

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI ŞIFALI BİTKİLERİN ANTIOKSİDAN
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Rana ARIDURU

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA
Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA
Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Gülnur ARABACI

Ocak 2013

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI ŞIFALI BİTKİLERİN ANTIOKSİDAN
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

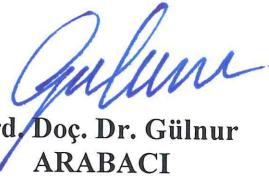
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Rana ARIDURU

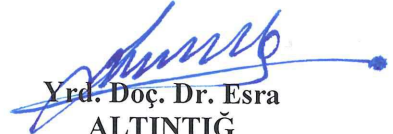
Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA

Bu tez 16/ 01 /2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.


Yrd. Doç. Dr. Gülnur
ARABACI
Jüri Başkanı


Doç. Dr. Serap ÇOŞANSU
AKDEMİR
Üye


Yrd. Doç. Dr. Esra
ALTINTIĞ
Üye

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince her türlü konuda bana destek olan danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Gülnur ARABACI' ya teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans dönemi boyunca deneyimlerinden ve bilgilerinden yararlandığım tüm kimya bölümü öğretim üyeleri, Araştırma görevlisi Esmâ Hande ALICI ve Laboratuvar arkadaşlarıma göstermiş oldukları ilgilerinden dolayı teşekkür ederim.

Ayrıca her an maddi ve manevi desteğini esirgemeyen eşim F.Emrah ARIDURU'ya hayatımın her aşamasında yanımda olan ikizim Berna BAŞOĞLU ve aileme şükranlarımı sunarım.

Bu yüksek lisans tezi Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ÖZET.....	x
SUMMARY.....	xi
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.	
GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Serbest Radikaller Hakkında Genel Bilgi.....	4
2.2. Antioksidanlar Hakkında Genel Bilgi.....	7
2.3. Gıdalar ve Antioksidanlar.....	11
2.3.1. Gıdalarda doğal olarak bulunan antioksidan maddeler	11
2.4. Bazı Antioksidan Maddeler	12
2.5. Fenolik Bileşikler.....	13
2.5.1. Fenolik bileşikler hakkında genel bilgi.....	13
2.5.2. Fenolik asitler ve aldehitler.....	14
2.5.3. Sinamik asitler.....	15
2.5.4. Flavonoidler.....	15
2.6. Çalışılan Bitkilerin Özellikleri.....	19

2.6.1. Sedef otu.....	20
2.6.2. Pelin otu.....	21
2.6.3. Kunitsa otu (Civanperçemi).....	22
2.6.4. Ciğertaze otu (Adaçayı).....	24
2.7. Antioksidan Aktivite Tayin Metotları.....	26
2.7.1. FCR ile toplam fenolik madde tayini	27
2.7.2. DPPH serbest radikali giderim aktivitesi metodu.....	28
2.7.3. CUPRAC metodu	29
2.7.4. Süper oksit anyon radikali giderim aktivitesi yöntemi.....	29
BÖLÜM 3.	
DENEYSEL ÇALIŞMALAR	32
3.1. Kullanılan Araç-Gereç ve Kimyasal Maddeler.....	32
3.1.1. Bitkisel materyal.....	32
3.1.2. Kimyasal maddeler.....	32
3.1.3. Kullanılan aletler.....	32
3.2. Kullanılan Ana Çözeltilerin Hazırlanması.....	33
3.2.1. Toplam fenolik madde miktarı tayininde kullanılan çözeltiler.	33
3.2.2. Toplam flavonoid madde miktarı tayininde kullanılan çözeltiler.....	33
3.2.3. DPPH serbest radikali giderim aktivitesi yönteminde kullanılan çözeltiler.....	33
3.2.4. Bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini (CUPRAC) yönteminde kullanılan çözeltiler.....	33
3.2.5. Süperoksit anyon radikali giderim aktivitesi yönteminde kullanılan çözeltiler.....	34
3.2.6. H ₂ O ₂ giderme aktivitesinin yönteminde kullanılan çözeltiler...	34
3.2.5. Demir (II) iyonlarını şelatlama aktivitesinin tayini yönteminde kullanılan çözeltiler.....	35
3.2.6. İndirgeme kapasitesi tayini yönteminde kullanılan çözeltiler...	35

3.3. Deneysel çalışma.....	35
3.3.1. Bitkilerin ekstraksiyon aşaması.....	35
3.4. Uygulanan Yöntemler ve Kalibrasyon Grafiklerinin Çizimi.....	36
3.4.1. Folin yöntemiyle toplam fenolik madde tayini.....	36
3.4.2. Alüminyum nitrat yöntemi ile toplam flavonoid madde tayini.....	37
3.4.3. DPPH serbest radikali giderim aktivitesi tayini	38
3.4.4. Bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini (CUPRAC).....	39
3.4.5. Süperoksit anyon radikali giderim aktivitesi yöntemi tayini....	40
3.4.6. H ₂ O ₂ giderme aktivitesinin tayini.....	40
3.4.7. Demir (II) iyonlarını şelatlama aktivitesinin tayini	41
3.4.8. İndirgeme kapasitesi tayini	41
BÖLÜM 4.	
ARAŞTIRMA BULGULARI	43
4.1. Folin Yöntemiyle Toplam Fenolik Madde Tayini Sonuçları.....	44
4.2. Alüminyum Nitrat Yöntemi ile Toplam Flavonoid Madde Tayini Sonuçları	46
4.3. DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Tayin Sonuçları.....	47
4.4. Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Tayini (CUPRAC) Sonuçları.....	49
4.5. Süperoksit Anyon Radikali Giderim Aktivitesi Sonuçları	51
4.6. H ₂ O ₂ Giderme Aktivitesinin Tayini Sonuçları	52
4.7. Demir (II) İyonlarını Şelatlama Aktivitesinin Tayini Sonuçları	53
4.8. İndirgeme Kapasitesi Tayini Sonuçları	56
BÖLÜM 5.	
SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR	59
KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ.....	71

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ROT	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismütaz
CAT	: Katalaz
GPX	: Glutasyon peroksidaz
GSH	: Glutasyon
SR	: Serbest radikal
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
ET	: Elektron transferi
ABTS	: 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyezolin-6-sülfonik asit)
TEAC	: Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite
FRAP	: Ferrik iyonu indirgeme antioksidan gücü
FCR	: Folin-Ciocalteu reaktifi
DPPH	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
CUPRAC	: Bakır (II) İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi
NADH	: Nikotinamitadenindinükleotit
PMS	: Fenazinmetasülfat
NBT	: Nitrobluetetrazolyum
TFC	: Toplam fenolik madde
GAE	: Gallik asite eşdeğer
TCA	: Trikloro asetik asit
BHT	: Bütillenmiş hidroksi toluen
IC50	: % 50 inhibisyona ulaşmak için gerekli antioksidan derişimi

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Fenol.....	13
Şekil 2.2.	a), b) : Gallik asit, vanilin.....	14
Şekil 2.3.	Kafeik asit	15
Şekil 2.4.	Klorojenik asit	15
Şekil 2.5.	Antoksanin üyelerinin kimyasal yapıları.....	16
Şekil 2.6.	Flavonoidlerin genel yapısı	17
Şekil 2.7.	Kaempferol, kuersetin, myricetin.....	18
Şekil 2.8.	Sedef otunun çiçekli, toprak üstü kısmı.....	20
Şekil 2.9.	Sedef otunun çalışmalarda kullanılan yaprak kısmı	20
Şekil 2.10.	Pelin otunun çiçekli, toprak üstü kısmı	22
Şekil 2.11.	Pelin otunun çalışmalarda kullanılan yaprak kısmı	22
Şekil 2.12.	Kunitsa otunun çiçekli, toprak üstü kısmı.....	23
Şekil 2.13.	Kunitsa otunun çalışmalarda kullanılan yaprak kısmı.....	23
Şekil 2.14.	Ciğertaze otunun çiçekli, toprak üstü kısmı	25
Şekil 2.15.	Ciğertaze otunun çalışmalarda kullanılan yaprak kısmı.....	25
Şekil 2.16.	DPPH molekülünün antioksidan madde ile reaksiyonu	28
Şekil 2.17.	Nitro blue diformazan	30
Şekil 3.1.	Toplam fenolik madde tayininde standart olarak kullanılan gallik asitin kalibrasyon eğrisi.....	37
Şekil 3.2.	Toplam flavonoid madde tayininde standart olarak kullanılan kuersetinin kalibrasyon eğrisi.....	38
Şekil 3.3.	Troloks standardının kalibrasyon eğrisi	39
Şekil 4.1.	Toplam fenolik madde tayininde standart olarak kullanılan gallik asitin kalibrasyon eğrisi.....	44
Şekil 4.2.	Toplam flavonoid madde tayininde standart olarak kullanılan kuersetinin kalibrasyon eğrisi	46

Şekil 4.3.	Bitki ekstrelerin DPPH serbest radikali giderim aktivitesi % inhibisyon değerleri.....	48
Şekil 4.4.	Bitki ekstrelerin süper oksit anyon radikali giderim aktivitesi % inhibisyon değerleri.....	51
Şekil 4.5.	Sedef otu ekstraktlarının metal şelatlama kapasitesi.....	53
Şekil 4.6.	Pelin otu ekstraktlarının metal şelatlama kapasitesi.....	53
Şekil 4.7.	Kunitsa otu ekstraktlarının metal şelatlama kapasitesi.....	54
Şekil 4.8.	Ciğertaze otu ekstraktlarının metal şelatlama kapasitesi.....	54
Şekil 4.9.	Metal şelatlama aktivitesi % inhibisyon değerleri.....	55
Şekil 4.10.	Sedef otu ekstraktlarının indirgeme kapasitesi.....	56
Şekil 4.11.	Pelin otu ekstraktlarının indirgeme kapasitesi.....	57
Şekil 4.12.	Kunitsa otu ekstraktlarının indirgeme kapasitesi.....	57
Şekil 4.13.	Ciğertaze otu ekstraktlarının indirgeme kapasitesi.....	58

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1.	Serbest Radikaller ve Serbest Radikal Üreten Bazı Türlerin Özellikleri.....	6
Tablo 2.2.	Fenolik bileşiklerin karbon sayılarına göre sınıflandırılması.....	14
Tablo 2.3.	Çalışmada kullanılan bitkiler.....	19
Tablo 4.1.	Bitki ekstralarının toplam fenolik madde miktarları	44
Tablo 4.2.	Bitki ekstralarının toplam flavonoid madde miktarları.....	47
Tablo 4.3.	TEAC _{CUPRAC} değerleri için standart ve bitki numunelerinin doğru denklemleri.....	49
Tablo 4.4.	Standart reaktifler için TEAC _{CUPRAC} değerleri.....	49
Tablo 4.5.	Bitki numuneleri için TEAC _{CUPRAC} değerleri	50
Tablo 4.6.	% H ₂ O ₂ Giderme Aktivitesi.....	52

ÖZET

Anahtar kelimeler: Antioksidan aktivite, Sedef Otu, (*Ruta Graveolens*), Pelin Otu, (*Artemisia Absinthium*), Kunitsa Otu, Civanperçemi, (*Achillea Millefolium*), Ciğertaze Otu, Ada Çayı, (*Salvia Officinalis*)

Antioksidanlar, radikal oluşumunun sınırlandırılması, radikal reaksiyonlarının sona erdirilmesi ve oluşan radikallerin etkisiz hale getirilmesinden sorumlu moleküllerdir. Beslenmenin büyük bir kısmını oluşturan meyve ve sebzeler ile doğal antioksidan etkili bileşikler, metabolizmaya katılır ve çeşitli hastalıklara karşı koruyucu etki gösterirler. Bu koruyucu etki, besinlerde bulunan askorbik asit, tokoferoller, karotenoidler, flavonoidler, fenolik asitler ve tiyoller gibi antioksidan özellikli bileşiklerden kaynaklanır.

Bazı bitkiler, özellikle flavonoidli yapıları yüksek antioksidan aktiviteler gösterir. Bu nedenle vücudun endojen savunma sisteminin diyetle alınacak antioksidan bileşikler ile desteklenmesi gerektiği görülür. Bu bitkiler ile beslenerek alınan flavonoidler metabolizmada, kanser, kalp, akciğer, karaciğer hastalıkları ve bunlar gibi birçok kronik rahatsızlığı tedavi amaçlı etki gösterir.

Bitkilerin bu fonksiyonları büyük önem teşkil ettiğinden bu konuda bir çalışma tercih edilmiştir. Bu çalışmada Türkiye’de yetişen ve tedavi amaçlı da kullanılabilen bitkilerden Sedef Otu (*Ruta graveolens*), Pelin Otu (*Artemisia absinthium*), Civanperçemi (*Achillea millefolium*)’nin Balkanlarda yetişen türü Kunitsa otu ve Adaçayı (*Salvia officinalis*)’nin Balkanlarda yetişen türü Ciğertaze Otu bitkilerinin antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. Bu amaçla bitkiler etüvde belirli bir sıcaklıkta kurutulup, doğrayıcı ile ufak parçalar haline getirildikten sonra etanol, metanol, aseton ve etil asetat çözücülerini ile ekstrakte edilerek farklı metodlar ile antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir.

Bitkilerin antioksidan kapasiteye neden olan türlerinin belirlenmesi amacıyla, her ekstraktın Folin Cioceltau reaktifi ile toplam fenolik madde içeriği, alüminyum nitrat yöntemi ile toplam flavonoid madde miktarı, DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki tayini, H₂O₂ giderme aktivite tayini, bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini (CUPRAC), Süperoksit (O₂⁻) anyon radikali tayini, indirgeme kapasite tayini ve Demir (II) iyonları şelatlama aktivite tayini UV-vis spektroskopisi ile yapılmıştır.

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITIES IN SOME MEDICINAL PLANTS

SUMMARY

Key Words: Antioxidant activity, Rue (*Ruta Graveolens*), Wormwood (*Artemisia Absinthium*) Kunitsa, Yarrow (*Achillea Millefolium*), Sage tea, Freshliver (*Salvia Officinalis*)

Antioxidants are responsible molecules that limiting the formation of a radical, resulting radical reactions and neutralizing radicals. Fruit and vegetables that constitute the majority of feeding and natural antioxidants involved in metabolism, and they show a protective effect against various diseases. This protective effect is caused by antioxidant compounds such as ascorbic acid, tocopherols, carotenoids, flavonoids, phenolic acids and thiols.

Some plants ,especially the flavonoid structures, show the highest antioxidant activity. Thus, the body's endogenous defense system should be supported by dietary antioxidant compounds. The flavonoids that are in these plants show therapeutic effect such as cancer, heart, lung, liver diseases and many other chronic diseases in metabolism.

This study is chosen because of crucial functions of these plants. In this study, plants grown in Turkey and can also be used for the treatment of Rue (*Ruta Graveolens*), Wormwood, (*Artemisia Absinthium*), Yarrow (*Achillea Millefolium*) Kunitsa type of grass that grows in the Balkans, Sage (*Salvia Officinalis*) Freshliver type of grass that grows in the Balkans were investigated about antioxidant activities. For this purpose, plants dried in the oven at specific temperatures,they were developed into small pieces with a blender after that the plants extracted with ethanol, methanol, acetone and ethyl acetate resolution, so that the antioxidant activity were determined by different methods.

In order to determine the antioxidant capacity of the species, all of the extracts will be analyzed with various methods which total phenolic content with Folin Cioceltau reagent, total flavonoid content with aluminum nitrate method, DPPH free redikal scavenging through the determination, the determination of the activity of removal of H₂O₂, copper (II) ion reducing antioxidant capacity determination (CUPRAC), Superoxide (O₂⁻) anion radical assay, determination of capacity reduction, Iron (II) ions chelating activity assay, and in support of with UV-vis spectroscopy.

BÖLÜM 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 ($ONOO^{\bullet}$) 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 pek çok hastalıktan sorumlu tutulurlar [1].

Oksidasyon, bir atom ya da molekülün bir alıcıya elektron vermesi ile meydana gelen yükseltgenme prosesidir. Yükseltgenme potansiyeli yüksek olan madde yükseltgenirken diğer madde indirgenir. İnsan vücudunda ve besinlerde bulunan lipidler, proteinler, karbonhidratlar, nükleik asitler oksidasyona uğrayabilmekte ve canlı organizma için zararlı olabilecek oksidasyon ürünleri oluşabilmektedir [2]. Bu durum oksidatif stres olarak ifade edilir.

Reaktif türlerin zararlı etkilerinin temel sebebi radikal olmaları, radikal oluşumuna sebep olabilmeleri veya yükseltgenme potansiyellerinin daha yüksek olmalarından kaynaklanmaktadır. Oksidatif stres sürecinde meydana gelen reaktif oksijen türleri nükleik asitleri, proteinleri ve lipitleri oksitleyebilir [3]. Reaktif oksijen türleri ile biyomoleküller arasındaki reaksiyon, radikalik zincir reaksiyonu şeklinde olduğu için, oksidatif hasar da zincirleme şeklindedir. Bu zincirleme reaksiyon, yeni reaktif türler oluşturmakta ve bunlar da başka biyomoleküllere zarar vermektedir. Bu durum organizmada ilerleyen dönemlerde daha belirgin hal almaktadır. Oksidatif stres

süresince üretilen reaktif türlerin yukarıda da belirtildiği gibi yaşlanmaya sebep olduğu bilinmektedir. Çünkü yaşlanmayla beraber reaktif oksijen türlerinin biyomoleküller üzerindeki oksidatif hasarında bir artış söz konusudur [3-7].

Organizmada oksidatif stres oluşturan değişik oksidanlara karşı antioksidan savunma sistemi vardır. Bu antioksidan savunma sistemi; serbest radikallerin aşırı üretilmesini engelleyerek, oluşan serbest radikallerin etkisini azaltarak veya oluşan oksidatif hasarı ya azaltarak ya da onararak etkisini gösterir. Bu sistemler, SOD, CAT ve GPX gibi endojen antioksidan enzimleri, GSH'ı, seruloplazmin ve transferrin gibi metal bağlayıcı proteinleri, Zn ve Cu gibi antioksidan özellikteki bazı elementleri ve A, C, E gibi antioksidan vitaminleri içermektedir [8].

Antioksidan savunma sistemlerine sahip olan aerobik organizmalar, aerobik solunum ve substrat oksidasyonu sonucu olarak ürettiği reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunu engellemektedir. Hidroksil radikallerini ($\cdot\text{OH}$), süperoksit anyonlarını ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ve hidrojen peroksiti (H_2O_2) içeren reaktif oksijen türlerinin küçük miktarları, hem iç hemde dış uyarıcılara karşılık olarak aerobik organizmalarda sürekli olarak üretilmektedir [9, 10].

Antioksidanlar radikal oluşumunun sınırlandırılması, radikal reaksiyonlarının sona erdirilmesi, oluşan radikallerin etkisiz hale getirilmesi ve hasarlı moleküllerin ortadan kaldırılmasından sorumlu moleküllerdir. Reaktif oksijen türlerinin üretimi ve çeşitli antioksidan savunmaları arasındaki dengesizlik, antioksidanların yetersizliğinden ve/veya reaktif oksijen türlerin artan oluşumundan ortaya çıkan yukarıda bahsedilen oksidatif stresle sonuçlanır [11].

Antioksidanlar, genel olarak serbest radikal oluşumunu engelleyen maddeler olarak tanımlanmışlardır. Antioksidan savunma sistemi hücre içi ve hücre dışı olarak ikiye ayrılır. Hücre içi savunma sisteminin enzimatik antioksidanları, SOD, CAT ve GPX'tir. Enzimatik olmayan hücre içi antioksidanlar; GSH, membranlara bağlanabilen α - tokoferol ve β -karoten, askorbat, transferin, seruloplazmin ve bilirubindir. Hücre dışı savunma sistemi ise; metallothionein gibi serbest radikal yok edicileri ve Zn gibi iz elementlerden oluşur [8].

Bitkilerde farklı antioksidan bileşiklerin meydana geldiği bilinmektedir [12]. Doğal antioksidanlar bitkilerin yaprak, gövde ve tohumları başta olmak üzere bütün dokularında meydana gelebilmektedir. Doğal antioksidanların başlıcaları karetenoidler, vitaminler, fenoller, flavonoidler, glutatyonin ve endojen metabolitleridir. Bitki türevli antioksidanlar singlet ve triplet oksijen kuancı, serbest radikal gidericisi, peroksit parçalayıcı, enzim inhibitörleri ve sinerjistler olarak görülürler [13]. Sebze ve meyveler birçok antioksidan bileşik içerirler [14,15]. Bu antioksidan bileşikler, tohumlarda, yapraklarda, çiçeklerde, köklerde ve kabuklarda bol miktarda bulunmaktadır [16]. Yapılan araştırmalarda bol miktarda sebze ve meyve tüketimi sonucu, hastalıklara yakalanma riskinin azaldığı, kalp-damar hastalıklarında, kanser vakalarında ve ölüm oranlarında kayda değer azalmalar olduğu bildirilmiştir [17].

Bu çalışmanın amacı; Türkiye’de yetişebilen ve hastalıklara karşı çeşitli formlarında şifa amaçlı kullanılan halk bitkilerinden Sedef Otu (*Ruta graveolens*), Pelin Otu (*Artemisia absinthium*), Civanperçemi (*Achillea millefolium*)’nin Balkanlarda yetişen türü Kunitsa otu ve Adaçayı (*Salvia officinalis*)’nin Balkanlarda yetişen türü Cığertaze Otu bitkilerinin belirli sıcaklıkta kurutularak hazırlanan farklı çözeltilerdeki ekstraktlarında antioksidan kapasite belirlemek adına araştırma yapmak, bulunan fenolik bileşiklerin miktarı ve profili hakkında bilgi sahibi olmaktır. Şifa amaçlı da kullanılan birçok bitkinin fenolik açıdan zenginliği ve antioksidan aktivite taşıdığı bugüne dek birçok yayında yer almıştır [18-25].

Literatürde yer alan metotlar kullanılarak bu bitkilerin fenolik bileşikleri hakkında araştırma yaparak sonuç elde etmek, kullanılan metotların optimum şartları hakkında bulgular elde etmek ve bu bitkilerin analiz sonuçlarını rakamsal olarak ifade etmek amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serbest Radikaller Hakkında Genel Bilgi

Serbest radikaller ile ilgili çalışmalar Gomberg'in 1900'larda trifenilmetil radikalının ($\text{Ph}_3\text{C}\cdot$) varlığını ispatlamasıyla başladı [26]. Serbest radikal, bir orbitalde sadece bir veya birden fazla ortaklanmamış elektron bulunduran kimyasal türlerdir [27].

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 [1].

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 hücresele koşullarda devamlı bir radikal yapımı vardır [28]. Serbest radikaller üç temel yolla oluşur:

- a) Kovalent bağların homolitik kırılması ile: Kovalent bağın kopması sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalır.
- 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 hücresele 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 metallere de ortaklanmamış elektronları olduğu halde serbest olarak kabul edilmezler. Fakat bu iyonlar reaksiyonları katalizlediklerinden dolayı serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar [29]. Normal fizyolojik şartlarda insan ve hayvan metabolizmasında üretilir. Oksijen türevi serbest radikaller proteinlere, karbonhidratlara, yağlara, nükleik asitlere, serbest radikal reaksiyonları ise plazma membranlarına büyük ölçüde zarar verebilir.

Serbest radikaller peroksidasyon denem zincir reaksiyonlarına sebep olur. Bu reaksiyon insan metabolizmasını önemli ölçüde etkiler. Bu etkilerin bazılarında kalp-damar hastalıkları, kanser vakaları, eklem kireçlenmesi gibi örnekler verilebilir [30]. Serbest radikaller; vücutta ayrıca yangı, bağışıklık sistemine ait hastalıklar, yaşlanma, nörolojik hastalıklar, ateroskleroz, hipertansiyon, iskemik hasar, karsinogenezis, mutajenezis, infeksiyöz hastalıklar, karaciğer hastalıkları, akciğer hastalıkları, göz hastalıkları ve ürolojik hastalıklar gibi hastalıklara da neden olabilir [8].

Oksijen radikalleri, buldukları ortamda çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenlerle zorunlu metabolik reaksiyonlar sonucunda oluşan en önemli serbest radikaldir. Bunlar arasında süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\cdot -}$), hidroksil radikali (OH^{\cdot}) ve radikal olmayan hidrojen peroksitin (H_2O_2) özel yerleri vardır, bunlar reaktif oksijen türleri (ROT) olarak bilinirler. Biyolojik sistemlerdeki oksijenden oluşan radikallerdir en önemli serbest radikallerdir. Serbest oksijen radikali reaksiyonlarında temel işlevi, oksijenin kendisi, süper oksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve geçiş metallere iyonları gösterir [11]. Oksijen atomunun toplam sekiz elektronundan, dış yörüngede bulunan iki tanesi eşleşmemiştir. Moleküler oksijen (O_2), iki tane eşleşmemiş elektronu bulduğundan kendisi de bir radikaldir. Her iki atom denge halinde

olduğundan bu oksijen molekülünün reaktif olma özelliği yoktur ve bundan dolayı oksijen, diğer serbest radikallerle kolaylıkla reaksiyona girer. Oksijen en son suya indirgenir. Mitokondriyal elektron transport zinciri tarafından gerçekleştirilen bu süreçte, %1–2 oranında moleküler oksijen kaçağı meydana gelir. Bu oksijenin redüksiyonu ile süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^{\cdot}) gibi reaktif ürünler açığa çıkar. Bu radikaller oksijenin toksik etkisinin gerçek nedenini oluştururlar [31].

Tablo 2.1. Serbest radikaller ve serbest radikal üreten bazı türlerin özellikleri (Halliwell, 1994).

Adı	Simgesi	Özelliği
Hidrojen radikali	H^{\cdot}	Bilinen en basit radikal
Hidroksil radikali	OH^{\cdot}	En reaktif oksijen metaboliti radikali. İnsan vücudundaki tüm moleküllere saldırır.
Süperoksit radikali	$O_2^{\cdot-}$	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü
Hidrojen peroksit	H_2O_2	Reaktifliği düşük, moleküler hasar özelliği zayıftır
Singlet oksijen	O_2	Yarılanma ömrü kısa, güçlü oksidatif form
Perhidroksi radikali	HO_2^{\cdot}	Lipidlerde hızlı çözünerek lipid peroksidasyonunu artırır
Peroksil radikali	ROO^{\cdot}	Perhidroksile oranla daha zayıf atkilidir, lipidlere lekolize olur
Triklorometil radikali	CCl_3^{\cdot}	CCl_4 metabolizması ürünüdür, karaciğerde üretilen bir radikaldir
Tiyil radikali	RS^{\cdot}	Sülfürlü ve eşleşmemiş elektron içeren türlerin genel adıdır
Alkoksil radikali	RO^{\cdot}	Organik peroksitlerin yıkımı ile üretilen oksijen metabolitidir
Azot monoksit	NO	L-argininden <i>in vivo</i> üretilir
Azot dioksit	NO_2	NO^{\cdot} in oksijen ile reaksiyonundan üretilir. Kirli hava, sigara dumanı vb.de bulunur.

Reaktif oksijen ve azot türleri insan vücudunda çeşitli şekillerde meydana gelirler:

1. Hücrenin normal solunumu sırasında yan ürün olarak reaktif oksijen ve azot türleri oluşur.
2. Süperoksit ve hidrojen peroksit miktarı, bazı biyomoleküllerin (adrenalin, dopamin, tetrahidrofolat, sitokrom P450 ve elektron transport zincirlerinin bazı bileşikleri) oksijen tarafından doğrudan oksidasyonu ile artabilir [32].
3. Vücudumuz, doğal ve insan kaynaklı radyasyona maruz kalabilir. Yüksek enerjili elektromagnetik ışın, suyu parçalayabilir ve hidroksi radikali oluşturur [33]. Reaktif oksijen ve azot türleri dışarıdan da organizmaya alınabilirler. Sigara dumanının ana bileşiği NO₂'dir. NO₂'in sigara olefinleri ile reaksiyona girmesiyle karbon merkezli radikallerin oluştuğu düşünülmektedir. Ayrıca sigara içimi nötrofilleri aktive ederek dolaylı olarak serbest radikal üretimini artırmaktadır [2].

Tıp ve biyolojide serbest radikallerin rolü ve önemi ile ilgili çalışmalar bir hayli fazladır [34, 35]. Bununla beraber tıpta, biyolojide, toksikolojide ve gıda ile farmasötik sanayinde serbest radikaller gittikçe artan yoğun bir ilgi alanına da sahip olmaktadır. Lipit peroksidasyonunun serbest radikalik reaksiyonları, gıda endüstrisinde imalat prosesleri boyunca karşılaşılan en önemli sorunlardan biridir. İmalatçılar, antioksidanları kullanarak, lipit içeren gıdaların oksidasyonunu yavaşlatmayı hedeflerler. Bunun yanı sıra biyomedikalci ve klinisyenler de organizmayı, reaktif oksijen türleri tarafından oluşan hasara karşı korudukları için antioksidanlara ilgi duymuşlardır [17].

2.2. Antioksidanlar Hakkında Genel Bilgi

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 [18]. Diğer bir tanımla Antioksidanlar radikal oluşumunun sınırlandırılması, radikal reaksiyonlarının sona erdirilmesi, oluşan radikallerin etkisiz hale getirilmesi ve hasarlı moleküllerin ortadan kaldırılmasından sorumlu moleküllerdir [36].

Metabolizmadaki elektron taşıma sistemleri her zaman mükemmel değildir, bazı durumlarda oksijen suya kadar indirgenemez ve ortamı bu halde terk eder. Oksijen reaksiyonunu tam olarak gerçekleştirememiştir ki bunu tamamlayabilmek eğilimi ile her türlü hücresel maddeye eğilim gösterir ve hücreye girerek çok tehlikeli reaktif oksijen türlerini oluşturur. Hücresel maddeye eğilimden kasıt elektron alıp elektron verebilme ve bu durumlarda da negatif, pozitif ya da nötr olabilmesidir [37]. Oksijenin bu şekilde davranışına karşılık metabolizma kendi antioksidan sistemini geliştirmiştir. Antioksidanlar, metabolizma veya yiyecekte düşük derişimde bulunduğu oksidasyon olayını önemli ölçüde geciktirir veya bu olaya engel olur [11].

Canlı sistemlerde bulunan bütün fizyolojik prosesler; enzim, hormon ve iz elementleri gibi farklı ajanlar tarafından yönetilen oksidasyon ve indirgenme reaksiyonlarının kompleks kombinasyonlarını içerir. Canlılarda redoks dengesinde meydana gelebilecek herhangi bir değişiklik, hücrelerin ve doku fonksiyonlarının bozulmasına sebep olabilir. Antioksidan maddeler farklı oksidasyon reaksiyonlarını düzenler ve dokularda doğal bir şekilde bulunur [17].

Reaktif oksijen türlerinin üretimi ve çeşitli antioksidan savunmaları arasındaki dengesizlik, antioksidanların yetersizliğinden ve/veya reaktif oksijen türlerin artan oluşumundan çıkan oksidatif stresle sonuçlanır [36]. Oksidatif stres durumunda reaktif oksijen ve azot türlerinin miktarında artış olur ve dolayısıyla bu ürünlerin reaksiyon hızları artar. Bu durumdan başta lipitler, proteinler ve nükleik asitler olmak üzere metabolizmada birçok sistem olumsuz etkilenir. Olumsuz etkilenen bu sistemler, diğer periferik sistemleri de etkilerler. Bu durum zincirleme olarak devam eder. Bu durum radikalik zincir reaksiyonu sonlanıncaya kadar antioksidan sistem tarafından prosesin bir yerinde devam eder. Aksi durumda bu reaktif türler hücrenin

doğrudan ya da dolaylı olarak ölümüne sebep olurlar [38]. Antioksidanların oksidatif reaksiyonlara etkisi farklı şekillerde olabilir:

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

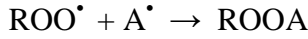
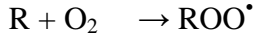
b) ROT'ları yakalayıp nötralize eden antioksidanlar: Flavonoidler, α -tokoferol, askorbik asit, metiyonin, ürik asit, β -karoten, indirgenmiş glutatyon, mukus gibi. Bu tür antioksidanlar radikalik zincir reaksiyonunun başlamasını inhibe eder veya zincir reaksiyonunun ilerlemesine engel olarak radikalik 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 [18].

Doğal kaynaklı antioksidanlar tahıllarda, baklagillerde, meyvelerde, şifalı bitkilerde ve bitki kaynaklı içeceklerde bol miktarlarda bulunurlar [39]. Bu kaynaklarda bulunan antioksidanlar; tokoferoller, flavonoidler, fenolik asitler gibi fenolik bileşikler, alkaloid, klorofil, protein, amin gibi azotlu bileşikler, polifonksiyonlu organik asitler ve karotenlerdir [17]. Bunların yanında sistein, metiyonin, histidin, triptofan ve lizin gibi aminoasitler ile sülfürlere zengin olan tiyoredoksin proteini de antioksidan özellik gösterirler [40].

Zincirleme reaksiyon teorisine göre, oksijen ile otokside olabilen madde oksijenle birleşmekte ve bu şekilde meydana gelebilen etkileşmiş peroksil radikal ve molekülleri enerjilerini maddenin yükseltgenebilen diğer moleküllerine aktararak besinlerdeki oksidasyon devam etmektedir [41]. Antioksidanlar bu zincir reaksiyonunu kırıcı rol oynarlar. Yani bu bileşikler aktivasyon enerjisini kabul eder fakat bu enerjiyi başka moleküle aktaramazlar. Bu şekilde bir antioksidan molekülün araya girmesiyle otoksidasyona uğraya bilen maddenin birçok molekülü yükseltgenmekten kurtulabilir.

Antioksidanların etki mekanizmasını şematik olarak göstermek gerekirse;



(AH: Antioksidan molekülü, A^{\bullet} Antioksidan Radikali)

Radikalik reaksiyon zincirini kırmaları sırasında kendileri yükseltgenerek bozulan antioksidanlar bu olayı yükseltgenebilen maddeler olduğundan gerçekleştirirler. Bu nedenle antioksidanlar yalnız belirli süre için yükseltgenebilen maddeyi koruyabilir ve belirli bir değerden sonra madde, ortam şartlarında antioksidan yokmuş varsayıp yükseltgenmeye devam eder [11].

Antioksidanlar, reaksiyon mekanizmalarına göre birincil ve ikincil antioksidanlar olarak ikiye ayrılırlar. Bazı antioksidanlar ise birden fazla aktivite mekanizması gösterirler ve bunlar çok fonksiyonlu antioksidanlar olarak adlandırılırlar. Birincil antioksidanlar (tip-1 veya zincir kırıcı antioksidanlar) otooksidasyonun başlangıç aşamasını erteleyen veya engelleyen ya da otooksidasyonun ileri aşamasını yarıda kesen serbest radikal alıcılarıdır [42]. Bunlara ilaveten birincil antioksidanlar; yeni oksidasyon zincirleri başlatan, yeni radikal üretiminin hızını düşürürler. Hidroperoksitleri indirgeyerek (glutatyon, peroksidaz, katalaz gibi) veya transisyon metal iyon katalizörlerini ayırarak (transferrin) etki edebilirler [41].

İkincil (tip-2 veya koruyucu antioksidanlar) antioksidanlar çok çeşitli reaksiyon mekanizmalarına sahiptirler. Bu antioksidanlar oksidasyon hızını yavaşlatırlar, fakat serbest radikalleri daha kararlı ürünlere dönüştürmezler. İkincil antioksidanlar prooksidan metallerle kelat yapabilirler ve onları deaktive edebilirler, hidroksiperoksitlerin radikal olmayan türlere parçalanmasını sağlayabilirler, singlet oksijeni deaktive edebilirler, ultraviyole radyasyonu absorbe edebilirler veya oksijen giderici olarak davranabilirler. Bu antioksidanlar, genellikle birincil antioksidanların

aktivitesini arttırlar. Sitrik asit, askorbik asit, askorbil palmitat, lesitin, tartarik asit, EDTA ve β -karoten ikincil antioksidanlara örnek olarak verilebilir [42].

Antioksidan tayin ölçümlerinde bazı ayırımlara önemle üzerinde durulması gerekir: Antioksidan kapasite ve antioksidan aktivite terimlerinin tanımları ve işlevleri çoğu zaman birbirleri yerine kullanılır fakat gerçekte anlamları birbirlerinden oldukça farklıdır. Antioksidan aktivite mevcut bir serbest radikale karşılık gelen tek bir antioksidanın hız sabiti olarak kabul edilir. Antioksidan kapasitesi ise incelenen numune çözeltisi tarafından süpürülen, bir serbest radikalin molünün sayısal değeridir [11].

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 [18].

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 [43]. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarla meyve ve sebzelerin içerdiği fitonutrientlerin diyabet, obezite, katarakt ve kardiovasküler hastalıkların ve özellikle bazı kanser türlerinin oluşma riskini azalttığı gösterilmiştir [44, 45].

2.4. Bazı Antioksidan Maddeler

Askorbik Asit (C Vitamini): 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. 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 [29, 46]. C vitamininin fagositoz için de önemli olduğu gösterilmiştir; aktive nötrofillerin sebep olduğu peroksidasyona karşı plazma lipidlerini korur ve güçlü bir hipoklorat gidericisidir [47].

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, antitümörjenik rolü olduğu gösterilmiştir [48]. Domates, yeşil yapraklı sebzeler (brokoli, ıspanak vb.) turunçgiller ve patates gibi sebze ve meyvelerde bolca bulunur. C vitamini çabuk okside olduğundan pişirirken ve hazırlarken dikkat edilmeli, ihtiva eden besinlerin hafif pişirilmeli, yenilebiliyorsa çiğ olmalı ve çabuk tüketilmelidir [11].

Alfa tokoferol (E Vitamini): Doğada yaygın olarak bulunan E vitamini ailesinin ana bileşenidir. Antioksidan aktivitesi yapısındaki fenolik hidroksil grubuna sahip aromatik halkadan kaynaklanır [29]. Lipofilik özelliğinden dolayı lipid peroksidasyonuna karşı hücre membranlarının ve plazma lipoproteinlerinin en önemli zincir kırıcı antioksidanıdır [29, 47].

E vitamini alfa, beta, gama ve delta tokoferolleri içerir. Alfa tokoferol önemli bir antioksidandır ve buğday, mısır, darı, pirinç gibi tahıllarda fazla oranda bulunur. İlaveten çeşitli yağlarda; ayçiçek yağı, mısırözü yağı, pamukyağında, ceviz, badem ve yerfıstığı gibi kuru yemişlerde ve yeşil sebzelerde bulunur. E vitamini ısıya dayanıklıdır, böylece pişirilme gibi durumlarda bozunmaz. E vitamini haricinde,

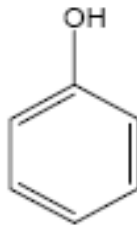
farklı maddelerde bulunan tokoferoller ise çoğu zaman bozunabilir. Yağda kızartma ve tahılların öğütülmesi esnasında E vitaminleri de bozunacağından, E vitamini içeren besinler yağda kızartılmadan, tahıl ürünleri ise kepekli olarak tüketilmelidir [11].

Beta-caroten (A Vitamini): Bitkilerde yaygın şekilde bulunan doğal renk pigmentleridir. Fotooksidatif proseslere karşı bitkileri korur. En bilineni A vitamini öncüsü olan β - karotendir [47]. β -karoten reaktif azot türlerini gidermede C ve E vitaminleri ile sinerjik etki gösterir [18]. Havuç, ıspanak ve brokoli gibi yeşil yapraklı sebzeler ile kayısı ve şeftali gibi meyvelerde fazlasıyla bulunur. Vücutta depolanarak A vitaminine de dönüştürülen kırmızımsı-turuncu bu pigment güçlü bir antioksidandır [11].

2.5. Fenolik Bileşikler

2.5.1. Fenolik bileşikler hakkında genel bilgi

Fenolik maddeler doğal antioksidanların en önemli gruplarını oluştururlar. Bunlar bitkilerin tüm kısımlarında görülen polifenolik komponentlerdir, en yaygın bitkisel fenolik antioksidanlar flavonoidler, sinamik asit türevleri, kumarinler, tokoferoller ve fenolik asitlerdir. Bunların besinlerde bulunan ve kolaylıkla oksitlenebilen maddeleri oksidasyondan korudukları bilinmektedir [49]. Fenolik bileşikler bir ya da daha çok fenolik grubun aromatik halkaya direkt bağlanmasıyla oluşur.



Şekil 2.1. Fenol

Polifenoller birden fazla hidroksil grubun bir ya da daha fazla benzen halkasına bağlanmasıyla oluşur. Fenolik terimi çok geniş ve çeşitli bileşikleri kapsar,

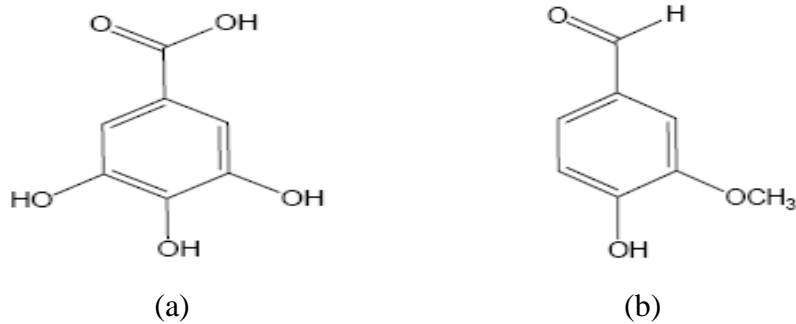
gruplandırılması da çok çeşitlidir [11]. Harborne ve Simmonds (1964) moleküldeki karbon sayılarına göre bir sınıflandırma yapmıştır:

Tablo 2.2. Fenolik bileşiklerin karbon sayılarına göre sınıflandırılması

Yapısı	Sınıfı
C ₆	basit fenolikler
C ₆ -C ₁	fenolik asitler ve ilgili bileşikler
C ₆ -C ₂	asetofenonlar ve fenilasetik asitler
C ₆ -C ₃	sinamik asitler, sinamil aldehitler sinamil alkoller
C ₆ -C ₃	kumarinler, izokumarinler, chromene
C ₁₅	chalkone, aurone, dihidrochalkone
C ₁₅	flavan
C ₁₅	flavanone
C ₁₅	flavanonol
C ₁₅	antosiyanidinler
C ₁₅	antosiyanidinler
C ₃₀	biflavon
C ₆ -C ₁ -C ₆ , C ₆ -C ₂ -C ₆	benzofenonlar, xanthone, stilbene
C ₆ , C ₁₀ , C ₁₄	quinone
C ₁₈	betasiyaninler

2.5.2. Fenolik asitler ve aldehitler

Hidroksi benzoik asitler, bir fenole bağlı karboksil grupları ve bunların substituentleridir [11].

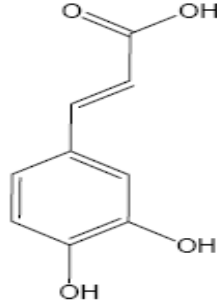


Şekil 2.2. a) Gallik asit (karboksil grup vardır)

b) Vanilin (aldehit grubu vardır)

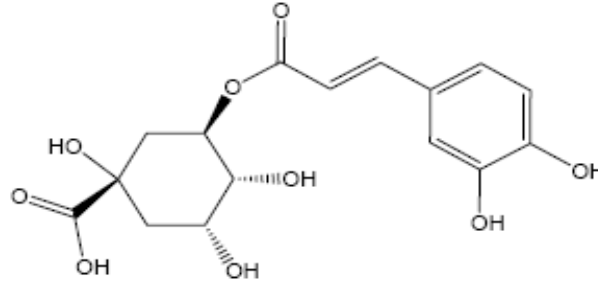
2.5.3. Sinamik asitler

6 genel sinamik asit vardır: Sinamik asit, p- kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit, 5-hidroksiferulik asit ve sinapik asit. Bunların en az üçü tüm bitkilerde bulunabilir.



Şekil 2.3. Kafeik asit

Sinamik asitler bitkilerde genellikle quinic asit, shikimic asit ve tartarik asitin esterleri şeklinde bulunur. Örneğin klorojenik asit; kafeik asit ve quinic asitin esteridir [11].

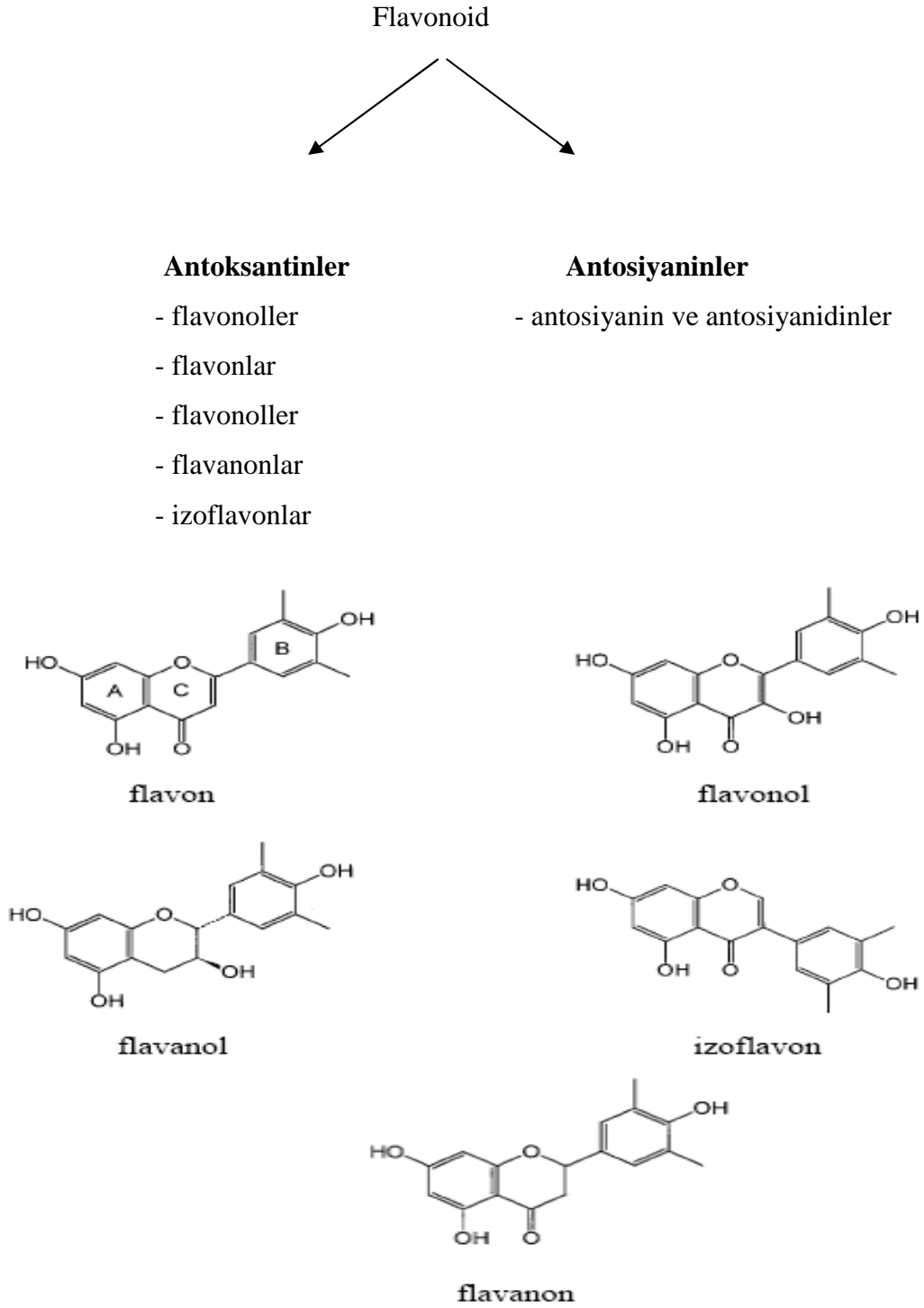


Şekil 2.4. Klorojenik asit

2.5.4. Flavonoidler

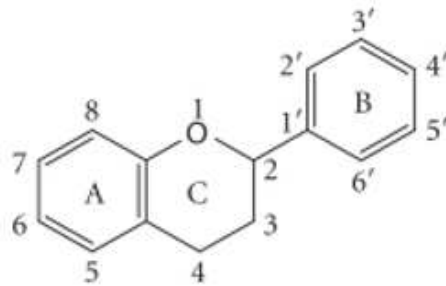
Flavonoidler iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan difenil propan ($C_6-C_3-C_6$) yapısındaki fenolik bileşiklerdir [17]. Ayrıca bitkilerin sekonder metabolitleri olan polifenolik bileşiklerdir [18]. Fenolik yapılarından dolayı antioksidan özellik göstermektedirler ve bazı flavonoidler, etkili bir şekilde hücreleri ve dokuları reaktif oksijen türlerinin olumsuz etkilerinden korur [50]. Flavonoidler genel yapı itibarıyla 3 büyük sınıfta toplanabilirler. Yapıdaki C_3 grubu sınıflandırılmayı sağlar. Bu sınıflandırma şöyledir: Chalkone, aurone ve flavonoidler [51]. Biz çalışmamız gereği flavonoidleri kapsamlı inceleyeceğiz. Günümüzde

bitkilerden izole edilen 4000'den fazla flavonoid bilinmektedir. Halka yapılarına göre flavonoller, flavonlar, flavanonlar, antosiyaninler, kateşinler ve izoflavonoidler olarak sınıflandırılır [52].



Şekil 2.5. Antoksanin üyelerinin kimyasal yapıları

Flavonoidlerin biyokimyasal aktiviteleri kimyasal yapısına ve bu yapının farklı varyasyonlarına bağlıdır. Yapısı fenolik halka ve furan halkalarından ibaret olan flavonoidler, benzo- γ -furan türevleridir. Gıdasal flavonoidler, hidroksil, metoksi ve glikozid yan gruplarının dizilimi ve A ile B halkaları arasındaki konjugasyona göre çeşitlilik oluşturur. 6 karbonlu A, B ve C halkalarından oluşan heterosiklik bileşikler, hetero halkanın yükseltgenme derecesine göre farklılık gösterir. Aromatik halkalar A ve B, hetero halka ise C olarak tanımlanır. Karbon atomları C halkasındaki oksijenden başlayarak numaralandırılırken, B halkasındaki karbon atomları üssü (') rakamlarla numaralandırılır. Yenilebilir bitkilerde flavonoidler en çok 3-O-glikozidleri ve polimerleri şeklinde bulunur. Lipid peroksidasyonunu engelleme, reaktif oksijen türlerini içeren biyolojik reaksiyonları azaltma gibi nitelikleri vardır. Flavonoidlerin glikozid birimleri çoğunlukla glukoz olup bunun yanı sıra glukoramnoz, ramnoz, arabinoz ve galaktoz da bulunabilmektedir [53]. Flavonoidler, aromatik halkalara bağlı antioksidan aktivitelerini oluşturan birçok fenolik hidroksil grupları içerirler [54].

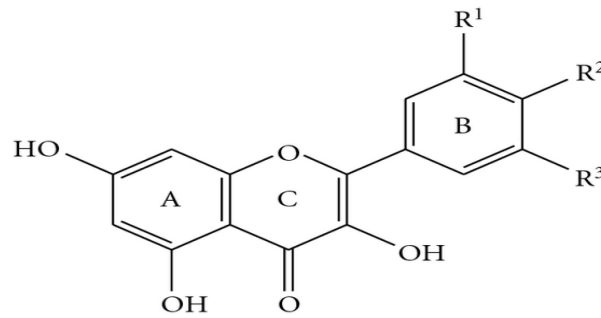


Şekil 2.6. Flavonoidlerin genel yapısı

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 [55, 56]. 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 [57].

Doğal antioksidanların bir çoğu özellikle de flavonoidler farklı biyolojik etkilere sahiptirler. Meyve ve sebze tüketimiyle kanser ve kalp-damar hastalıkları arasındaki ters orantı meyvelerde bol miktarda bulunan flavonoidlerden kaynaklanmaktadır [58, 59]. Japonya’da yürütülen bir çalışmada flavonoid (quercetin, myricetin, kaempferol ve luteolin) alımının artmasıyla plazma total kolesterol ve LDL- kolesterol konsantrasyonlarının azaldığı görülmüştür. Finlandiya’daki bir başka çalışmada ise quercetin’den zengin elma ve soğan tüketimi arttığında kronik mortalite azalmış olarak bulunmuştur [60].

Flavonların heterosiklik halkaları bir katon grubudur. En sık karşılaşılan doğal flavonlara kaempferol, kuersetin, myricetin örnek verilebilir [51]. Kuersetin flavonoidlerin en önemli bileşiği olup, bitkilerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşendir. Soğan, salatalık, brokoli, domates, çay, kırmızı şarap, yemişler, zeytin yağı ve elma kabuğunda bol miktarda bulunur. Mirisetin kızılıcık, üzüm ve kırmızı şarapta mevcuttur. Kaempferol ise pırasa, brokoli, marul, greyfurt ve siyah çayda bulunur [61].



	R^1	R^2	R^3
Kaempferol	H	OH	H
Kuersetin	OH	OH	H
Myricetin	OH	OH	OH

Şekil 2.7. Kaempferol, Kuersetin, Myricetin

Flavonun dihidroksi türevi flavanon'dur. En yaygın olarak naringenin, naringin, hesperidin ve hesperetin örnek verilebilir. Flavonların izomeri olan izoflavonlara ise genistein, daidzein ve bunların glikozidleri olan genistin ve daidzin örnektir. Flavonollerin C halkasında bulunan çifte bağlı oksijen atomunun yerine -CH₂ grubu bağlandığında flavanol oluşur. Flavanol, flavonların indirgenmiş türevleridir. En önemlileri kateşin ve epikateşindir [62].

2.6. Çalışılan Bitkilerin 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. Tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi Türkiye'de de bitkilerin tıbbi açıdan önlemleri araştırılmaktadır ve bu bitkiler birçok hastalığa çare olarak geliştirilmektedir.

Çalışmamızda kullanılan Sedef otu (*Ruta graveolens*), Pelin Otu (*Artemisia absinthium*), Civanperçemi (*Achillea millefolium*)'nin Balkanlarda yetişen türü Kunitsa otu ve Adaçayı (*Salvia officinalis*)'nin Balkanlarda yetişen türü Ciğertaze Otu halk arasında tedavi amaçlı kullanılan bitkilerdendir. Bu bitkilerin botanik adları ve familyaları aşağıdaki tablo 2.3'de verilmektedir.

Tablo 2.3. Çalışmada kullanılan bitkiler

Türkçe Adı	Latince Adı	Familyası	Kullanılan Kısım
Sedef otu	<i>Ruta graveolens</i>	Rutaceae (Sedefotugiller)	Yaprak
Pelin Otu	<i>Artemisia absinthium</i>	Asteraceae (Papatyagiller)	Yaprak
Kunitsa Otu (Civanperçemi)	<i>Achillea millefolium</i>	Compositae (Bileşikgiller)	Yaprak
Ciğertaze Otu (Adaçayı)	<i>Salvia officinalis</i>	Lamiaceae (Ballıbabagiller)	Yaprak

2.6.1. Sedef otu

Sedef otu (*Ruta graveolens*) Sedefotugiller (*Rutaceae*) familyasının örnek bitkisidir. Anayurdu bilinmemekte, Avrasya ve Kanarya adalarında yabani olarak yetişmekte, yaz-kış yeşil kaldığı için Avrupa ve ülkemizde bazı bahçelerde sevilerek üretilmektedir. 60-100 cm boylanabilen, dayanıklı çalıdır. Yuvarlak kesitli, mavi-yeşil renkli gövdesi bitkinin ikinci yılında odunsulaşır. Parçalara bölünmüş, küçük ve yuvarlak yaprakları da mavi-yeşil renkli, acı tatlı ve kokulu, içerdiği yağ benekleri nedeniyle benekli görünüşlüdür [63, 64].



Şekil 2.8. Sedef otunun çiçekli, toprak üstü kısmı



Şekil 2.9. Sedef otunun çalışmalarda kullanılan yaprak kısmı

Bitkinin yeşilimsi sarı renkli gösterişli çiçekleri yaz sonuna doğru açar. Olgunlaşan çiçekleri siyah renkli ve hilal biçimli tohumlara dönüşür. Sedef otu bitkisi güneşli yerleri sevmesine karşın yarı gölgeli yerlere de dayanır. Suyu iyi akıntılı alkalik toprakları yeğler. Bitki, tohumuyla çoğalır ama ağır ağır gelişir. Daha iyisi ilkbaharda bitkinin bölünerek ya da yaz sonunda gövde kalemleri alınarak çoğaltılmasıdır. Sedefotu bitkisinin toprak üstü bölümleri uçucu yağ, alkaloidler, tanen, reçine, rutin adı verilen glikozit ile pektin içerir. Tohum ve yaprakları az miktarlarda tüketilmek koşuluyla bazı ülkelerin mutfağında yer alır [64].

Antik çağlarda hastalıklara karşı yararlarıyla ün kazanan sedef otuna Latince hastalıktan kurtulma anlamına gelen Ruta adı verilmiştir. Bitkinin bazı önemli tıbbi etkileri şöyle sıralanabilir: Mide rahatsızlıklarına iyi gelir. İştahı açar ve sindirimi kolaylaştırır. Gaz söktürücüdür. Yatıştırıcıdır. Spazmları çözer. Spazmla oluşan öksürüğü keser. Kalp çarpıntısı ve endişeden doğan sorunları en aza indirger, isteri durumunu yok eder. Âdet söktürücüdür. Kadınlarda aybaşı dönemini kolaylaştırır ve düzene sokar. Uyarıcıdır. Terleticidir. Solucan (kurt) düşürücü etkisi vardır. Romatizma ağrılarına karşı etkili olur. Karın ağrılarına karşı etkilidir. Sedef otunun taze yapraklarından birkaçı ağızda çiğnenirse, yüksek tansiyondan oluşan baş ağrısını geçirir. Tüm bu rahatsızlıklara karşı kullanım kürleri farklıdır ve özeldir. Bu kürlerin kullanılmasında dikkat edilmelidir. Çünkü yüksek dozda alınırsa zehirlenmelere yol açabilir. Ayrıca Sedefotu gebelikte kesinlikle kullanılmamalıdır çünkü çok etkili bir çocuk düşürücüdür [64].

2.6.2. Pelin otu

Pelin otu (*Artemisia absinthium*), papatyagiller (*Asteraceae*) familyasından Anadolu'da doğal olarak bulunan bir bitki türüdür. Anayurdu Avrupa olan; ülkemizde Kuzey, İç ve Güney Anadolu'da yabani olarak yetişen çok yıllık dayanıklı otsu bitkidir.

Boyu 120 cm'ye kadar uzayabilen bu bitki grimsi ya da beyazımsı yeşil renkli, parçalı yapraklıdır. İtirli bir bitkidir. Temmuz-ağustos aylarında açan açık sarı küçük çiçekleri salkımlar oluşturur. Silindirik yapılı yassı, küçük ve gri renkli meyvelerinin içinde kahverengimsi gri minik tohumları bulunur. Pelin döktüğü tohumlarıyla çoğalır ya da sonbaharda alınan gövde kalemleriyle çoğaltılır. Pelinin küçük yapraklı dalları özel kokulu ve çok acı lezzetlidir. Uçucu yağ, absintin gibi acı maddeler, antiosidan özellik gösteren flavon ve pineni içerir [64].



Şekil 2.10. Pelin otunun çiçekli toprak üstü kısmı



Şekil 2.11. Pelin otunun çalışmalarda kullanılan yaprak kısmı

Dağlarda yetişen tadı acı olan bu bitki ilaç-ıçki yapımında kullanılır. Oldukça acı bir ottur. Pelin isminin anlamı ise güzel dokulu bitkidir. Bitkinin bazı önemli tıbbi etkileri şöyle sıralanabilir: Pelin Otu Acı lezzetiyle iştah açıcıdır. Kuvvet verici, bağırsak gazlarını giderici flavon glikozitleri ile idrar söktürücü ayrıca ateş düşürücüdür. Tembel ve mide suyu azlığı ile seyreden gastritli midelerde mide tonosunu ve salgılarını artırarak faydalı olur. Sindirimi zor olan besinlerin hazmını kolaylaştırır. Safra kesesi çalışması ve safra yapımını artırır. Tonik etkisiyle kan dolaşımını artırdığından vücuda zindelik verir. Bu sebeple ameliyat ve hastalıkların nekahat devirlerinde ve grippe direnci arttırmak için verilir. Tüm bu rahatsızlıklara karşı kullanım kürleri farklıdır ve özeldir. Bu kürlerin kullanılmasında dikkat edilmelidir. Çünkü Pelin, geçmiş yıllarda kurt düşürücü, adet söktürücü ve çocuk düşürücü etkilerinden yararlanılmak üzere yüksek dozlarda kullanılırdı. Ancak, yapılan dikkatli analizler, bitkinin zehirleyici ve sinir sistemini yıkıma uğraticı etkilerini saptadığından, bitkinin bu amaçlarla kullanımı da terk edilmiştir [65].

2.6.3. Kunitsa otu (Civanperçemi)

Kunitsa otu, Civanperçemi (*Achillea millefolium*) Bileşikgiller (*Compositae*) familyasının alt grubu olan Achillagillere dahil olup bu grup içinde en yaygın olarak yetişen ve kullanılan türdür. Günümüzde bilinen iki yüzün üzerinde türü vardır [64]. Civanperçemi bitkisinin halk arasında yöreden yöreye değişen, birden fazla bilinen

ismi vardır. Türkiye'de de 40 kadar civanperçemi türü bulunmakta ve bunların birçoğu yöresel olarak adlandırılıp kullanılmaktadır [66]. Balkanlarda yetişen türleri Kunitsa otu (Kunica) diye anılır.

Güneşin bol olduğu bölgelerde ve azotça zengin topraklarda yetişenleri en uygun olanlarıdır. Nemli toprak bu bitki için uygun değildir. Civanperçemi otu 20-100 cm boyunda dikine yükselen, yuvarlak, içi dolu gövdeli, türüne göre tüylü veya sık tüylü bir bitkidir. Köklerinin bulunduğu yerden çevresine kollar yayarak kısa sürede olduğu yerde kümeler oluşturur. Yaprakları gövdeye oturmuş olup her biri 20-40 adet yapraktan meydana gelir. Yaprakları ilkbaharda koyu yeşil, yazın sarımsı yeşil renkli, yaprakçıkların kenarları dişli, karşılıklı dizilmiş olup sonda tek bir tane bulunur. Çiçekleri oldukça küçük, topluca bir arada bir demet veya kandil şeklinde, taç yaprakları beş adet, beyaz ters kalp şeklinde, ortasında 5-20 adet borucuktan meydana gelen sarımsı veya pembemsi göbek yaprakları vardır. Bileşimlerinde antioksidan özellik gösteren Flavonlar ve Flavonitler (Apigenin, Luteloin ve Quercetin glikozitler ile Rutin) bulunur [67].



Şekil 2.12. Kunitsa otunun çiçekli toprak üstü kısmı



Şekil 2.13. Kunitsa otunun çalışmalarda kullanılan yaprak kısmı

Eski bitki kitaplarında civanperçemi, tüm hastalıkların ilacı olarak nitelendirilmektedir. Bedeni temizleyici etkisi sayesinde, yıllar boyu yer etmiş hastalıkları iyileştirici etki gösterir. Civanperçemi ilaç gibi kullanılabilen, çok değerli bir şifalı ottur. Birçok bilimsel kanıtıyla alternatif tıpta, bir antiseptik (cilde ve dışarı

açılan boşlukların mukozasına dıştan uygulanarak kullanılan antimikrobik madde), antipasmodik (spazmı önleyen veya yok eden madde), astrenjan (vücutta yumuşak dokuların kasılmasını sağlayan, kanamayı ve salgılamayı kontrol altına alan madde), karminatif (mide ve bağırsaklardaki aşırı gazı yok eden madde), diyaforetik (terlemeyi arttıran madde), sindirimi kolaylaştırıcı, uyarıcı (psikiyatride; beyin ve sinir sisteminin işlevini hızlandıran kimyasal madde), tonik ve vazodilator (damar düz kasını gevşeterek damarı genişleten) olarak kullanılır. Bitkinin bazı önemli tıbbi etkileri şöyle sıralanabilir: Soğuk algınlığı, kramplar, ateşlenmeler, böbrek düzensizlikleri, diş ağrıları gibi rahatsızlıklarda ve kadınların adet dönemini düzenlemede iyileştiricidir. Safra akışını uyarıcıdır ve kanı temizler. Çay kürü şiddetli soğuk algınlıkları ve grip için, mide ülserleri için, mide krampları, apseler, travma ve kanamalar için ve iltihap azaltıcı olarak kullanılan çok iyi bir ilaçtır [66].

Yapılan araştırmalarda düzenli olarak içilen bitki çayı ile migren hastalığının tümüyle iyileştirebildiği, en iyi biçimde ve doğrudan kemik iliğini etkilediği ve orada kan üretimini düzene soktuğu görülür. Civanperçemi ayrıca, akciğer kanamalarının durdurulmasında etkilidir ve ağır kökü ile birlikte kullanıldığında akciğer kanserini iyileştirebilir [68]. Tüm bu rahatsızlıklara karşı kullanım kürleri farklıdır ve özeldir. Bu kürlerin kullanılmasında dikkat edilmelidir.

2.6.4. Ciğertaze otu (Adaçayı)

Ciğertaze otu, Ada çayı *Salvia officinalis*, Ballıbabagiller (*Lamiaceae*) familyasına ait türdür. 30-70 cm boyunda olan bitkinin menekşe renkli çiçekleri halka dizilişlidir. Karşılıklı olan beyaz keçeli yaprakları gümüş gibi parıltı verir ve acımtırak, ıtırılı bir koku yayarlar. [64]. Bileşimlerinde antioksidan özellik gösteren Flavonlar vardır. Adaçayı aydınlatılmış bileşenleri, fenolik bileşenlerin üç sınıfı şeklinde gruplandırılabilir: Fenolik asitler (kaffeik asit ve rosmarinik asit), flavonoidler (apigenin), fenolik diterpenler (karnosik asit, rosmadial) [69].

Genellikle Akdeniz Bölgesi'nde ve Ege Bölgesi'nde yetişen, başlık biçiminde çiçek açan, güzel kokulu bir bitkidir. Sadece Anadolu'da 90 kadar değişik türü yetişir. Dünyada, Orta Avrupa ve Balkanlar'da bulunur [66]. Balkanlar da doğal olarak

yetişen türüne yöresel olarak Ciğertaze otu denir. Adını karaciğer ve akciğer hastalıklarında tedavi amaçlı ‘Ciğeri tazeleyen’ anlamından alır.



Şekil 2.14. Ciğertaze otunun çiçekli toprak üstü kısmı



Şekil 2.15. Ciğertaze otunun çalışmalarda kullanılan yaprak kısmı

Tüylü ve beyazımsı bir renkte olan yapraklarının kuru çay gibi haşlanarak içildiği gibi, et yemeklerine koku ve lezzet vermek için de kullanılır. Bitki yaprakları çiçeklenme öncesi, Mayıs-haziran aylarında toplanır. Etken maddelerinin doruğa ulaştığı öğlen saatlerinde toplanan yapraklar, gölgeli ve havadar bir yerde kurumaya bırakılır. İyice kuruduktan sonra ince kıyılarak, hava almayan kaplarda saklanır [64]. Bitkinin bazı önemli tıbbi etkileri şöyle sıralanabilir: Mide bulantısını kesip, sindirimi düzenler. Karaciğer hastalıklarına şifadır. Göğsü yumuşatır, bademcik ve dişeti iltihaplarına iyi gelir. En etkili nezle ilacıdır. İçerdiği cineol gibi etkili maddeler sebebiyle öksürüğü engeller, tabii bir antibiyotiktir. Astımdaki sıkıntıları geçirir, kan temizleyici etkileri vardır. Yüksek tansiyonu düşürür, gece terlemelerin en aza indirir. Menopoz sıkıntılarını azaltır, iltihap kurutucu özelliği vardır [66].

Adaçayı sıkça içildiğinde tüm bedeni güçlendirir, kalp krizi tehlikesini azaltır ve kötürümlüklerde çok yararlıdır. Pek çok doktorun, ada çayının değerli özelliklerini artık iyice tanımış olduklarını biliyoruz. Ada çayı, hasta karaciğeri de çok olumlu etkiler, onunla ilgili tüm rahatsızlıkları giderir ve gazları yok eder. Solunum organlarını ve mideyi balgamsı salgılardan temizler, iştah açıcıdır. Mideyi ve bağırsakları rahatlatır, gazların dışkılanmasını sağlar. Kramp çözücü etkisi sayesinde,

ishalde çok rahatlatıcıdır. Sinirli ve yorgun olan kişiler ve dölyatağı (rahim) hastalığı çeken kadınlar da iyileştirici etki gösterir. Çalkalama/gargara yaparak dişeti kanamaları için kullanılır. Haricen uygulandığında, hasar ve yaraları hafifletir, cilt yangılarını tedavi eder [66]. Tüm bu rahatsızlıklara karşı kullanım kürleri farklıdır ve özeldir. Bu kürlerin kullanılmasında dikkat edilmelidir.

2.7. Antioksidan Aktivite Tayin Metotları

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 yıllarda bir hayli artmıştır. Bu artış tüketilen gıdaların antioksidan kapasitesini ve bileşiklerini öğrenmek için beslenme, sağlık ve gıda bilimi uzmanlarının ve özellikle halkın artan ilgisinden dolayıdır [18].

Bilimsel yayınlar incelendiğinde antioksidan aktivitesinin tanımlanmasında çeşitli terimler karşılaşılar. Bunlar toplam antioksidan “kapasite”, “aktivite” veya “güç” gibi tanımlardır. Antioksidan maddeyi belirlemek adına kullanılan tek bir analiz yöntemi o yöntemin özel koşullarına bağlı olarak reaksiyon göstereceğinden, bu reaksiyon sonucunu analiz edilen örneğin “toplam antioksidan aktivitesidir” diye genellemek yanıltıcı olacaktır. Bunun yerine Süperoksit giderme aktivitesi, demir iyonu indirgeme aktivitesi gibi özel terimler kullanılması önerilir [11, 70]. Her metotla elde edilen sonuçlar arasında paralellik söz konusuysa, örneğin “antioksidan aktivitesine” ait genel bir yorum yapılabilir.

Antioksidan aktivite tayin metotları sınıflandırılabilir, çalışma kapsamı gereği ET (elektron transferine) dayalı metotları ayrıntılı inceleyeceğiz:

ET temeline dayalı metotlar; antioksidan madde Fe^{3+} , $ABTS^{+}$ gibi oksidan tarafından yükseltgenerek 1 elektron antioksidandan oksidana transfer olur, bu olay oksidanın renk değişimini sağlar ve UV/VIS ile absorpsiyon değişimi ölçülür. Bu absorpsiyon değişiminin derecesi antioksidan konsantrasyonuyla orantılı olduğundan, antioksidanın indirgeyici kapasitesi tayininde kullanılır. FCR ile toplam fenolik

bileşik tayini, CUPRAC (Cu^{2+} indirgeme kapasitesi), TEAC (Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite ölçümü), DPPH kullanarak “toplam antioksidan potansiyel” ölçüm yöntemi ve FRAP (Ferrik iyonu indirgeme antioksidan gücü) metodları bu sınıfa girer [18].

Antioksidan kapasitesi belirlemek adına incelenen bir bitkideki antioksidan maddelerin moleküler farklılığı, yukarıdaki yöntemlerin sonuçları ile paralellik göstermesini engelleyebilir. Yani tek bir yöntem örneğin antioksidan kapasitesini vermeyebilir. Bitkilerin antioksidan aktivitesi seçilen metota son derece bağlıdır, bitki ekstraktlarının toplam fenolik madde içerikleri ile bitkilerin antioksidan aktivitesi arasında tam bir paralellik olmayabilir [71, 72, 73].

2.7.1. Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile toplam fenolik madde tayini

Bu yöntem farklı uygulayıcılar tarafından sürekli geliştirilmiş ve modifiye edilmiştir. Folin-Ciocalteu reaktifi (Folin Fenol Reaktifi veya Folin-Denis reaktifi) fosfomolibdat ve fosfotungstat karışımı bir reaktif olup fenolik ve polifenolik antioksidanların kolorimetrik tayininde kullanılır [74]. 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 [75].

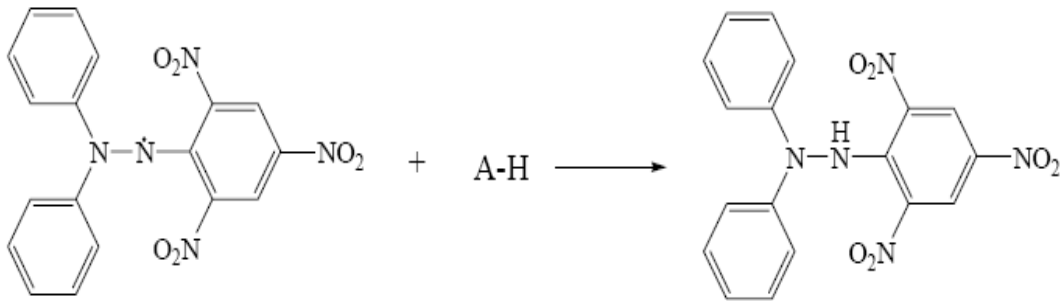
Bu yöntem suda ve organik çözümlerde çözülmüş olan fenolik yapıdaki bileşiklerin Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile alkali (bazik) ortamda renkli kompleks (sarıdan maviye dönüşüm) oluşturması esasına dayanır. Oluşan renkli kompleks (mavi renkli) 750-760 nm dolaylarında maksimum absorbanans verir [76].

Bu yöntemde elektron transferi söz konusudur ki elektron alkali ortamda bir fenolik bileşik olan fosfomolibdic / fosfotungstic asit kompleksine transfer olur. 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. Bu metod

test edilen örneğin, reaktifin oksidasyonunu inhibe etmesi için gerekli miktarını ölçer [76].

2.7.2. DPPH serbest radikali giderim aktivitesi tayini

Metot, antioksidanların serbest radikalini giderme kapasitesini belirleyen, pratik ve güvenilirliği yüksek olan bir yöntemdir. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) kararlı yapıda bir azot radikalidir, ticari olarak mevcuttur ve stabil radikallerden biridir. Fenolik yapıdaki antioksidan maddelerin aktivitelerini incelemek adına kullanılan ilk sentetik antioksidanlardan biridir. DPPH'nin etanoldeki çözeltisi mor renklidir ve 517 nm'de absorbansı ölçülür. DPPH çözeltisine antioksidanların ilave edilmesiyle, antioksidan tarafından indirgenir sularak çözeltinin rengi sarıya doğru kayar, bu yüzden reaksiyonun ilerleyişi spektrofotometre ile izlenir. DPPH'nin renginin solması antioksidan konsantrasyonu ile orantılıdır [77]. DPPH ve antioksidan madde arasındaki reaksiyon Şekil 2.16' da verilmiştir [11]:



Şekil 2.16. DPPH molekülünün antioksidan madde ile reaksiyonu

DPPH yöntemi teknik olarak basittir fakat dezavantajları da vardır. Birçok antioksidan bileşik peroksil radikalleri ile çok hızlı tepkime vermektedir, fakat DPPH ile tepkimeleri yavaştır. Örneğin askorbik asit ile 1,15 dakika ve rutin ile 103 dakikada tepkime vermektedir. Sonuç olarak antioksidan kapasitenin/aktivitenin doğru bir şekilde ifade edilemediği düşünülebilir. Ayrıca, DPPH ile antioksidan madde arasındaki reaksiyon kinetiğinin DPPH derişimi ile her zaman doğrusallık göstermediği de bilinmektedir [75, 78]. Bu sebeple antioksidan aktivite tayini yapılırken diğer metotlarla da desteklenmesi önerilir.

2.7.3. Bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini (CUPRAC)

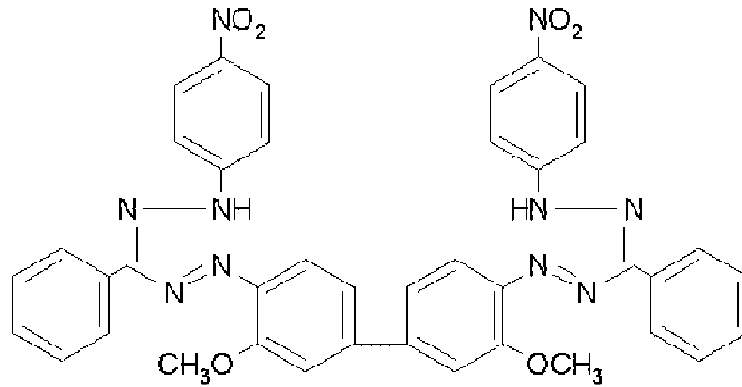
Apak ve arkadaşlarının geliştirdiği bu yöntemde, 2,9-dimetil-1,10 fenantrolin (Neokuproin-Nc)'in Cu(II) ile oluşturduğu bakır(II) neokuproin kompleksinin (Cu(II)-Nc), 450 nm'de maksimum absorbans veren bakır(I) neokuproin[Cu(I)Nc] kelatına indirgenme yeteneğinden yararlanarak antioksidan kapasite hesaplanmaktadır. Elde edilen test sonuçları Troloks[®] eşdeğeri antioksidan kapasite cinsinden, TEAC_{CUPRAC} olarak ifade edildi. Bu yöntem daha sonra kuprik iyonu indirgeme potansiyeli ölçülmek suretiyle bitki ekstralarında ve insan serumunda total antioksidan kapasite tayini için geliştirilmiş ve bakır iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity:CUPRAC) olarak isimlendirilmiştir [79]. Yeni geliştirilen CUPRAC yönteminde kullanılan kromojenik oksidasyon reaktifi olan bis(neokuproin) Cu(II) klorür ile antioksidan polifenol arasındaki reaksiyon aşağıdaki gibi gerçekleşmektedir:



Bu reaksiyonda, Ar(O)_n hidroksi grubu içeren antioksidan polifenolden oluşan kinonu ifade etmektedir. Tepkime sonunda iki proton açığa çıkmakta ve Ar(OH)_n yapısında bulunan hidroksil grubu kinon formuna dönüşmektedir. Cu(II)-Nc ise 450 nm'de maksimum absorbans veren şiddetli renk oluşumuyla birlikte Cu(I)-Nc kelatına dönüşmektedir. Bu reaksiyondan-OH grubu içeren antioksidan karakterli bileşikler 2n-e donörü olarak hareket etmektedir [80].

2.7.4. Süperoksit anyon radikali giderim aktivitesi yöntemi

Bu yöntem pH=8'e ayarlanmış tampon ortamında nikotinamitadeninükleotit (NADH) ile fenazinmetasülfat (PMS) arasındaki tepkime sonucu açığa çıkan süperoksit anyon radikalinin (O₂⁻), nitroblutetrazolyum (NBT) boyasının rengini gidermesine dayanır. Süperoksit, NBT ile reaksiyona girdiğinde önce monoformazon sonra diformazon oluşur. NBT boyası 560 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermezken diformazon bu dalga boyunda yüksek absorbans vermektedir.



Şekil 2.17. Nitro blue diformazan

Antioksidanlar oluşan $O_2^{\bullet\bullet}$ 'i gidererek NBT boyasının 560 nm'deki absorbansında azalma sağlarlar. Absorbanstaki düşüşün fazla olması antioksidanın $O_2^{\bullet\bullet}$ 'i çok iyi giderdiğini göstermektedir [81].

Antioksidan aktivite hakkında yapılan çalışmaların bir kısmına yer verildiğinde şu kaynaklar sıralanabilir:

Günlük beslenmemizde en az bir kaçını tükettiğimiz üzüm, nar, elma, üzümü meyveler, adaçayı, biberiye, kekik, brokoli, domates, soğan, sarımsak, havuç, ıspanak, karnabahar, lahana, kereviz, çay, yeşilçay, şarap, siyah üzüm suyu gibi çeşitli meyve, sebze ve içeceklerle yapılan araştırmalarda, özellikle flavonoid ağırlıklı olmak üzere, içerdikleri fitoözelliklerin yüksek antioksidan aktiviteler gösterdiği bildirilmektedir. Bu nedenle vücudun endojen savunma sisteminin diyetle alınacak antioksidan bileşikler ile desteklenmesi gerektiği bildirilmektedir [19- 24].

Biberiye, adaçayı, kekik, mercanköşk, zencefil ekstraktlarının mısır, balık, zeytin, fındık, ayçiçeği, soya yağları üzerindeki oksidasyon stabilitesi incelenmiş ve etkili sonuçlar bulunmuştur [82].

Son yıllarda yapılan bilimsel çalışmalar, insan beslenmesinde meyve ve sebze tüketimi ile kansere yakalanma riski arasındaki ters ilişkiyi ortaya koymuştur. Bu sebeple meyve ve sebzelerin fitokimyasal profilinin-kimyasal parmakizinin

çıkarılması ve antioksidant kapasitelerinin belirlenmesi bazı spesifik kanser türlerindeki klinik çalışmalara ışık tutması açısından önem arz etmektedir [83, 84].

Shon ve ark. sıcak su ve metanol ekstraktlarının bütanol, etil asetat ve kloroform ekstraktlarından daha iyi DPPH radikal giderdiğini bildirmişlerdir [85]. Miliauskas ve ark. bazı aromatik bitki ekstraktlarıyla yaptıkları çalışmada ise aseton, metanol ve etil asetat ekstraktları arasında DPPH radikali gidermede en etkili ekstraktın metanol ekstraktı olduğunu bildirerek, antiradikalik aktiviteyi TFC içeriği ile ilişkilendirmişlerdir [72].

Benzer şekilde Bektaş ve arkadaşları, nanenin çeşitli ekstraktlarının (hexan, diklormetan, metanol) ve esansiyel yağının antioksidan aktivitesini ve kimyasal bileşimini incelemişler ve ekstraktlar arasında en güçlü aktiviteyi metanol ekstraktının gösterdiğini buldular [86].

Başka bir çalışmada; dereotu toplam fenolik madde değerleri su ekstraktında $3,12 \pm 0,06$ mg GAE/g taze bitki [87], metanol ekstraktında $12,5 \pm 0,3$ mg GAE/g kurutulmuş bitki [88], değerlerindeki verilere rastlanmıştır.

Bunea ve arkadaşları ıspanağın karotenoid ve toplam fenolik madde içeriğini araştırdılar; ve ıspanağın toplam fenol madde içeriğinin 2088 mg GAE/kg olarak buldular [89].

Lu ve arkadaşları, *Salvia officinalis* (adaçayı) polifenollerinin antioksidan aktivitelerini, flavon glikozid içeriklerini ve rosmanirik asit türevlerinin DPPH ve süperoksit radikallerini (SOD) temizleme kapasitelerini değerlendirdiler [90].

BÖLÜM 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Araç-Gereç ve Kimyasal Maddeler

3.1.1. Bitkisel materyal

Deneyleerde kullanılan bitkiler Sakaryanın Yazlık köyünden kökleri ile alınmış ekilip yetiştirilmiş ve analizlerde kullanılmıştır.

3.1.2. Kimyasal maddeler

Deneyleerde kullanılan tüm kimyasal maddeler analitik kalitededir. Tüm deneyleerde kullanılan su ise bidistile sudur. Gallik asit (GA), kuarsetin (QE) Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Germany), etanol, metanol, etil asetat, aseton, asetikasit Merck (Darmstadt, Germany) firmalarından temin edilmiştir. Folin-Ciocalteu's phenol reaktifi, sodyum karbonat gibi diğer tüm kimyasallar Merck (Darmstadt, Germany) firmasından temin edilmiştir.

3.1.3. Kullanılan aletler

Shimatzu UV-2401 PC UV-VIS recording spectrophotometer UV, RÜCHI Rotavapor ve B-114 RÜCHI Waterbath B-480 Evaporatör, buzdolabı (Arçelik), hassas terazi (AND GR-200), vorteks karıştırıcı (Votex 2 GENIE ve SHAKER QL-861), blendır (Simbo), pHmetre (HANNA), santrifüj (nüve-NF200, ROTINA 420-HETTİCH), otomatik pipet (BIOHIT PROLINE ve BRAND TRANSFERPETTE S-100- 1000MICROLT), etüv (nüve-FN 120), ultrasonik banyo (Bandelin Sonorex), kullanılmıştır.

3.2. Kullanılan Ana Çözeltilerin Hazırlanması

3.2.1. Toplam fenolik madde miktarı tayininde kullanılan çözeltiler

%20'lik Na_2CO_3 çözeltilisinin hazırlanması: 20 g Na_2CO_3 100 mL saf su içerisinde çözüldü.

%10'luk Folin-Ciocalteu reaktifinin hazırlanması: 10 mL FCR 100 mL saf su içerisinde çözüldü.

3.2.2. Toplam flavonoid madde miktarı tayininde kullanılan çözeltiler

% 10'luk Alüminyum nitrat çözeltilisinin hazırlanması: 17,6 g $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 100 mL'lik balon jojeye koyuldu ve bir miktar deiyonize su ile çözüldü. Çözünme tamamlandıktan sonra deiyonize su ile balonun hacmine tamamlandı.

1 M Sodyum asetat çözeltilisinin hazırlanması: 13,6 g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 100 mL'lik balon jojeye koyuldu ve bir miktar deiyonize su ile çözüldü. Çözünme tamamlandıktan sonra deiyonize su ile balonun hacmine tamamlandı.

3.2.3. DPPH serbest radikali giderim aktivitesi yönteminde kullanılan çözeltiler

0.1 mM DPPH çözeltilisinin hazırlanması: 4 mg DPPH tartılarak 100 mL etanolde çözüldü.

3.2.4. Bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini (CUPRAC) yönteminde kullanılan çözeltiler

0.01 M'lık CuCl_2 çözeltilisinin hazırlanması: 67,25 mg CuCl_2 alındı ve 50 ml destile suda çözüldü.

$7,5 \times 10^{-3}$ M'lık etanolik neokuprin çözeltilisinin hazırlanması: 78 mg Neokuprin alındı ve 50 ml etanolde çözüldü.

1 M'lık $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ tamponunun hazırlanması (pH: 6,5): 7,7 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ alındı ve 80 ml saf suda çözüldü, pH-metre ile pH'sı 6,5'e ayarlandı ve toplam hacim 100 ml'ye saf su ile tamamlandı.

3.2.5. Süperoksit anyon radikali giderim aktivitesi yönteminde kullanılan çözeltiler

16 mM pH: 8 Tris-HCl tamponunun hazırlanması: 0,1938 g Tris bir miktar suda çözüldükten sonra 0.1 M'lık HCl ile pH metre kullanılarak pH'ı 8'e getirildi. Son hacmi 100 mL'ye deiyonize su ile tamamlandı.

78 μM NADH çözeltisinin hazırlanması: 5,6 mg NADH tartılarak 100 mL Tris- HCl tamponunda (16 mM, pH=8) çözüldü.

10 μM PMS çözeltisinin hazırlanması: 6,1 mg PMS tartılarak 10 mL Tris-HCl tamponu (16 mM, pH=8) ile çözüldü. Bu çözeltiden 50 μL alınarak Tris-HCl tamponu ile hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

50 μM NBT çözeltisinin hazırlanması: 4,1 mg NBT tartılarak 100 mL Tris-HCl tamponunda (16 mM, pH=8) çözüldü.

3.2.6. H_2O_2 giderme aktivitesinin yönteminde kullanılan çözeltiler

0.1 M fosfat tampon (pH=7.4) çözeltisinin hazırlanması: 13.61 g/L KH_2PO_4 ve 14.20 g/L Na_2HPO_4 çözeltileri (yaklaşık 1:4 oranında) karıştırılarak s.NaOH ile pH=7.4 olacak şekilde hazırlandı.

40 mM H_2O_2 çözeltisinin hazırlanması: 0.41 mL H_2O_2 otomatik pipetle çekilerek, balon jode 0.1 M fosfat tamponu (pH=7.4) ile 100 mL'ye tamamlandı.

3.2.7. Demir (II) iyonlarını şelatlama aktivitesinin tayini yönteminde kullanılan çözeltiler

2 mM FeCl₂ çözeltisi: 0.0245 gr FeCl₂ tartılarak destile suda çözüldü ve balon jodede 100 mL'ye tamamlandı.

5 mM Ferrozin çözeltisi: 0.0616 gr ferrozin tartılarak destile suda çözüldü ve balon jodede 25 mL'ye tamamlandı.

3.2.8. İndirgeme kapasitesi tayini yönteminde kullanılan çözeltiler

% 1'lik K₄Fe(CN)₆. 3H₂O çözeltisi: 1 gr K₄Fe(CN)₆. 3H₂O tartılarak destile suda çözüldü ve balon jodede 100 mL'ye tamamlandı.

% 10'luk TCA çözeltisi: 10 gr TCA tartılarak destile suda çözüldü ve balon jodede 100 mL'ye tamamlandı.

% 0.1'lik FeCl₃ çözeltisi: 0.1 gr FeCl₃ tartılarak destile suda çözüldü ve balon jodede 100 mL'ye tamamlandı.

0.2 M fosfat tamponu (pH=6.6): 27.22 gr KH₂PO₄ ve 28.40 gr Na₂HPO₄ çözeltileri pH=6.6 olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.

3.3. Deneysel Çalışma

Bu bölümde Sedef Otu (*Ruta graveolens*), Pelin Otu (*Artemisia absinthium*), Civanperçemi (*Achillea millefolium*)'nin Balkanlarda yetişen türü Kunitsa otu ve Adaçayı (*Salvia officinalis*)'nin Balkanlarda yetişen türü Ciğertaze Otu'nun yaprak kısımları üzerinde yapılan ekstraksiyon işlemleri ve ekstrelerde yapılan antioksidan aktivite çalışmaları hakkında bilgi verilmektedir.

3.3.1. Bitkilerin ekstraksiyon aşaması

Bitkisel materyaller ortalama 45 °C sıcaklık olmak üzere etüvde kurutulduktan sonra doğrayıcı ile iri toz haline getirildi. Bitki:çözücü oranı 1:20 olacak şekilde çözücüleri eklendi ve 8 saat çalkantılı su banyosunda 250 rpm'de ekstrakte edildi. Çözücü olarak metanol, etanol, aseton ve etil asetat kullanıldı. Süre sonunda çözelti Whatman tipi süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntülerin evaporatörde 50 °C sıcaklıkta çözücüleri uçuruldu, kalan katı maddenin tartımı alınarak stok çözeltiler hazırlandı. Bu stok çözeltiler de 5000 rpm 'de 15'er dakika santrifüjlenerek, çökeltilerinden ayrılıp buzlukta saklandı.

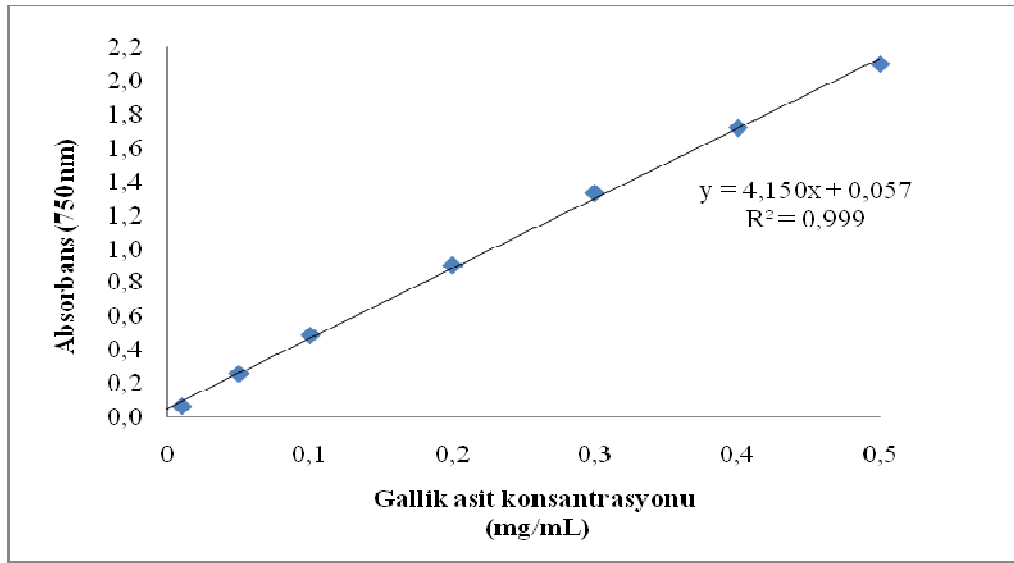
Stok çözeltilerin hazırlanması: Evaporatörde çözücülerin uçurulması işleminden sonra her bitkinin kalan katı maddesi ekstrakte edildiği kendi dört farklı çözeltisinde çözülerek hazırlandı. Bu stok çözeltilerden istenilen konsantrasyonlarda seyreltmeler ise etil asetat ve metanol çözeltilerinde metanol ile etanol ve aseton çözeltilerinde ise etanol ile yapıldı.

3.4. Uygulanan Yöntemler ve Kalibrasyon Grafiklerinin Çizimi

3.4.1. Folin yöntemiyle toplam fenolik madde tayini

Ekstreler içerisindeki toplam fenol miktarı Folin-Ciocaltaeu yöntemine göre yapılmıştır [91]. Yöntem modifiye edilerek kullanıldı. Etil asetat ve metanol ekstraktlarının çözeltileri metanol ile etanol ve aseton ekstraktlarının çözeltileri etanol ile hazırlandı. Standart grafiğin hazırlanmasında bir fenolik madde olan gallik asit standardı kullanıldı. Standart olarak kullanılan gallik asit çözeltileri ultra saf su içinde hazırlandı. Gallik asitin farklı konsantrasyonları hazırlandı (0,01-0,50 mg/mL). 750 nm'deki absorbans değerleri y-ekseninde ve konsantrasyon değerleri ise x-ekseninde gösterilerek bir standart çalışma grafiği hazırlandı. Elde edilen standart çalışma grafiğinde absorbans konsantrasyonla doğru orantılı olup, elde edilen doğru denklemi $y=4.150x+0,057$ olarak tespit edildi. Standart grafiğe göre tüm bitki ekstraktlarındaki toplam fenolik madde mg gallik asit / gr ekstre olarak hesaplandı.

0.5 ml örnek, 2.5 ml Folin Ciocaltaeu reaktifi (%10'luk, h/h, suda) ve 7.5 ml sodyum karbonat çözeltisi (%20'lik, a/h, suda) deney tüpüne karıştırılarak 2 saat 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Aynı işlem gallik asite de uygulandı. Süre sonunda numune ve standart çözeltilerin absorbansları UV Spektrofotometresi'nde 750 nm'de okutuldu. Blank olarak bitki numunesi yerine her birinin kendi çözücüsü ilave edilerek hazırlanmış çözeltiler kullanılmıştır. Analizler bütün denemelerde üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

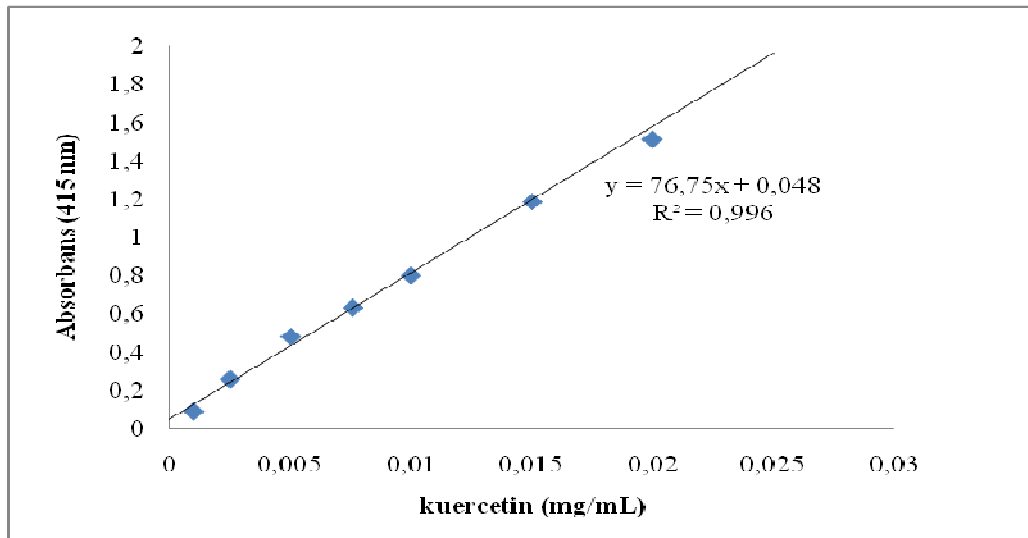


Şekil 3.1. Toplam fenolik madde tayininde standart olarak kullanılan gallik asitin kalibrasyon eğrisi

3.4.2. Alüminyum nitrat yöntemi ile toplam flavonoid madde tayini

Bitki ekstralarının toplam flavonoid miktarları kuarsetine eşdeğer olarak alüminyum nitrat yöntemi ile belirlendi [92]. Yöntem modifiye edilerek kullanıldı. Toplam flavonoid madde tayini için 10 mg/ml konsantrasyonundaki bitki ekstralarının her birinden 500 µl alınarak üzerlerine 0,1 ml sodyum asetat eklenmiş ve 1 dakika sonra da 0,1 ml %10'luk (w/v) Al(NO₃)₃ ilave edilerek çalkalandılar. Daha sonra %96'luk (v/v) etanol ile hacimleri 5 ml'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında 50 dakika bekletilen karışımların absorbans değerleri 450 nm dalga boyunda ölçüldü. Toplam flavonoid madde içeriği mg kuarsetin eşdeğeri (QE)/gram ekstrakt olarak ifade edilmiştir. Blank olarak numune yerine etanol ilave edilerek hazırlanmış çözelti kullanılmıştır. Analizler bütün denemelerde üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

Toplam flavonoid madde analizinde standart olarak kuarsetin kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrisinin oluşturulması için 12,6 mg kuarsetin, 25 ml'lik bir balon jodede 15 ml etanol ile çözdürülmüş ve hacmi etanol ile 25 ml'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltiden sırası ile 25, 50, 75, 100, 150, 200 ve 250 µl alınarak %96'lık (v/v) etanol ile hacimleri 4,8 ml'ye tamamlanmıştır. Çözeltilerin üzerlerine 0,1 ml sodyum asetat eklenmiş ve 1 dakika sonra da 0,1 ml %10'luk (w/v) $Al(NO_3)_3$ ilave edilerek çalkalanmışlardır. Elde edilen karışımlar 30 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildikten sonra oluşan mavi rengin absorbands değeri 415 nm dalga boyunda UV spektrofotometresi ile ölçülmüştür.



Şekil 3.2. Toplam flavonoid madde tayininde standart olarak kullanılan kuarsetinin kalibrasyon eğrisi

3.4.3. DPPH serbest radikali giderim aktivitesi tayini

Bitki ekstralarının ve standart maddelerin serbest radikali giderim aktiviteleri DPPH serbest radikali kullanılarak belirlendi [93]. Yöntem modifiye edilerek kullanıldı. Standart olarak Troloks ve BHT kullanıldı. 50 µg ile 1000 µg arasında değişen konsantrasyonlardaki 1 mL örnek içeren numunelerin üzerine DPPH çözeltisinden 4 mL ilave edildi. Kontrol olarak 1 mL etanol kullanıldı. Blank olarak etanol kullanıldı. Oda sıcaklığında 30 dk inkübasyondan sonra 517 nm'de absorbandsları ölçüldü. Örneklerin absorbands değerleri kontrole karşı değerlendirildi. Konsantrasyon artışıyla absorbandsın düşmesi beklenir. Çünkü azalan absorbands

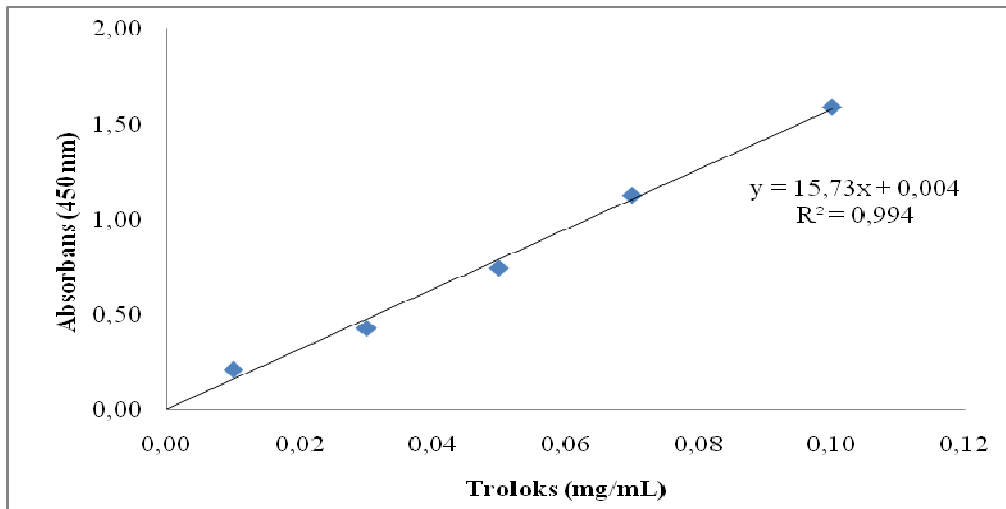
geriye kalan DPPH' çözeltisi miktarını yani serbest radikal giderim aktivitesini verir. Serbest radikal giderim aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$\text{DPPH Giderim Aktivitesi (\% İnhibisyon)} = \frac{A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}}}{A_{\text{Kontrol}}} \times 100$$

A_{Kontrol} kontrolün absorbansı, $A_{\text{Örnek}}$ örneğin absorbansıdır.

3.4.4. Bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini (CUPRAC)

Bakır(II) İyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini Güçlü *et al.*, (2006)'e göre yapıldı [94]. 0,01M CuCl₂, 7,5x10⁻³ M neokuproin çözeltileri ve 1M amonyum asetat tamponundan (pH: 7) 1'er mL alındı. Üzerine son hacim 4.1 mL olacak şekilde, 600 µL ekstre çözeltisi ve 500 µL ekstre çözgeninden ilave edilip iyice çalkalandı. Tüpler oda sıcaklığında ağzı kapalı olarak 30 dakika bekletilip 450 nm'de absorbans okundu. Standart olarak BHT, Troloks ve C vitamini kullanıldı. Troloks için elde edilen grafiğin eğimi ile örnekler için elde edilen doğruların eğimleri oranlanarak CUPRAC aktivitesi TEAC_{CUPRAC} olarak ifade edildi.



Şekil 3.3. Troloks standardının kalibrasyon eğrisi

3.4.5. Süperoksit anyon radikali giderim aktivitesi tayini

Bitki ekstralarının ve standart maddelerin süperoksit anyon radikali giderim aktiviteleri NADH-PMS-NBT yöntemine göre belirlendi [81]. Yöntem modifiye edilerek kullanıldı. Standart olarak BHT ve askorbik asit kullanıldı. Bu yöntemde 1000 µg 1 mL örnek içeren çözeltilerin üzerine sırasıyla 1 mL Tris tamponundan, 1 mL NADH ve 1 mL NBT çözeltilerinden konuldu. Reaksiyon 1 mL PMS'nin ilavesi ile başlatıldı. 1 mL metanol kontrol olarak kullanıldı. 5 dk sonra karışımın 560 nm'de absorbansı ölçüldü. Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi. Süperoksit anyon radikali giderim aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$O_2^{\bullet -} \text{ Giderim Aktivitesi (\% İnhibisyon)} = \frac{A_{Kontrol} - A_{Örnek}}{A_{Kontrol}} \times 100$$

$A_{Kontrol}$ kontrolün absorbansı, $A_{Örnek}$ örneğin absorbansıdır.

3.4.6. H₂O₂ giderme aktivitesinin tayini

Bitki ekstralarının hidrojen peroksit giderme yeteneği Ruch ve ark. metoduna göre çalışıldı [95]. Bu yöntemde, reaksiyon ortamına eklenen belirli miktardaki hidrojen peroksit çözeltisinin bitki ekstraktı tarafından yıkılması 230 nm'deki absorbans değişimiyle izlenir.

Değişik konsantrasyonlarda bitki ekstraktları (250-1000 µg/mL) ve standart çözeltileri hazırlandı. Standart reaktif olarak BHT ve C vitamini kullanıldı. Çalışmalar denenerek 1000 µg/mL derişiminde hesaplamalar yapıldı. Numune ve standart çözeltilerin her birinin 1 mL'sine 2,4 mL fosfat tamponu (0,1 M pH=7,4) ve 0,6 mL 40 mM H₂O₂ çözeltisi eklendi. Ayrıca her bir örnek için ayrı ayrı 1 mL bitki numunesi ve 3 mL fosfat tamponundan oluşan ve H₂O₂ içermeyen numune körleri hazırlandı. Kontrol olarak 3,4 mL fosfat tamponu ve 0,6 mL 40 mM H₂O₂ çözeltisi hazırlandı. Tüpler vortekslenerek, oda koşullarında, karanlıkta, 30 dakika inkübasyondan sonra 230 nm'de cam küvette absorbansları ölçüldü.

Aşağıdaki denklem kullanılarak örneklerin H₂O₂ giderme aktivitesi hakkında bilgi edinildi.

$$\% \text{ H}_2\text{O}_2 \text{ Giderme Aktivitesi} = 1 - \frac{230 \text{ nm'de örnek absorbanası}}{230 \text{ nm'de kontrol absorbanası}} \times 100$$

3.4.7. Demir (II) iyonlarını şelatlama aktivitesinin tayini

Farklı konsantrasyonlardaki (100-1000 µg/mL) bitki ekstraktlarının Fe⁺² iyonlarını şelatlama aktivitesi Dinis ve ark. metoduna göre çalışıldı [96]. 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 FeCl₂ çözeltisi eklendi. Oda koşullarında 30 dakika inkübasyondan sonra 200 µL 5 mM ferrozin çözeltisi eklenerek vortekslendi. 10 dakika sonra karışımların absorbanans değerleri 562 nm'de ölçüldü. Örnek yerine 1 mL deiyonize su kullanılarak kontrol çalışıldı. Blank olarak su kullanıldı. Standart olarak 10-1000 µg/mL konsantrasyonlarında EDTA çözeltileri kullanıldı. Ferrozin-Fe⁺² kompleksinin inhibisyon yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\% \text{ Şelatlama Aktivitesi} = 1 - \frac{562 \text{ nm'de örnek absorbanası}}{562 \text{ nm'de kontrol absorbanası}} \times 100$$

3.4.8. İndirgeme kapasitesi tayini

Bitki ekstraktlarının indirgeme kapasitesi Oyaizu metoduna göre tayin edildi [97]. Ortamdaki indirgen madde Fe⁺³ iyonlarını Fe⁺² iyonlarına indirger ve FeCl₃ ilavesiyle oluşan Prusya mavisi rengindeki kompleksin absorbanansı ölçülür. Yüksek absorbanans değeri yüksek indirgeme kapasitesinin göstergesidir. Çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan bitki ekstraktları (100-1000 µg/mL) ve standart madde çözeltilerinin (100-1000 µg/mL) 1 mL'sine, 2,5 mL fosfat tamponu (0,2 M, pH=6,6)

ve 2,5 mL % 1'lik $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ eklendi. Karışımlar 50 °C'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. Blank olarak su kullanıldı.

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

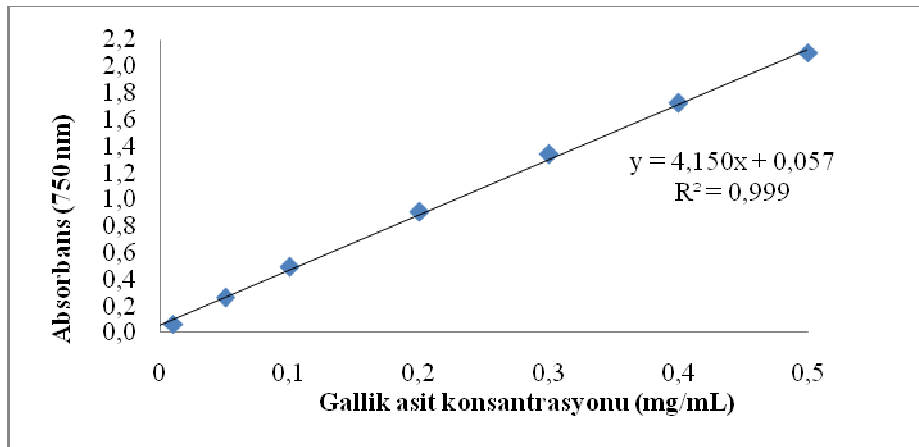
Son yirmi yılda antioksidan aktivite gösteren bitkilerin gıda ve beslenme alanlarındaki kullanımları hakkında oldukça fazla sayıda çalışmalar yapıldı ve bu yoğun çalışmalar halen devam etmektedir. Bunun sebebi ise bitkilerin birer antioksidan olan karotenoid, flavonoid ve fenolik bileşik içeriği bakımından zengin olmaları ve herhangi bir yan etkiye sahip olmamalarıdır [3].

Besinlerin antioksidan aktivitelerinin ve antioksidan bileşenlerinin profili tıp ve diyet uzmanlarının olduğu kadar sağlık ve biyokimya alanındaki araştırmacılarında ilgisini çeker. Besinlerin özellikle bitki bileşenlerinin çok çeşitli olması nedeniyle her bir antioksidan maddeyi tanımak, ayırmak ve tek başına tayin edilmek hem pahalı hem zordur. Bu, neticede toplam antioksidan kapasiteyi ölçen yöntemlere önem kazandırmaktadır. Aynı zamanda az sayıda kimyasallı reaksiyona dayanan toplam antioksidan kapasite tayini gerçekçi olmayabilir, yanılgılara sebep olabilir. Bu yüzden toplam antioksidan kapasiteyi ölçmeye yönelik çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Metot farklılıkları oldukça fazladır ve bu konuda yayınlanan pek çok yayın ve geliştirilen pek çok yöntemle rağmen bunlarda bir söz birliğine ulaşılamamıştır. Yapılan araştırmalarda genel bir antioksidan aktivite yöntemi;

- 1) Biyolojik olarak anlamlı bir substrat seçmeli,
- 2) Çeşitli oksidasyon durumlarını test edebilmeli,
- 3) Hem başlangıç ve hem de sekonder oksidasyon ürünlerini ölçebilmeli,
- 4) Aynı molar derişimde aktif bileşen içeren antioksidanları karşılaştırabilmeli,
- 5) İndüksiyon periyodu, yüzde inhibisyon, hidrojen peroksit oluşumu veya yıkımı hızı veya IC50 (% 50 inhibisyona ulaşmak için gerekli antioksidan derişimi) temelinde kantitasyona izin vermelidir [11].

4.1. Folin Yöntemiyle Toplam Fenolik Madde Tayini Sonuçları

Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak yapılan toplam fenolik bileşik tayininde en sık kullanılan standart bileşik gallik asittir. Gallik asit kullanılarak elde edilen standart çalışma grafiği şekil 4.1’de görülmektedir. Gallik asit standart grafiğinden elde edilen doğru denklemi; $y=4,150x + 0,057$ değerindedir.



Şekil 4.1. Toplam fenolik madde tayininde standart olarak kullanılan gallik asitin kalibrasyon eğrisi

Tablo 4.1’de bu kalibrasyon denklemi kullanılarak bitki ekstraktlarındaki toplam fenolik madde tayini gallik asite eş değer olarak mg fenolik madde/gram ekstre şeklinde hesaplanmış sonuçları verilmektedir.

Tablo 4.1. Bitki ekstratlarının toplam fenolik miktarları (Fenolik madde miktarı: gallik asite eşdeğer olup birimi mg fenolik madde / gram ekstre olarak ifade edildi. Sonuçlar 3 paralel testin ortalaması olup, standart sapma değerleri göz önüne alındı.)

Numuneler	Sıcaklık	Metanol	Etil Asetat	Etanol	Aseton
Sedef Otu	45 °C	16,62 ±0,21	7,93 ±0,25	41,40 ±0,86	10,08 ±0,25
Pelin Otu	45 °C	17,55 ±0,11	15,09 ±0,17	11,10 ±0,13	5,99 ±0,08
Kunitsa Otu	45 °C	85,04 ±0,67	5,07 ±0,33	62,85 ±0,46	14,47 ±0,18
Çiğertaze Otu	45 °C	23,62 ±0,15	18,29 ±0,64	43,55 ±0,15	11,58 ±0,28

Toplam fenolik madde tayini olarak en yüksek değeri Kunitsa otu ekstraktında gözlemlendi. Kunitsa otu ekstraktlarında çözücü farklılığına göre sıralanması ise metanol ekstraktı > etanol ekstraktı > aseton ekstraktı > etil asetat ekstraktı şeklindedir.

İkinci sırada yüksek aktivite gösteren ciğertaze otu için çözücü farkını izlersek değerler: etanol ekstraktı > metanol ekstraktı > etil asetat ekstraktı > aseton ekstraktı şeklindedir. Sedef otu için ise çözücü farklılığına göre sıralanması etanol ekstraktı > metanol ekstraktı > aseton ekstraktı > etil asetat ekstraktı şeklindedir.

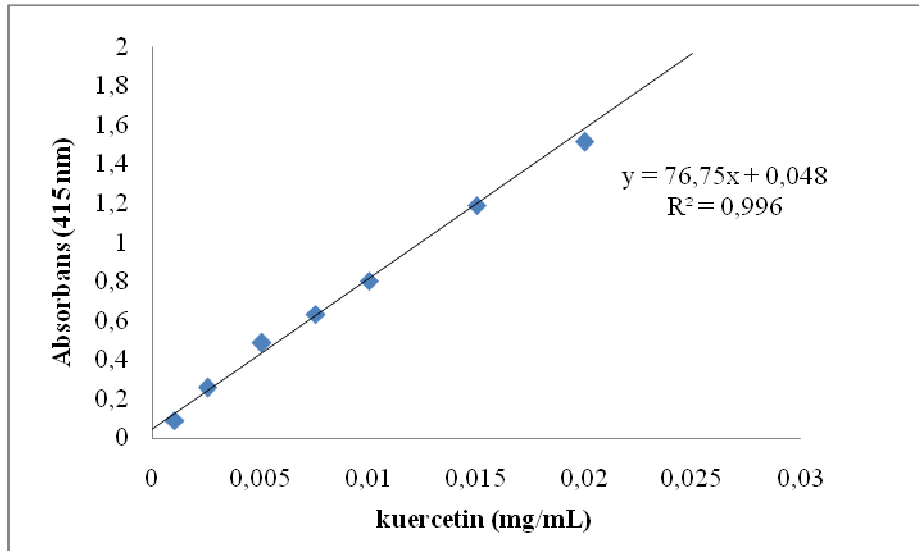
Pelin otunun genel olarak diğer üç bitkiye göre değerlerinin düşük olduğu izlendi ve çözücü farklılığının her bitki için etkisi görüldü. Tüm bitki numunelerinin metanol ve etanol ekstraktlarının toplam fenolik madde bakımından daha yüksek aktivite gösterdiği sonucuna varıldı. Tüm bitki numunelerinin aseton ve etil asetat ekstraktlarının ise toplam fenolik madde bakımından birbirine yakın aktivite gösterdiği görüldü.

Fenollerin hidroksil gruplarının serbest radikalleri yok etme gücü sebebiyle çok önemli bitki bileşenleri olduğu açıklanır [98]. Çalışmalar çok çeşitli türde toplam fenol ve antioksidan aktivite arasında paralel bir ilişki olduğunu gösterir [99].

Toplam fenolik madde miktarı Chen vd.'in dört çeşit nutrosötik bitki yapraklarının su ekstraktlarıyla yaptıkları antioksidan aktivite çalışmalarında 64,95-185,04 GAE mg/g aralığında [100], Wong vd.'in 30 çeşit medikal bitkide yaptıkları çalışmada ise su ekstraktları için 2,4-50,8 mg GAE/g, metanol ekstraktı için 1,3-36,4 mg GAE/g olarak [101] tayin edilmiştir. Çalışmamıza benzer olarak yapılan çalışmalardan da anlaşılacağı gibi bitkilerdeki kimyasal yapı farklılıkları ve çalışmamızda etkisini gördüğümüz çözücü farklılıkları fenolik madde miktarını doğrudan etkilemektedir.

4.2. Alüminyum Nitrat Yöntemi ile Toplam Flavonoid Madde Tayini Sonuçları

Ekstraktların toplam flavonoid madde tayinleri kuarsetine eşdeğer olarak alüminyum nitrat yöntemi ile belirlendi. Kuarsetin kullanılarak elde edilen standart çalışma grafiği şekil 4.2’de görülmektedir. Kuarsetinin standart grafiğinden elde edilen doğru denklemi; $y=76,75x + 0,048$ değerindedir.



Şekil 4.2. Toplam flavonoid madde tayininde standart olarak kullanılan kuarsetinin kalibrasyon eğrisi

Tablo 4.2’de kalibrasyon denklemi kullanılarak bitki ekstraktlarındaki toplam flavonoid madde tayini kuarsetine eş değer olarak μg flavonoid madde/gram ekstre şeklinde hesaplanmış sonuçları verilmektedir.

Tablo 4.2. Bitki ekstralarının toplam flavonoid madde miktarları (Flavonoid madde miktarı kuarsetine eşdeğer olup birimi μg flavonoid madde / gram ekstre olarak ifade edildi. Sonuçlar 3 paralel testin ortalaması olup, standart sapma değerleri göz önüne alındı.)

Numuneler	Sıcaklık	Metanol	Etil Asetat	Etanol	Aseton
Sedef Otu	45 °C	2481,82 $\pm 3,87$	581,63 $\pm 0,37$	1170,36 $\pm 3,41$	1332,90 $\pm 0,18$
Pelin Otu	45 °C	385,73 $\pm 3,59$	975,18 $\pm 1,75$	413,42 $\pm 0,18$	184,63 $\pm 0,37$
Kunitsa Otu	45 °C	1907,95 $\pm 0,83$	640,59 $\pm 0,46$	1973,55 $\pm 0,18$	507,04 $\pm 3,04$
Çiğertaze Otu	45 °C	1593,81 $\pm 3,78$	2125,54 $\pm 0,46$	1617,39 $\pm 2,12$	1947,69 $\pm 0,83$

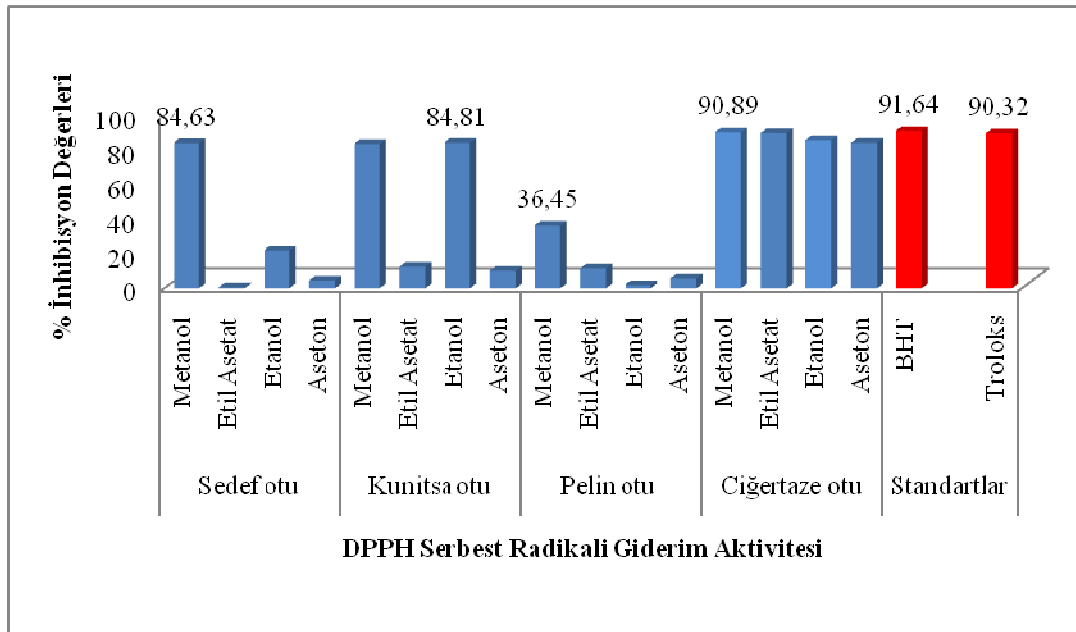
Toplam flavonoid madde tayini sonuçlarında çiğertaze otunun tüm ekstraktlarının yüksek toplam flavonoid maddeye sahip olduğu gözlemlendi. Sedef otunun metanol ekstraktının ise tüm bitki numunelerinin arasında en yüksek toplam flavonoid madde içerdiği görüldü. Kunitsa otunun diğer bitkilere göre ortalama, pelin otunun ise oldukça düşük toplam flavonoid maddeye sahip olduğu gözlemlendi. Çözücü farklılığının her bitkiye göre etkisinin farklı olduğu, her bitkinin farklı çözücülerde en yüksek toplam flavonoid madde içerdiği görüldü.

4.3. DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Tayin Sonuçları

Bitki ekstralarının DPPH serbest radikali giderim aktivitesi 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonda tayin edildi. Standart olarak kullanılan BHT ve Troloksa göre aktivite karşılaştırmaları yapıldı. Sonuçlara göre en yüksek DPPH giderim aktivitesini, BHT % 91,64 ($\pm 0,01$) değerinde gösterdi. Çiğertaze otunun metanol ekstraktı % 90,89 ($\pm 0,12$) ve etil asetat ekstraktı % 90,48 ($\pm 0,23$) değerleri % 90,32 ($\pm 0,11$) değerindeki Troloks standardından daha fazla DPPH serbest radikali giderme

yeteneği gösterir. Ayrıca ciğertaze otunun DPPH serbest radikali giderme aktivitesinin tüm bitki ekstraktlarında yüksek olduğu görüldü.

Analiz sonucunda en yüksek DPPH giderim aktivitesine sahip bitki sıralaması ciğertaze otu > kunitsa otu > sedef otu > pelin otu şeklinde kaydedildi. Sonuçların çözücü farklılığına göre değiştiği ve tüm bitki ekstraktlarının metanoldeki % inhibisyon değerlerinin en fazla olduğu görüldü. Pelin otu ve sedef otu aseton, etil asetat, etanol ekstraktlarındaki % inhibisyon değerlerinin oldukça düşük olduğu kaydedildi.



Şekil 4.3. Bitki ekstrelerin DPPH serbest radikali giderim aktivitesi % inhibisyon değerleri (Antioksidan aktivite sonuçları 3 paralel testin ortalamasıdır.)

Miliauskas vd. 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 [72]. Benzer şekilde Shon vd. da sıcak su ve metanol ekstraktlarının bütanol, etil asetat ve kloroform ekstraktlarından daha iyi DPPH radikal giderdiğini bildirmişlerdir [85]. Çalışmamızın yukarıdaki çalışmalar ile benzer özellik göstermiş yukarıda belirtildiği gibi metanol ekstraktı etanol, etil asetat ve aseton ekstraktlarından daha iyi aktivite gösterdiği görülmüştür.

4.4. Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Tayini (CUPRAC) Sonuçları

CUPRAC metodu ile çalışılan örnek ekstraları ve standart antioksidanların konsantrasyona karşı absorbans grafikleri çizildi ve grafiklerin eğimleri oranlandı. Standart reaktif ve bitki numunelerinin doğru denklemleri tablo 4.3’de gösterildi.

Tablo 4.3. TEAC_{CUPRAC} değerleri için standart ve bitki numunelerinin doğru denklemleri

Troloks	$y = 15,733x + 0,004$
C vitamini	$y = 14,627x + 0,044$
BHT	$y = 15,831x + 0,061$
Sedef Otu Metanol Ekstraktı	$y = 1,678x + 0,566$
Sedef Otu Etil Asetat Ekstraktı	$y = 2,069x + 0,664$
Sedef Otu Etanol Ekstraktı	$y = 1,103x - 0,001$
Sedef Otu Aseton Ekstraktı	$y = 0,753x + 0,031$
Pelin Otu Metanol Ekstraktı	$y = 2,537x + 0,640$
Pelin Otu Etil Asetat Ekstraktı	$y = 3,096x + 0,677$
Pelin Otu Etanol Ekstraktı	$y = 0,746x + 0,012$
Pelin Otu Aseton Ekstraktı	$y = 0,876x + 0,012$
Kunitsa Otu Metanol Ekstraktı	$y = 2,015x + 0,662$
Kunitsa Otu Etil Asetat Ekstraktı	$y = 3,531x + 0,673$
Kunitsa Otu Etanol Ekstraktı	$y = 0,956x + 0,013$
Kunitsa Otu Aseton Ekstraktı	$y = 1,130x + 0,031$
Ciğertaze Otu Metanol Ekstraktı	$y = 1,435x + 0,657$
Ciğertaze Otu Etil Asetat Ekstraktı	$y = 2,342x + 0,636$
Ciğertaze Otu Etanol Ekstraktı	$y = 1,210x + 0,017$
Ciğertaze Otu Aseton Ekstraktı	$y = 1,094x + 0,018$

Numune ve standartların antioksidan derişimine karşı CUPRAC yöntemi ile verdikleri absorbans sonuçlarından elde edilen grafiklerde, doğru denklemlerinin eğimleri ile hesaplama yapıldı. Grafikteki her bir doğrunun eğimi Troloks için elde edilen doğru denkleminin eğimine oranlanmış ve TEAC_{CUPRAC} değerleri elde edilmiştir. Sonuçlar tablo 4.4 ve 4.5’deki gibidir.

Tablo 4.4. Standart reaktifler için TEAC_{CUPRAC} değerleri

	Troloks	BHT	C vitamini
Eğim	15,733	15,831	14,621
TEAC_{CUPRAC}	1	1,006	0,929

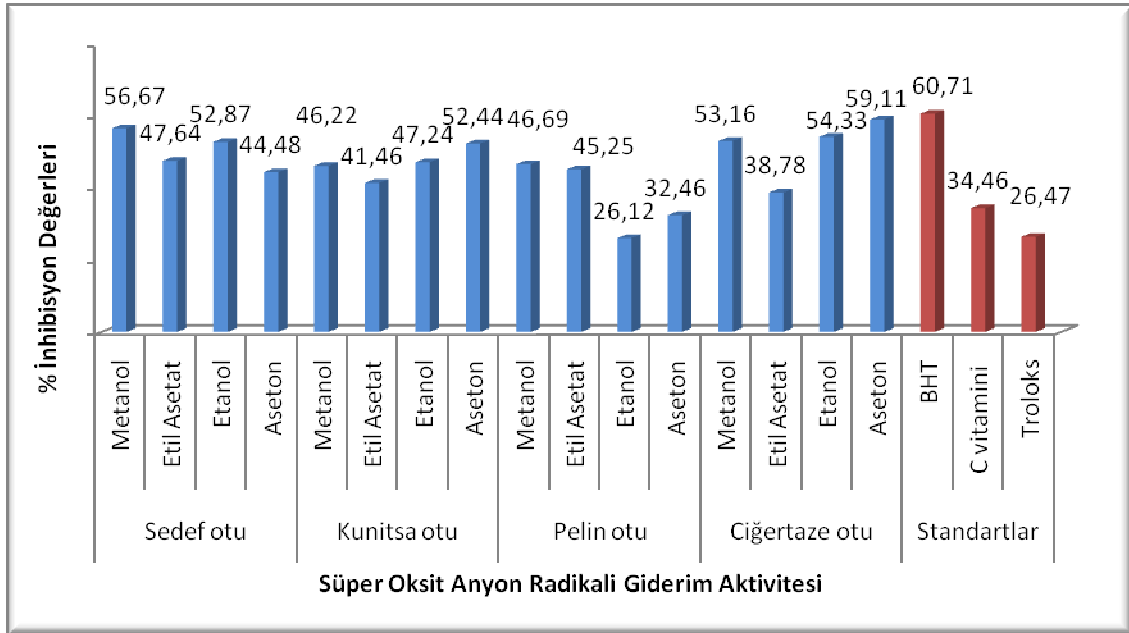
Tablo 4.5. Bitki numuneleri için TEAC_{CUPRAC} değerleri

Numuneler	Sıcaklık		Metanol	Etil Asetat	Etanol	Aseton
Sedef Otu	45 °C	Eğim	1,678	2,069	1,103	0,753
		TEAC_{CUPRAC}	0,107	0,132	0,070	0,048
Pelin Otu	45 °C	Eğim	2,537	3,096	0,746	0,876
		TEAC_{CUPRAC}	0,161	0,197	0,047	0,056
Kunitsa Otu	45 °C	Eğim	2,015	3,531	0,956	1,130
		TEAC_{CUPRAC}	0,128	0,224	0,061	0,072
Ciğertaze Otu	45 °C	Eğim	1,435	2,342	1,210	1,094
		TEAC_{CUPRAC}	0,091	0,149	0,077	0,070

Tabloda görüldüğü üzere yaygın olarak bilinen ve yüksek antioksidan aktivitesi özelliği ile gıdalara koruyucu katkı maddesi olarak eklenen sentetik antioksidan BHT eşdeğer miktardaki Troloks standartı ile nerdeyse bire bir antioksidan aktivite göstermektedir. Standart olarak kullanılan diğer madde C vitamini ise eşdeğer miktardaki Troloks'a çok yakın aktivite göstermektedir. Numunelerin ise eşdeğer miktardaki Troloks bazına göre çok yüksek aktivite göstermediği ve sıralamanın kunitsa otu > pelin otu > ciğertaze otu > sedef otu şeklinde olduğu görüldü. Çözücü farklılığının etkisi; metanol ekstraktı ve etil asetat ekstraktı (seyreltmeleri metanol ile yapılmış) numunelerinin absorbanlarının etanol ve aseton (seyreltmeleri etanol ile yapılmış) numunelerinin absorbanlarından çok yüksek olduğu şeklinde görüldü. Bunun sonucunda da metanol ve etil asetat ekstraktlarının TEAC_{CUPRAC} değerinin etanol ve aseton ekstraktlarının TEAC_{CUPRAC} değerinden daha yüksek olduğu sonucuna varılır.

4.5. Süperoksit Anyon Radikali Giderim Aktivitesi Sonuçları

Bitki ekstrelerin süperoksit anyon radikali giderim aktiviteleri, NADH-PMS-NBT yöntemine göre 1000 µg/mL konsantrasyonda belirlendi. Standart olarak askorbik asit, BHT ve troloks kullanıldı. Şekilde de görüldüğü gibi en yüksek aktiviteyi sentetik antioksidan olan BHT 60,71 (±1,96) olarak gösterdi. Ciğertaze otunun aseton ekstresinin ikinci sırada aktiflik gösterdiği kaydedildi. Bitkilerin süper oksit anyon giderim aktivitesinin ciğertaze otu > sedef otu > kunitsa otu > pelin otu şeklinde olduğu görüldü. Çözücü farkının bitkiler arasında büyük bir değişiklik oluşturmadığı gözlenirken tüm bitki ekstralarının süper oksit anyon radikali giderim aktivitesinin birbirine yakın ve ortalama değerlerde olduğu görüldü.



Şekil 4.4. Bitki ekstrelerin süper oksit anyon radikali giderim aktivitesi % inhibisyon değerleri (Antioksidan aktivite sonuçları 3 paralel testin ortalamasıdır.)

Ortalama olarak tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu serbest süperoksit radikali anyonu oluşur. Süperoksit serbest radikalliğine rağmen direkt olarak fazla zarar vermez. Zararlı olmasının baş nedeni hidrojen peroksit kaynağı ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Yani süperoksit radikali doku hasarı oluşturan ve biyoaktif makromolekülleri harekete başlaması için gerekli potansiyele sahip aktif serbest radikaller için bir öncüdür [11].

4.6. H₂O₂ Giderme Aktivitesinin Tayini Sonuçları

Bitki ekstraktlarının H_2O_2 giderim aktivitesi Ruch vd.'nin (1989) metoduna göre analiz edildi [95]. Ekstraktlardan hiçbiri reaksiyon ortamındaki H_2O_2 'yi % 100 uzaklaştıramamasına rağmen, standart ve numune analizleri sonuçları aşağıdaki gibidir. Standart olarak BHT ve C vitamini kullanıldı ve bitki numuneleri bu standartlarla karşılaştırıldı. Tüm standart ve bitki ekstraktlarının 1000 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarından elde edilen sonuçlar hesaplandı. Standart olarak kullanılan;

BHT % inhibisyon sonucu; $41,98 \pm 0,16$ ve C vitamini % inhibisyon sonucu; $21,90 \pm 0,31$ 'dir.

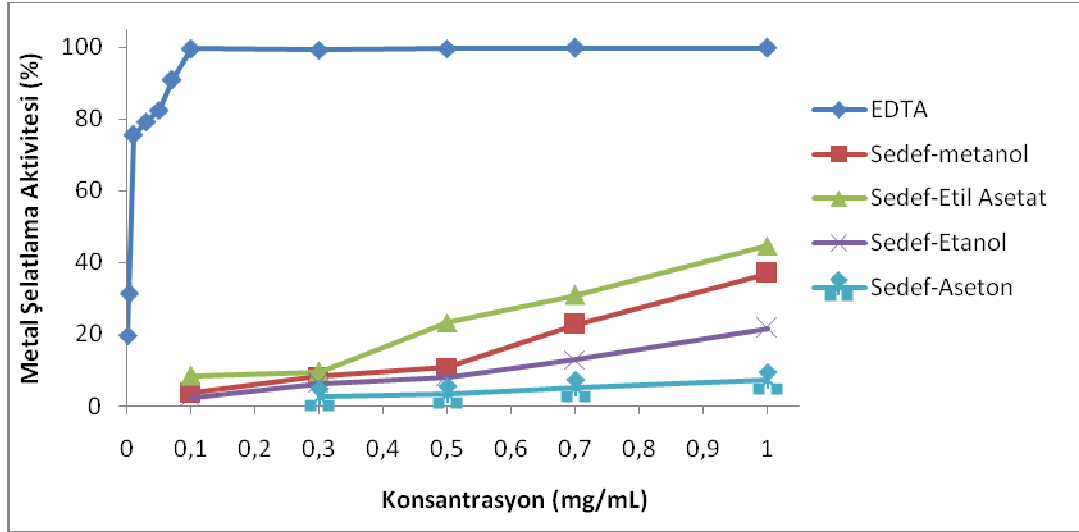
Tablo 4.6. % H_2O_2 Giderme Aktivitesi

Numuneler	Sıcaklık	Metanol	Etil Asetat	Etanol	Aseton
Sedef Otu	45 °C	51,59 $\pm 0,95$	12,57 $\pm 1,14$	19,52 $\pm 0,07$	40,14 $\pm 0,18$
Pelin Otu	45 °C	11,13 $\pm 0,81$	43,28 $\pm 1,81$	30,84 $\pm 0,79$	-
Kunitsa Otu	45 °C	38,74 $\pm 1,70$	41,39 $\pm 1,10$	63,94 $\pm 1,33$	23,01 $\pm 0,39$
Çiğertaze Otu	45 °C	0,98 $\pm 0,93$	37,99 $\pm 0,08$	29,97 $\pm 1,41$	40,27 $\pm 0,43$

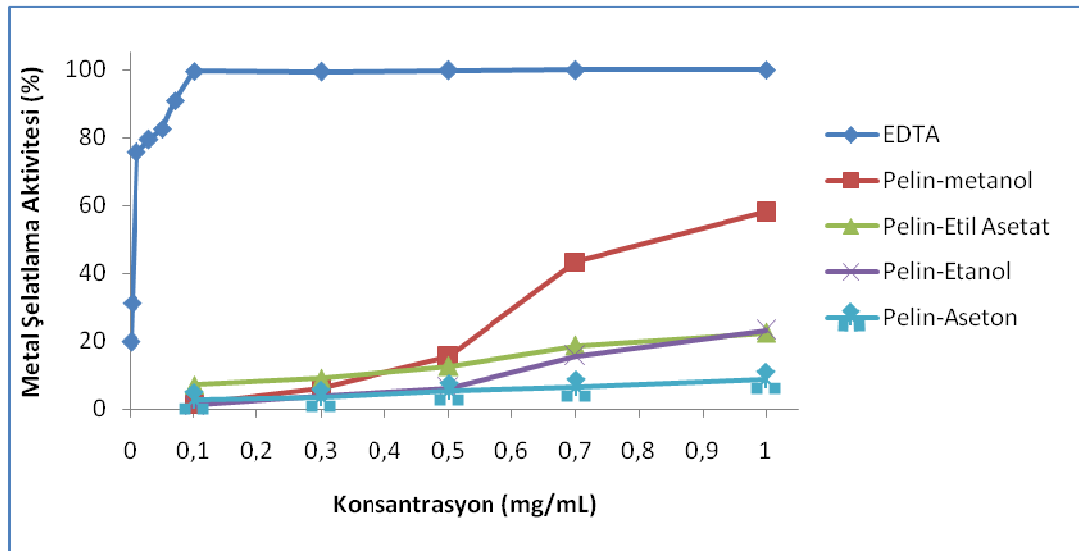
En yüksek aktiviteye kunitsa otunun etanol ekstraksiyonu sahip olduğu kaydedilmiş olup kunitsa otunun etanol, sedef otunun metanol ve pelin otunun etil asetat ekstraktlarının standart olarak kullanılan BHT ve C vitamininden daha fazla H_2O_2 giderme yeteneğine sahip olduğu gözlemlendi. Bitkilerin farklılığının yanı sıra çözücü farkının her ekstraksiyonun analiz sonucunda yüksek değişkenlik oluşturduğu sonucuna varıldı. Pelin otunun aseton ekstraktında H_2O_2 giderim aktivitesi gözlenmedi. Son olarak bitkilerin H_2O_2 giderim aktivitesinin kunitsa otu > sedef otu > çiğertaze otu > pelin otu şeklinde olduğu görüldü.

4.7. Demir (II) İyonlarını Şelatlama Aktivitesinin Tayini Sonuçları

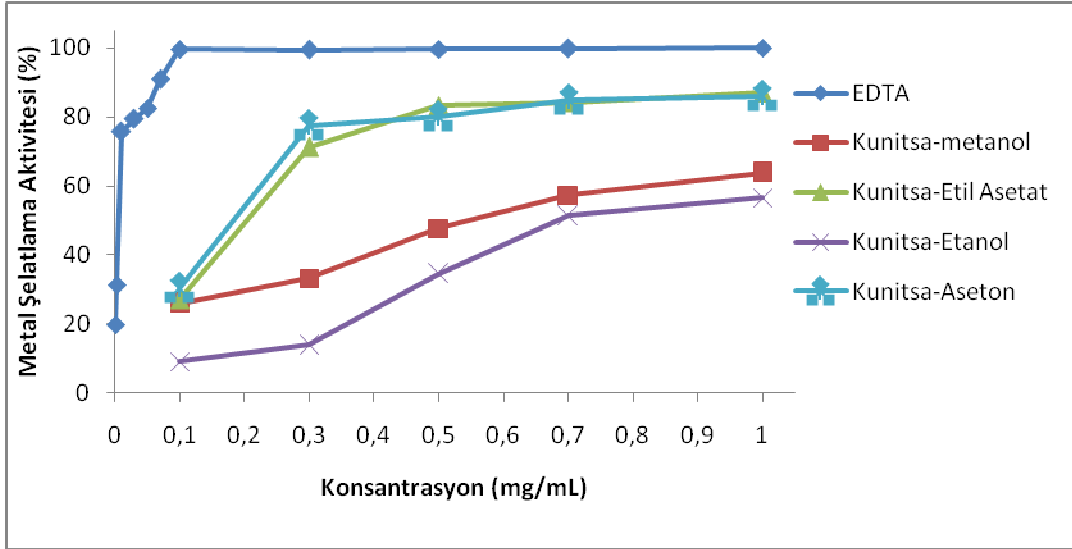
Metal iyonu şelatlama aktivitesi; bitki ekstraktlarının çözeltideki Fe^{2+} iyonlarını bağlayabilmek için ferrozin ile yarışmasına göre değerlendirildi. Kıyaslama maddesi olarak iyi bir metal şelatlayıcı olan EDTA seçildi. Çalışmada kullanılan tüm bitkilerin herbir ekstraktının metal şelatlama potansiyelini gösteren şekil 4.5 – Şekil 4.8'deki konsantrasyon-% inhibisyon grafikleri oluşturuldu.



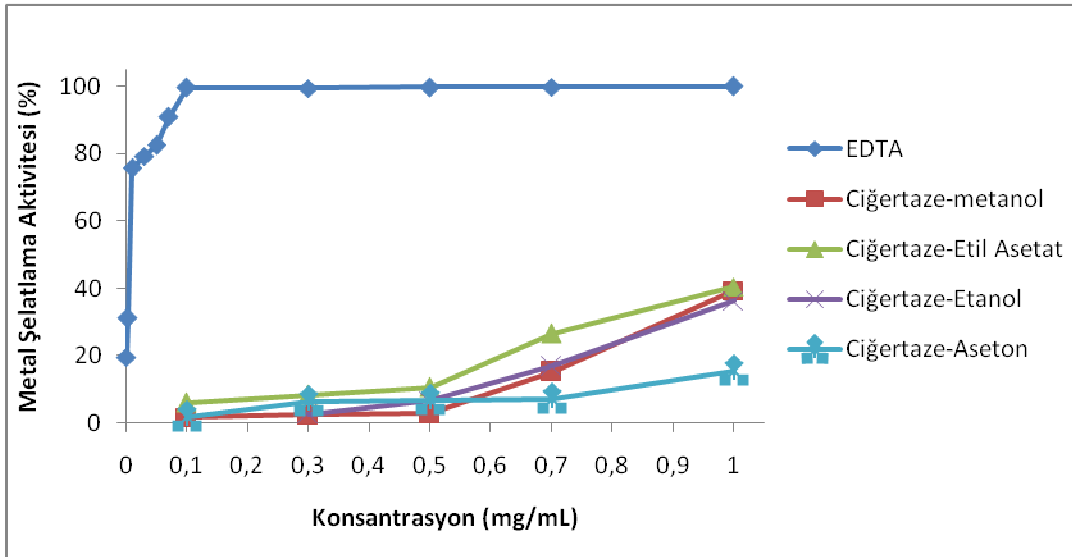
Şekil 4.5. Sedef otu ekstraktlarının metal şelatlama kapasitesi



Şekil 4.6. Pelin otu ekstraktlarının metal şelatlama kapasitesi



Şekil 4.7. Kunitsa otu ekstraktlarının metal şelatlama kapasitesi

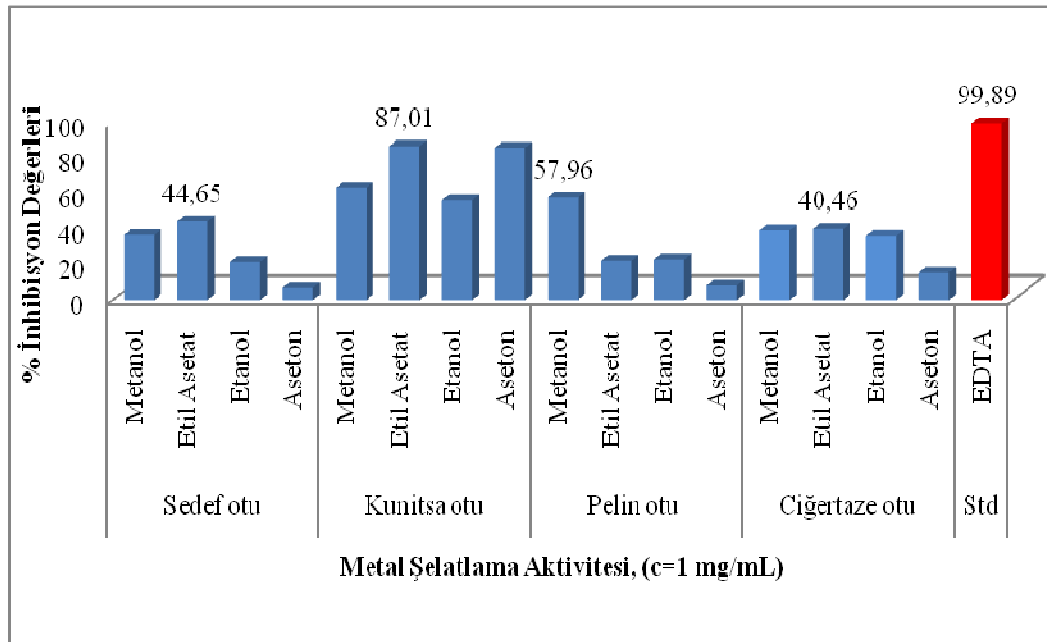


Şekil 4.8. Ciğertaze otu ekstraktlarının metal şelatlama kapasitesi

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

Ayrıca tüm bitki ekstraktlarının 1000 $\mu g/mL$ konsantrasyondaki aktiviteleri ile standart olarak kullanılan EDTA arasında aktivite karşılaştırmaları % inhibisyon değerlerine göre yapıldı. Uygulanan deney koşullarında tüm ekstraktlar arasından

kunitsa otunun etil asetat ekstraktı en yüksek metal şelatlama aktivitesi gösterdiği ve bitkilerin metal şelatlama aktivitesinin kunitsa otu > çiğertaze otu > pelin otu > sedef otu şeklinde olduğu görüldü. Ayrıca kunitsa otunun etil asetat (KEA1000 = % 87,01±0,05, KEA700 = % 84,10±0,33, KEA500 = % 83,23±0,063) ve yine kunitsa otunun aseton (KA1000 = % 86,02±0,01, KA700 = % 84,99±0,89) ekstraktları yukarıda verilen değerlerde görüldüğü gibi 1000 µg/mL konsantrasyondan daha düşük konsantrasyonlarda bile diğerlerine göre yüksek aktivite gösterdi.



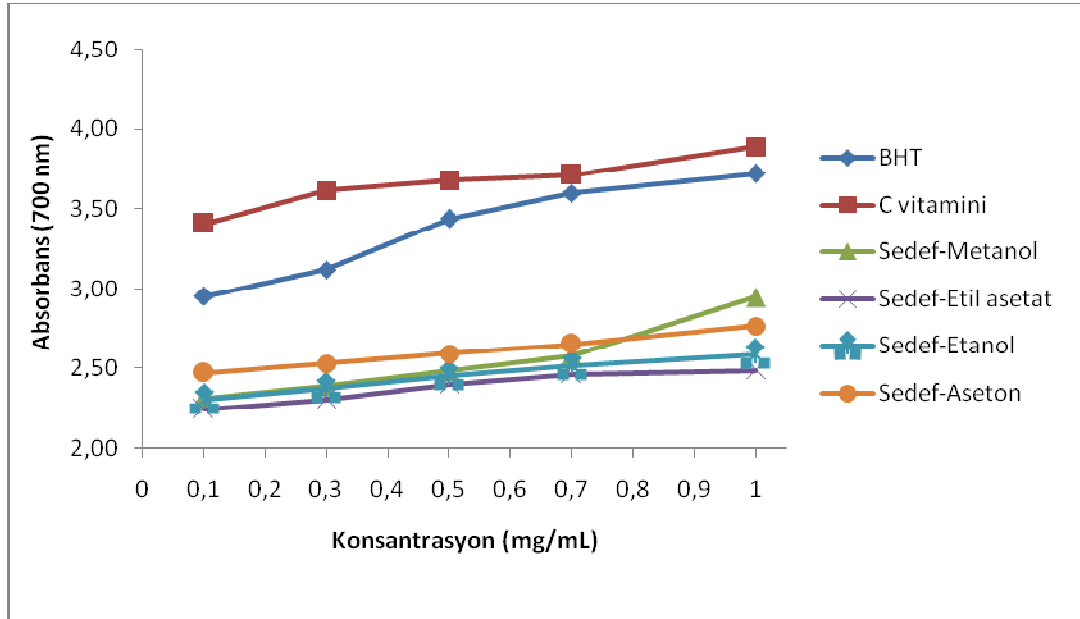
Şekil 4.9. Metal şelatlama aktivitesi % inhibisyon değerleri

Tüm ekstraktların aktivite göstermesine rağmen ekstraktların hiçbirinin Fe^{2+} iyonlarını şelatlama kapasitesinin EDTA'dan daha iyi olmadığı da belirtilmelidir. EDTA 70 µg/mL kadar düşük konsantrasyonda bile % 90,84 şelatlama aktivitesi gösterdi.

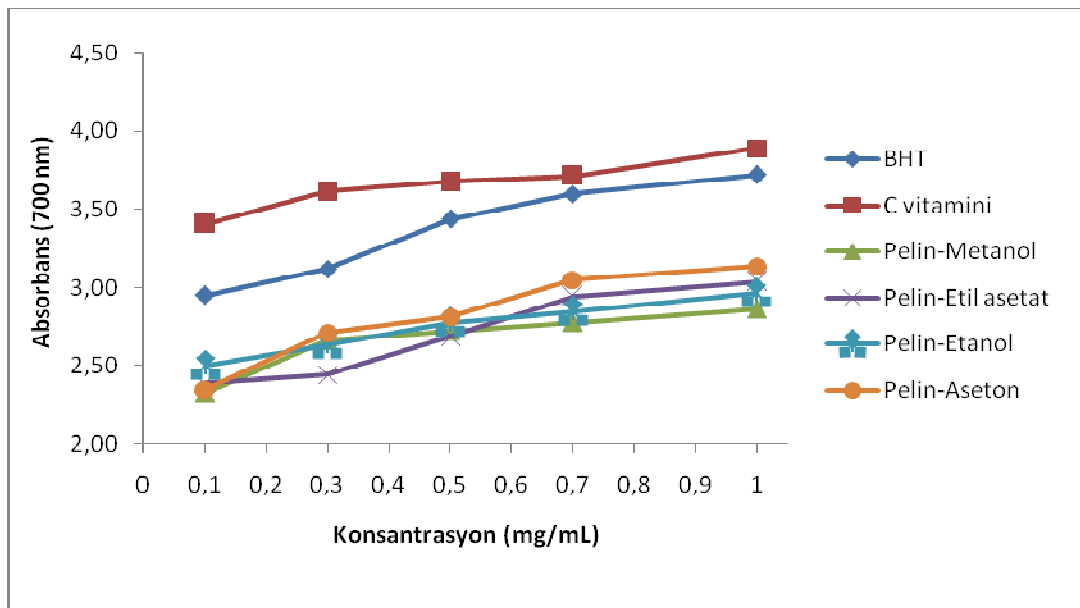
4.8. İndirgeme Kapasitesi Tayini Sonuçları

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.

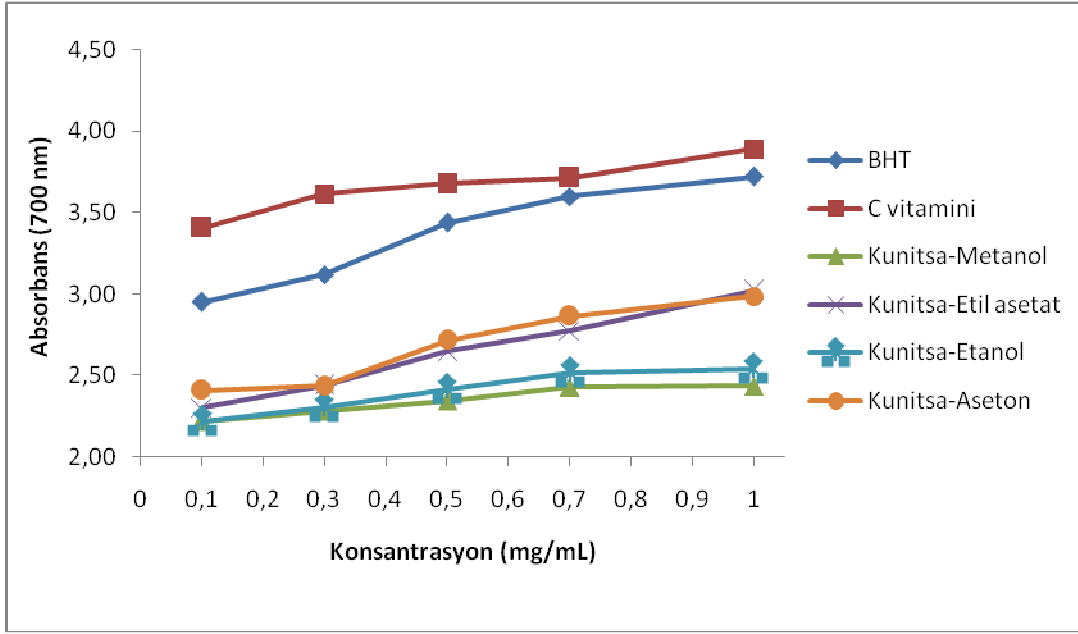
Bitki ekstraktının ortamdaki Fe^{+3} 'ü indirgeme yeteneğini belirlemek üzere değişen ekstrakt ve standart konsantrasyonlarında çalışıldı ve oluşan komplekslerin absorbansı 700 nm'de ölçüldü. BHT ve C vitamini standartlarıyla karşılaştırılarak her bir bitki ekstraktı için şekil 4.10 –4.13'deki konsantrasyon-absorbans grafikleri çizildi.



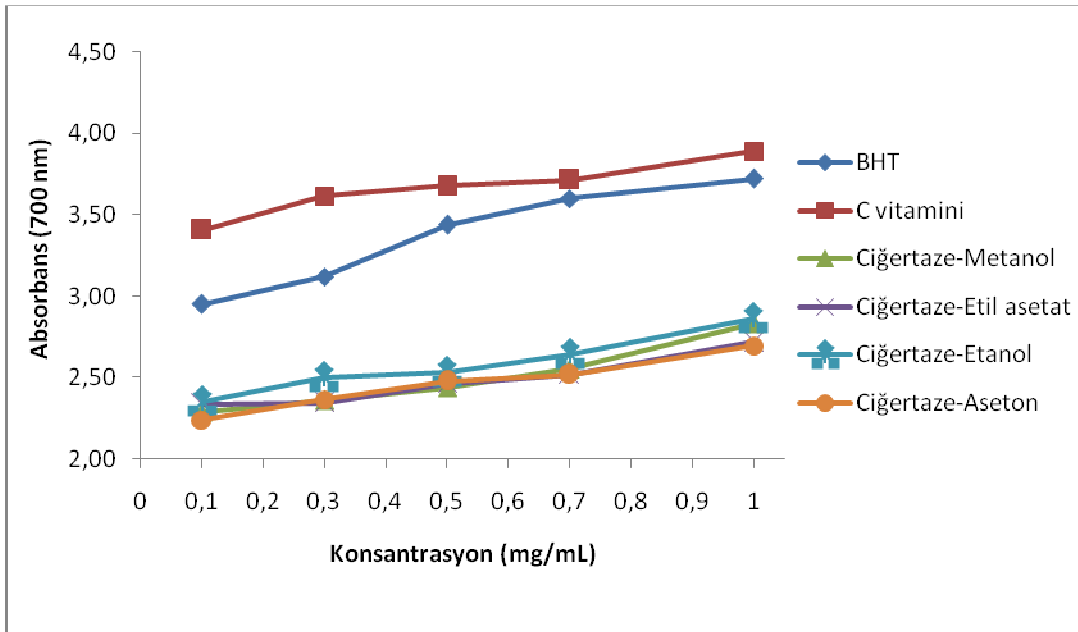
Şekil 4.10. Sedef otu ekstraktlarının indirgeme kapasitesi



Şekil 4.11. Pelin otu ekstraktlarının indirgeme kapasitesi



Şekil 4.12. Kunitsa otu ekstraktlarının indirgeme kapasitesi



Şekil 4.13. Ciğertaze otu ekstraktlarının indirgeme kapasitesi

Grafiklerden görüldüğü üzere, çalışılan bitki ekstraktlarının Fe^{+3} 'ü indirgeme yetenekleri yönünden standartlarla karşılaştırıldığında çok yüksek aktiviteye sahip olmadıkları gözlemlendi. Çalışılan bitkilerin indirgeme gücü yetenekleri genel olarak pelin otu > kunitsa otu > ciğertaze otu > sedef otu şeklinde sıralanmaktadır.

İndirgeme kapasitesi tayininde yüksek absorbans değerinin yüksek indirgeme kapasitesinin göstergesi olduğu kabul edilmektedir.

Ayrıca yine grafiklerden görüldüğü gibi; çalışmada kullanılan tüm ekstraktların konsantrasyon arttıkça artan indirgeme kapasitesi gösterdiği belirlendi. Bununla birlikte absorbans sonuçlarının tüm bitki ekstraktlarında ve çözücü farklılıklarında birbirine çok yakın değerler olduğu ve tüm bitki ekstraktlarının 1000 µg/mL konsantrasyondaki değerleri ancak standartların 100 µg/mL (C vitamini; 3,41±0,01 BHT: 2.95±0,05) konsantrasyonlarındaki absorbans değerleri ile yakın bir sonuç vermiştir.

BÖLÜM 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR

Bu çalışma ile şifa amaçlı kullanılan dört farklı bitkinin, (sedef otu, pelin otu, kunitsa otu ve ciğertaze otu) çeşitli çözenlerdeki ekstraksiyonlarında toplam fenolik madde içerikleri ve fenolik madde profilleri ortaya konularak antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir.

Benzer yapılu bitkilerin fenolik bileşikler bakımından zengin olduğu, yüksek antioksidan aktivite gösterdiği bilinmektedir. Tez çalışmasında fenolik bileşikleri ve dolayısıyla antioksidan kapasitesi hakkında daha önceden çalışılmamış olan Balkanlarda yetişen Adaçayı türü Ciğertaze otu (*Salvia Officinalis*) ve Civanperçemi türü Kunitsa otu (*Achillea Millefolium*), ayrıntılı olarak antioksidan kapasiteleri incelenmemiş Sedef otu (*Ruta Graveolens*) ve Pelin otu (*Artemisia Absinthium*) çeşitli spektrofotometrik yöntemlerle analiz 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 [102].

Bitkilerin içeriğindeki fenolik bileşiklerin eldesinde ve buna bağlı olarak maksimum antioksidan aktivitesine ulaşılmasında ekstraksiyon yönteminde kullanılan çözen farklılığının, sonuçları ne oranda etkileyip etkilemediği araştırılmasında varılan en genel sonuç bitkilerin metanol ekstre analiz değerleri > etanol ekstre analiz değerleri

> etil asetat ekstre analiz > aseton ekstre analiz değerleri şeklinde aktiviteler gösterdiğidir.

Bitkisel örneklerin yapısal farklılıkları nedeniyle ekstraksiyon yöntemlerinde her örnek için tek bir özgen sisteminin kullanımından bahsetmek mümkün olamamaktadır. Elde edilen sonuçların da açıkça ortaya koyduğu gibi, analizlerde farklı ozgenlerle çalışarak en uygun özgen seçebilir ki bu sayede, bitkilerin antioksidan kapasitesi hakkında doğru ve yüksek sonuçlar elde edilebilir.

Fenolik madde ve flavonoid miktarları ile antioksidan kapasitesi tayin yöntemleri arasında ilişki mevcut olabilir. Özellikle radikal yakalama temeline dayalı DPPH gibi metotların toplam fenolik madde ve flavonoid miktarları ile ilişkisi bazı bitkisel yapılarda önemli olabilir. 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) radikali, bununla birlikte antioksidan kapasiteleri ile fenolik bileşikler ve flavonoidler arasında da önemli farklılıklar söz konusu olabilir. Bitkisel kaynakların antioksidan kapasitelerini değerlendirirken bu ilişkilerin de irdelenmesi önerilmektedir.

Sonuçlara göre, çalışılan bitkilerin fenolik madde içeriğindeki farklılıkların, gösterdikleri antioksidan özelliklerini etkilediği açıkça gorulmuştur. Buna dayanarak ekstraktların gösterdikleri farklı antioksidan aktivitelerin, ekstraksiyon sırasında ozucuye geçebilen fenollerin miktarı ve kimyasal yapılarından dolayı olduğu söylenebilir. Yüksek fenolik miktarına veya yüksek radikal yakalama aktivitesine sahip olmanın, tüm antioksidan aktivitesi çalışmalarında yüksek sonuç vermediği açıkça gorulmuştur. Boylenlikle tek bir yöntemle antioksidan aktivitesi hakkında karar vermenin doğru bir yaklaşım olmadığı anlaşılmakta ve buna göre antioksidan aktivitesi belirlenirken, farklı yöntemler kullanılması, farklı metotların uygulanması ve elde edilen aktivite sonuçlarının, her bir özelliğe göre verilmesi daha doğru bir yaklaşım olacaktır.

Bu kapsamdaki antioksidan aktivite çalışmalarına genel olarak bakıldığında bitkilerin aktivitelerinin kunitsa otu > ciğertaze otu > sedef otu > pelin otu şeklinde olduğu görüldü. Bu veri ve sonuçlara göre halk arasında ciğeri tazeleyen bitki olarak bilinen şifa amaçlı olarak tüketilen ciğertaze otu ve kanser türlerinde yine şifa amaçlı olarak

tüketilen kunitsa otunun antioksidan özellikleri deneysel olarak belirlenmiş olup tüketilmeleri sonucu alınan olumlu etkilerin antioksidan özelliklerinden ötürü olduğu düşünülmektedir. Bunun yanında sedef otu ve pelin otunun da insanlar arasında şifa amaçlı tüketilmeleri sonucunda hastalıklara karşı sağladıkları yararların, diğer bitkilere göre daha az aktivite göstermelerine rağmen antioksidan özelliklerinden ötürü olduğu düşünülmektedir.

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 ve sağlık, sistemlerindeki antioksidan etkilerinin incelenmesi ile çalışmaların hastalıkları tedavi edici alternatif yolları uygulamaya yönelik devamlılığının sağlanması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] HALLIWELL B., GUTTERIDGE JMC., “Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview.” *In: Methods in Enzymology*, 1990; 186, 1-85.
- [2] PAPAS, A.M., Determinants of antioxidant status in humans. *Lipids*, 1996; 31, 77- 82.
- [3] ŞERBETÇİ H., Meyan (*Glycyrrhiza glabra L.*) Bitkisinin Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 2007.
- [4] BERLETT, B.S., STADTMAN, E.R., Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative, Stres. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997; 272, 20313-20316.
- [5] SZWEDA, P.A., FRIGUET, B., SZWEDA, L.I., Proteolysis, free radicals, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 2002; 33, 29-36.
- [6] SOHAL, R.S.,. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radical Biology and Medicine*, 2002; 33, 37-44.
- [7] GRUNE , T., JUNG, T., MERKER, K., DAVIES, K.J.A., Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and ‘aggresomes’ during oxidative stress, aging, and disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2004; 36, 2519-2530.
- [8] DÜZGÜNER, V., Deneysel olarak diyabet oluşturulan tavşanlarda çinkonun lipid peroksidasyonu ve antioksidan sistem üzerine etkisi, Yüksek Lisans Tezi, M.K.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji (VET) Anabilim Dalı,2005.
- [9] HURST, R., BAO, Y., JEMTH, P., MANNERVIK, B., WILLIAMSON, G., Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of rat class Theta glutathione transferase T2-2, *Biochem Soc Trans*, 1997; 25: S559.
- [10] MILLS, EM., TAKEDA, K., YU, ZX., et al. Nerve growth factor treatment prevents the increase in superoxide produced by epidermal growth factor in PC12 cells, *J Biol Chem*, 1998; 273:22165-8.

- [11] EREN E., Bazı Soğans Bitkilerin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya, 2011.
- [12] RAMARATHNAM, N., OSAWA, T., NAMIKI, M. AND KAWAKISHI, S., Chemical studies on novel rice hull antioxidants. 1. Isolation, fractionation, and partial characterization. *J. Agric. Food Chem.*, 1988; 36, 732-737.
- [13] LARSON, R. A., The antioxidants of higher plants. *Pytochemistry*, 1988; 27 (4), 969-978.
- [14] CAO, G., SOFIC, E. and PRIOR, P., Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radical Biol. Med.*, 1997; 22, 749-760
- [15] WANG, H., CAO, G. and PRIOR, R.L., Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 1996; 44, 701-705.
- [16] PRATT, D.E., HUDSON, B.J.F., Natural antioxidants not exploited commercially in food antioxidants.; Hudson B.J F.; Ed.; Elsevier; Amsterdam, 1990; 17-192.
- [17] AK T., Curcumin'in Antioksidan ve Antiradikal Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 2006.
- [18] İŞBİLİR Ş.S., Yaprakları Salata-Baharat Olarak Tüketilen Bazı Bitkilerin Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne 2008.
- [19] PRIOR RL., "Antioxidant capacity and health benefits of fruits and vegetables." *NABC Meetings in Portland, Oregon*, 1998.
- [20] NEHIR EL S., KARAKAYA S., TAŞ AA., "Bazı gıdalardaki fenolik bileşiklerin antioksidan etkilerinin in vitro koşullarda saptanması." *TÜBİTAK Projesi*, 1999.
- [21] FRANKEL EN., "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., 1999
- [22] HALVORSEN BL., HOLTE K., MYHRSTAD MCW., BARIGMO I., HVATTUM E., REMBERG SF. vd., "A systematic screening of total antioxidants in dietary plants." *The Journal of Nutrition*, 2002; 132(3), 461-471
- [23] OPARA EC., ROCKWAY SW., "Antioxidants and micronutrients". *Disease a Month*, 2006; 52, 151-163

- [24] ORAK HH., "Total antioxidant activities, phenolics, anthocyanins, polyphenoloxidase activities and its correlation of some important red wine grapevarieties which are grown in Turkey.", *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*,2006; Topic: Food Science and Technology,9(1),<http://www.ejpau.media.pl/volume9/issue1/art18.html>.
- [25] ÖZCAN MM., BAYDAR H., SAĞDIÇ O., ÖZKAN G., "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, 2007.
- [26] GOMBERG, M., An incidence of trivalent carbon trimethylphenyl, *J. Am Chem. Soc.* 1900; 22, 757-771.
- [27] PERKINS, M.J., *Radical Chemistry*, Ellis Horwood,London, 1995.
- [28] ONAT T., EMERK K., SÖZMEN EY. (Ed.), *İnsan Biyokimyası*, Palme Yayıncılık, Ankara,2002.
- [29] AKKUŞ İ, *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*, Mimoza Yayınları, Konya,1995.
- [30] GÖÇ., B., Türkiye’deki yenilebilir soğansız bitkilerin toplam antioksidan içeriklerinin araştırılması, Yüksek lisans tezi, İstanbul Teknik üniversitesi, Fen bilimleri enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 2009.
- [31] SARIKAYA, A.O., Kestane bal ve propolisinin fenolik asit kompozisyonu ve antioksidan özelliğinin belirlenmesi, Yüksek lisans tezi, Karadeniz Teknik üniversitesi, Fen bilimleri enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 2009.
- [32] FRIDOVICH I. Superoxide Dimutases. *Meth. Enzymol* 1986; 58: 61–97.
- [33] VON-SONNTAG C. *The Chemical Basis of Radiation Biology*, London, Taylor & Francis, 1987; pp.:15-49.
- [34] HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J.M.C., *Free radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford, 1989; 238-240.
- [35] WEISS, S.J., Tissue destruction by neutrophils, *New Engl. J. Med.*, 1989; 320, 365-376.
- [36] ARUMA, G. I., SPENCER, J.P.E., WARREN, Q.D., JENNER, P., BUTLER, P., HALLIWELL, B., Characterization of Food Using Commercial Garlic Antioxidants, *Illustrated and Food Chemistry*, 1997; 60, 149, 156.
- [37] SCANDALIOS, J.G., *Oxidative Stress and The Molecular Biology of Antioxidant Defenses*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1997; p.1.

- [38] MOLDOVAN, L., MOLDOVAN, N.I., Oxygen free radicals and redox biology of organelles. *Histochemistry and Cell Biology*, 2004; 122, 395-412.
- [39] NAMIKI, M., Antioxidants/antimutagens in food. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, 1990; 29, 273-300.
- [40] ÖZTÜRK M., *Micromeria Ciliçica* ve *M. Juliana* Türlerinde Antioksidan Bileşiklerin Hplc İle Analizi Ve Yapılarının Aydınlatılması, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Enstitüsü, İstanbul, 2008.
- [41] WAYNER, D.D.M., BURTON, G.W., INGOLD, K.U., LOCKE, S., Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capacity of human blood plasma by controlled peroxidation, *FEBS Letters*, 1985;187 (1) 33-37.
- [42] REISCHE DW., LILLARD DA., EITEN MILLER RR., AKOH CC, MIND B., editör., *Food Lipids Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, New York: Marcel Dekker Inc; 2002; pp.: 335-542.
- [43] VECCHIA CL., ALTIERI A., TAVANI A., "Vegetables, fruit , antioxidants and cancer: A Review of Italian Studies." *European Journal of Nutrition*, 2001; 40, 261-267.
- [44] GIUGLIANO D., CERIELLO A., ESPOSITO K., "The effect of diet on inflammation: Emphasis on the metabolic syndrome." *Journal of American College of Cardiology*, 2006; 48(4), 677-685.
- [45] SCHRODER H., "Protective mechanism of the Mediterranean diet in obesity and type 2 diabetes." *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2007; 18, 149-160.
- [46] HALLIWELL B., "Free radicals and antioxidants:A personal view." *Nutrition Reviews*, 1994; 52(8), 253-265.
- [47] SEVEN A., CANDAN G., "Antioksidan savunma sistemleri." *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 1996; 27(1), 41-50.
- [48] ANDERSON RA., "Prescribing antioxidants."Chapter 103, p.1083-1094, *In: Rakel: Integrative Medicine*, 2nd ed., Saunder, 2007.
- [49] TUNALIER Z., ÖZTÜRK N., KOŞAR M., BAŞER K.H.C., DUMAN H., KIRIMER N., Bazi *Sideritis* Türlerinin Antioksidan Etki Ve Fenolik Bileşikler Yönünden İncelenmesi, 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, 29-31 Mayıs 2002.
- [50] GROOT, H., RAUEN, M., Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundamental Clinic Pharmacology*, 1998; 12, 249-255.

- [51] VERMERRIS W., NICHOLSON R., Phenolic compound Biochemistry Springer, 2006; 2-14.
- [52] BİLALOĞLU GULİYE V., HARMANDAR M., Flavonoidler: Molekül yapıları, kimyasal özellikleri, belirleme teknikleri, biyolojik aktiviteleri, Aktif Yayınevi, İstanbul, 2000.
- [53] HEIM, K.E., TAGLIAFERRO, R., BOBILYA, D.J., Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, The Journal of Nutritional Biochemistry, 2002; 13, 572-584.
- [54] RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., PAGANGA, G., Antioxidant properties of phenolic compounds, Trends in Plant Science, 1997; 2, 152-159.
- [55] MILLER NJ., LUIZ-LARREA MB., “Flavonoids and other plant phenols in the diet: Their significance as antioxidants.” *Journal of Nutritional and Environmental Medicine*, 2002; 12, 39-51.
- [56] ROSS JA., KASUM CM, “Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety.” *Annual Review of Nutrition*, 2002; 22, 19-34.
- [57] ÇİMEN MBY., “Flavonoidler ve antioksidan özellikleri.” *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 1999; 19, 296-304.
- [58] KNEKT, P., JÄRVINEN, R., SEPPÄNEN, R., HELIÖVAARA, M., TEPPÖ, L., PUKKALA, E. and AROMAA, A., Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am. J. Epidemiol*, 1997; 146, 223-230.
- [59] HERTOĞ, M.G.L., KROMHOUT, D., ARAVANIS, C., BLACKBURN, H., BUZINA, R., FIDANZA, F., GIAMPAOLI, S., JANSEN, A., MENOTTI, A., NEDELJKOVIC, S., PEKKARINEN, M., SIMIC, B. S., TOSHIMA, H., FESKENS, E. J. M., HOLLMAN, P. C. H. AND KATAN, M. B., Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch. Intern. Med.*, 1995; 155, 381-386.
- [60] COŞKUN T., Nutrition and Metabolism Unit, Department of Pediatrics, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey Health benefits of functional foods, *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 2005; 48: 69-84.
- [61] CONNER ve BEUCHAT 1984, AKGÜL 1997, ARORA ve KAUR 1999, GRIFFITHS ve ark. 2002.
- [62] RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., BOLWELL, P.G., BRAMLEY, P.M., PRIDHAM, J.B., The relative activities of plant-derived polyphenolic flavonoids, *Free Radical Research*, 1995; 22, 375-383.
- [63] www.şifalıbitkiler.biz/ 15/10/2012

- [64] www.tr.wikipedia.org 20/10/2012
- [65] www.herbalisatabay.com 15/10/2012
- [66] www.50mucizebitki.com 15/10/2012
- [67] www.zdravstvo.com/kunica 09/08/2012
- [68] TREPEN M., "Gesundheit aus der Apotheke Gottes" "Tanrı'nın Eczanesinden Sağlık", Anahtar Kitaplar Yay., Çev.: N.Eröztürk, 1994.
- [69] SANTOS-GOMES, P. C., SEABRA, R.M., ANDRADE, P.B., FERNANDES-FERREIRA, M., "Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro shoots of sage", *Plant Science*, 2002; 162: 981- 987.
- [70] KOLEVA, I., IVAN BEEK, A. T., LINSSEN, J. P. H., DE GROOT, A. and EVSTATIEVA L. N., Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods, phytochemical analysis, 2002; 13: 8- 19.
- [71] DORMAN, H. J. D, PELTOKETO, A., HILTUNEN, R. and TIKKANEN, M. J., Characterization of the antioxidant properties of de-odorized aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs, *Food chemistry*, 2003; 83(2): 255-262.
- [72] MILIAUSKAS, G., VENSKUTONIS, P. R. and VAN BEEK, T. A., Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts, *Food chemistry*, 2004; 85 (2): 231-237.
- [73] TROUILLAS, P., CALLISTE, C. A., ALLAIS, D. P., SIMON, A., MARFAK, A., DELAGE, C. and DUROUX, J. L., Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas, *Food chemistry*, 2003; 80(3): 399-407.
- [74] SINGLETON, V. L., ORTHOFER , R. and LAMUELA-RAVENTOS, R. M., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-ciocalteu reagent, *Methods in enzymology*, 1999; 299: 152-178.
- [75] HUANG D., OU B., PRIOR R., "The chemistry behind antioxidant capacity assays". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005; 53, 1841-1856.
- [76] VINSON, J., ZUBIK, L., BOSE, P., SAMMON, N. and PROCH, J., Dried fruits: excellent in vitro and in vivo antioxidants, *Journal of the American College of nutrition*, 2005; 24(1): 44-50.

- [77] FRANKEL, E.N., MEYER AS., The problems of using one dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants.”*Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000; 80, 1925-1941.
- [78] MOLYNEUX, P., The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Journal of science and technology*, 2004; 26(2): 211-219.
- [79] APAK, R., GÜÇLÜ, K., ÖZYÜREK, M. and KARADEMİR, S. E. A novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols, vitamin C and E using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004; 52: 7970-7981.
- [80] ARDAĞ, A., Antioksidan kapasite tayin yöntemlerinin analitik açıdan karşılaştırılması, Yüksek lisans tezi, Adnan Menderes üniversitesi, Fen bilimler enstitüsü, Analitik anabilim dalı, 2008.
- [81] LIU F, OOI VEC, CHANG ST., Free radical scavenging activity of mushroom polysaccharide extracts., *Life Sci*; 1997; 60: 763–771.
- [82] YANISHLIEVA NV., MARINOVA EM, “Stabilisation of edible oils with natural antioxidants”. *European Journal of Lipid Science Technology*, 2001; 103, 752-767.
- [83] AMES, B.M., SHIGENA, M. K. HAGEN, T.M., Oxidants, Antioxidants and The Degenerative Diseases of Aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1993; 90: 7915-7922.
- [84] KAUR, C. and H.C. KAPOOR., Antioxidants in Fruits and Vegetables -The Millenniums Health. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 2001; 36 (7):703-725.
- [85] SHON MY., KIM TH., SUNG NJ.: “Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* *Phellinus* of *Hymenochaetac* extracts.” *Food Chemistry*, 2003; 82, 593-597.
- [86] TEPE, B., DAFERERA, D., TEPE, A.S., POLISSIOU, M., SOMKEN, A., Antioxidant activity of the essential oil and various extracts of *Nepeta flavida* Hub. Mor. from Turkey, *Food Chemistry*, 2007; 103 1358–1364.
- [87] ZHENG W., WANG SY.; “Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001; 49, 5165-5170.
- [88] PROESTOS C., CHORIANOPOULOS N., NYCHAS GJE., KOMAITIS M.: “RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity.”*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005; 53, 1190-1195.

- [89] BUNEA, A., ANDJELKOVIC, M., SOCACIU, C., BOBIS, O., NEACSU, M., VERHE, R., CAMP, J.V., Total and individual carotenoids and phenolic acids content in fresh, refrigerated and processed spinach (*Spinacia oleracea* L.), Food Chemistry, 2008; 108 649–656.
- [90] LU, Y., FOO, L.Y., Antioxidant Activities of Polyphenols from Sage (*Salvia officinalis*), Food Chemistry, 2001; 75 197-202.
- [91] GAMEZ-MEZA, N., NORIEGA - RODRIGUEZ, J.A., MEDINA-JUAREZ, L.A., ORTEGA - GARCÍA,J., CAZAREZ - CASANOVA, R., ANGULOGUERRERO, O.: J.A.O.C.S., 1999; 76, 1445.
- [92] MORENO MIN, ISLA MI, SAMPIETRO AR, VATTUONE MA., Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. J Ethnopharmacol; 71: 109–114, 2000 , T.C. Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik Ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Üzümsü Meyvelerden Elde Edilen Ekstraktların Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi ve Meyveli İçeceklerdeki Raf Ömrüne Etkisi, ÖZARDA Ö., Yüksek Lisans Tezi, Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı, 2009.
- [93] BLOIS M. S., Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, Nature, 1958; 181: 1199–1200.
- [94] GÜÇLÜ, K., ALTUN, M., ÖZYÜREK, M., KARADEMİR, S. E. And APAK, R., Antioxidant capacity of fresh, sun-and sulphited-dried Malatya apricot (*Prunusarmeniaca*) assayed by CUPRAC, ABTS/ TEAC and folin methods; International Journal of Food Science and Technology, 2006; 41: 76- 85.
- [95] RUCH R. J., CHENG S. J., KLAUNIG J. E., “Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea.” Carcinogenesis, 1989; 10(6), 1003-1008.
- [96] DINIS TCP., MADEIRA VMC., ALMEIDA LM., “Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) assay inhibitors of membrane lipid peroxidation and assay peroxy radical scavengers.” *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1994; 315(1), 161-169.
- [97] OYAIZU M., “Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine.” *Japan Journal of Nutrition*, 1986; 44, 307-315.
- [98] HATANO, T., EDAMATSU, R., MORI, A., FUJITA, Y., YASUHARA, E.; Effect of interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and on DPPH radical. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1989; 37, 2016–2021.

- [99] VINSON, J.A., YONG, H., XUCHUI, S., ZUBÍK, L.; Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998; 46, 3631–3634.
- [100] CHEN HY., LIN YC., HSIEH CL., “Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs.” *Food Chemistry*, 2007; 104, 1418-1424.
- [101] WONG CC., LI HB., CHENG KW., CHEN F., “A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay.” *Food Chemistry*, 2006; 97, 705-711.
- [102] ZIN ZM., ABDUL-HAMID A., OSMAN A., “Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf.” *Food Chemistry*, 2002; 78, 227-231.

ÖZGEÇMİŞ

Rana ARIDURU, 08.08.1986'da Sakarya'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Sakarya'da tamamladı. 2005 yılında başladığı Sakarya Üniversitesi Kimya Bölümünü 2009 yılında ikincilikle bitirdi. 2011 yılında Sakarya Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı.