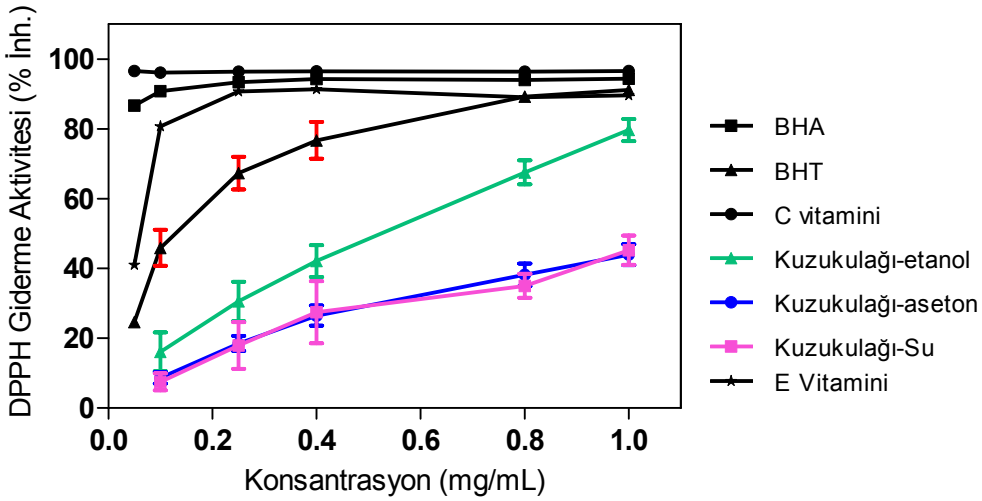
Ekstraktların DPPH serbest radikali giderme aktivitelerine ait konsantrasyon-% inhibisyon grafikleri çizildi (Şekil 4.5-4.9).



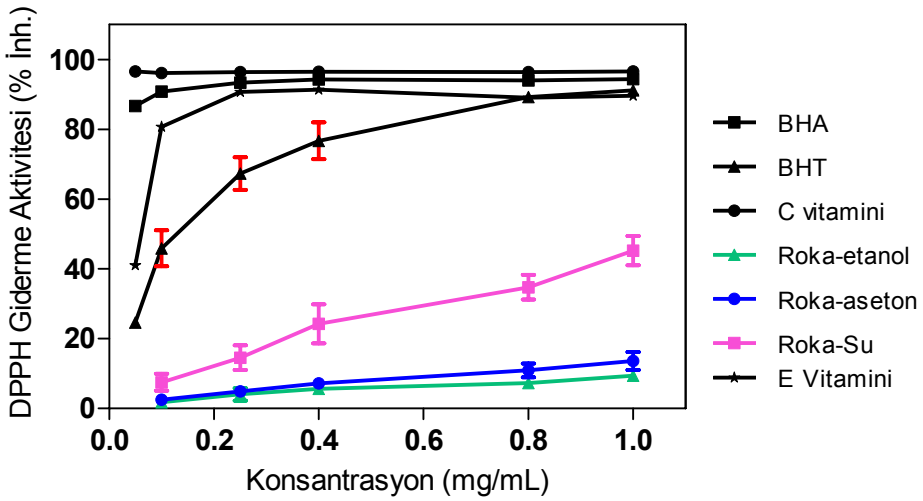
Şekil 4.5. Dereotu ekstraktlarının DPPH radikali giderme aktivitesi



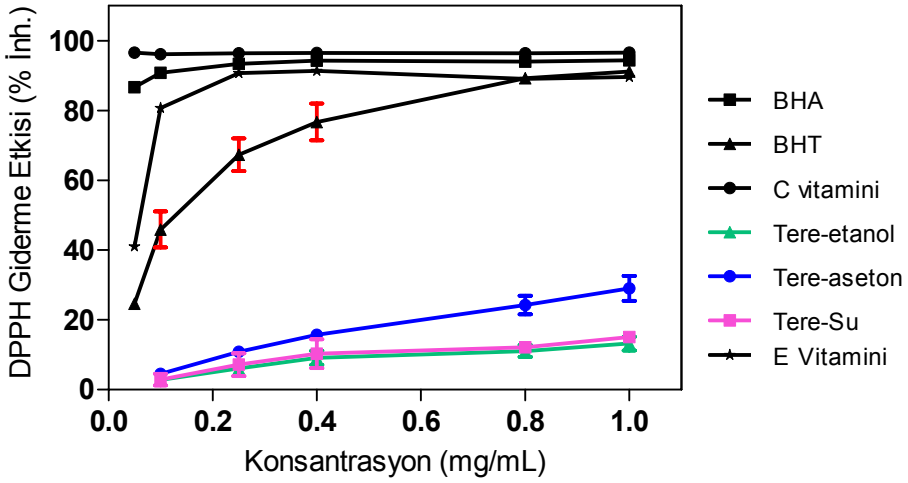
Şekil 4.6. Gelincik ekstraktlarının DPPH radikali giderme aktivitesi



Şekil 4.7. Kuzukulağı ekstraktlarının DPPH radikali giderme aktivitesi



Şekil 4.8. Roka ekstraktlarının DPPH radikali giderme aktivitesi



Şekil 4.9. Tere ekstraktlarının DPPH radikali giderme aktivitesi

Şekil 4.5-Şekil 4.9 incelendiğinde; DPPH serbest radikali giderme aktivitesi yönünden dereotu ve gelinciğin etanol ve su, kuzukulağının etanol ekstraktları standartlarla karşılaştırılabilir başarılı aktiviteler gösterdi.

Rokanın etanol ve aseton, dereotunun aseton ve terenin tüm ekstraktlarında konsantrasyon artışı ile birlikte % inhibisyon oranlarında artış gözlenmesine rağmen elde edilen değerler standartlardan oldukça düşüktü ve bu nedenle antiradikalik aktivite açısından bu ekstraktlar zayıf olarak kabul edildi.

DPPH serbest radikali giderme aktivitesi sonuçları detaylı incelendiğinde; çalışılan bitki ekstraktlarının bir kısmının standartların aynı konsantrasyonunda elde edilen radikal giderme aktivitesi sonuçlarıyla çok yakın değerde olduğu gözlendi. Bununla birlikte bazı bitki ekstraktlarının yüksek konsantrasyonları, düşük standart konsantrasyonlarına eşdeğer aktivite gösterebildi.

Gelinciğin su ve etanol ekstraktlarının 400 µg/mL, 800 µg/mL ve 1000 µg/mL konsantrasyonları (GS400 = % 79,41±9,13, GS800 = % 88,46±0,08, GS1000 = % 88,46±0,26 ve GE800 = % 86,81±0,34, GE1000 = % 87,13±0,09) BHT ve E vitamininin eşdeğer konsantrasyonlarıyla karşılaştırıldığında (BHT400 = % 76,7±9,10, BHT800 = % 89,28±1,64, Evit800 = % 89,07±1,06, Evit1000 = % 89,57±0.03) serbest radikal giderme açısından aynı % inhibisyon değerlerine sahip olduğu görüldü.

Dereotunun su ve etanol ekstraktlarının 800 µg/mL ve 1000 µg/mL konsantrasyonları (DS800 = %79,73±0,63, DS1000 = % 79,66±0,58 ve DE800 = % 87,22±0,97, DE1000 = % 87,32±0,73) ve kuzukulağının etanol ekstraktının 1000 µg/mL konsantrasyonu (KE1000 = % 79,69±5,47) radikal giderme aktivitesi yönünden oldukça başarılı olmalarına rağmen; eşdeğer BHT ve E vitamini konsantrasyonlarıyla karşılaştırıldıklarında (BHT800 = % 89,28±1,64, BHT1000 = % 91,17±0,33, Evit800 =

% 89,07±1,06, Evit1000 = % 89,57±0.03) biraz daha düşük aktiviteye sahip oldukları görüldü.

Reaksiyon ortamındaki DPPH radikalinin % 50'sinin yok edilmesi için gereken etkili antioksidan konsantrasyonu EC_{50} (veya IC_{50}) değeri olarak tanımlanır ve düşük EC_{50} değeri yüksek radikal giderme aktivitesinin göstergesidir. Çalışmada kullanılan tüm bitki ekstraktlarının herbiri için ayrı ayrı çizilen konsantrasyon-% inhibisyon grafiklerinden EC_{50} değerleri belirlendi. Elde edilen bu değerler Tablo 4.2'de verildi.

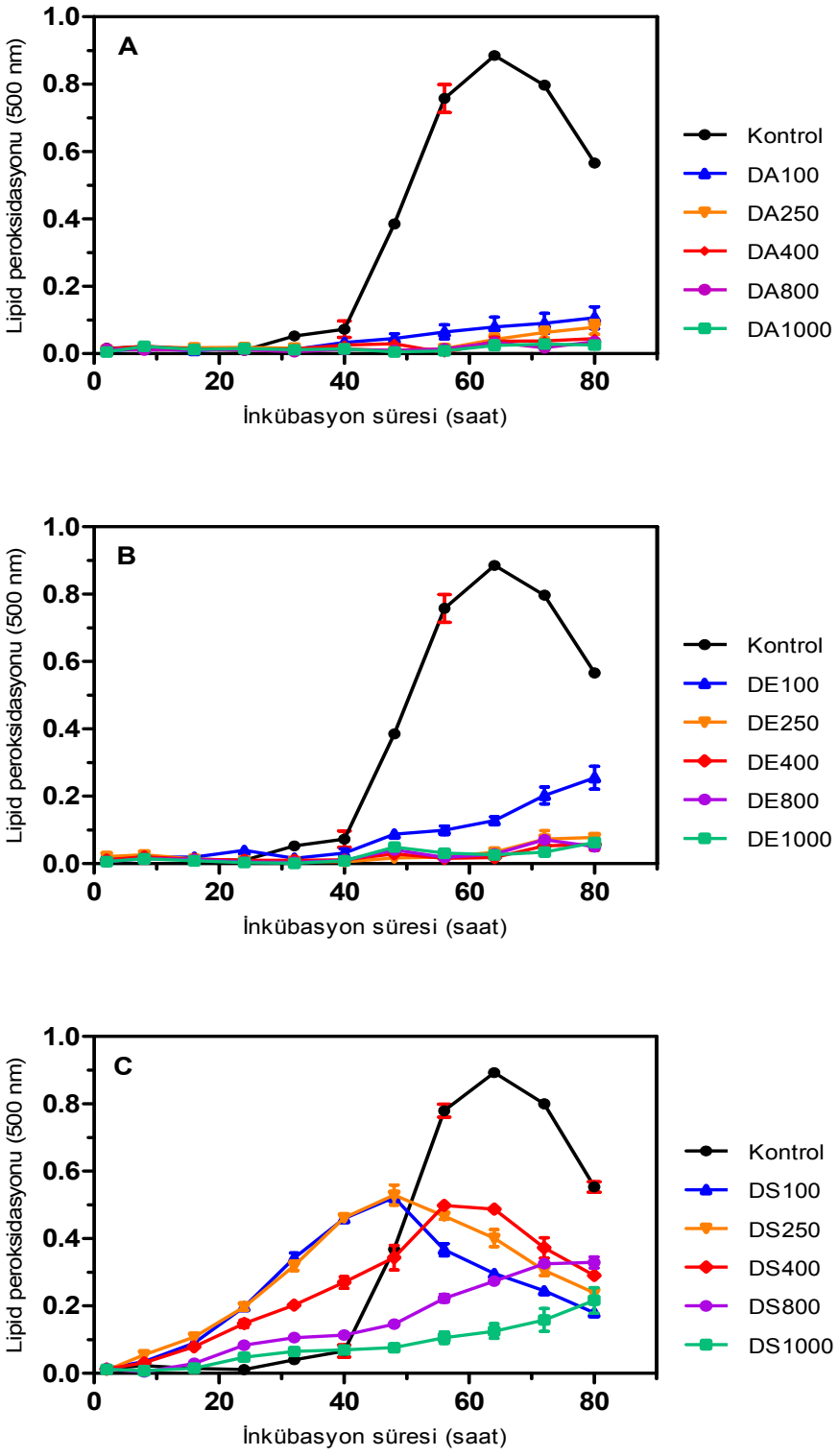
Tablo 4.2. Çalışılan bitki ekstraktlarının ve standartların DPPH radikali giderme aktivitesi sonuçlarından elde edilen EC_{50} değerleri

	EC_{50} (mg/mL)		
	Su Ekstraktı	Etanol Ekstraktı	Aseton Ekstraktı
Dereotu	1,93±0,53	4,75±1,35	8,95±1,41
Gelincik	1,39±0,54	3,11±1,42	5,49±1,35
Kuzukulağı	7,32±1,57	5,93±1,31	4,76±1,34
Roka	3,37±0,05	4,63±1,74	6,39±1,68
Tere	3,65±0,94	3,64±1,63	6,47±1,45
C Vitamini	0,43±0,05		
E Vitamini		0,56±0,09	
BHA		0,71±0,06	
BHT		1,80±0,27	

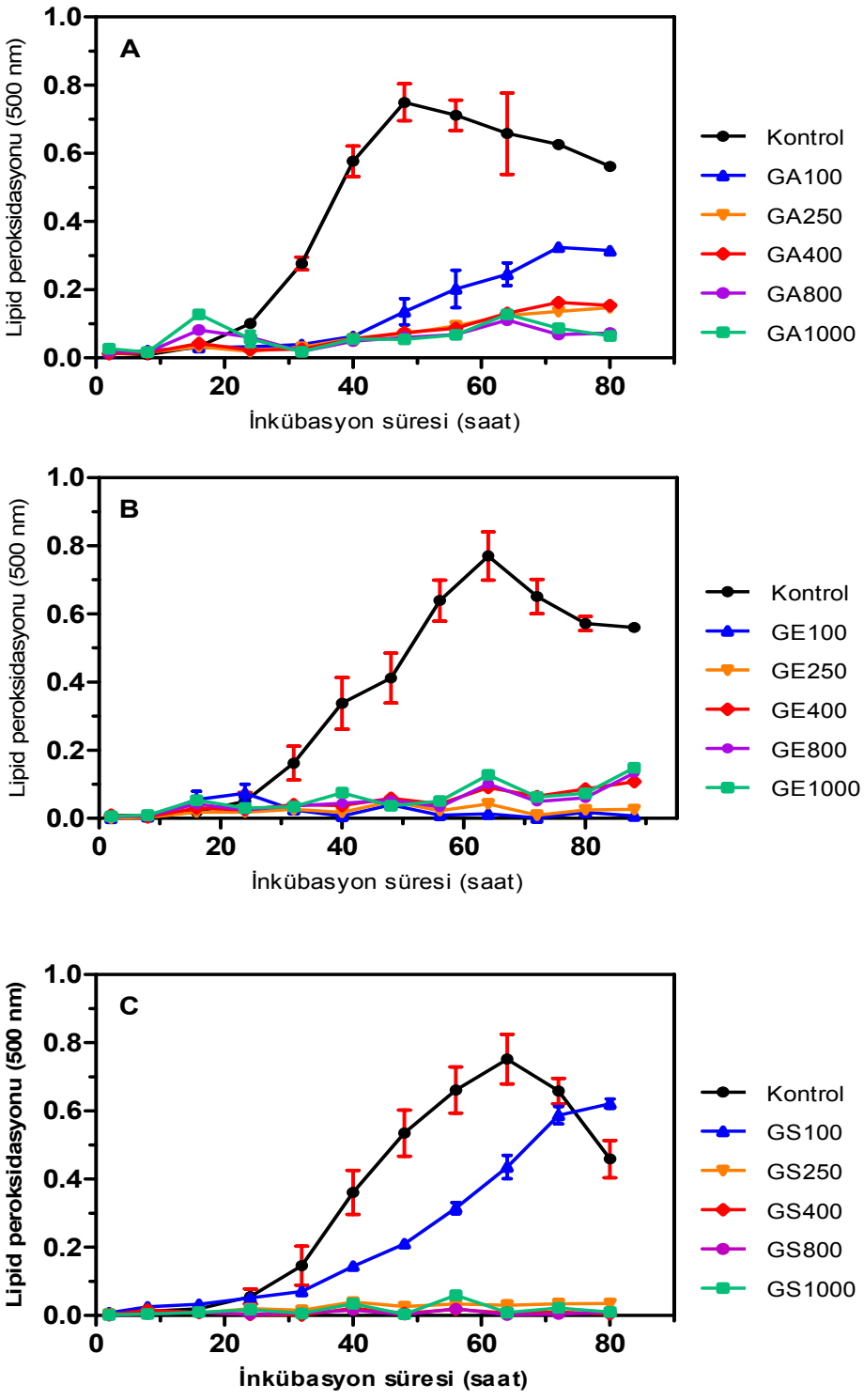
Tablo 4.2'ye göre; çalışılan ekstraktlar içinde en düşük EC_{50} değeri dereotu ve gelincik su ekstraktlarında, en yüksek EC_{50} değeri dereotu aseton ve kuzukulağı su ekstraktlarında tayin edildi. Gelincik ve dereotunun su ekstraktlarının, BHT standartı ile kıyaslanabilecek ölçüde etkili EC_{50} değerleri olduğu görülmektedir.

4.3. Linoleik Asit Sisteminde Ferrik Tiyosiyanat Metodu ile Toplam Antioksidan Aktivite Tayini

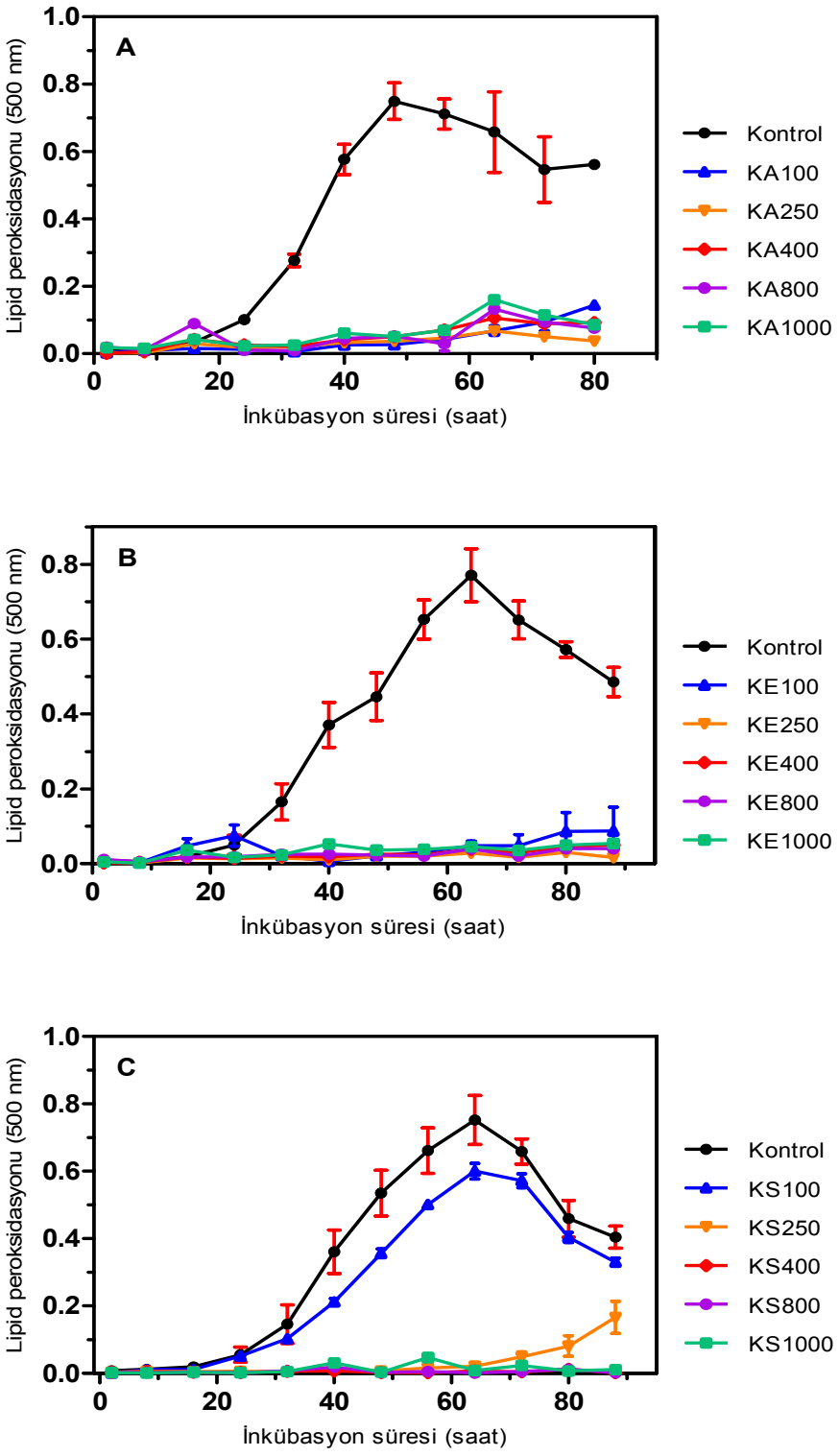
Bitki ekstraktlarının linoleik asit peroksidasyonu üzerindeki inhibisyon etkileri, 2,5-1000 µg/mL aralığındaki konsantrasyonlarda ferrik tiyosiyanat (FTC) metodu ile ölçüldü ve sonuçlar BHA, BHT, E vitamini ve C vitamininin inhibisyon oranları ile karşılaştırıldı. İnkübasyon sırasında emülsiyonda oluşan peroksitlerin miktarı, oksidasyonun ilerleyişi sırasında sekiz saatte bir ölçüm alınarak 120 saat boyunca takip edildi. Kontrolün absorbansının maksimum olduğu yani lipid peroksidasyonunun en fazla olduğu zaman kadar olan veriler kullanılarak, herbir ekstraktın farklı konsantrasyonları için ve standart maddeler için absorbans-zaman grafikleri çizildi (Şekil 4.10-4.14). Grafikler yardımıyla kontrolün maksimum absorbansı ve her bir örneğin maksimum peroksit oksidasyonu anına karşılık gelen absorbansları belirlendi. Bölüm 3.2.4'te verilen formül yardımıyla lipid peroksidasyonunu inhibe etme oranları tayin edildi.



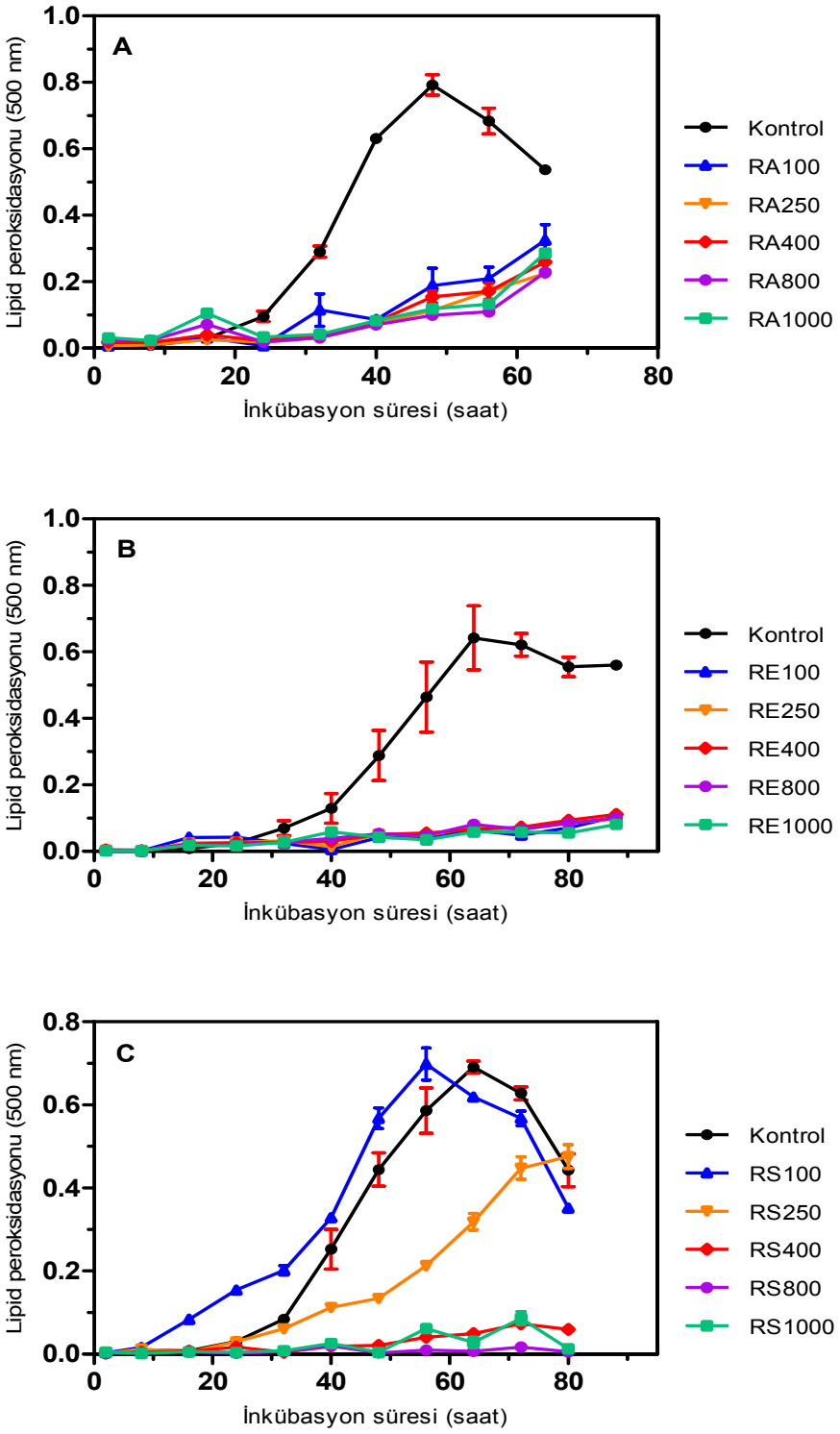
Şekil 4.10. Linoleik asit peroksidasyonunda dereotu aseton (A), etanol (B), su (C) ekstraktlarının etkisi



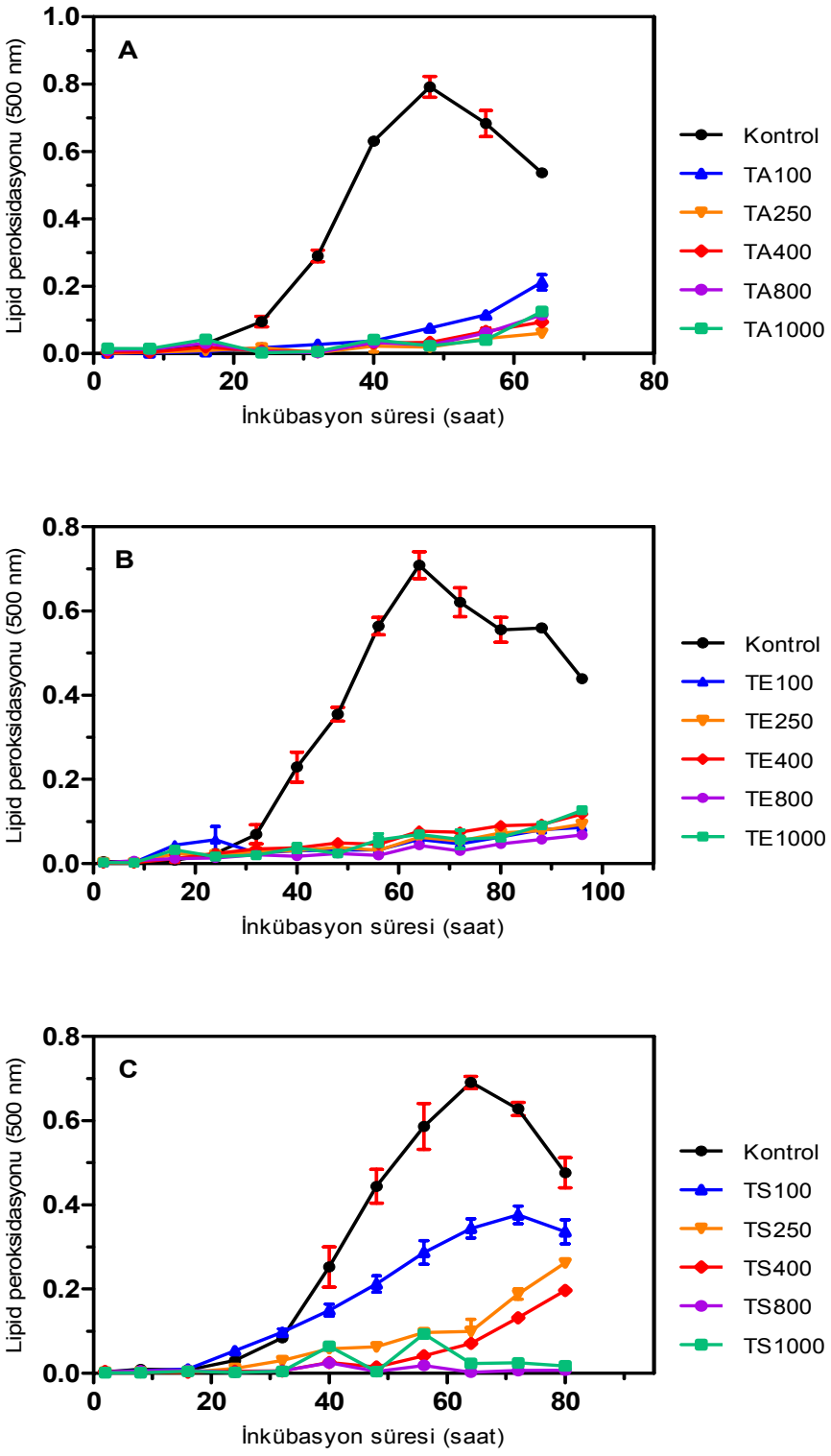
Şekil 4.11. Linoleik asit peroksidasyonunda gelincik aseton (A), etanol (B), su (C) ekstraktlarının etkisi



Şekil 4.12. Linoleik asit peroksidasyonunda kuzukulağı aseton (A), etanol (B), su (C) ekstraktlarının etkisi



Şekil 4.13. Linoleik asit peroksidasyonunda roka aseton (A), etanol (B), su (C) ekstraktlarının etkisi

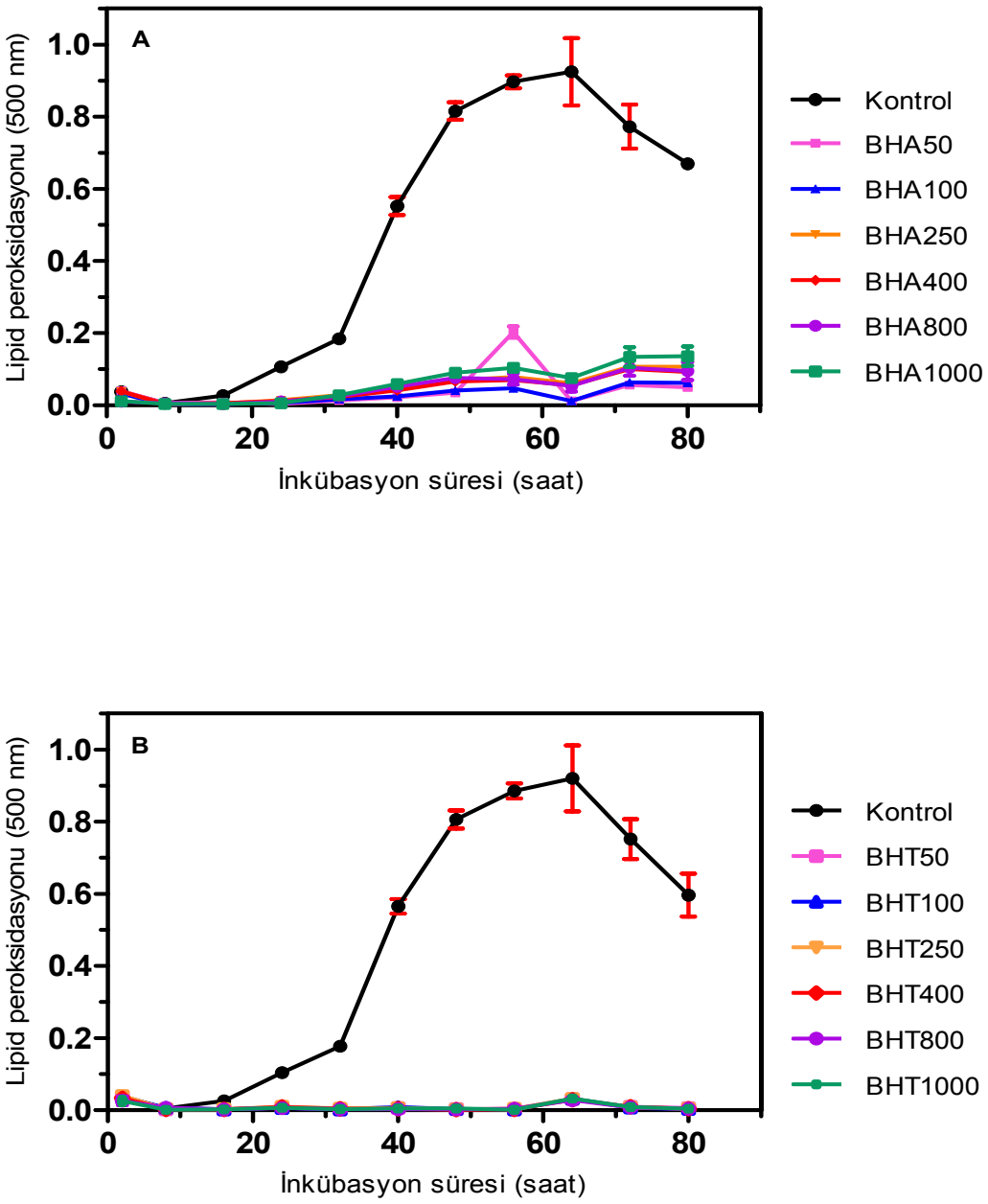


Şekil 4.14. Linoleik asit peroksidasyonunda tere aseton (A), etanol (B), su (C) ekstraktlarının etkisi

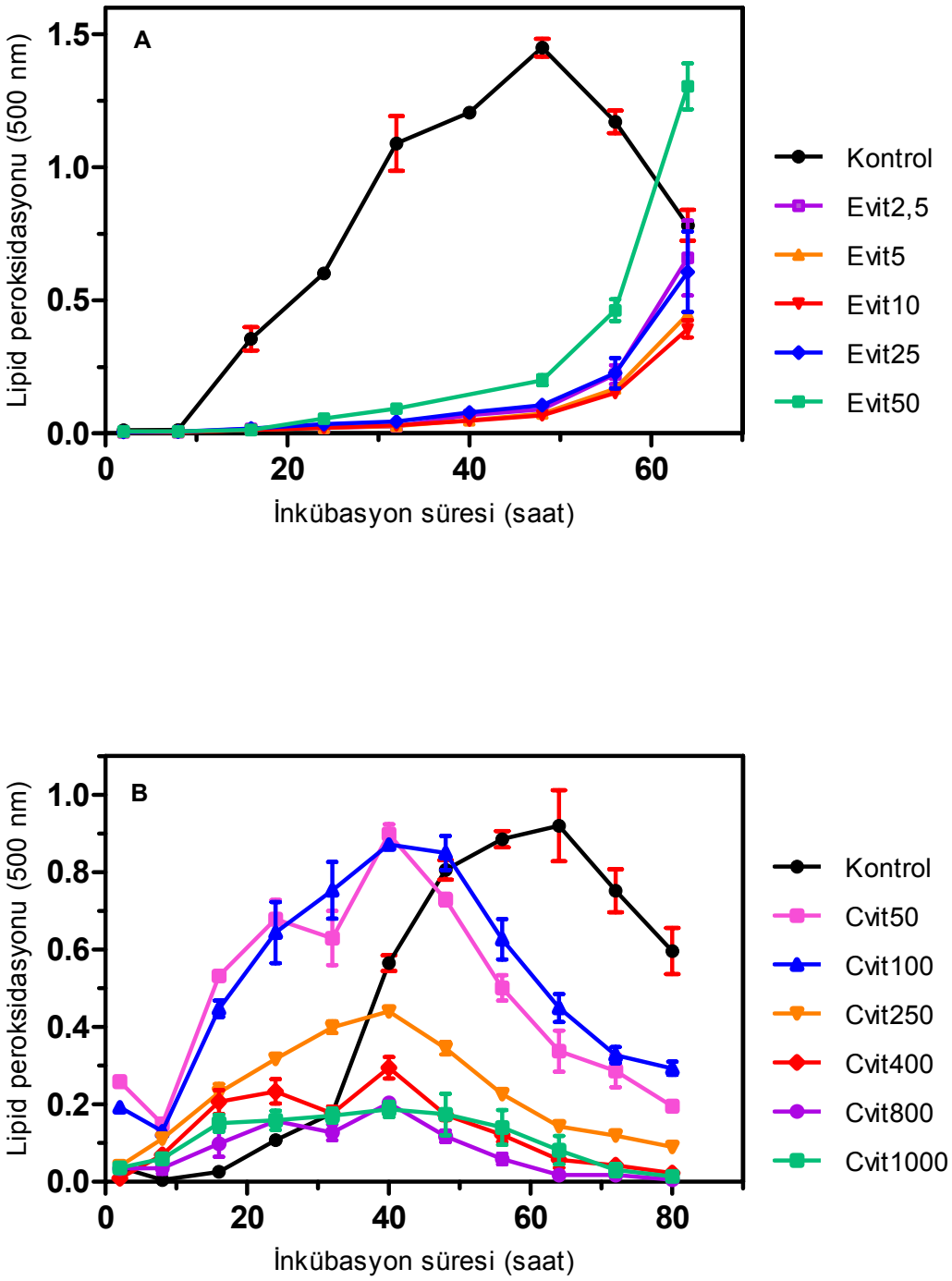
Şekil 4.10-4.14'e göre genel olarak aseton ve etanol ekstraktlarında su ekstraktlarına göre daha iyi aktiviteler görülmektedir. Dereotu aseton ve etanol ekstraktları yüksek antioksidan aktivite gösterirken, su ekstraktının çalışılan tüm konsantrasyonlarda lipid peroksidasyonunu önlemede zayıf olduğu gözlendi (Şekil 4.10). Gelincik aseton ve su ekstraktlarının 100 μg/mL konsantrasyonu hariç diğer konsantrasyonları ve etanol eksraktı yüksek antioksidan aktiviteler göstermiştir (Şekil 4.11). Kuzukulağı ve tere su ekstraktlarının 100 μg/mL konsantrasyonu düşük inhibisyon oranı gösterirken, en yüksek aktiviteler aseton ve etanol ekstraktlarında tayin edilmiştir (Şekil 4.12 ve Şekil 4.14). Şekil 4.13'e göre rokanın su ekstraktı düşük konsantrasyonlarda lipid peroksidasyonunu önlemede başarılı olamamış, en yüksek aktivite etanol ekstraktında belirlenmiştir.

Çalışmamızda; linoleik asit emülsiyonu ile yapılan lipid peroksidasyonu denemesinde BHA ve BHT kullanılan tüm konsantrasyonlarda peroksit oluşumunu tamamen inhibe ederek tipik bir antioksidan profili sergilediler (Şekil 4.15). Ancak E vitamini ve C vitamini sentetik antioksidanlara göre farklı davranış gösterdiler (Şekil 4.16).

100-1000 μg/mL konsantrasyon aralığında çalışıldığında E vitamininin lipid peroksidasyonunu önlemede çok etkili olmadığı ve kontrolden yüksek absorbans değerleri verdiği gözlendi. Literatürde yüksek dozdaki E vitamininin prooksidan etki gösterebileceği (Tafazoli vd., 2005, Burdurlu ve Karadeniz, 2006) bildirilmiştir. Bu yüzden daha düşük konsantrasyonlar ile (2,5, 5, 10, 25 ve 50 μg/mL) çalışıldığında, lipid peroksidasyonunun maksimum olduğu sürede yüksek inhibisyon oranları tayin edildi (Şekil 4.16 (A)). Şekil 4.16 (B)'de C vitamininin lipid peroksidasyonu üzerindeki etkisi görülmektedir. Grafiğe göre çalışılan konsantrasyon aralığının (50-1000 μg/mL) bazı miktarlarında, C vitamininin lipid peroksidasyonunu engellemediği, aksine kontrole oranla daha önce maksimuma ulaştığı yani lipid peroksidasyonunu hızlandırdığı görülmektedir.



Şekil 4.15. Linoleik asit peroksidasyonunda sentetik antioksidan olan BHA (A) ve BHT (B)'nin etkisi

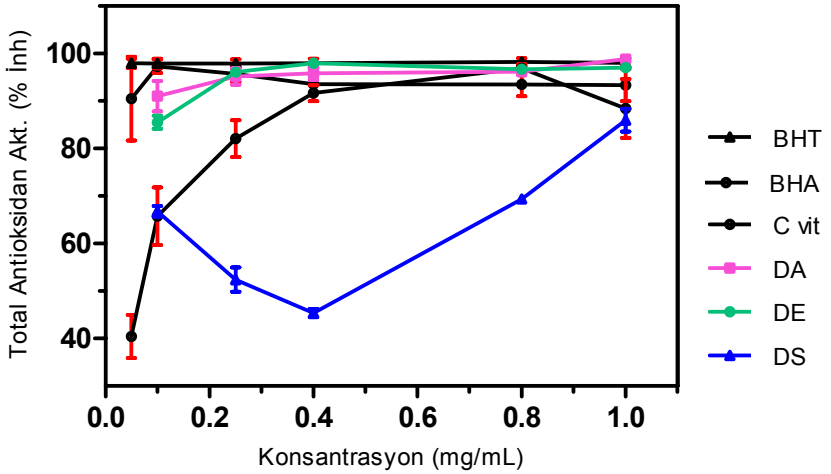


Şekil 4.16. Linoleik asit peroksidasyonunda E vitamini (A) ve C vitamini (B)'nin etkisi

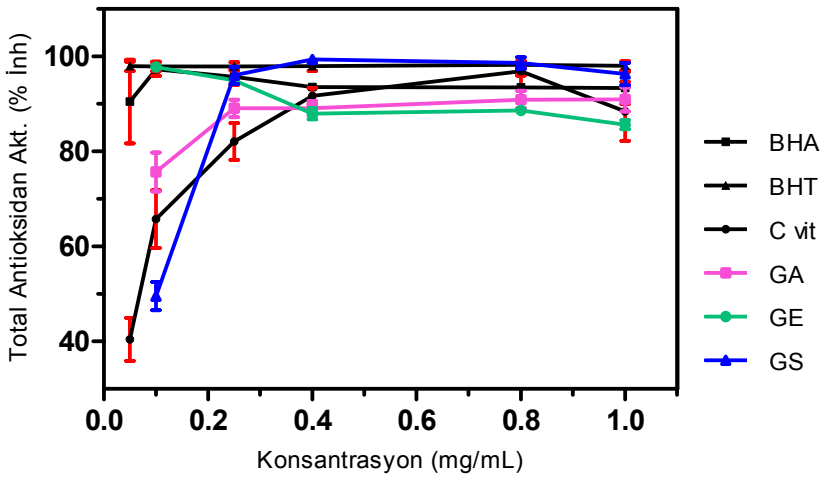
Bitki ekstraktlarının ve standartların antioksidan aktivitelerini daha açık şekilde görebilmek için, elde edilen % inhibisyon değerleri Tablo 4.3'te verilmiştir. Çalışılan konsantrasyonlar ile % inhibisyon oranları arasında çizilen grafiklerde (Şekil 4.17-4.21) her bir bitki ekstraktının standart olarak kullanılan sentetik antioksidanlar ve C vitaminine karşı total antioksidan aktiviteleri görülmektedir.

Tablo 4.3. Ekstraktların ve standartların lipid peroksidasyonunu inhibe etme oranları

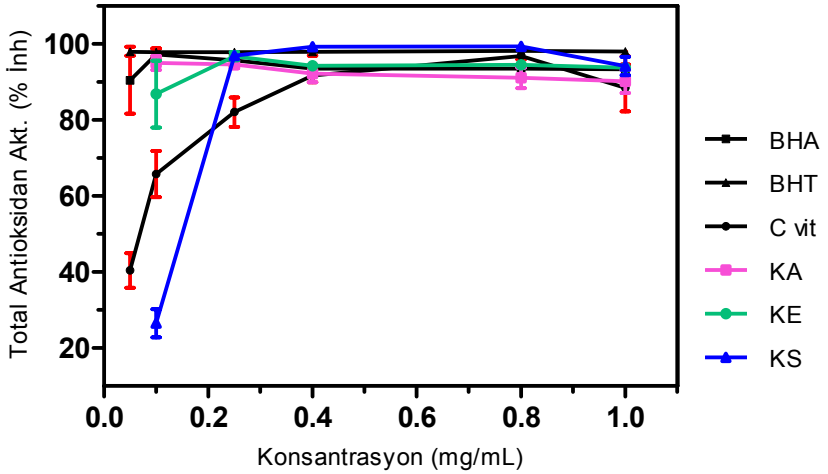
Bitki	**% İnhibisyon**					
Ekstraktı	**50 µg/mL**	**100 µg/mL**	**250 µg/mL**	**400 µg/mL**	**800 µg/mL**	**1000 µg/mL**
DA		91,01±5,54	95,15±2,99	95,81±2,40	96,16±0,44	98,82±0,68
DE		85,53±2,39	96,12±0,16	97,97±0,26	96,72±1,04	97,03±0,63
DS		66,80±1,89	52,40±4,50	45,35±1,47	69,35±0,99	85,97±4,19
GA		75,67±7,15	89,07±4,21	89,08±3,21	90,93±1,85	90,98±3,79
GE		97,80±1,09	94,98±0,62	87,99±2,06	88,62±1,15	85,65±1,64
GS		49,50±5,13	96,01±3,11	99,34±0,36	98,63±2,05	96,31±4,02
KA		95,06±3,16	94,63±1,77	92,24±3,94	91,10±4,71	90,17±5,23
KE		86,84±15,20	96,81±1,91	94,32±1,43	94,54±1,50	93,82±1,54
KS		26,52±6,45	96,99±1,55	99,32±0,46	99,33±0,92	94,21±4,14
RA		75,64±13,26	85,61±0,33	80,63±2,88	87,49±0,86	85,02±0,30
RE		90,43±1,77	88,68±1,52	88,70±3,94	88,18±1,73	91,44±1,08
RS		10,82±2,94	58,64±11,15	93,45±0,82	98,11±0,44	94,62±5,10
TA		90,41±0,71	97,54±0,36	95,71±0,79	96,84±0,09	97,06±0,24
TE		90,88±2,16	89,93±1,46	87,88±2,67	93,04±0,94	89,41±1,22
TS		54,37±10,86	82,96±1,981	91,26±2,09	98,82±0,99	93,52±6,70
BHA	90,49±15,21	97,32±2,47	95,72±2,91	93,57±1,30	93,50±4,32	93,38±5,86
BHT	97,95±1,68	97,91±1,73	97,70±1,51	97,94±1,68	98,20±1,46	98,04±1,63
C vit.	60,17±19,75	46,03±10,69	82,10±6,73	91,68±2,95	96,91±1,47	88,45±10,73
	2,5 µg/mL	**5 µg/mL**	**10 µg/mL**	**25 µg/mL**	**50 µg/mL**	
E vit.	93,65±0,09	94,84±0,61	95,25±1,08	92,63±0,92	86,13±2,26	



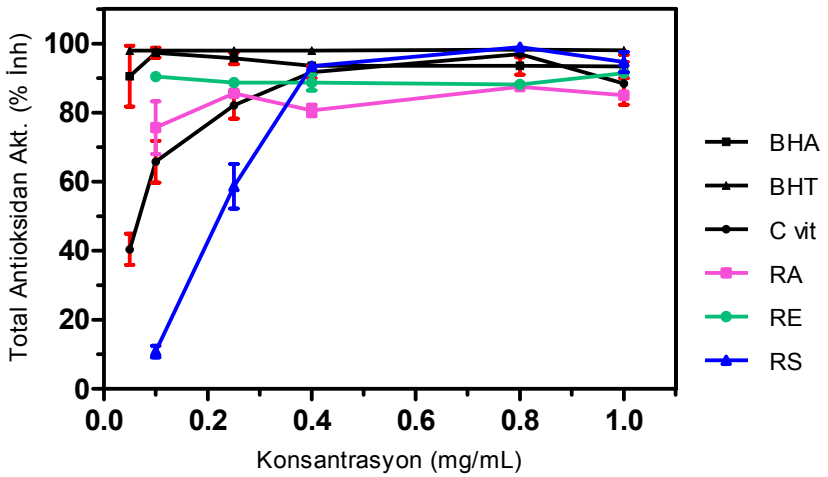
Şekil 4.17. Dereotu ekstraktlarının total antioksidan aktivitesi



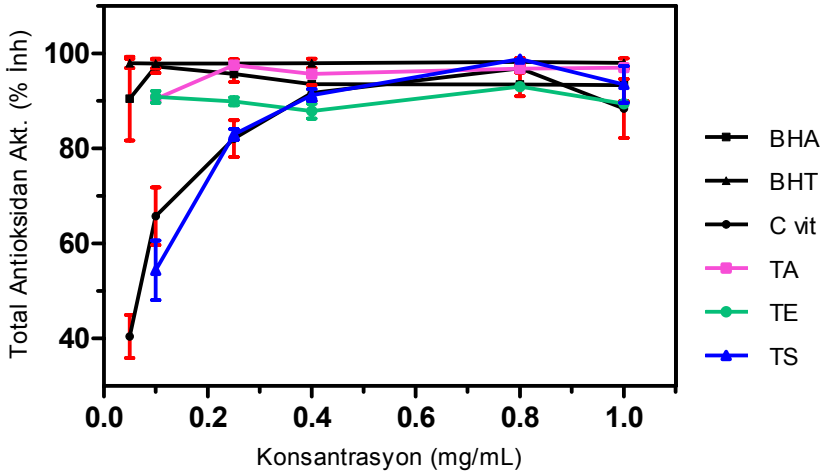
Şekil 4.18. Gelincik ekstraktlarının total antioksidan aktivitesi



Şekil 4.19. Kuzukulağı ekstraktlarının total antioksidan aktivitesi



Şekil 4.20. Roka ekstraktlarının total antioksidan aktivitesi

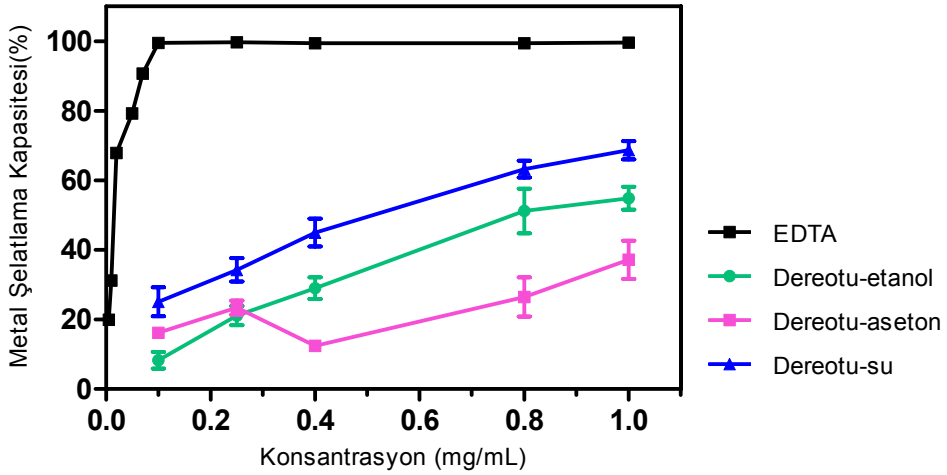


Şekil 4.21. Tere ekstraktlarının total antioksidan aktivitesi

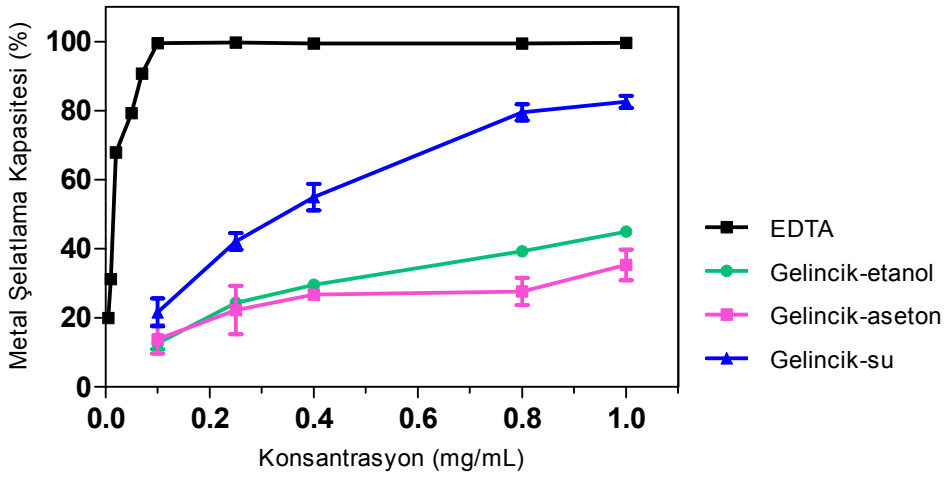
Tablo 4.3 ve Şekil 4.17-4.21'den görüldüğü gibi, dereotu su ekstraktının tüm konsantrasyonları, gelincik, kuzukulağı, roka ve tere su ekstraktlarının 100 µg/mL konsantrasyonu hariç diğer ekstraktların hepsinin güçlü antioksidan aktivite göstererek, linoleik asit otooksidasyonunun başlamasını önemli ölçüde geciktirdikleri söylenebilir.

4.4. Demir (II) İyonlarını Şelatlama Aktivitesinin Tayini

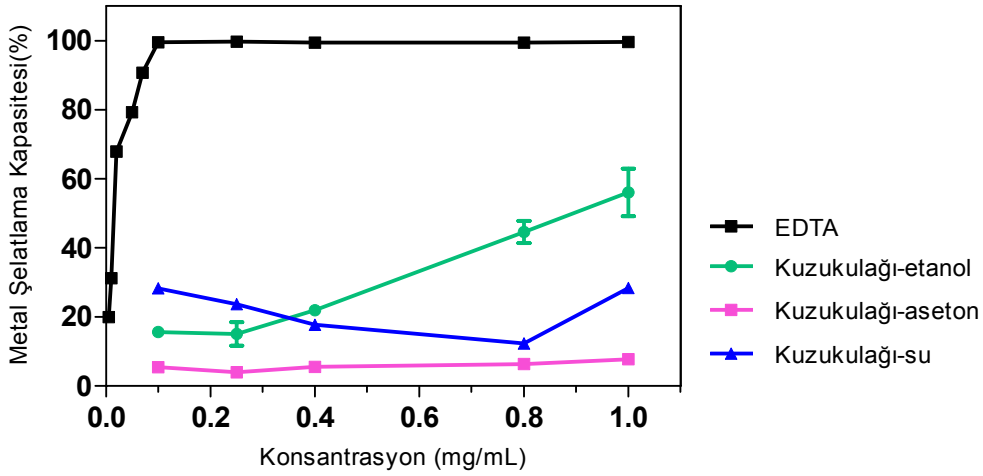
Metal iyonu şelatlama aktivitesi; bitki ekstraktlarının çözeltideki Fe^{2+} iyonlarını bağlayabilmek için ferrozin ile yarışmasına göre değerlendirildi. Kıyaslama maddesi olarak iyi bir metal şelatlayıcı olan EDTA seçildi. Çalışmada kullanılan tüm bitkilerin herbir ekstraktının metal şelatlama potansiyelini gösteren konsantrasyon-% inhibisyon grafikleri oluşturuldu (Şekil 4.22-4.26).



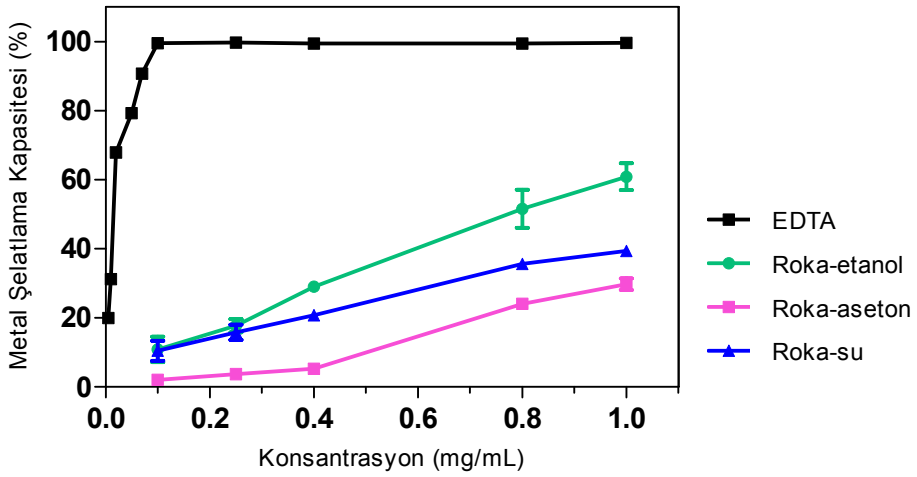
Şekil 4.22. Dereotu ekstraktlarının metal şelatlama kapasitesi



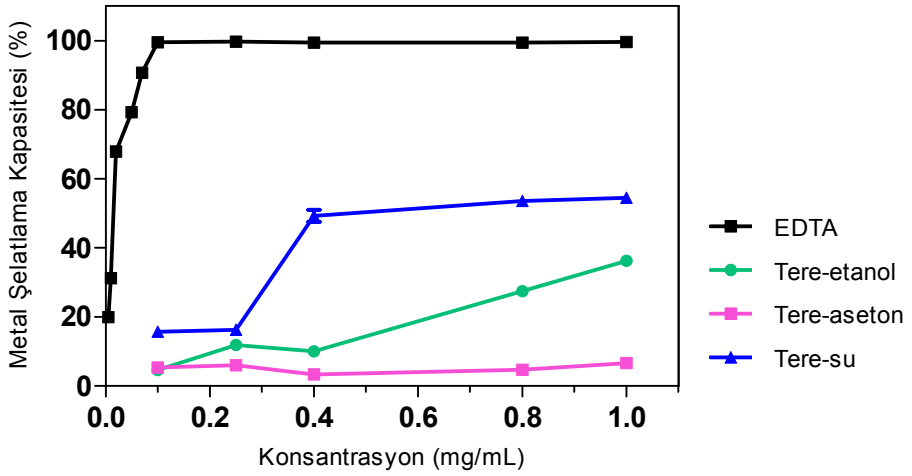
Şekil 4.23. Gelincik ekstraktlarının metal şelatlama kapasitesi



Şekil 4.24. Kuzukulağı ekstraktlarının metal şelatlama kapasitesi



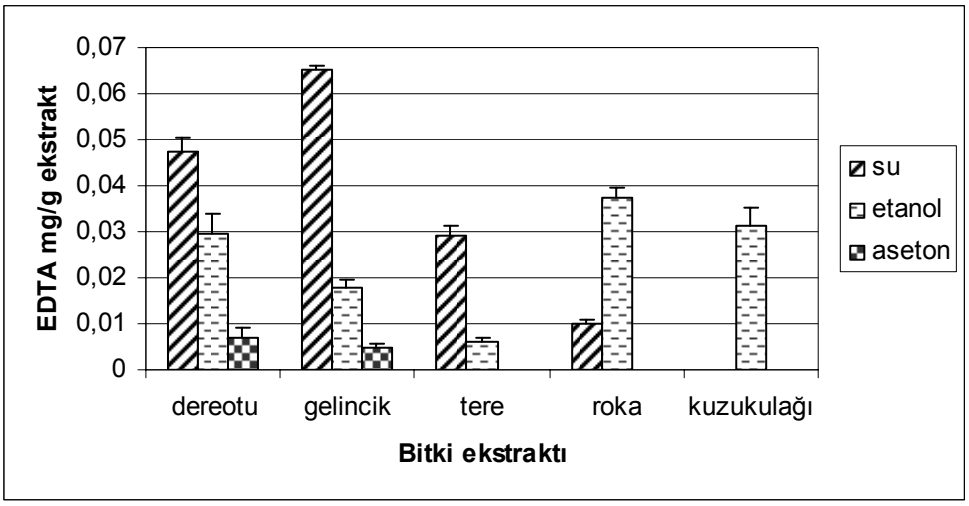
Şekil 4.25. Roka ekstraktlarının metal şelatlama kapasitesi



Şekil 4.26. Tere ekstraktlarının metal şelatlama kapasitesi

Grafiklerden görüldüğü gibi; çalışmada kullanılan tüm ekstraktların konsantrasyon arttıkça artan şelatlama aktivitesi gösterdiği belirlendi. Bununla birlikte kuzukulağı ve terenin aseton ekstraktlarının Fe^{2+} iyonlarını şelatlama aktivitelerinin çok düşük olduğu görülmektedir.

Uygulanan deney koşullarında tüm ekstraktlar arasından dereotu (DS1000 = % 68,7±4,47), gelincik (GS800 = % 79,51±4,05, GS1000 = % 82,54±3,06) ve terenin (TS1000 = % 54,49±0,20) su ekstraktları; kuzukulağı (KE1000 = % 56,07±11,93) ve rokanın (RE1000 = % 60,86±6,69) etanol ekstraktları diğerlerine göre daha yüksek aktivite gösterdi. Ayrıca yüksek aktivite gösteren tüm bitki ekstraktlarının sahip olduğu EDTA aktivitesi "EDTA eşdeğeri mg/g kurutulmuş bitki" cinsinden hesaplandı ve elde edilen verilerden grafik oluşturuldu (Şekil 4.27).

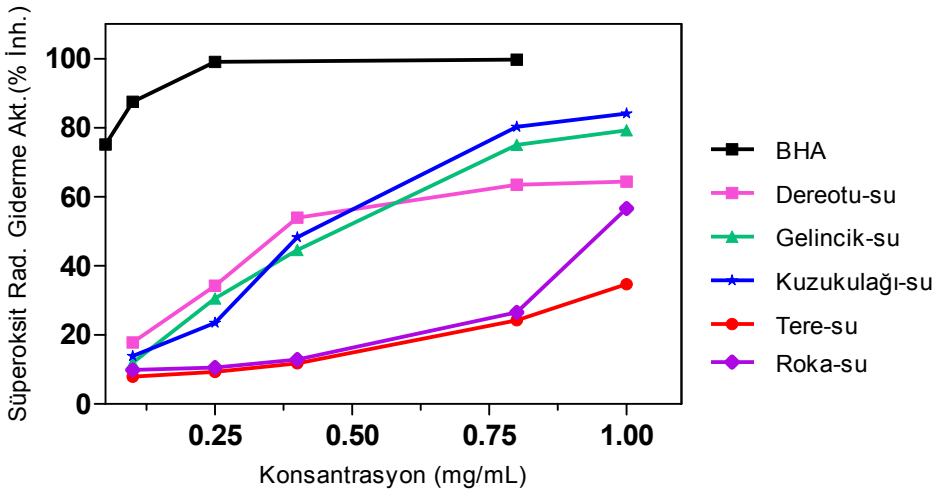


Şekil 4.27. Bitki ekstraktlarının EDTA eşdeğeri olarak metal şelatlama kapasiteleri

Bu ekstraktların yüksek metal şelatlama aktivitelerine rağmen ekstraktların hiçbirinin Fe^{2+} iyonlarını şelatlama kapasitesinin EDTA'dan daha iyi olmadığı da belirtilmelidir. EDTA 70 µg/mL kadar düşük konsantrasyonda bile 90,66±0,29 şelatlama aktivitesi gösterdi.

4.5. Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini

Çalışmada kullanılan bitki ekstraktlarının süperoksit radikali giderme aktivitesi in vitro koşullarda PMS/NADH/O_2 sisteminde süperoksit radikali oluşturularak çalışıldı ve ekstraktların bu radikali etkisizleştirebilme kapasiteleri belirlendi. Çalışılan örneklerden sadece dereotu, gelincik, kuzukulağı, roka ve terenin su ekstraktlarında süperoksit radikali giderme aktivitesi gözlendi. Bu nedenle sadece bitkilerin su ekstraktlarının ve standart olarak seçilen BHA'nın değişen konsantrasyonlarına karşılık süperoksit radikalini giderme aktiviteleri (% inhibisyon) grafiğe geçirildi (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. Su ekstraktlarının süperoksit radikalini giderme aktivitesi

Süperoksit radikali giderme aktivitesi yönünden su ekstraktlarını karşılaştırdığımızda kuzukulağı>gelincik>dereotu>roka≥tere şeklinde azalan aktivite gözlenmiştir. Örneklerin konsantrasyon artışı ile radikal giderme aktivitesi artışı orantılı olmasına rağmen, standart olarak kullanılan BHA'ya (BHA800 = % 99,64±0,16) en yakın aktiviteler gelincik (GS1000 = % 79,25±1,08) ve kuzukulağının (KS1000 = % 84,12±0,34) su ekstraktlarında; en düşük aktivite terenin su ekstraktında (TS1000 = % 31,58±5,96) gözlendi.

4.6. H_2O_2 Giderme Aktivitesinin Tayini

Bitki ekstraktlarının H_2O_2 giderme aktivitesi Ruch vd.'nin (1989) metoduna göre tayin edildi. Ekstraktlardan hiçbiri reaksiyon ortamındaki H_2O_2'yi tamamen uzaklaştıramamasına rağmen, denemede en iyi aktivite gösteren ekstraktlar Tablo 4.5'te verilmiştir. Tablodan görüldüğü gibi 250 ve 400 µg/mL konsantrasyonlardaki bitki

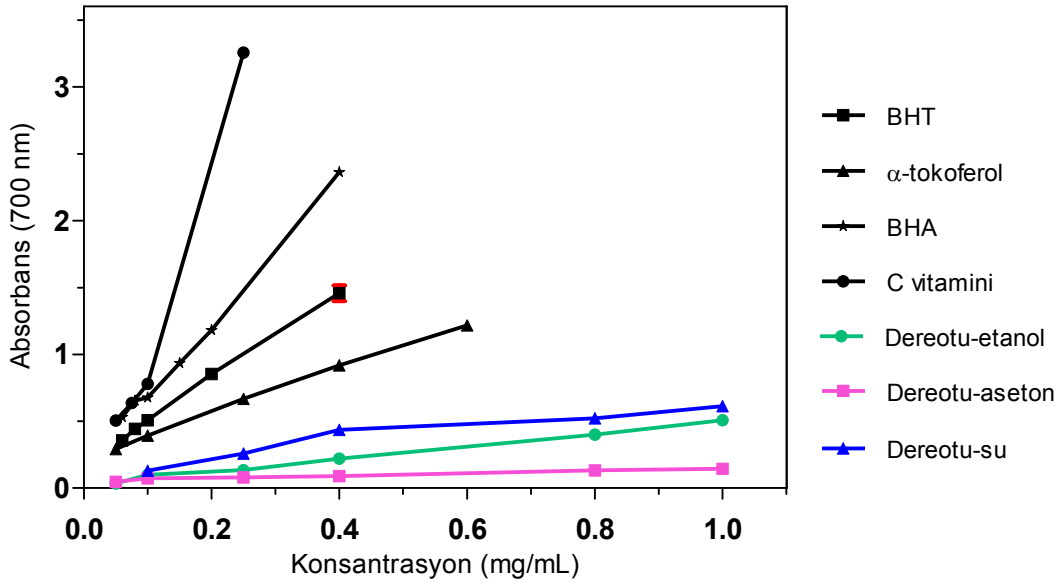
ekstraktları zayıf H_2O_2 giderme aktiviteleri göstermişlerdir. Aktivite gösteren ekstraktlar arasında, en yüksek inhibisyon oranları 400 µg/mL konsantrasyondaki kuzukulağı etanol (% 66,29±2,05), dereotu su (% 60,96±6,78) ve roka aseton (59,16±0,63) ekstraktlarına aittir.

Tablo 4.4. Bitki ekstraktları ve standartların H_2O_2 giderme aktiviteleri

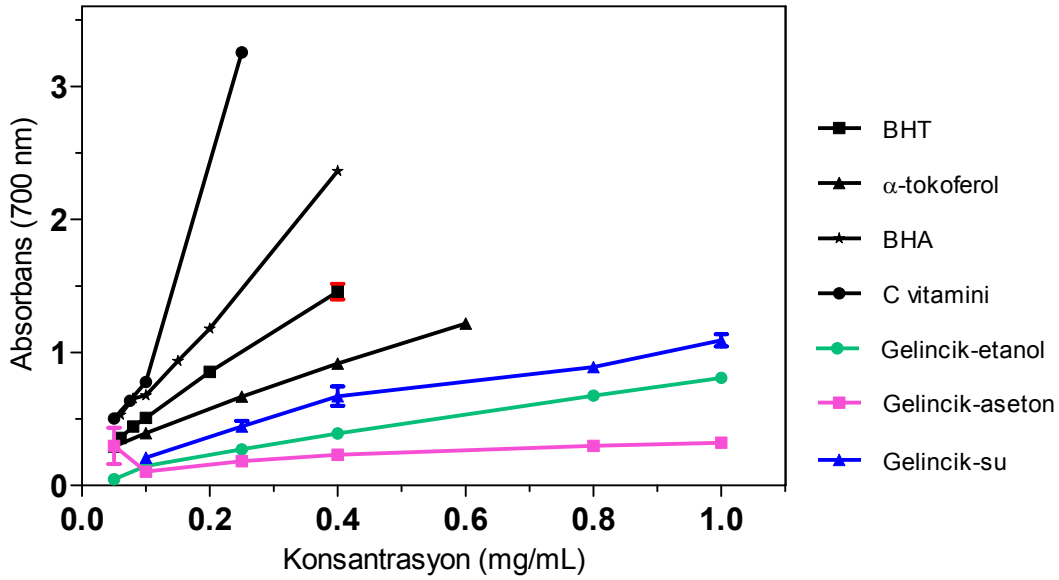
Ekstrakt	**Konsantrasyon (µg/mL)**	**% İnhibisyon**
Dereotu-su	250	44,13±0,81
	400	**60,96±6,78**
Dereotu-etanol	250	16,60±0,84
	400	25,05±0,35
Gelincik-su	250	17,46±1,32
	400	39,8±0,98
Gelincik-etanol	250	10,75±0,35
	400	15,60±1,69
Kuzukulağı-su	250	42,74±1,14
	400	38,95±0,34
Kuzukulağı-etanol	250	51,61±4,56
	400	**66,29±2,05**
Kuzukulağı-aseton	250	22,37±2,12
	400	33,22±1,85
Roka-su	250	39,11±0,25
	400	46,46±1,89
Roka-etanol	250	45,96±5,12
	400	57,15±2,52
Roka-aseton	250	55,35±2,52
	400	**59,16±0,63**
Tere-su	250	5,90±0,84
	400	11,42±0,82
Tere-etanol	250	12,08±1,02
	400	16,10±0,28
BHA	250	56,05±1,76
	400	84,85±0,49
BHT	250	85,75±0,49
	400	95,9±0,42
C vitamini	250	78,50±1,76
	400	83,77±2,73

4.7. İndirgeme Kapasitesi Tayini

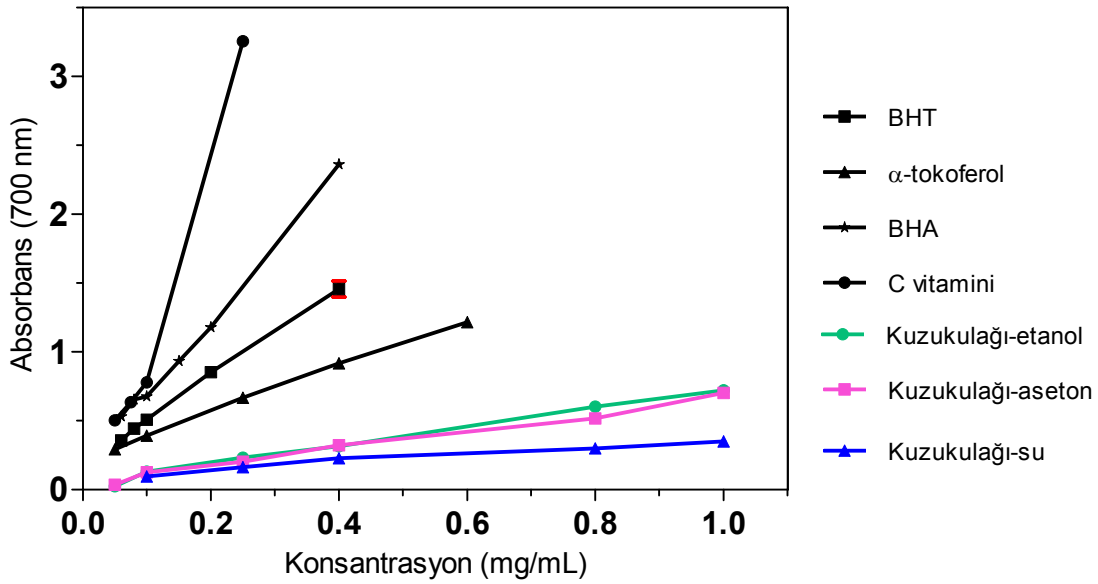
Fe^{3+} iyonlarının indirgenmesi, bir bileşiğin antioksidan aktivite gösterebilmesi için önemli bir mekanizma olan elektron verebilme yeteneğinin göstergesidir ve diğer antioksidan özellikler ile de yakından ilişkilidir. Bitki ekstraktının ortamdaki Fe^{+3}'ü indirgeme yeteneğini belirlemek üzere değişen ekstrakt ve standart konsantrasyonlarında çalışıldı ve oluşan komplekslerin absorbansı 700 nm'de ölçüldü. BHA, BHT, E vitamini ve C vitamini standartlarıyla karşılaştırılarak her bir bitki ekstraktı için konsantrasyon-absorbans grafikleri çizildi (Şekil 4.29-4.33).



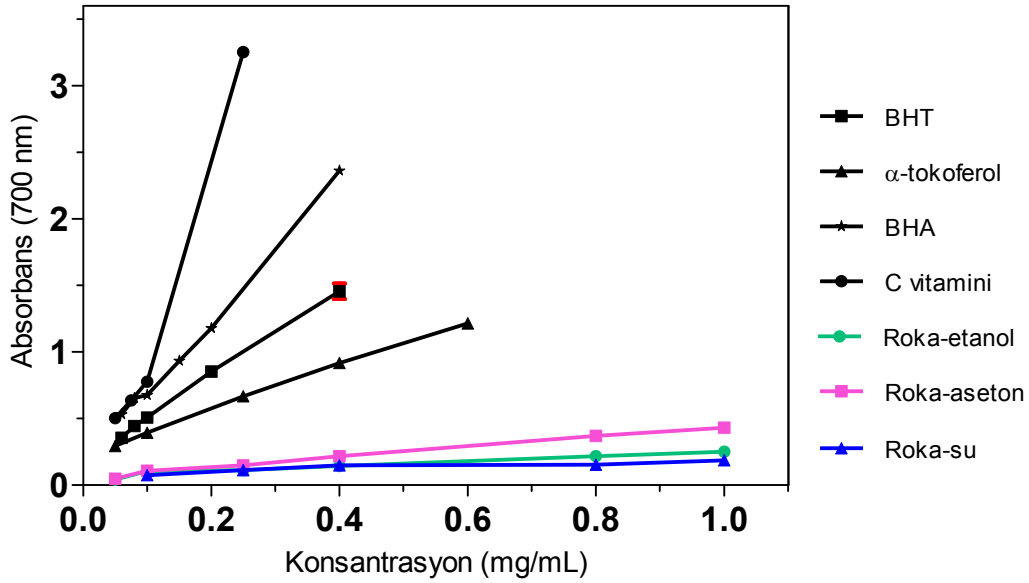
Şekil 4.29. Dereotu ekstraklarının Fe^{+3}'ü Fe^{+2}'ye indirgeme kapasitesi



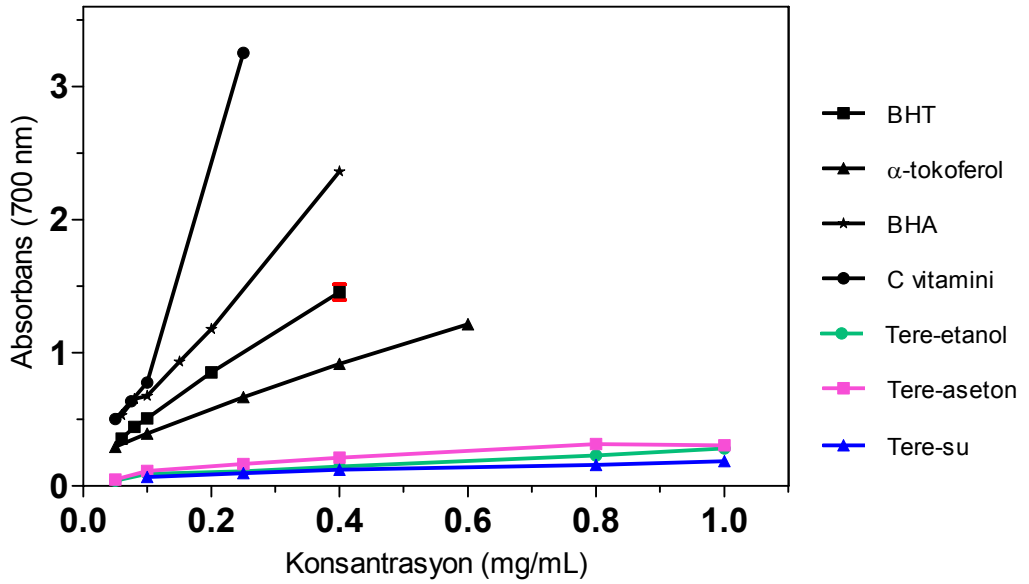
Şekil 4.30. Gelincik ekstraklarının Fe^{+3}'ü Fe^{+2}'ye indirgeme kapasitesi



Şekil 4.31. Kuzukulağı ekstraklarının Fe^{+3}'ü Fe^{+2}'ye indirgeme kapasitesi



Şekil 4.32. Roka ekstraktlarının Fe^{+3}'ü Fe^{+2}'ye indirgeme kapasitesi



Şekil 4.33. Tere ekstraktlarının Fe^{+3}'ü Fe^{+2}'ye indirgeme kapasitesi

Grafiklerden görüldüğü üzere, çalışılan bitki ekstraktlarının Fe^{+3}'ü indirgeme yetenekleri yönünden standartlarla karşılaştırıldığında çok yüksek aktiviteye sahip olmadıkları gözlendi. Çalışılan bitkilerin indirgeme gücü yetenekleri genel olarak gelincik>kuzukulağı>dereotu>roka>tere şeklinde sıralanmaktadır.

İndirgeme kapasitesi tayininde yüksek absorbans değerinin yüksek indirgeme kapasitesinin göstergesi olduğu kabul edilmektedir. Gelincik etanol ekstraktının 800 µg/mL (0,67±0,009) konsantrasyonu E vitamininin 250 µg/mL (0,67±0,01) ve BHA'nın 100 µg/mL (0,68±0,006) konsantrasyonlarına eşit indirgeyici değerler gösterirken; 1000 µg/mL (0,81±0,017) konsantrasyonu da C vitamininin 100 µg/mL (0,78±0,007) ve BHT'nin 200 µg/mL (0,85±0,009) konsantrasyonlarına yakın indirgeyici değerler gösterdi. En yüksek aktivitenin olduğu gelincik su ekstraktı 800 µg/mL ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarına yüksek aktivite (0,89±0,01 ve 1.09±0,08) gösterdi, bu değerler standart olarak kullanılan C vitamininin 100 µg/mL (0,78±0,007), BHA'nın 150 µg/mL ve 200 µg/mL (0,93±0,007 ve 1.18±0,07), BHT'nin 200 µg/mL ve 400 µg/mL (0,85±0,009 ve 1,46±0,10) ve E vitamininin 400 µg/mL ve 600 µg/mL (0,92±0,03 ve 1,22±0,03) konsantrasyonlarındaki indirgeyici değerlerine eşit veya büyüktür.

Dereotunun su ekstraktının ve kuzukulağının aseton ve etanol ekstraktlarının 800 µg/mL ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarındaki absorbans değerleri 0,52-0,72 arasında olup, E vitamininin 250 µg/mL, BHA ve BHT'nin 100 µg/mL konsantrasyonlarındaki absorbans değerleri ile (sırasıyla 0,66±0,01, 0,68±0,006, 0,51±0,01) kıyaslanabilir düzeydedir.

Tere ve rokanın tüm ekstraktlarında, kuzukulağının su, gelincik ve dereotunun aseton ekstraktlarında düşük değerler elde edildi.

5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Bu tezin başlangıç aşamasında yapılan kaynak ve literatür taramaları sonucunda genellikle dereotunun yaprak ve tohumlarının aroma bileşenleri; rokanın yaprak ve tohumlarının glikosinolat içeriği ve gelinciğin alkaloid içeriği yönünden incelendiği literatürlere rastlanmıştır. Sağlanan kaynaklarda çalışılması düşünülen bitkilerin antioksidan aktivite yönünden değerlendirilmelerine sınırlı sayıda rastlanmıştır. Bu çalışmada daha önce detaylı antioksidan kapasite çalışması yapılmadığını tespit ettiğimiz, taze yaprakları salata, kuru halleri baharat olarak günlük yaşamda tüketilen dereotu, gelincik, kuzukulağı, roka ve tere bitkileri seçilmiş ve yapraklarından elde edilen su, etanol ve aseton ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı, total antioksidan aktivite, DPPH serbest radikali giderme aktivitesi, metal iyonlarını şelatlama kapasitesi, indirgeme kapasitesi, süperoksit radikali giderme aktivitesi ve H_2O_2 giderme aktivitesi metodlarıyla antioksidan kapasiteleri detaylı olarak incelenmiştir. Çalışılan bitkilerin kendi aralarında ve benzer literatürlerdeki verileriyle kıyaslanarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

Bitkilerden ekstrakt eldesi katı:sıvı oranı 1:20 olacak şekilde destile su ile 30 dakika kaynatılarak; etanol ve aseton ile 3 saat boyunca oda koşullarında çalkalamalı su banyosunda ekstrakte edilerek yapılmıştır (Mata vd., 2007, Wong vd., 2006). Birçok araştırmacı su, metanol, etanol, aseton, petrol eteri, etil asetat, kloroform, diklorometan gibi çeşitli çözücü veya çözücü karışımları ile homojenizer kullanarak, oda koşullarında bekleterek (maserasyon), çözücü ile kaynatarak ve Soxhlet ekstraksiyonu ile ekstrakt elde etmişlerdir (Nakiboğlu vd., 2007, Su vd., 2007, Silva vd., 2007, Tawaha vd., 2007). Çalışmamızda ekstraksiyon için polaritesi yüksek, toksiditesi diğer çözücülere oranla düşük olan, ekonomik açıdan uygun ve kolay temin edilebilecek çözücüler tercih edilmiştir.

Hayouni vd. (2007) ile Özcan vd. (2007) farklı yöntemler ve farklı polariteye sahip çözücüler kullanarak yaptıkları araştırmaları sonucunda % ekstrakt miktarları üzerine polar çözücülerin apolar çözücülerden daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu bulgularla uyumlu olarak, çalışmamızda kullanılan bitkilerde ekstrakte edilebilen bileşiklerin ektraksiyon verimleri genel olarak su> etanol >aseton sıralaması şeklindedir (Tablo 4.1).

Fenolik bileşikler bitkiler aleminin önemli doğal bileşenleridir ve son yıllarda gıdalardaki fenolik bileşiklerin antioksidan etkilerinin incelenmesi giderek önem kazanmaktadır (Nehir El vd., 1999). Geniş bir aile olan fenolik bileşiklerin spesifik bir grubunun ayrı ayrı analizleri mümkün olsa da gıdalardaki toplam fenolik bileşiklerin tayini her zaman gereksinim duyulan bir analizdir. Çalışmamızda bitki ekstraktlarındaki toplam fenoliklerin miktarı FCR ile tayin edilerek ekstraktlardaki miktarlar genel standart olarak kabul edilen gallik asit ve kateşol cinsinden hesaplandı. Toplam fenolik bileşik miktarı su ekstraktları için 49,63±2,5-127,55±14,48 GAE mg/g eksrakt, etanol ekstraktları için 53,79±3,82-100,88±20,65 GAE mg/g eksrakt ve aseton ekstraktları için 55,46±1,9-92,55±6,29 GAE mg/g eksrakt aralığında değişmektedir. Toplam fenolik madde miktarı Chen vd.'in (2007) dört çeşit nutrosötik bitki yapraklarının su ekstraktlarıyla yaptıkları antioksidan aktivite çalışmalarında 64,95-185,04 GAE mg/g aralığında, Wong vd.'in (2006) 30 çeşit medikal bitkide yaptıkları çalışmada ise su ektraktları için 2.4-50,8 mg GAE/g, metanol ekstraktı için 1,3-36,4 mg GAE/g olarak tayin edilmiştir.

Tez kapsamında çalışılan bitkilere dair yapılan literatür taramasında; dereotu su ekstraktında 3,12±0,06 mg GAE/g taze bitki (Zheng ve Wang, 2001), metanol ekstraktında 12,5± 0,3 mg GAE/g kurutulmuş bitki (Proestos vd., 2005), dereotu tohumunun su ekstaktında 233 mg kateşol/g kurutulmuş bitki, etanol ekstraktında 246 mg kateşol/g kurutulmuş bitki, tere tohumunun metanol ekstraktında 0,15g GAE/100g kurutulmuş bitki (Al-İsmail ve Aburjai, 2004) değerlerindeki verilere rastlanmıştır.

Rokayla ilgili çalışmalarda, su ekstraktında 26,32 µg pirokateşol/g kurutulmuş bitki (Saçan vd., 2008) ve etanol ekstraktında 208,1±18,32 mg GA/100g (Heimler vd., 2007) fenolik madde miktarları rapor edilmiştir.

Öztürk vd.'in (2002) fenolik bileşikleri yönünden, kurtulmuş maydanoz, dereotu ve rokayı inceledikleri bir çalışmalarında rokanın su, metanol ve etil asetat ekstreleri için sırasıyla 161,43±4,79, 91,78±6,42 ve 197,13±63 mg GAE/g ekstre; dereotunun su, metanol ve etil asetat ekstreleri için sırasıyla 170,63±1,36, 160,32±3,92 ve 213,11±0,95 mg GAE/g ekstre verilerini bildirmişlerdir.

Doğal antioksidanlar arasında önemli rol oynayan bitkisel polifenol içeriği bitki türü, tarımsal proses, ışık iklim, hasat zamanı ve depolama şartları gibi pek çok dış etkenden etkilenir (Heimler vd., 2007). Ayrıca çözücü ve ekstraksiyon proseslerinindeki çeşitlilik de fenolik bileşiklerde gözlenen miktar değişikliklerinin sorumluları arasındadır.

DPPH radikali biyolojik bir radikal olmamasına rağmen, antioksidanların serbest radikal giderme aktivitelerinin tayini için kabul görmüş bir indikatördür (Wojdylo vd., 2007, Chen vd.,2007). Çalışmamızda; bitki ekstraktlarının serbest radikal giderici etkileri stabil bir radikal olan DPPH üzerinden test edilmiştir. DPPH çözeltisi mordur ve antioksidan bir bileşikle etkileştiğinde yapısı değişerek sarı renkli yeni bir bileşik haline gelir. Bu renk değişikliğinin derecesi, antioksidanın konsantrasyonu ile orantılıdır. Çalışmadaki bitki ekstraklarının radikal giderme kapasitelerine ait grafikler Şekil 4.5-4.9'da.görülmektedir. Ekstraksiyon için kullanılan çözücülerin radikal giderme aktivitesinde etkili olduğu bilinmektedir. Bu araştırmada genel olarak polar ekstraktlardaki radikal giderme aktivitelerinin daha yüksek değerlerde olduğu belirlenmiştir.

Miliauskas vd. (2004) bazı aromatik bitki ekstraktlarıyla yaptıkları çalışmada aseton, metanol ve etil asetat ekstraktları arasında DPPH radikali gidermede en etkili ekstraktın metanol ekstraktı olduğunu bildirerek, antiradikalik aktiviteyi TFC içeriği ile ilişkilendirmişlerdir. Benzer şekilde Shon vd. (2003) da sıcak su ve metanol ekstraktlarının bütanol, etil asetat ve kloroform ekstraktlarından daha iyi DPPH radikal giderdiğini bildirmişlerdir.

Çalışmada dereotu için radikal giderme aktiviteleri su ekstraktı >etanol ekstraktı>aseton ekstraktı sıralaması şeklindedir. Al-İsmail ve Aburjai tarafından (2004) dereotu tohumlarının su ekstraktının radikal giderme aktivitesinin etanol ekstraktına göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

Gelinciğin DPPH radikali giderme aktivitesi incelendiğinde özellikle su ve etanol ekstraktlarında yüksek aktiviteler gözlenmiştir. Benzer şekilde Nehir El ve Karakaya (2004) Akdeniz diyetinde tüketilen salatalık bitkilerin antiradikalik aktivitesiyle ilgili çalışmalarında çeşitli konsantrasyonlardaki (2-10 mg/mL) metanolik gelincik ekstraktlarında orta düzeyde DPPH radikali giderme aktivitesi tayin etmişlerdir. Buna karşılık Middleton vd. (2004) gelincik tohumlarıyla yaptıkları çalışmada, tohumların hekzan, diklorometan ve metanol ekstraktlarına kalitatif veya kantitatif olarak uygulanan DPPH giderme tayinlerinde, ekstraktların aktivite göstermediğini bildirmişlerdir.

Bu tez çalışmasında kuzukulağının yapraklarından elde edilen ekstraktların DPPH giderme aktiviteleri 1000 μg/mL konsantrasyonu için su ekstraktında % 45,21, etanol ekstraktında % 79,68 ve aseton ekstraktında % 43,94 olarak bulunmuştur. Literatür taramasında antioksidan aktivite ile ilgili olarak tere bitkisine ve Rumex ailesinin çalışmada kullanılan türü olan *Rumex acetosella* L. (kuzukulağı)'ya ait veri elde edilememiştir. Ancak Yıldırım vd.'nin (2001) *Rumex crispus* L. (kıvırcık labada)

türü ile yaptığı bir çalışmada; 400 μg/mL konsantrasyonunda yaprakların su ve etanol ekstraktlarında % 12 ve % 4 DPPH giderme aktiviteleri bildirilmiştir. Çalışmada kuzukulağının 400 μg/mL konsantrasyonu için su ve etanol ekstraktları % 24,26 ve % 42,12 olarak belirlendi.

DPPH radikali giderme deneyinde tere diğer bitki ekstraktlarından farklı davranış göstermiştir. Terenin tüm ekstraktlarının aktiviteleri dereotu, kuzukulağı, gelincik ve rokanınkilerden düşük olmasına rağmen, kendi içinde en yüksek aktivite aseton ekstraktında görülmüştür.

Tablo 4.2'ye göre; çalışılan ekstraktlar içinde en düşük EC_{50} değeri dereotu ve gelincik su ekstraktlarında, en yüksek EC_{50} değeri dereotu aseton ve kuzukulağı su ekstraktlarında tayin edildi. Çalışmada kullanılan bitkilerle ilgili yapılan benzer araştırmalarda, gelincik metanol ekstraktı için EC_{50}=63,01 mg/mg DPPH (Nehir El ve Karakaya, 2004), roka tohumunun etanol ekstraktı için IC_{50}=60-65 μg/mL (Alam vd, 2007), roka yapraklarının etanol ekstraktı için IC_{50}=3829,12 mg/mg DPPH (Heimler vd, 2007) olarak bildirilmiştir.

Çalışmada EC_{50} değerleri 1,39±0,54–8,95±1,41 mg/mL aralığında belirlenmiştir. Hinneburg vd. (2006) ise maydanoz, defne, zencefil, rezene, fesleğen ve kimyon gibi benzer aromatik bitkilerin DPPH radikali giderme aktivitesi çalışmalarında 0,49±0,01 – 12,0±0,10 mg/mL aralığında IC_{50} değerleri bildirmektedir. Kullandıkları referans maddelerin IC_{50} değerleri BHA ve C vit= 0,09±0,01 mg/mL, BHT= 0,21±0,01 mg/mL ve GA= 0,03±0,01 mg/mL olarak tayin edilmiştir.

Bitki ekstraktlarının **linoleik asit peroksidasyonu** üzerindeki inhibisyon etkisi çeşitli konsantrasyonlarda FTC metoduna göre çalışıldı ve BHT, BHA, α-tokoferol ve C vitamini standartlarıyla karşılaştırıldı.

Ekstraktların konsantrasyon artışına bağlı olarak (100-1000 µg/mL) lipid peroksidasyon inhibisyonunda da artış gözlendi. Ekstrakt eklenmemiş olan linoleik asit otooksidasyonunun (kontrol) peroksit değerinde hızlı bir artış gözlendi ve artışın 2,5-3. gününde maksimuma ulaştığı görüldü. Genel olarak ekstraktların her birinin linoleik asit peroksidasyonunun inhibisyonunda önemli derecede antioksidan aktiviteler gösterdiği ve linoleik asit otooksidasyonunun başlama periyodunu uzattığı gözlendi.

Çalışmada dereotunun etanol ve aseton ekstraktları ile terenin etanol ekstraktı standartlarla karşılaştırılabilir düzeyde güçlü antioksidan aktiviteler göstermiştir. Linoleik asit emülsiyon sisteminde gerçekleştirilen benzer çalışmalarda; dereotu tohumu su ve etanol ekstraktlarının 10 mg/mL konsantrasyonu için yüksek inhibisyon oranları (% 87,6 ve % 70,2) bildirilmiş (Al-İsmail ve Aburjai, 2004); İran diyetindeki sebzelerin antioksidan aktivite yönünden değerlendirilmesinde tere ve dereotunun metanol ekstraktları için kersetin ve α-tokoferole yakın IC_{50} değerleri olan yüksek aktiviteler rapor edilmiştir (Souri vd., 2004).

Yapılan çalışmada roka etanol ekstraktının tüm konsantrasyonları ve roka su ekstraktının 400-1000 µg/mL konsantrasyonları yüksek aktiviteler göstermiştir. Benzer şekilde Saçan vd. (2008) roka su ekstraktının, çalıştıkları tüm konsantrasyonlarda (20-100 µg/mL) etkili antioksidan aktiviteler gösterdiğini bildirmiştir.

Kuzukulağı ve gelinciğin çalışılan konsantrasyonlardaki su (100 µg/mL hariç), aseton ve etanol ekstraktlarının lipid peroksidayonunu iyi derecede önlediği görüldü. Kuzukulağı ile aynı aileden olan *Rumex crispus* L. (kıvırcık labada)'nın yapraklarının su ve etanol ekstraktlarında 75 µg/mL konsantrasyonu için sırasıyla % 94 ve % 81 oranında antioksidan aktiviteler bildirilmiştir (Yıldırım vd., 2001).

Linoleik asit peroksidasyonunu önlemede genel olarak bitki örneklerinin su ekstraktlarının, etanol ve aseton ekstraktlarına göre daha düşük aktiviteler gösterdiği belirlendi. Deney ortamının apolar karakterli linoleik asit emülsiyonundan oluşması sebebiyle, su ekstraktı içeriğindeki polar karakterli antioksidan bileşikler apolar fazda gerçekleşen reaksiyonlara yeterince katılamamış olabilir. Bu yüzden su ekstraktlarındaki toplam antioksidan aktivite apolar çözücü ekstraktlarındakine göre düşük bulunmuştur. Ancak aradaki fark sadece su ekstraktlarının düşük konsantrasyonları için belirgindir.

E vitamini çalışılan tüm konsantrasyonlarda (2,5-50 µg/mL) kontrolde maksimum lipid peroksidasyonunun oluştuğu ana kadar yüksek inhibisyon etkisi gösterdi (Şekil 4.16 (A)). Bu süreden sonra (48-56. saat) lipid peroksidasyonunun arttığı gözlendi. Bu artışın sebebi oksidasyonu önlemek veya geciktirmek için ortamda bulunan E vitamininin harcanması ve bunun sonucunda daha az reaktif olan E vitamini radikallerine dönüşmesi olabilir. In vivo koşullarda oluşan E vitamini radikalleri askorbat veya flavonoidler tarafından rejenere edilerek, tekrar E vitamini formuna dönüştürülmektedir.

C vitamininin çalışılan konsantrasyon aralığındaki düşük konsantrasyonlarda (50-250 µg/mL) lipid peroksidasyonunu inhibe etmeden kontrole yakın değerler gösterdiği (Şekil 4.16(B)) görüldü. Bu sonuçlara göre; C vitamininin düşük konsantrasyonlarda prooksidan olarak davrandığı söylenebilir. Antioksidan aktivitenin konsantrasyona bağımlı olabileceği ve düşük konsantrasyonlardaki askorbik asidin antioksidan etkisinin azalarak prooksidan etkisinin ortaya çıktığı bildirilmiştir (Rees, 1987).

Bitki ekstraktlarının **Fe^{2+} iyonlarını şelatlama** aktivitesinin ölçümü 100-1000 µg/mL aralığındaki konsantrasyonlarda çalışıldı. Kuzukulağının su ve terenin aseton ekstraktları haricindeki diğer ekstraktlarda Fe^{2+} şelatlama aktivitesinin konsantrasyona

bağlı olarak arttığı gözlendi (Şekil.4.22-4.36). Bitkilerin aseton ekstraktları en düşük şelatlama aktivitesi gösterirken, bu sistemde ekstraktların hiçbiri standart olarak kullanılan EDTA'dan daha iyi şelatör değildi. Benzer sonuçlar *Lamiaceae* türleri (Dorman vd., 2004) ve *Smilax excelsa* L. (Özsoy vd., 2008) ile yapılan çalışmalarda bildirilmiştir.

Çalışmada 1 mg/mL konsantrasyondaki roka etanol ekstraktı % 60,86, roka su ekstraktı % 39,38 oranlarında aktiviteler gösterdi. Heimler vd. (2007) roka etanol ekstraktında % 41 (66,7 mg taze bitki/mL), Saçan vd. (2008) roka su ekstraktında (1 mg/mL) % 51,6 şelatlama etkisi bildirmişlerdir.

Gelincik etanol ekstraktı 250 µg/mL konsantrasyonda 10 dakika inkübasyon sonrası % 24,3 oranında aktivite gösterirken, Nehir El ve Karakaya'nın (2004) çalışmasında 200 µg/mL daki metanolik gelincik ekstraktı 5 dakika inkübasyon sonrası % 25, 10 dakika inkübasyon sonrası % 69 oranında şelatlama aktivitesi göstermiştir.

Bu çalışmada Fe^{2+} şelatlama aktiviteleri 4,6-65,1 µg EDTA/100 g ekstrakt aralığında tayin edilmiştir. Tarwadi ve Agte (2003) çalışmada kullanılan bitkilere benzer yeşil yapraklı sebzelerle yaptıkları Fe^{2+} iyonlarını şelatlama aktivitesini EDTA eşdeğeri olarak 9,3-65,7 mM EDTA/100 g sebze olarak bildirmişlerdir.

Geçiş metalleri arasından Fe^{2+}, lipid oksidasyonunda prooksidan olarak bilinir. Fenton reaksiyonu ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + {}^{\bullet}OH$) vasıtasıyla reaktif oksijen türlerini oluşturur ve lipid oksidasyonunu hızlandırır (Halliwell ve Gutteridge, 1990). Bitki ekstraktları geçiş metal iyonlarını bağlayarak ortamdaki konsantrasyonlarını azaltır ve Fe^{2+} katalizli lipid peroksidasyonunu geciktirirler. Grafiklerden de görüldüğü gibi (Şekil 4.22-4.26) dereotu, gelincik ve terenin su ekstraktları, kuzukulağı ve rokanın etanol ekstraktları diğer ekstraktlara göre daha yüksek aktivite göstermişlerdir. Özellikle

dereotu su ekstraktı (1000 µg/mL=% 68,66) 20 µg/mL EDTA (% 67,9) ile, gelincik su ekstraktları (800 µg/mL=% 79,51 ve 1000 µg/mL=% 82,5) sırasıyla 50 µg/mL EDTA (% 79,24) ve 70 µg/mL EDTA (% 90,66) ile kıyaslanabilecek değerler göstermiştir.

Dereotu, gelincik, kuzukulağı, roka ve terenin su ekstraktlarının çeşitli konsantrasyonlarının **süperoksit radikali giderme aktivitesine** ait grafik Şekil 4.28'de verilmiştir. Bitkilerin sadece su ekstraktlarında orta düzeyde süperoksit radikali giderme aktivitesi tayin edildi, etanol ve aseton ekstraktları bu denemede çok zayıf ve düşük oranda aktivite gösterdi. Sonuçlar ekstrakt miktarının artmasıyla radikal giderme aktivitesinin arttığını göstermesine rağmen, düşük konsantrasyonlarda (100-400 µg/mL) ekstraktların hiçbirinin süperoksit radikalini giderme kapasitesinin BHA kadar iyi olmadığı görüldü. 800 µg/mL için gelincik su ekstraktı (% 74,98±0,16) ve kuzukulağı su ekstraktı (% 80,27±0,73) süperoksit radikali giderme kapasitesi açısından BHA (99,64±0,16) ile kıyaslanabilir orandadır.

Roka tohumunun etanol ekstraktının % 82,91±4,32 (100 µg/mL için) ve % 57,84 ±3,76 (250 µg/mL için) aktivite gösterdiği Alam vd. (2007) tarafından rapor edilmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda *Ocimum sanctum Linn.* (fesleğen)'in 1 mg/mL konsantrasyondaki metanol ekstraktında % 88,51±1,15 (Juntachote ve Berghofer, 2005), *Smilax excelsa* L.(dikenucu, saparna)'nın 2,5 mg/mL konsantrasyondaki su ekstraktında % 75,4±1,35 (Özsoy vd., 2008) süperoksit radikalini giderme aktiviteleri bildirilmiştir. Gülçin vd. *Salvia sclarea* L. (miskadaçayı)'nın kloroform ve aseton ekstraktlarının (2004), *Eugenia caryophyllata* Thunb (karanfil tomurcuğu)'un ve *Lavandula stoechas* L. (karabaş lavanta)'nin su ve etanol ekstraktlarının (2004) güçlü süperoksit radikali giderme aktiviteleri olduğunu bildirmişlerdir.

Ekstraktların **H_2O_2 giderme aktivitesine** ait inhibisyon oranları Tablo 4.4'te verildi. Çeşitli makalelerde H_2O_2'in reaktivitesinin düşük olduğu ve lipid peroksidasyonunu başlatabilecek aktivitede olmadığı bildirilmiştir (Yen ve Duh, 1994).

Ancak Fenton reaksiyonu ile reaktif hidroksil radikalini oluşturma potansiyeli vardır. Bu yüzden gıdalar veya hücrelerdeki antioksidan savunma için H_2O_2'in uzaklaştırılması önem taşımaktadır.

Gelincik su ekstraktları % 17,46±1,32 (250 μg/mL) ve % 39,8±0,98 (400 μg/mL) oranlarında düşük inhibisyon değerleri gösterdi. Nehir El ve Karakaya'nın (2004) çalışmalarında ise gelincik metanol ekstraktı 50 μg/mL konsantrasyonda H_2O_2 giderme aktivitesi göstermezken, 100 μg/mL konsantrasyon için % 10,57±2,5, 200 μg/mL konsantrasyon için % 52,70±4,0 aktivite göstermiştir.

Oktay vd. (2003) rezene tohumunun su ekstraktında (250 μg/mL) % 53,8, etanol ekstraktında (250 μg/mL) % 45,5; Gülçin vd. (2004) *Salvia sclarea* L. (miskadaçayı) aseton ve kloroform ekstraktlarının 250 μg/mL konsantrasyonu için % 42,5 ve % 55 oranlarında H_2O_2 giderme aktiviteleri bildirmişlerdir.

İndirgeme kapasitesi tayininde bitki ekstraktlarının Fe^{+3}'ü Fe^{+2}'ye dönüştürebilmesi incelendi. Bir bileşiğin indirgeme kapasitesi onun elektron transfer edebilmesiyle ilişkilidir ve potansiyel antioksidan aktivitesinin önemli bir göstergesi olarak kabul edilir.

Ekstraktların hepsinin Fe^{+3}'ü indirgeyebildiği gözlendi. Ancak tere ve roka ekstraktları bu bakımdan oldukça zayıfken, dereotu ve gelinciğin su ve etanol ekstraktları, kuzukulağının etanol ve aseton ekstraktları yüksek konsantrasyonlarında standart maddelerle karşılaştırılabilecek düzeyde indirgeme kapasitesi gösterdiler.

Literatüre göre, Saçan vd. (2008) çalışmalarında roka su ekstraktının standartlara göre zayıf indirgeme gücü gösterdiğini, Alam vd. (2007) roka tohumunun etanol

ekstraktının gallik asit ve askorbik aside karşı gösterdiği indirgeyici gücünün önemli derecede ve doza bağımlı olduğunu bildirmektedir.

Çalışmada kuzukulağının su ekstraktları en düşük değerlere sahipken, etanol ve aseton ekstraktları daha yüksek değerler (KE400=0,285, KE800=0,611) gösterdi. Yıldırım vd. (2001) *Rumex crispus* L. yapraklarının 500 µg/mL konsantrasyondaki su ve etanol ekstraktlarının absorbanslarını sırasıyla 0,130 ve 0,158 olarak bildirmişlerdir.

Yüksek konsantrasyonlardaki (800 ve 1000 µg/mL) dereotu su ve etanol, gelincik etanol, kuzukulağı etanol ve aseton ekstraktları 0,50-0,78 arasında absorbans değerleri göstermişlerdir, bu değerler 250 µg/mL konsantrasyondaki E vitamini (0,660) ve 100 µg/mL konsantrasyondaki C vitamini (0,785), BHA (0,822) ve BHT (0,505)'ye benzer değerlerdir. En iyi antioksidan aktivite gösteren gelincik su ekstraktı (GS800=0,903, GS1000=1,181) E vitamini (Evit400=0,92, Evit600=1,21) ve BHA (BHA150=0,93, BHA200=1,10) ile yarışabilir düzeydedir. Dorman vd. (2003) Lamiaceae ailesinden mercanköşk, biberiye, adaçayı, kekik bitkileri ile yaptıkları çalışmalarında benzer indirgeme kapasiteleri bildirmişlerdir.

Toplam araştırma kapsamında; bazı ekstraktların iyi derecede Fe^{+3} indirgeyici kapasiteleri ve dolayısıyla elektron verebilme yetenekleri olduğu gözlendi. Bu özelliklerinden dolayı ekstraktların reaktif serbest radikal türlerini, daha stabil radikal olmayan türlere dönüştürerek serbest radikal zincirini sonlandırmak üzere rol oynayabilecekleri söylenebilir. Bazı çalışmalarda da Fe^{+3} indirgeyici kapasite ile lipid peroksidasyonunun inhibisyonu arasında güçlü bir ilişki olduğu belirtilmiştir (Juntachote ve Berghofer, 2005; Hinneburg vd., 2006; Özsoy vd., 2008).

Yapılan deneylerde antoksidan kapasite; ekstraktların linoleik asit peroksidasyonunu inhibe edebilme veya serbest radikal giderme yeteneğiyle ifade

edildi. Ekstraktların antioksidan aktiviteleri; hidroperoksitlerin indirgenmesi, serbest radikallerin inaktivasyonu, metal iyonları ile kompleks oluşturma veya bunların birkaçının bir arada bulunmasından dolayıdır. Bu mekanizmalarla sağlanan antioksidan aktivitenin bir kısmının flavonoidlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca bitkilerde gözlenen antioksidan aktiviteler, bitkide bulunan iki veya daha fazla bileşiğin sinerjistik etkileşiminden kaynaklanabilir. Pek çok doğal antioksidatif bileşiğin genellikle birbirleriyle sinerjistik olarak faaliyet gösterdiği ve böylece serbest radikallere karşı etkili bir savunma sağladığı bildirilmiştir (Zin vd, 2002).

Çalışmamızda dereotu, gelincik ve kuzukulağı ekstraktlarındaki fenolik madde içeriği tere ve rokaya göre yüksek bulunmuştur. Genel olarak değerlendirildiğinde bu üç bitkinin çalışılan metodlardaki aktiviteleri de yüksektir. Fenolik bileşiklerin kimyasal yapılarına göre farklı antioksidan aktiviteler gösterdiği bildirilmiştir (Al-İsmail ve Aburjai, 2004). Buna dayanarak ekstraktların gösterdikleri farklı antioksidan aktivitelerin, ekstraksiyon sırasında çözücüye geçebilen fenollerin miktarı ve kimyasal yapılarından dolayı olduğu söylenebilir.

Dereotunun kimyasal bileşimi ile ilgili çalışmalarda ana bileşenlerinin karvon, limonen ve dillapiole olduğu (Singh vd, 2005, Huopalahti ve Linko, 1983) ve dereotu ekstraktının alternatif bir doğal antioksidan kaynağı olarak kullanılabileceği önerilmektedir.

Rokanın filiz, tohum veya yapraklarıyla yapılan izolasyon çalışmalarında değişik miktarlarda glukosinolat (Kim ve İshii, 2006, Bennett vd., 2006), glukoerusin (Alam vd., 2007, Barillari vd., 2005) ve çeşitli flavonoidler izole edilmiştir. Kim vd. (2004) tarafından saflaştırılmış glukosinolatların orta düzeyde antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Heimler vd. (2007), roka etanol ekstraktında tayin ettikleri yüksek şelatlama kapasitesinin glukosinolatlardan kaynaklanabileceğini önermişlerdir.

Kuzukulağının kateşin ve epikateşin gibi tanenler (Stoggl vd., 2004) ve flavonoidlerce zengin (Zeybek ve Zeybek, 2002) olması, gösterdiği yüksek antioksidan aktiviteler ile ilişkilendirilmektedir.

Tere tohumlarının ferulik asit (% 5,63), gallik asit (% 9,44), klorojenik asit (% 14,77), dihidrokersetin (% 4,37) ve kersetin (% 3.15) gibi çeşitli fenolik bileşikler içerdiği bildirilmesine rağmen (Orlovskaya ve Chelombitko, 2007), çalışmamızda tere ekstraktları FTC metodu ile toplam antioksidan aktivite denemesi haricindeki metodlarda zayıf antioksidan aktiviteler göstermiştir.

Antioksidan aktivite tayin metodları çalışılan sistemdeki substrat, reaksiyon koşulları, konsantrasyonlar ve analizlenecek bileşiğin yapısı gibi çeşitli parametrelere bağlı olduğundan, bir bileşiğin antioksidan aktivitesini tayin etmek için standart bir metod yoktur. Bu yüzden antioksidan değerlendirmenin birkaç metod kullanılarak farklı oksidasyon şartları altında çalışılması önerilmektedir. Tez kapsamında da çeşitli metodlarla bitki ekstraktlarının serbest radikalleri giderme ve toplam antioksidan aktiviteleri çalışılmıştır. Literatür taraması sonucu seçilen bitkilere dair fazla veriye ulaşılmadığından, elde edilen sonuçlar bu alana daha fazla veri ile katkı sağlayacaktır.

Bu doktora tezi kapsamında çalışılan bitkilere ait bulguların sonuçları şöyle özetlenebilir: Genel olarak çalışılan beş bitkinin sulu ekstraktlarında antioksidan aktiviteleri daha yüksek bulunduğundan, günlük tüketimde bu bitkilere daha çok yer verilmesi önerilir. Bunun yanında tamamen doğal ortamdan toplanan gelincik ve kuzukulağında, kültürleme yoluyla üretilen tere ve roka bitkilerine göre daha yüksek antioksidan aktiviteler bulunması; bu bitkilerin mümkün olduğunca organik-doğal ortamlardan sağlanması gerektiğini de ortaya çıkarmaktadır.

Ayrıca günümüzde, geleceğe yönelik sentetik antioksidanların yerini alabilecek doğal antioksidan arayışları hızla sürmektedir. Bu tip çalışmalarla yüksek antioksidan aktiviteye sahip bitki ekstraktları belirlenerek, bunların gıda sistemlerindeki antioksidan etkilerinin incelenmesi ile çalışmaların endüstriyel uygulamaya yönelik devamlılığının sağlanması düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

AKKUŞ İ, (1995), Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, Konya.

ALAM MS., KAUR G., JABBAR Z., JAVED K., ATHAR M., (2007): "*Eruca sativa* seeds posses antioxidant activity and exert a protective effect on mercuric chloride induced renal toxicity." *Food and Chemical Toxicology*, 45, 910-920.

AL-İSMAİL K.M., ABURJAI T., (2004): "Antioxidant activity of water and alcohol extracts of chamomile flowers, anise seeds and dill seeds". *Journal of The Scıence of Food and Agrıculture.*, 84, 173-178.

ANDERSON RA., (2007): "Prescribing antioxidants."Chapter 103, p.1083-1094, *In: Rakel:Integrative Medicine*, 2nd ed., Saunders.

BARILLARI J., CANISTRO D., PAOLINI M., FERRONI F., PEDULLI G.F., IORI R., VALGIMIGLI L., (2005): "Direct antioxidant activity of purified glucoerucin, the dietary secondary metabolite contained in rocket (*Eruca sativa* Mill*)* seeds and sprouts." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2475-2482.

BARRERA-ARELLANO D., ESTEVES W., (1992): "Oxidative stability of potato chips determined by Rancimat." *JAOCS*, 69(4), 335-337.

BECKER EM., NISSEN LS., SKIBSTED LH., (2004):"Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects." *European Food Research and Techonology,* 10.107/s00217-004-1012-4.

BENNETT RN., ROSA EAS., MELLON FA., KROON PA., (2006): "Ontogenic profilling of glucosinates, flavonoids, and other secondary metabolites in *eruca sativa* (salad rocket), *diplotaxis erucoide* (wall rocket), *diplotaxis tenuifolia* (Turkish rocket)." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4005-4015.

BENZIE IFF., STRAIN JJ., (1996): "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) assay a measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay." *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.

BİLALOĞLU GULİYEV V., HARMANDAR M., (2000): Flavonoidler: Molekül yapıları, kimyasal özellikleri, belirleme teknikleri, biyolojik aktiviteleri, Aktif Yayınevi, İstanbul.

BLOCK G., (1999): "Emerging role of nutrition in chronic disease prevention: A look at the data, with an emphasis on vitamin C." Chapter 3, p.45-54, *In: Antioxidant Food Supplements in Human Health*, Ed: Packer L., Hiramatsu M., Yoshikawa T., Elsevier Inc.

BLOIS MS., (1958): "Antioxidant determinations by the use of stable free radical." *Nature*, 1199-1200.

BLUMENTHAL H., DANIEL J., ELIAS PS, SCHEUPLEIN RJ., SILANO V., TURTURRO A., VETTORAZI G., (1986): "Risk assessment associated with the use of phenolic antioxidants in foods". *Food and Chemical Toxicology,* 24(10/11), 1243-1253.

BOWLER RP., BARNES PJ., CRAPO JD., (2004). "The role of oxidative stres in chronic obstructive pulmonary disease." *Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease,* 1(2), 255-277.

BURDURLU HS., KARADENİZ F. (2006): "Bazı doğal antioksidanların toksikolojik özellikleri." *Dünya GIDA*, 6, 49-53.

CHEN HY., LIN YC., HSIEH CL., (2007): "Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs*." Food Chemistry*, 104, 1418-1424.

CONNING DM., PHILLIPS JC. (1986): "Comperative metabolism of BHA, BHT and other phenolic antioxidants and its toxicological relevance". *Food and Chemical Toxicology,* 24(10/11), 1145-1148.

COTELLE N., BERNIER JL., CATTEAU JP., POMMERY J., WALLET JC., GAYDOU EM., (1996): "Antioxidant properties of hydroxy-flavones." *Free Radical Biology and Medicine*, 20(1), 35-43.

COTTON F.A., WILKINSON G., (1988), Advanced Inorganic Chemistry, 5th Ed., John Wiley &Sons Inc., USA.

CRUTHIRDS DL., NOVAK L., AKHI KM., SANDERS PW., THOMPSON JA., vd., (2003): "Mitochondrial targets of oxidative stress during renal ischemia/reperfusion." *Archives Biochemistry and Biophysics*, 412, 27-33.

ÇİMEN MBY., (1999): "Flavonoidler ve antioksidan özellikleri." *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 19, 296-304.

DAĞLI Ü., BALK M., YÜCEL D., ÜLKER A., ÖVER H., vd., (1997): "The role of reactive oxygen metabolites in ülcerative colitis." *Inflammatory Bowel Diseases*, 3(4), 260-264.

DASGUPTA N., DE B., (2007): "Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A comparative study." *Food Chemistry*, 101, 471-474.

DAUER W., PRZEDBORSKI S., (2003): "Parkinson's disease: Mechanism and models." *Neuron,* 39, 889-909.

DAVIS PH., (1965-1985) Flora of Turkey and the East Aegean Islands, (v:1-4), Edinburgh.

DINIS TCP., MADEIRA VMC., ALMEIDA LM., (1994): "Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) assay inhibitors of membrane lipid peroxidation and assay peroxyl radical scavengers." *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315(1), 161-169.

DORMAN HJD., PELTOKETO A., HILTUNEN R., TIKKANEN MJ., (2003): "Characterisation of the antioxidant properties of deodourised aqueous extracts from selected Lamiacea herbs". *Food Chemistry*, 83, 255-262.

FINLEY JW., GIVEN PJR, (1986): "Techonological necessity of antioxidants in the food endustry". *Food and Chemical Toxicology,* 24(10/11), 999-1006.

FRANKE SIR., CKLESS K, SILVEIRA JD, RUBENSAM G., BRENDEL M., ERDTMANN B., HENRIQUES JAP., (2004): "Study of antioxidant and mutagenic activity of different orange juices." *Food Chemistry*, 88(1), 45-55.

FRANKEL EN., (1999): "Naturel phenolic antioxidants and their impact on health." Chapter 25, p.393-410 *In: Antioxidant Food Supplements in Human Health*, Ed: Packer L., Hiramatsu M., Yoshikawa T., Elsevier Inc.

FRANKEL EN., MEYER AS., (2000): "The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants." *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1925-1941.

GIUGLIANO D., CERIELLO A., ESPOSITO K., (2006): "The effect of diet on inflammation: Emphasis on the metabolic syndrome." *Journal of American College of Cardiology*, 48(4), 677-685.

GUTTERIDGE JMC., RICHMOND R., HALLIWELL B., (1980): "Oxygen free radicals and lipid peroxidation: Inhibition by the protein caeruloplasmin." *FEBS Letters*, 112(2), 269-272.

GÜLÇİN İ., OKTAY M., KİREÇCİ E., KÜFREVİOĞLU Öİ., (2003): "Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts". *Food Chemistry*, 83, 371-382.

GÜLÇİN İ., ŞAT İG., BEYDEMİR Ş., ELMASTAŞ M., KÜFREVİOĞLU Öİ., (2004): "Comparision of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophylata thunb*) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.)." *Food Chemistry*, 87, 393-400.

GÜLÇİN İ., UĞUZ MT., OKTAY M., BEYDEMİR Ş., KÜFREVİOĞLU Öİ., (2004): "Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of clary sage (*Salvia sclarea* L.)". *Turkish Journal of Agriculture and Forestry,* 28, 23-33.

HALLIWELL B., (1994): "Free radicals and antioxidants:A personal view." *Nutrition Reviews*, 52(8), 253-265.

HALLIWELL B., CLEMENT MV., LONG LH., (2000): "Hydrogen peroxida in the human body." *FEBS Letter*, 486, 10-13.
HALLIWELL B., GUTTERIDGE JMC., (1990) "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview." *In: Methods in Enzymology*, 186, 1-85.

HALVORSEN BL., HOLTE K., MYHRSTAD MCW., BARIGMO I., HVATTUM E., REMBERG SF. vd., (2002): "A systematic screening of total antioxidants in dietary plants." *The Journal of Nutrition*, 132(3), 461-471

HAWKINS CL., DAVIES MJ., (1998): "Degradation of hyaluronic acid, poly- and mono-saccharides, and model compounds by hypochlorite: Evidence for radical intermediates and fragmentation." *Free Radical Biology and Medicine*, 24(9), 1396-1410.

HAYOUNI EA., ABEDRABBA M., BOUIX M., HAMDI M., (2007): "The effects of solvent and extraction method on the phenolic contents and biological activities iv vitro of Tunisian *Quercus coccifera* and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts." *Food Chemistry* 105(3), 1126-1134.

HEIMLER D., ISOLANI L., VIGNOLINI P., TOMBELLI S., ROMANI A., (2007): "Polyphenol content and antioxidative activity in some species of freshly consumed salads." *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 55, 1724-1729.

HINNEBURG I., DORMAN HJD., HİLTUNEN R., (2006): "Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices." *Food Chemistry*, 97, 122-129.

HIPKISS AR., (2007): "Biological aspects of ageing." *Psychiatry*, 6(12), 476-479.

HIROSE M., TAKESADA Y., TANAKA H., TAMANO S., KATO T., SHIRAI T., (1997): "Carcinogenicity of antioxidants BHA, caffeic acid, sesamol, 4-methoxyphenol and catechol at low doses, either alone or in combination, and modulation of their effects in a rat medium-term multi-organ carcinogenesis model." *Carcinogenesis*, 19(1), 207-212.

HO CT., WANG M., WEI GJ., HUANG TC., HUANG MT., (2000): "Chemistry and antioxidative factors in rasemary and sage." *BioFactors*, 13, 161-166.

http://bitkisel-tedavi.com (Haziran 2008)

http://tr.wikipedia.org (Mart 2008)

http://www.kkgm.gov.tr (Temmuz 2008)

http://www.mustafaaltinisik.org (Ocak 2007)

http://www.tarimziraat.com (Haziran 2008)

HUANG D., OU B., PRIOR R., (2005): "The chemistry behind antioxidant capacity assays". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 53, 1841-1856.

HUOPALAHTI R., LINKO RR., (1983): "Composition and content of aroma compounds in dill, Anethum graveolens L., at three different growth stages." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31, 331-333.

ITO N., FUKUSHIMA S., TSUDA H., (1985): "Carcinogenicity and modification of the carcinogenic response by BHA, BHT, and the other antioxidants". *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 15(2), 109-150.

ITO N., HIROSE M., FUKUSHIMA S., TSUDA H., SHIRAI T., TATEMATSU M., (1986): "Studies on antioxidants: their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis". *Food and Chemical Toxicology,* 24(10/11), 1071-1082.

JAYAPRAKASHA GK., SELVI T., SAKARIAH KK., (2003): "Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts." *Food Research International*, 36, 117-122.

JULIANI HR., SIMON JE., (2002): "Antioxidant activity of basil." p.575-579, A. Whipkey (eds.) *Trends in new crops and new uses*. ASHS Pres, Alexandria, VA.

JUNTACHOTE T., BERGHOFER E., (2005): "Antioxidative properties and stability of ethanolic extracats of holy basil and galangal". *Food Chemistry,* 92, 193-202.

KARPINSKA M., BOROWSKİ J., DANOWSKA-QZIEWICH, (2001): "The use of natural antioxidans in ready-to-serve food." *Food Chemistry,* 72, 5-9.

KEANEY JF., FREI B., (1994): " Antioxidant protection of LDL and its role in the prevention of atherosclerotic vascular disease." p.303-309, *In: Natural Antioxidants in Health and Disease*, Ed: Frei B., Academic Pres Inc.

KIM SJ., ISHII G., (2006): "Glucosinolate profiles in the seeds, leaves and roots of rocket salad (*Eruca sativa* Mill.) and anti-oxidative activities of intact plant powder and purified 4-methoxyglcobrassicin." *Soil Science and Plant Nutrition*, 52, 394-400.

KÖSECİK M., EREL Ö., SEVİNÇ E., SELEK S., (2005): "Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking." *International Journal of Cardiology*, 100(1), 61-64.

KÜLTÜR Ş., (2007): "Medicinal plants used in Kırklareli Province (Turkey)." *Journal of Ethnopharmacology*, 111, 341-364.

LEE J.D., (1991), Concise Inorganic Chemistry, 4th Ed., Chapman&Hall, New York.

MADSEN HL., BERTELSEN G., (1995):"Spices as antioxidants". *Trends in Food Science and Technology,* 6, 271-277.

MASUDA Y., KIKUZAKI H., HISAMOTO M., NAKATANI N., (2004): "Antioxidative properties of gingerol related compounds from ginger." *BioFactors*, 21, 293-296.

MATA AT., PROENÇA C., FERREIRA AR., SERRALHEIRO MLM., NOGUEIRA JMF., ARAUJO MEM.,(2007): "Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices." *Food Chemistry*, 103, 778-786.

MAURE A., CRUZ JM., FRANCO D., DOMINGEZ M., SINEIRO J., NUNEZ MJ., PARAJO JC., (2001): "Natural antioxidants from residual sources." *Food Chemistry*, 72, 145-171.

McNEIL JD., WIEBKIN OW., BETTS WH., CLELAND LG., (1985): "Depolymerisation products of hyaluronic acid after expose to oxygen-derived free radicals." *Annals of the Rheumatic Diseases*, 44, 780-789.

MERAM I., AKTARAN Ş., (2002): "Serbest radikallerin biyomoleküller üzerine etkileri." *Arşiv*, 11, 299-304.

MIDDLETON P., STEWART F. EGAN P., O'ROURKE C., ABDULRAHMAN A., BYRES M., vd., (2004): "Antioxidant ve antibacterial activities and general toxicity of *Alnus glutinosa, Fraxinus excelsior* and *Papaver rhoeas*.", *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2, 81-86.

MILIAUSKAS G., VENSKUTONIS PR., VAN BEEK TA., (2004): "Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts." *Food Chemisrty*, 85, 231-237.

MILLER NJ., LUIZ-LARREA MB., (2002): "Flavonoids and other plant phenols in the diet: Their significance as antioxidants." *Journal of Nutritional and Environmental Medicine*, 12, 39-51.

MIYAJIMA Y., KIKUZAKI H., HISAMOTO M., NAKATANI N., (2004): "Antioxidative polyphenols from berries of *Pimenta dioica*." *BioFactors*, 22, 301-303.

MOSLEY RL., BENNER EJ., KADIU I., THOMAS M., BOSKA MD., vd., (2006): "Neuroinflammation, oxidative stres, and the pathogenesis of Parkinson's disease." *Clinical Neuroscience Research*, 6(5), 261-281.

MURKOVIC M., STEINBERGER D., PFANNHAUSER W., (1998): "Antioxidant speices reduce the formation of heterocyclic amines in fried meat." *Z. Lebensm Unters Forsch*, 207, 477-480.

MURRAY RK., GRANNER DK., MAYES PA, RODWELL VW, (1996), Harper'ın Biyokimyası 24. baskı, (Çev: Dikmen N., Özgünen T.), Barış Kitabevi, İstanbul.

NAKATANI N., (2000): "Phenolic antioxidants from herbs and spices". *BioFactors,* 13, 141-146.

NAKİBOĞLU M., UREK RO., KAYALI HA., TARHAN L., (2007):"Antioxidant capacities of endemic *Sideritis sipylea* and *Origanım sipyleum* from Turkey." *Food Chemistry* 104. 630-635.

NANDITA S., RAJINI PS., (2004): "Free radical scavenging avtivity of an aqueous extract of potato peel." *Food Chemistry*, 85, 611-616.

NEHIR EL S., KARAKAYA S., TAŞ AA., (1999): "Bazı gıdalardaki fenolik bileşiklerin antioksidan etkilerinin in vitro koşullarda saptanması." *TÜBİTAK Projesi* No:TOGTAG-1698, İzmir.

NEHİR EL S., KARAKAYA S., (2004): "Radical scavenging and iron-chelating actvities of some greens used as traditional dishes in Mediterranen diet." *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 55(1), 67-74.

NISHIKIMI M., RAO NA., YAGI K., (1972): "The occurance of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 46(2), 849-854.

OKTAY M., GÜLÇİN İ., KÜFREVİOĞLU Ö.İ., (2003): "Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seede extracts". *Lebensm.-Wiss. U.Technol*., 36, 263-271.

ONAT T., EMERK K., SÖZMEN EY. (Ed.), (2002), İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, Ankara.

OPARA EC., ROCKWAY SW., (2006): "Antioxidants and micronutrients". *Disease a Month,* 52, 151-163

ORAK HH., (2006): "Total antioxidant activities, phenolics, anthocyanıns, polyphenoloxidase activities and its correlation of some important red wine grape varieties which are grown in Turkey.", *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities,* Topic: Food Science and Technology, 9(1), http://www.ejpau.media.pl/volume9/issue1/art-18.html.

ORLOVSKAYA TV., CHELOMBIT'KO VA., (2007): "Phenolic compounds from *Lepidium sativum.*" *Chemistry of Natural Compounds,* 43(3), 323-329.

OU B., HUANG D., HAMPSCH-WOODILL M., FLANAGAN JA., DEEMER EK., (2002): "Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxydant power (FRAP) assays: A comparative study". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 50, 3122-3128.

OYAIZU M., (1986): "Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine." *Japan Journal of Nutrition*, 44, 307-315.

ÖZCAN MM., BAYDAR H., SAĞDIÇ O., ÖZKAN G., (2007): "Türkiye'de ticari açıdan önemli Lamiaceae familyasına ait baharat veya çeşni olarak kullanılan bitkilerin fenolik bileşenleri ile antioksidan ve antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi." *TÜBİTAK Projesi*, No:TOGTAG-3319, Konya.

ÖZTÜRK N., TUNALIER Z., KOŞAR M., BAŞER KH, (2002): "*Petroselinum crispum*, *Anethum graveolens* ve *Eruca sativa*'nın antioksidan etki ve fenolik bileşikler yönünden incelenmesi." *14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, Bildiriler, Eskişehir.

PACKER L., WITT EH., TRISTCHLER HJ., (1995): "Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant." *Free Radical Biology and Medicine*, 19(2), 227-250.

PAN Y., ZHANG X., WANG H., LIANG Y., ZHU J., LI H., ZHANG Z., WU Q., (2007): "Antioxidant potential of ethanolic extract of Polygonum cuspidatum and application in peanut oil." *Food Chemistry*, 105(4), 1518-1524.

PERCIVAL M., (1998): "Antioxidants." *Clinical Nutrition Insıghts*, 10, 1-4.

POKORNY J., (1991): "Natural antioxsidants for food use". *Trends in Food Science and Technology,* 223-227.

PRIOR RL., (1998): "Antioxidant capacity and health benefits of fruits and vegetables." *NABC Meetings in Portland*, Oregon.

PROESTOS C., CHORIANOPOULOS N., NYCHAS GJE., KOMAITIS M., (2005): "RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity.", *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 53, 1190-1195.

REES S., (1987): "Ascorbic acid and lipid peroxidation. The cross-over effect*." Acta Biochimica Biophysica Hungarica*, 22, 241-249.

REITER RJ., (1998): "Melatonin and human reproduction." *The Finnish Medical Society Duodecim*, 30(1), 103-108.

RICE-EVANS C., (1999): "Screening of phenolics and flavonoids for antioxidant activity." Chapter 16, p.239-253, *In: Antioxidant Food Supplements in Human Health*, Ed: Packer L., Hiramatsu M., Yoshikawa T., Elsevier Inc.

ROSS JA., KASUM CM, (2002): "Dietary flavonoids: Bioavaibility, metabolic effects, and safety." *Annual Review of Nutrition*, 22, 19-34.

RUCH RJ., CHENG SJ., KLAUNIG JE., (1989): "Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular comunication by antioxidant catechins isolated from Chinese grean tea." *Carcinogenesis*, 10(6), 1003-1008.

SAÇAN Ö., ORAK H., YANARDAĞ R., (2008): "Antioxidant activity of water extractof *Eruca sativa* Mill.", *Asian Journal of Chemistry*, 20(5), 3462-3474.

SCHRODER H., (2007): "Protective mechanism of the Mediterranean diet in obesity and type 2 diabetes." *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18, 149-160.

SCOTT BC., AUROMA OI., EVANS PJ., O'NEILL C., Van Der VLIET A., vd., (1994): "Lipoic acid and dihydrolipoic acid as antioxidants. A critical." *Free Radical Biology and Medicine*, 20 (2), 119-133.

SEVEN A., CANDAN G., (1996): "Antioksidan savunma sistemleri." *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 27(1), 41-50.

SHON MY., KIM TH., SUNG NJ., (2003): "Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii (Phellinus of Hymenochaetaceae)* extracts." *Food Chemistry*, 82, 593-597.

SILVA EM., SOUZA JNS., ROGEZ H., REES JF., LARONDELLE Y., (2007): "Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region." *Food Chemistry*, 101, 1012-1018.

SINGH G., MAUYA S., DE LAMPOSANA M.P., CATALAN C., (2005): "Chemical constituens, antimicrobial investigations, and antioxidative potential of *Anethum graveolens* L. essential oil and acetone extract:part 52" *Journal of Food Science,* 70(4).

SINGLETON VL., ROSSI JA., (1965): "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents." *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

SOURI E., AMIN GH., FARSAM H., ANDAJI S.,(2004): "The antioxidant activity of some commonly used vegetables in Iranian diet." *Fitoterapia*, 75(6), 585-588.

STAHL W., SIES H., (1999): "Carotenoids: Occurance, biochemical activities, and bioavability." Chapter 13, p.183-202 *In: Antioxidant Food Supplements in Human Health*, Ed: Packer L., Hiramatsu M., Yoshikawa T., Elsevier Inc.

STAHL W., SIES H., (2003): "Antioxidant activity of carotenoids." *Molecular Aspects of Medicine,* 24, 345-351.

STEINMETZ KA., POTTER JD., (1996): "Vegetables, fruit, and cancer prevention: A review". *Journal of the American Dietetic Association*, 96 1027-1039.

STOGGL WM., HUCK CW., GUNTHER K. (2004): "Structural elucidation of catechin and epicatechin in sorrel leaf extracts using liquid-chromatography coupled to diode array-, fluorescence-, and mass spectrometric detection." *Journal of Separation Science*, 27(7-8), 524-528.

STRYER L., (1995), Biochemistry, 4th Ed., W.H. Freeman and Company, New York.

SU L., YIN JJ., CHARLES D., ZHOU K., MOORE J., YU LL., (2007): "Total phenolic contents, chelating capacities, and radical-scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon, and oregano leaf." *Food Chemistry*, 100, 990-997.

ŞENKÖYLÜ N.,(2001): Yemlik Yağlar, Trakya Üniv. Ziraat Fak. Tekirdağ.

TAFAZOLI S., WRIGHT JS., O′BRIEN PJ. (2005): "Prooxidant and antioxidant activity of vitamin E analouges and troglitazone." *Chemical Research in Toxicology*, 18(10), 1567-1574.

TAO F., GONZALES-FLECHA B., KOBZİK L., (2003): "Reactive oxygen species in pulmonary inflammation by ambient particulates." *Free Radical Biology and Medicine,* 35(4), 327-340.

TARWADI K., AGTE V., (2003): "Potential of commonly consumed green leafly vegetables for their antioxidant capacity and its linkage with the micronutrient profile". *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 54, 417-425.

TAŞÇI I., YAVUZ N., CANER M., GÖKSEL S., YILMAZ O., vd., (1995): "Karaciğer sıcak iskemi ve reperfüzyon hasarında dimetilsülfoksil (DMSO), allopurinol ve deferoksamin'in etkileri." *Çağdaş Cerrahi Dergisi*, 9, 198-202.

TAVANI A., NEGRI E., La VECCHIA C., (1996): "Food and nutrient intake and risk of cataract." *Annals of Epidemiology*, 6(1), 41-46.

TAWAHA K., ALALI FQ., GHARAIBEH M., MOHAMMAD M., EL-ELIMAT T., (2007): "Antioxidant activity and total phenolic of selected Jordanian plant species." *Food Chemistry*, 104, 1372-1378.

TEPE B., SÖKMEN M., AKPULAT HA., SÖKMEN A., (2006): "Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* speices from Turkey." *Food Chemistry*, 95, 200-204.

TOMER D., McLEMAN L., OHMINE S., SCHERER PM., MURRAY BK., O'NEILL KL.,(2007): "Comparision of the total oxyradical scavenging capacity and oxygen radical absorbance capacity antioxidant assays". *Journal of Medicinal Food*, 10(2) ,337-344.

VAN DER VLIET A., O'NEILL C.A., HALLIWELL B., CROSS C., KAUR H., (1994): "Aromatic hydroxylation and nitration of phenylalanine and tyrosine by peroxynitrite". *FEBS Letters*, 339, 89-92

VAZGEÇER B., ULU H., ÖZTANA., (2005): "Et ve et ürünlerinde baharatın antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi." *Gıda*, 30(2), 75-81.

VECCHIA CL., ALTIERI A., TAVANI A., (2001): "Vegetables, fruit , antioxidants and cancer: A Review of Italian Studies." *European Journal of Nutrition,* 40, 261-267.

WEIJL NI., CLETON FJ., OSANTO S., (1997): "Free radicals and antioxidants in chemothraphy-induced toxicity." *Cancer Treatment Reviews*, 23, 209-240.

WINTERNBOURN CC., GUTTERIDGE JMC., HALLIWELL B., (1985): "Doxorubicin-dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O_2." *Journal of Free Radicals in Biology and Medicine*, 1(1), 43-49.

WOJDYLO A., OSZMİANSKI J., CZEMERYS R., (2007): "Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs.", *Food Chemisrty*, 105(3), 940-949.

WONG CC., LI HB., CHENG KW., CHEN F., (2006): "A systematic survey of antioxidant avtivity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay." *Food Chemistry*, 97, 705-711.

WOOD JE., SENTHILMOHAN ST., PESKIN AV. (2002): "Antioxidant activity of procyanidin-containing plant extract at different pHs." *Food Chemistry*, 77, 115-161.

YANISHLIEVA NV., MARINOVA EM, (2001): "Stabilisation of edible oils with natural antioxidants". *European Journal of Lipid Science Technology*,103, 752-767.

YAZICI C., KÖSE K., (2004): "Melatonin: Karanlığın antioksidan gücü." *Erciyes Üniv. Sağlık Bilimleri Dergisi,* 13(2), 56-65.

YEN GC., DUH PD., (1994): "Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active-oxiygen species." *Journal of Agricultural and Food Chemistry,*. 42, 629-632.

YEŞİLKAYA A., YEĞİN A., ÖZDEM S., AKSU TA., (1998): "The effect of bilirubin on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in cumene hydroperoxide-treated erythrocytes**.**" *Internatıonal Journal of Clınıcal and Laboratory Research*, 28, 230-234.

YILDIRIM A., MAVİ A., KARA A., (2001): "Determination of antioxidant and antimicrobial avtivities of Rumex crispu L. extract.", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4083-4089.

ZALATA A., YAHIA S., EL-BAKARY A., ELSHEIKHA HM., (2007): "Increased DNA damage in children caused by passive smoking as assessed by comet assay and oxidative stress." *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 629(2), 140-147.

ZEYBEK U., ZEYBEK N., (2002), Farmasötik Botanik (3. baskı), Ege Üniv. Eczacılık Fak. Yayınları, No:3, İzmir.

ZHENG W., WANG SY., (2001): "Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 49, 5165-5170.

ZIN ZM., ABDUL-HAMID A., OSMAN A., (2002): "Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf." *Food Chemistry*, 78, 227-231.

ÖZGEÇMİŞ

1976 Edirne doğumluyum. İlk, orta ve lise öğrenimimi sırasıyla Büyükkarıştıran İlköğretim Okulu, Lüleburgaz Merkez Ortaokulu ve Lüleburgaz Lisesi'nde tamamladıktan sonra öğrenimime 1993-1997 yılları arasında Trakya Üniversitesi Fen–Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde devam ettim. Yüksek lisansımı 1997-2000 yılları arasında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda tamamladım. 2001 yılında Trakya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı'nda doktora öğrenimime başladım.

1998 yılından bu yana Trakya Üniversitesi Fen–Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım. Evliyim ve iki çocuğum var.