

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

**BAZI SOĞANSI BİTKİLERİN ANTIOKSİDAN
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Elif EREN

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Gülnur ARABACI

Ağustos 2011

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

**BAZI SOĞANSI BİTKİLERİN ANTIOKSİDAN
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Elif EREN

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Bu tez ... / ... /2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Üye

Üye

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım 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 ve araştırma görevlilerine göstermiş oldukları ilgilerinden dolayı teşekkür ederim.

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

Aileme;

Tüm hayatım boyunca hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, eğitimim ve görüşlerimin daimi destekçisi aileme, özellikle babama minnettarım, tüm aileme sonsuz teşekkürler ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLOLAR LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xii
SUMMARY.....	xiii
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.	
GENEL BÖLÜM.....	5
2.1. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar Hakkında Genel Bilgi.....	5
2.2. Antioksidanlar Hakkında Genel Bilgi.....	7
2.3. Antioksidan Savunma Mekanizması.....	9
2.4. Bazı Antioksidan Maddeler	10
2.5. Fenolik Bileşikler.....	10
2.5.1. Fenolik bileşikler hakkında genel bilgi.....	10
2.5.2. Fenolik asitler ve aldehitler.....	12
2.5.3. Sinamik asitler.....	12

2.5.4. Flavonoidler.....	13
2.6. Çalışılan Soğans Bitkilerin Özellikleri..... (Yeşil soğan, pırasa, çiriş)	17
2.7. Antioksidan Aktivite Tayin Metotları.....	20
2.7.1. FCR ile toplam fenolik madde tayini	21
2.7.2. DPPH serbest radikali giderim aktivitesi metodu.....	22
2.7.3. CUPRAC metodu	23
2.7.4. Demir indirgeme antioksidan gücü (FRAP) tayin metodu..	23

BÖLÜM 3.

DENEYSEL ÇALIŞMALAR	26
3.1. Kullanılan Araç-Gereç ve Kimyasal Maddeler.....	26
3.1.1. Bitkisel materyal.....	26
3.1.2. Kimyasal maddeler.....	26
3.1.3. Kullanılan aletler.....	26
3.2. Kullanılan Ana Çözeltilerin Hazırlanması.....	27
3.2.1. %20'lik Na ₂ CO ₃ çözeltisinin hazırlanması	27
3.2.2. %10'luk Folin-Ciocalteu reaktifinin hazırlanması.....	27
3.2.3. DPPH Serbest radikali giderim aktivitesi yönteminde kullanılan çözelti.....	27
3.2.4. Bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini (CUPRAC) yönteminde kullanılan çözeltiler.....	28
3.2.5. Süperoksit anyon radikali giderim aktivitesi yönteminde kullanılan çözeltiler.....	28
3.2.6. H ₂ O ₂ giderme aktivitesinin yönteminde kullanılan çözeltiler...	29
3.3. Deneysel Çalışma.....	29
3.3.1. Bitkilerin ekstraksiyon aşaması.....	29
3.4. Uygulanan Yöntemler ve Kalibrasyon Grafiklerinin Çizimi.....	30
3.4.1. Folin yöntemiyle toplam fenolik madde tayini.....	30
3.4.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile fenolik bileşiklerin analizi.....	31
3.4.3. DPPH serbest radikali giderim aktivitesi tayini.....	32

3.4.4. Bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini (CUPRAC).....	32
3.4.5. Süperoksit anyon radikali giderim aktivitesi yöntemi.....	33
3.4.6. H ₂ O ₂ giderme aktivitesinin tayini.....	33
3.4.7. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile fenolik bileşiklerin analizi.....	34
BÖLÜM 4.	
ARAŞTIRMA BULGULARI.....	36
4.1. Folin yöntemiyle toplam fenolik madde tayini sonuçları.....	37
4.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile fenolik bileşiklerin analizi sonuçları.....	40
4.3. Bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini (CUPRAC) sonuçları.....	41
4.4. Süperoksit anyon radikali giderim aktivitesi sonuçları.....	44
4.5. H ₂ O ₂ giderme aktivitesinin tayini sonuçları	45
4.6. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile fenolik madde profillerinin belirlenmesi.....	46
BÖLÜM 5.	
SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR.....	67
KAYNAKLAR	70
ÖZGEÇMİŞ	78

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ROT	: Reaktif oksijen türleri
NADPH	: Nikotinamid dinükleotid hidrojen fosfat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
SOD	: Süperoksit dismutaz
CAT	: Katalaz
GPX	: Glutasyon peroksidaz
GSH	: Glutasyon
RAT	: Reaktif azot türlerini
WHO	: Dünya Sağlık Teşkilatı
ET	: Elektron transferi
FCR	: Folin-Ciocalteu reaktifi
TEAC	: Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite ölçümü
CUPRAC	: Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite
DPPH	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
NADH	: Nikotinamidadenin dinükleotit
PMS	: fenazinmetasülfat
NBT	: nitroblütetrazolyum
HPLC	:Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
BHT	:Bütillenmiş hidroksi toluen
ABTS	: 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyezolin-6-sülfonik asit)

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Fenol.....	11
Şekil 2.2.	Gallik asit	12
Şekil 2.3.	Vanilin	12
Şekil 2.4.	Kafeik asit	12
Şekil 2.5.	Klorojenik asit	13
Şekil 2.6.	Flavonoidlerin genel yapısı	14
Şekil 2.7.	Antoksantin üyelerinin kimyasal yapıları.....	15
Şekil 2.8.	a), b), c) : kaempferol, kuersetin, myricetin.....	16
Şekil 2.9.	Yeşil soğan	17
Şekil 2.10	Pırasa.....	19
Şekil 2.11.	Çiriş çiçekli, toprak üstü kısım.....	19
Şekil 2.12.	Çiriş toplandıktan sonraki toprak üstü kısımları.....	19
Şekil 2.13.	DPPH Molekülünün Antioksidan Madde ile Reaksiyonu.....	22
Şekil 2.14.	NBT' den diformazon oluşumu.....	24
Şekil 3.1.	Toplam fenolik madde tayininde standart olarak kullanılan gallik asitin kalibrasyon eğrisi.....	30
Şekil 3.2.	Toplam flavonoid madde tayininde standart olarak kullanılan kuersetinin kalibrasyon eğrisi.....	31
Şekil 3.3.	Troloksun kalibrasyon eğrisi.....	33
Şekil 4.1.	Toplam fenolik madde tayininde standart olarak kullanılan gallik asitin kalibrasyon eğrisi.....	37
Şekil 4.2.	Toplam flavonoid madde tayininde standart olarak kullanılan kuersetinin kalibrasyon eğrisi.....	38
Şekil 4.3.	Bitki Ekstrelerin DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi % İnhibisyon Değerleri	41

Şekil 4.4.	Bitki Ekstrelerin Süper Oksit Anyon Radikali Giderim Aktivitesi % İnhibisyon Değerleri	44
Şekil 4.5.	Bazı fenolik asitlerin optimum HPLC şartlarının belirlenmesi....	47
Şekil 4.6.	Solventde yer alan asetik asit kromatogramı.....	47
Şekil 4.7.	Solventde yer alan metanol kromatogramı.....	48
Şekil 4.8.	35 °C’de kurutulmuş çiriş bitkisinin sudaki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı.....	48
Şekil 4.9.	65 °C’de kurutulmuş çiriş bitkisinin sudaki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı.....	49
Şekil 4.10.	35 °C’de kurutulmuş çiriş bitkisinin metanoldeki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı.....	49
Şekil 4.11.	65 °C’de kurutulmuş çiriş bitkisinin metanoldeki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı.....	50
Şekil 4.12.	35 °C’de kurutulmuş çiriş bitkisinin su:metanol (1:1) karışımındaki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı.....	50
Şekil 4.13.	35 °C’de kurutulmuş çiriş bitkisinin su:metanol (1:1) karışımındaki ekstraksiyonuna ait gerekli pik boyunun görülmesi için daha geniş skalalı HPLC kromatogramı	51
Şekil 4.14.	65 °C’de kurutulmuş çiriş bitkisinin su:metanol (1:1) karışımındaki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı.....	51
Şekil 4.15.	35 °C’de kurutulmuş çiriş bitkisinin etil asetat içindeki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı.....	52
Şekil 4.16.	65 °C’de kurutulmuş çiriş bitkisinin etil asetat içindeki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı.....	52
Şekil 4.17	35 °C’de kurutulmuş yeşil soğan bitkisinin sudaki ekstraksiyonuna ait HPLC Kromatogramı.....	53
Şekil 4.18	65 °C’de kurutulmuş yeşil soğan bitkisinin sudaki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı.....	53
Şekil 4.19	35 °C’de kurutulmuş yeşil soğan bitkisinin metanoldeki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı.....	54
Şekil 4.20	65 °C’de kurutulmuş yeşil soğan bitkisinin metanoldeki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı.....	54
Şekil 4.21	35 °C’de kurutulmuş yeşil soğan bitkisinin su:metanol (1:1)	

	karışımındaki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı.....	55
Şekil 4.22.	65 °C’de kurutulmuş yeşil soğan bitkisinin su:metanol (1:1) karışımındaki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı.....	55
Şekil 4.23.	35 °C’de kurutulmuş yeşil soğan bitkisinin etil asetat içindeki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı.....	56
Şekil 4.24.	65 °C’de kurutulmuş yeşil soğan bitkisinin etil asetat içindeki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı.....	56
Şekil 4.25.	35 °C’de kurutulmuş pırasa bitkisinin sudaki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı.....	57
Şekil 4.26.	65 °C’de kurutulmuş pırasa bitkisinin sudaki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı.....	57
Şekil 4.27.	35 °C’de kurutulmuş pırasa bitkisinin metanoldeki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı.....	58
Şekil 4.28.	65 °C’de kurutulmuş pırasa bitkisinin metanoldeki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı.....	58
Şekil 4.29.	35 °C’de kurutulmuş pırasa bitkisinin su:metanol (1:1) karışımındaki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı.....	59
Şekil 4.30.	65 °C’de kurutulmuş pırasa bitkisinin su:metanol (1:1) karışımındaki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı.....	59
Şekil 4.31	35 °C’de kurutulmuş pırasa bitkisinin etil asetat içindeki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı.....	60
Şekil 4.32	65 °C’de kurutulmuş pırasa bitkisinin etil asetat içindeki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı.....	60

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1.	Serbest radikaller ve serbest radikal üreten bazı türlerin özellikleri.....	6
Tablo 2.2.	Fenolik bileşiklerin karbon sayılarına göre sınıflandırılması.....	11
Tablo 3.1.	Gradient akış tablosu.....	35
Tablo 3.2.	Standart reaktifler için HPLC analiz sonucuna ait bilgiler.....	35
Tablo 4.1.	Toplam fenolik madde miktarı	39
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 2 paralel testin ortalaması olup, standart sapma değerleri göz önüne alındı.).....	40
Tablo 4.3.	TEAC _{CUPRAC} değerleri için standart ve bitki numunelerinin doğru denklemleri.....	42
Tablo 4.4.	Standart reaktifler için TEAC _{CUPRAC} değerleri.....	42
Tablo 4.5.	Bitki numuneleri için TEAC _{CUPRAC} değerleri.....	43
Tablo 4.6.	% H ₂ O ₂ giderme aktivitesi.....	45
Tablo 4.6.	Standart reaktiflerin alıkonma zamanları.....	46
Tablo 4.8.	35 °C' de kurutulmuş çirişin tüm ekstraktlarındaki fenolik bileşikler.....	61
Tablo 4.9.	65 °C' de kurutulmuş çirişin tüm ekstraktlarındaki fenolik bileşikler.....	62
Tablo 4.10.	35 °C' de kurutulmuş yeşil soğanın tüm ekstraktlarındaki fenolik bileşikler.....	63
Tablo 4.11.	65 °C' de kurutulmuş yeşil soğanın tüm ekstraktlarındaki fenolik bileşikler.....	64

Tablo 4.12.	35 °C' de kurutulmuş pırasanın tüm ekstraktlarındaki fenolik bileşikler.....	65
Tablo 4.13.	65 °C' de kurutulmuş pırasanın tüm ekstraktlarındaki fenolik bileşikler.....	65

ÖZET

Anahtar kelimeler: Antioksidan aktivite, çiriş (*Asphodelus Ramosus*), yeşil soğan (*Allium Cepa L.*), pırasa (*Allium Porrum L.*), HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)

Meyve ve sebzelerde doğal olarak bulunan fenolik yapıli bileşikler (flavonoidler, polifenoller), antioksidan özellik göstermekte ve birçok hastalığa iyi geldiği bilinmektedir. Fenolik bileşiklere ilaveten kronik hastalıklara karşı koruyucu yapıdaki kimyasal maddeler karotenoidler, askorbik asit (C vitamini), tiyoller ve tokoferollerdir.

Soğanlı bitkilerin flavonoidli yapıları yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu gösterir. Soğanlı bitkiler ile beslenerek alınan flavonoidlerin metabolizmadaki işlevi; kanser, kalp ve kronik rahatsızlıkları azaltmak şeklindedir.

Soğansız bitkilerin bu fonksiyonları büyük önem teşkil ettiğinden bu konuda bir çalışma tercih edilmiştir. Bu çalışmada kurutulmuş "Allium" bitkilerinden olan pırasa (*Allium Porrum L.*) ile yeşil soğan (*Allium Cepa L.*) bitkilerinin ve sarı zambak olarak da bilinen bir soğangil olan çirişin (*Asphodelus Ramosus*) antioksidan aktiviteleri çeşitli metodlarla incelenmiştir. Bu amaçla bitkiler etüvde farklı sıcaklıklarda kurutulup, doğrayıcı ile ufak parçalar haline getirildikten sonra su, metanol ve etil asetat çözümleri ile ekstrakte edilmiş, bu sayede bitkilerin antioksidan aktivitelerini belirlemede sıcaklık ve çözücü olarak iki parametre kullanılmıştır.

Antioksidan kapasiteye neden olan türlerin belirlenmesi amacıyla, her ekstraktın Folin Cioceltau reaktifi ile toplam fenolik madde içeriği, alüminyum nitrat yöntemi ile toplam flavonoid madde miktarı, DPPH üzerinden serbest redikal süpürücü etki tayini, H₂O₂ giderme aktivite tayini, bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini (CUPRAC), süperoksit anyon radikali giderim aktivitesi tayini yapılmıştır ve bunlar HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) ile desteklenmiştir.

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SOME BULP PLANTS

SUMMARY

Key Words: Antioxidant activity, yellow lily (*Asphodelus Ramosus*), green onion (*Allium Cepa L.*), leek (*Allium Porrum L.*), HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Structure of phenolic compounds found naturally in fruits and vegetables (flavonoids, polyphenols), show antioxidant properties and is known to be good for many diseases. Phenolic compounds protect against chronic diseases in addition to the structure of chemical substances carotenoids, ascorbic acid (vitamin C), thiols and tocopherols.

Plants of onion which have flavonoid structure indicate that the high antioxidant activity. The functions in metabolism of flavonoids which have taken with onions of plants is to reduce cancer, heart and chronic diseases.

A study on this issue was chosen because of crucial functions of these plants. In this study, the leek (*Allium Porrum L.*) dried "Allium" plants and green onion (*Allium Cepa L.*) and *Asphodelus Ramosus* also known as a yellow lily which has been a plant of onion were investigated about antioxidant activities with various methods. For this purpose, plants dried in the oven at different temperatures, were chopped into small pieces with a blender after that the plants were extracted with water, methanol and ethyl acetate resolution, so that the antioxidant activity of plants were determined for two parameters as temperature and solvent.

In order to determine the antioxidant capacity of the species, all of the extracts were analyzed with various methods which those; total phenolic content with Folin Cioceltau reagent, total flavonoid content with aluminum nitrate method, DPPH free radical scavenging through the determination, the determination of the activity of removal of H₂O₂, copper (II) ion reducing antioxidant capacity determination (CUPRAC), removal activity of super oxide anion and the results were with HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Oksidasyon canlı organizmalar için çok önemli bir proses iken oksijen hem yaşamın hem ölümün molekülü olarak bilinmektedir. Oksijen insanların hayatlarını devam ettirebilmeleri için çok önemli bir moleküldür. Oksijen anaeroplara için öldürücü ya da gelişimi durdurucu etkiye sahiptir. Oksijenin eksik indirgenmesi ayrıca reaktif oksijen türlerinin de (ROT) oluşmasına sebep olmaktadır. Hücreye zarar veren bu reaktif oksijen türleri, antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda hücre ölümüne sebep olmaktadır [1].

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 [2-3]. Reaktif oksijen türlerinin düşük seviyeleri hücre farklılaşmasında ve hücre gelişiminin durdurulmasındaki molekül içi iletme sahip çoğu biyokimyasal proseslerde, bağışıklıkta ve mikroorganizmalara karşı savunmada vazgeçilmezdir [4-7]. Bunun aksine reaktif oksijen türlerinin yüksek dozları ya da uzaklaştırılma yetersizliği, şiddetli metabolik bozukluklara sebep olabildiği gibi biyolojik makromoleküllere de zarar verebilen oksidatif strese yol açabilir [8, 9].

Canlılardaki elektron akışı serbest enerjinin elde edildiği birçok basamağı takip eder ve son olarak bu akış oksidatif fosforilasyonda O_2 molekülünde durur. Çünkü indirgenme potansiyeli daha yüksek bir bileşiğin ortamda mevcudiyeti söz konusu değildir. Problemsiz işleyen bir sistemde O_2 suya kadar indirgenir [1].



Serbest radikaller, mitokondriyal solunum, fagositlerin aktivasyonu ve bazı enzimlerin (nikotinamid dinükleotid hidrojen fosfat (NADPH) oksidaz ve ksantin oksidaz gibi) ve/veya Fe ve Cu gibi metallerin katalizlediği oksidasyon reaksiyonları sonucunda oluşurlar. Oluşan bu serbest radikaller, özellikle reaktif oksijen türleri (ROT), lökositlerin yabancı maddeleri yok etmeleri sırasında, biyolojik olarak aktif olan önemli aracı moleküllerdir ve yangı ile ilgili temel bileşiklerin oluşmasında da rol oynarlar. Bununla beraber aşırı üretilmeleri halinde toksiktirler ve hücrelerdeki lipitleri, proteinleri ve DNA'yı oksitleyerek peroksidasyona ve modifikasyonlara neden olabilirler. Bu prooksidanların, özellikle ROT'lerin birikmesine "oksidatif stres" denir. Son yıllarda oksidatif stresin, başta diyabet olmak üzere koroner kalp rahatsızlıkları, kanser, katarakt gibi daha birçok hastalığın patogenezinin neden olduğu saptanmıştır.

Organizmada oksidatif stres oluşturan değişik oksidanlara karşı daha önce bahsedildiği gibi 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.

Oksidanların özellikle ROT'lerin aşırı birikmesiyle oluşan oksidatif stres; membran lipitlerindeki doymamış yağlardaki bağları koparıp membran viskozitesini ve geçirgenliği artırır, ayrıca membran seçiciliğini de değiştirir. ROT'lerin oluşumunun başlangıcında yer alan O_2^- , proteinleri bölümlere ayırarak enzim aktivasyonlarında bozulmaya ve iyon transferinde aksaklıklara neden olurken, ayrıca demir iyonu ile reaksiyona girip proteolizis oluşturur. DNA'da ise; sakkarit halkalarında kopmalar sonucu mutasyonlar, bazlardaki modifikasyonlara bağlı translasyon hataları, zincir kırılmaları ile proteosentezde inhibisyonlara neden olur. Böylece hücre ölüme gider. 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 .

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; metalotionin gibi serbest radikal yok edicileri ve Zn gibi iz elementlerden oluşur [10].

Antioksidanlar, metabolizma veya yiyecekte düşük derişimde bulunduğunda oksidasyon olayını önemli ölçüde geciktirir veya bu olaya engel olur [4]. Yine başka bir tanımla; lipid, protein, karbonhidrat ve nükleik asitler gibi yükseltgenebilir bir substratla karşılaştırıldığında daha düşük konsantrasyonlarda bulunduğu zaman o substratın oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren/önleyen maddeye antioksidan denir.

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 çıkan oksidatif stresle sonuçlanır [5].

Bu çalışmanın amacı; Türkiye'de çok miktarda var olan ve geniş yetişme spektrumuna sahip soğansız bitkilerden soğan (*Allium Cepa L.*), pırasanın (*Allium Porrum L.*) ve çirişin (*Asphodelus Ramosus*) farklı sıcaklıklarda kurutulmuş hazırlanan farklı çözeltilerdeki ekstraktlarında antioksidan kapasite belirlemek adına araştırma yapmak, bulunan fenolik bileşiklerin miktarı ve profili hakkında bilgi sahibi olmaktır. Soğan çeşitlerinin fenolik açıdan zenginliği ve antioksidan aktivite taşıdığı bu güne dek bir çok yayında yer almıştır [11].

Asphodelus türleri hakkında biyolojik ve ekolojik bilgilere ulaşılmışsa da fenolik bileşiklerine ait yayınlanmış çalışmalara rastlanmamıştır [12]. 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 ve Antioksidanlar Hakkında Genel Bilgi

1891’de George Johnstone Stoney atomlardaki elektrik yüklü birimlerin varlığını öne sürerek bu yüklere elektron isminin verilmesini istedi. Elektronlar atom ve moleküllerde orbital olarak isimlendirilen küresel yörüngelerde bulunurlar ve her orbital birbirine zıt yönde hareket eden en fazla iki elektron taşır [13]. Serbest radikaller son orbitallerinde eşleşmemiş elektron içerir ve buna bağlı olarak çok fazla reaktif özellik taşırlar. Serbest radikalde eşleşmemiş elektron, atom veya molekülün üst kısmına konulan noktayla belirtilir. Bunlar oksijen türevi ya da azot türevi serbest radikaller olabilirler. Normal fizyolojik şartlarda insan ve hayvan metabolizmasında üretilir. Oksijen türevi serbest radikaller proteinlere, karbohidratlara, yağlara, nükleik asitlere zarar verebilir. Serbest radikal reaksiyonları plazma membranlarına büyük ölçüde zarar verebilir.

Serbest radikaller peroksidasyon denen zincir reaksiyonlarına sebep olur. Bu reaksiyon insan metabolizmasını önemli ölçüde etkiler. Bu etkilerin bazılarında kalp-damar hastalıkları, kanser vakaları, eklem kireçlenmesi gibi örnekler verilebilir. Bu durumun etkileri yine metabolizma tarafından zararsız hale getirilir. Vücuttaki enzim sistemleri bunu sağlar. Eğer enzim sistemleri çalışmaz ise, serbest radikalleri uzaklaştırmak üzere diyetle madde alınır ve bu işi onlar yapar. Serbest radikalleri zararsız hale getiren diyet maddelerine antioksidan denir [14]. 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 [15].

İçinde bulunduğumuz çevrede çeşitli fiziksel etkiler ve kimyasal olaylar nedeniyle devamlı bir radikal oluşumu olur. Bu radikal oluşumu nerede ve nasıl üretildiğine bakılmaksızın başlıca 3 mekanizma ile açıklanabilir (Kılınç 2002):

1.Kovalent Bağların Homolitik Kırılması: Yüksek sıcaklık (500-600 °C) ve yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar kimyasal bağların kırılma nedenidir. Eğer kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalırsa bu kırılma türüne homolitik kırılma denir ve her iki atom üzerinde de paylaşılmamış elektron kalır. Paylaşılmamış elektron taşıyan türler radikalik özellik gösterirler.

2.Normal Bir Molekülün Elektron Kaybetmesi: Radikalik özellik göstermeyen bir molekülden elektron ayrılması sonucu dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa radikal form oluşur.

3.Normal Bir Moleküle Elektron Transferi: Radikal özellik göstermeyen bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşması yine radikal form oluşturur.

Tablo 2.1. Serbest Radikaller ve Serbest Radikal Üreten Bazı Türlerin Özellikleri (Halliwell, 1994)

Adı	Simgesi	Özelliği
Hidrojen radikali	H [•]	Bilinen en basit radikal
Hidroksil radikali	OH [•]	En reaktif oksijen metaboliti radikali. İnsan vücudundaki tüm moleküllere saldırır
Süperoksit radikali	O ₂ ^{•-}	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü
Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂	Reaktifliği düşük, moleküler hasar özelliği zayıftır
Singlet oksijen	O ₂	Yarılma ömrü kısa, güçlü oksidatif form
Perhidroksi radikali	HO ₂ ^{•-}	Lipidlerde hızlı çözünerek lipid peroksidasyonunu artırır
Peroksil radikali	ROO ^{•-}	Perhidroksile oranla daha zayıf etkilidir, lipidlere lekolize olur
Triklorometil radikali	CCl ₃ [•]	CCl ₄ metabolizması ürünüdür, karaciğerde üretilen bir radikaldir
Tiyil radikali	RS [•]	Sülfürlü ve eşleşmemiş elektron içeren türlerin genel adıdır
Alkoksil radikali	RO [•]	Organik peroksitlerin yıkımı ile üretilen oksijen metabolitidir
Azot monoksit	NO	L-argininden <i>in vivo</i> üretilir
Azot dioksit	NO ₂	NO [•] in oksijen ile reaksiyonundan üretilir. Kirli hava, sigara dumanı vb.de bulunur.

Oksijen radikalleri, buldukları ortamda çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenlerle zorunlu metabolik reaksiyonlar sonucunda oluşan en önemli serbest radikaldir. Bunlar arasında süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$), hidroksil radikali (OH \cdot) ve radikal olmayan hidrojen peroksitin (H_2O_2) özel yerleri vardır, bunlar reaktif oksijen türleri (ROT) olarak bilinirler ve biyolojik sistemlerdeki oksijenden oluşan en önemli serbest radikallerdir. Serbest oksijen radikali reaksiyonlarında temel işlevi, oksijenin kendisi, süper oksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve geçiş metallerin iyonları gösterir. Oksijen atomunun toplam sekiz elektronundan, dış yörüngede bulunan iki tanesi eşleşmemiştir. Moleküler oksijen (O_2), iki tane eşleşmemiş elektronu bulunduğu için 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 kaçacağı meydana gelir. Bu oksijenin redüksiyonu ile süperoksit anyonu (O^{2-}), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH \cdot) gibi reaktif ürünler açığa çıkar. Bu radikaller oksijenin toksik etkisinin gerçek nedenini oluştururlar [16], [17].

2.2 Antioksidanlar Hakkında Genel Bilgi

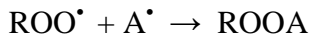
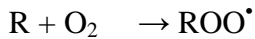
Oksijeni bulan Priestley ve Scheele ile oksidasyon olayını keşfeden Lavoisier'in de önemle kabul ettikleri şudur ki; moleküler oksijen tüm aerobik organizmalar için büyük önem teşkil eder fakat bunun yanı sıra bazı uygun koşullar oluştuğunda tehlikeli de olabilmektedir. Yani bilim adamlarına göre oksijen hem hayatın kendisidir hem de yine aynı oksijen hayatı yok edebilir [18]. Metabolizmadaki elektron taşıma sistemleri her zaman mükemmel değildir, bazı durumlarda oksijen suya kadar indirgenemez ve ortamı bu halde terk eder. Oksijen reaksiyonunu tam olarak gerçekleştirilememiştir 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 [19]. 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 [20]. Yine başka bir tanımla; lipid, protein, karbonhidrat ve nükleik asitler gibi yükseltgenebilir bir substratla karşılaştırıldığında daha düşük konsantrasyonlarda bulunduğu zaman o substratın oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren/önleyen maddeye antioksidan denir [21].

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 çıkan oksidatif stresle sonuçlanır [22].

Zincirleme reaksiyon teorine 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 [23]. Antioksidanlar bu zincir reaksiyonunu kırıcı rol oynarlar. Yani bu bileşikler aktivaston enerjisini kabul eder fakat bu enerjiyi başka moleküle aktaramazlar. Bu şekilde bir antioksidan molekülün araya girmesiyle otoksidasyona uğraya bilen maddenin bir çok molekülü yükseltgenmekten kurtulabilir.

Antioksidanların etki mekanizmasını şematik olarak göstermek gerekirse;



(AH: Antioksidan molekülü, A[•] 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 [24].

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 radikalın molünün sayısal değeridir.

Antioksidanlar iki grupta sınıflandırılırlar: Birincil antioksidanlar; yeni oksidasyon zincirleri başlatan, yeni radikal üretiminin hızını düşürürler. Hidroperoksitleri indirgeyerek (glutasyon, peroksidaz, katalaz gibi) veya transiyon metal iyon katalizörlerini ayırarak (transferrin) etki edebilirler. İkincil antioksidanlar radikalleri doğrudan tutarlar, böylece oksidasyonun zincir uzunluklarını azaltarak peroksidatif hasarın büyümesini sınırlarlar (E vitamini, süperoksit dismutaz gibi). Bazı metal kelatlayıcıları da radikalik zincir reaksiyonlarını katalizleyen geçiş metallerini çekerek ikincil antioksidan gibi davranırlar [25].

2.3. Antioksidan Savunma Mekanizması

Oksijenin hem yararları hem de zararları yukarıda ifade edilmiştir. Aerobların hayatta kalabilmelerinin sebebi ise, antioksidan savunma mekanizmalarının işlemedir.

- Antioksidan savunma mekanizması oluşturan etkenler şöyle sıralanabilir:
- Süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidaz enzimleri serbest radikalleri ve diğer reaktif türlerini katalitik olarak uzaklaştırırlar.
- Proteinler farklı mekanizmalarla biyomolekülleri oksidatif hasara karşı korurlar.
- Glutasyon, askorbik asit ve α -tokoferol gibi küçük moleküllu ajanlar reaktif oksijen ve reaktif azot türlerini (ROT/RAT) süpürürler [26].

2.4. Bazı Antioksidan Maddeler

Alfa tokoferol (E Vitamini): E vitamini alfa, beta, gama ve delta tokoferolleri içerir. Alfa tokoferol önemli bir antioksidandır ve buğday, mısır, darı, pirinç gibi tahıllarda fazla oranda bulunur. İlâveten 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 tüketilmeli, tahıl ürünlerini ise kepekli olarak tüketmek daha sağlıklı olur

Beta-caroten (A Vitamini): 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

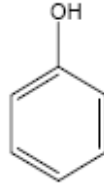
Askorbik Asit (C Vitamini): Domates, yeşil yapraklı sebzeler (brokoli, ıspanak vb.) turunçgiller ve patates gibi sebze ve meyvelerde bolca bulunur. C vitamini çabuk okside olduğundan pişirirken ve hazırlarken dikkat edilmeli, ihtiva eden besinlerin hafif pişirilmeli, yenilebiliyorsa çiğ olmalı ve çabuk tüketilmelidir [27].

Fenolik Maddeler: Bu başlık kapsamlı şekilde incelenecektir.

2.5. Fenolik Bileşikler

2.5.1. Fenolik bileşikler hakkında genel bilgi

Fenolik bileşikler bir ya da daha çok fenolik grubun aromatik halkaya direkt bağlanmasıyla oluşur.



Şekil 2.1. : Fenol

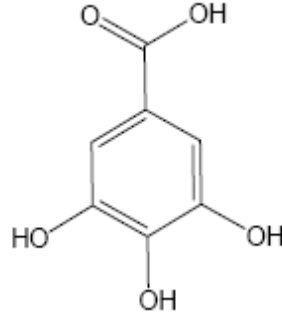
Polifenoller birden fazla hidroksil grubun bir ya da daha fazla benzen halkasına bağlanmasıyla oluşur. Fenolik terimi çok geniş ve çeşitli bileşikler kapsar, gruplandırılması da çok çeşitlidir. Harborne ve Simmonds (1964) moleküldeki karbon sayılarına göre bir sınıflandırma yapmıştır:

Tablo 2.2. Fenolik bileşiklerin karbon sayılarına göre sınıflandırılması

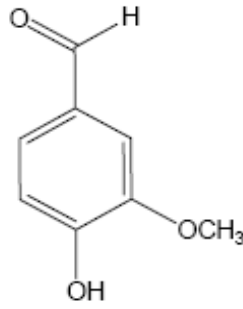
Yapısı	Sınıfı
C_6	basit fenolikler
C_6-C_1	fenolik asitler ve ilgili bileşikler
C_6-C_2	asetofenonlar ve fenilasetik asitler
C_6-C_3	sinamik asitler, sinamil aldehitler sinamil alkoller
C_6-C_3	kumarinler, izokumarinler, chromene
C_{15}	chalkone, aurone, dihydrochalkone
C_{15}	flavan
C_{15}	flavanone
C_{15}	flavanonol
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}	qinone
C_{18}	betasiyaninler

2.5.2. Fenolik asitler ve aldehitler

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



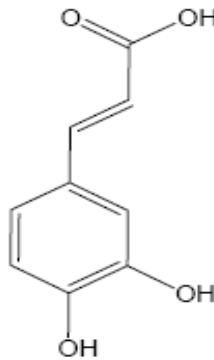
Şekil 2.2. : Gallik asit (karboksil grup vardır)



Şekil 2.3. : Vanilin (karboksil grubu yerine aldehit grubu vardır)

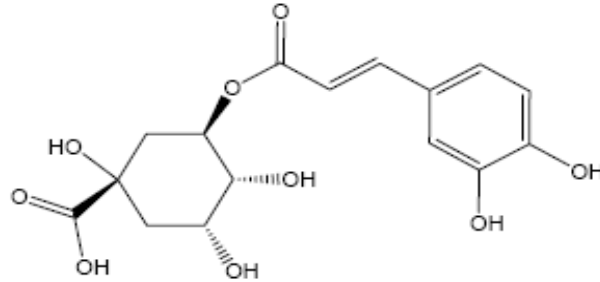
2.5.3. Sinamik asitler

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 2.4. : 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.



Şekil 2.5. : Klorojenik asit

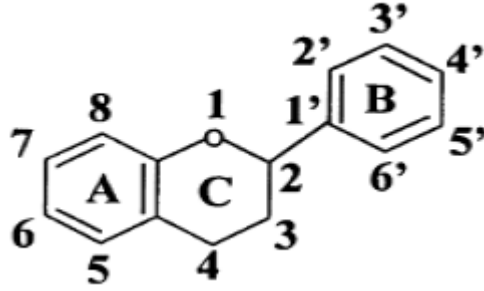
2.5.4. Flavonoidler

Flavonoidler $C_6-C_3-C_6$ yapısındaki 15 karbonlu bileşiklerdir. Flavonoidler genel yapı itibariyle 3 büyük sınıfta toplanabilirler. Yapıdaki C_3 grubu sınıflandırılmayı sağlar. Bu sınıflandırma şöyledir: Chalkone, aurone ve flavonoidler [28]. Biz çalışmamız gereği flavonoidleri kapsamlı inceleyeceğiz.

Flavonoidler insan beslenmesinde yer alan bitkilerde en çok bulunan fenolik yapılu bileşiklerdir. Kuersetin, kaempferol, gallik asit ve myricetin gibi gıda kaynaklı flavonoidler, flavonoller ve fenolik bileşiklerin antibakteriyel, antiviral, antialerjik ve antioksidan gibi geniş bir biyolojik yelpazesi vardır [29]. Flavonoidler flavan çekirdeğe bağlı düşük molekül ağırlıklı polifenolik bileşiklerdir. 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 [30]. Flavonoidler, aromatik halkalara bağlı antioksidan aktivitelerini oluşturan birçok fenolik hidroksil grupları içerirler [31].



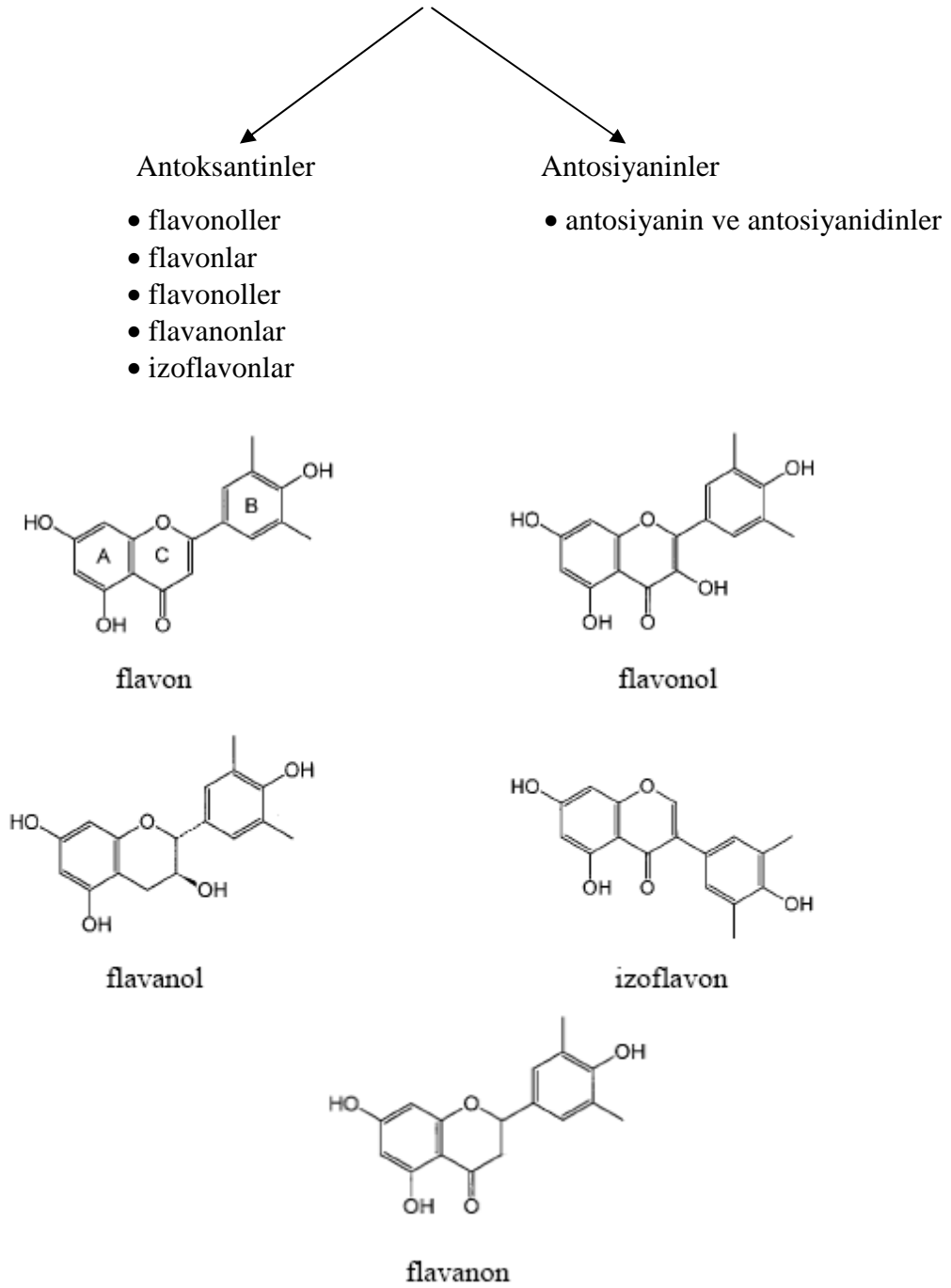
Şekil 2.6. : Flavonoidlerin genel yapısı

Flavonoidler bir asrı geçen süre itibariyle bitkisel pigmentler diye bilinmektedir. Polifenolik bileşiklerdir ve tüm bitkilere dağılmış haldedir. In vitro çalışmalarda serbest radikal yakalama özellikleri ve dolayısıyla antioksidan özellikleri yönüyle çok ve dikkatle çalışılan konu olmuştur. Son yıllarda yapılan çalışmalar flavonoidlerin oksidatif DNA zedelenmesini serbest radikal tutulması dışında mekanizmalarla önlediğini göstermektedir [32].

Flavonoid tüketiminin artması ile koroner kalp hastalığı görülmesi arasında ters bir ilişki vardır. (antioksidan ve antitrombotik etkilerine bağlı olarak) [33]. 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 [34].

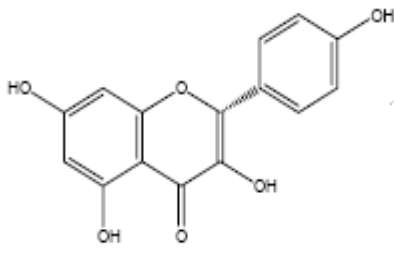
Halkalar arasındaki yapı farklılıkları flavonoidleri sınıflandırır [35].

Flavonoid

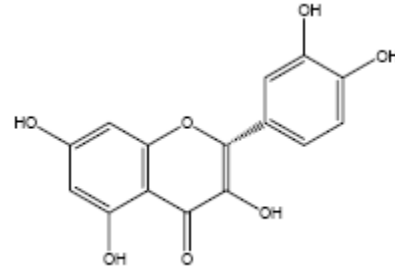


Şekil 2.7. : Antoksanin üyelerinin kimyasal yapıları

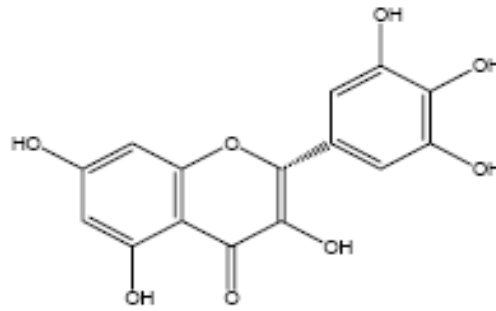
Flavonların heterosiklik halkaları bir keton grubudur. En sık karşılaşılan doğal flavonlara kaemferol, kuersetin, myricetin örnek verilebilir [28].



a) kaempferol



b) kuersetin



c) myricetin

Şekil 2.8. : a), b), c) : kaempferol, kuersetin, myricetin

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 kızılıçık, üzüm ve kırmızı şarapta mevcuttur. Kaempferol ise pırasa, brokoli, marul, greyfurt ve siyah çayda bulunur [36].

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 epikateşin'dir [37].

2.6. Çalışılan Soğansı Bitkilerin Özellikleri

(Yeşil soğan, pırasa, çiriş)

Tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi Türkiyede'de bitkilerin tıbbi açıdan önlemleri araştırılmaktadır ve bu bitkiler birçok hastalığa çare olarak geliştirilmektedir. Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) kayıtlarına göre 20.000 tıbbi bitki mevcuttur [38].

Soğansı bitkilerden olan soğan ve pırasa *Allium* türüdür. Bu türler çok yıllık ve yumru gövdeli olup, soğangillerde mevcut karakteristik koku ve tat veren kimyasal bileşikler üretirler [39]. Soğan; *Allium Cepa L.* ve pırasa; *Allium Porrum L.* olarak isimlendirilir [40].

Soğanın 6000 yıl önce Orta Asya'nın en önemli yiyecek ve tıbbi bitkisi olduğu bilinmektedir. Eski mısırlarda soğanın mumyalamada saklama maddesi olarak kullanıldığı bilinir. Sporcuların kanı temizlemek ve kan akışını hızlandırmak amacı ile soğan tükettikleri bilinir. *Allium cepa L.* antimikrobiyal (enfeksiyon önleyici), antispazmodik (düz kasların kasılmasını önleyici), anticholesterolemic (kolesterol önleyici/düşürücü), hipotansif (tansiyon düşürücü), hipoglisemik (kan şekeri düşürücü), antiasthmatic (astım nöbetlerini önleyici), antikanser ve antioksidan özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir [11].



Şekil 2.9. : yeşil soğan

Günümüzde soğansı bitkilerin yetişme alanı çok geniştir. Bu familyaya ait bitkileri yetiştiren ülkeler sıralaması; ABD, Çin, Rusya, Hindistan, Türkiye, İspanya'dır [41]. Soğansı bitkiler; flavonoidler ve alk(en)il sistein sülfoksitler olmak üzere başlıca 2 grupta toplanan bileşikler içerir. Soğanlarda flavonoidlerin başlıca iki önemli grubu

bulunur. Bunlar flavonoidler ve antisiyaninlerdir. Flavonlar bir karbonil grubu içeren fenolik bileşiklerdir, 3 hidroksil ilavesiyle flavonoller oluşur. Soğanda bulunan flavonoller çoğunlukla soğan iç kabuklarının sarı-krem renk almasını sağlar. Beyaz soğan ve pırasada flavonoller bulunmaz, çoğu kırmızı soğanın dış kabuklarında bulunur. Soğanda kuersetin bol miktarda bulunur ve kuersetinin önemli işlevlerinden biri olan metabolizmayı hızlandırmak en başta gelen ve en önemlisidir. Böylece soğanla beslenmek vücudunuzdaki yağları yakar ve toksinleri atmamızı sağlamaktadır. Flavonoid tüketiminin kalp-damar hastalığını azalttığı kaydedilmiştir. Japonya'da yapılan bir çalışmada kuersetin alımının artmasıyla plazma toplam kolesterol ve LDL-kolesterol derişimlerinin azaldığı görülmüştür [14].

Soğanın tüm dünyada kabuk renklerine göre yaygın olarak beyaz, kırmızı, sarı olarak farklı türleri bulunur. Bunlar toprak altın da yumru oluşturmadan önce de tüketilebilirler [36]. Soğan yapısında % 90 su, % 8 glikoz ve sakkaroz karışımı şeker vardır. Diğer maddeler ise protein, kalsiyum, sülfür, flor, provitamin A, B, ve C, vitaminleridir. Soğan; Asya, Avrupa ve Latin Amerika toplumlarında tıbbi amaçlarla yara ve iltihaplarda, ülserlerde, soğuk algınlıklarında kullanılır.

Soğan her mevsimde yetiştirilmektedir ve de istenildiğinde toprak altında bekletilerek gelişmesi sağlanır ve hasat sonrası uygun ortamda kurutularak dayanımı artırılır [42].

Pırasa, *Allium porrum* olarak da bilinir, soğan ve sarımsak gibi allium cinsidir. Pırasa çeşitleri vardır. En yaygını hasat için olan yaz pırasasıdır. Yaz pırasası daha küçüktür ve daha güçlü aromalıdır. Genel olarak sonbahar başında yetiştirilmeye başlanır, sonbahar ortalarında hasat edilir, genellikle taze haldeyken yenir ya da yemeklerde kullanılır [43]. İlk olarak Akdeniz kıyısındaki çorak veya ağaçsızlandırılmış sahalarda ortaya çıkmış olduğu beklenir. Günümüz pırasasıyla alâkadar olan bu yabanî pırasa "opium" a benzeyen uyuşturucu bir madde olan "lactucarium" içermekteydi. Romalılar, uykuyu kolaylaştırması için pırasayı yemeklerin sonunda yiyerek, bitkinin bu özelliğinden faydalandılar.



Şekil 2.10. : pırasa

Pırasanın tüm kısımlarıyla yapılan analizlere göre yapısındaki bazı maddeler ve miktarları şöyledir: 100 gramında 61 kcal, 3,9 g şeker, 1,8 g lif, 83 g su, 0,3 yağ, 1,5 g protein, 12 mg C vitamini, 0,92 mg E vitamini, 59 mg kalsiyum, 2,1 mg demir, 28 mg magnezyum, 180 mg potasyum, 20 mg sodyum, 0,12 mg çinko [44].

Çiriş (*Asphodelus Ramosus*) ; Diğer isimleri sarı zambak, sarı çiri olarak bilinir. Latince adı : *Asphodelus Ramosus*, familyası : Liliaceae olup dallı çiriş otu olarak da bilinen çok yıllık bitkidir. Deniz seviyesinden yaklaşık 1300 metre yükseklikte yetişir ve çiçek açma dönemi yüksekliğe bağlı olarak marttan – hazirana kadar devam eder, tüketimi ise yine nisandan yaz ortalarına dek sürer. Ülkemizde yaygın olarak Marmara, Ege, Akdeniz Bölgelerinde yüksek, dağlık alanlarda yetişir [45].



Şekil 2.11. Çiçekli, toprak üstü kısım



Şekil 2.12. Toplandıktan sonraki toprak üstü kısımları

Bilinen bileşimi; yumruları nişasta, inulin ve acı madde içerirken toprak üstü kısımda bugüne dek detaylı bir çalışma mevcut değildir. Fakat yine de burada da inulin ve buna ek olarak flavonoid ve uçucu yağ içerdiği bilinmektedir [46].

Çirişin toprak üstü kısımlarının tamamı ve yumrularının birçok rahatsızlığa iyi geldiği gözlemlenmiştir. Bunlar sıralanırsa; bayanlarda regli dönemi düzenleyici, süt arttırıcı, kas ağrıları giderici, basuru ve iltihaplı bağırsak hastalıklarını giderici olduğu ifade edilir. Ayrıca yumruları cilde sürülerek sivilce, çıban, frengi yaraları ve saç kıran hastalığına iyi geldiği görülmüştür [47].

2.7. Antioksidan Aktivite Tayin Metotları

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 H₂O₂ giderme aktivitesi, demir iyonu indirgeme aktivitesi gibi özel terimler kullanılması önerilir [48]. 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 Fe³⁺, ABTS⁺ gibi oksidan tarafından yükseltgenerek 1 elektron antioksidandan oksidana transfer olur, bu olay oksidanın renk değişimini sağlar ve UV/VIS ile absorban değişimi ölçülür. Absorban ölçümündeki değişim antioksidan madde konsantrasyonu ile orantılıdır. Bu temele dayalı metotlar;

- Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile toplam fenolik madde tayini
- Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite ölçümü (TEAC)

- CUPRAC (Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi
- DPPH kullanarak “toplam antioksidan potansiyel” ölçüm yöntemi [49].

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 [50, 51, 52].

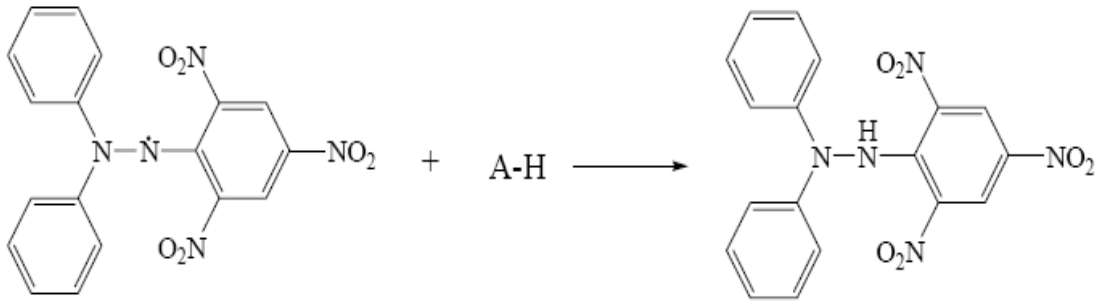
2.7.1. Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile toplam fenolik madde tayini

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 [53].

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 absorban verir. 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 indirgenmediği için fenolik bileşiklere spesifik değildir. Ancak fenolik bileşikler sadece bazik şartlar altında (metotta pH~10 için karbonat çözeltisi kullanılır) FCR ile reaksiyon verir. Bu metot test edilen örneğin, reaktifin oksidasyonunu inhibe etmesi için gerekli miktarını ölçer [54]. FCR reaktifin ilaç analizinde [55], idrar gibi biyolojik örneklerde [56], gıdasal ürünlerde [57], fenolik bileşik düzeyi veya indirgeme kapasitesi analizleri için modifiye edilmiş uygulamaları vardır [58].

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'ın 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'in renginin solması antioksidan konsantrasyonu ile orantılıdır [59]. DPPH ve antioksidan madde arasındaki reaksiyon Şekil 2.7.1' de verilmiştir [60]:



Şekil 2.13. 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 [61], [62]. Bu sebeple antioksidan aktivite tayini yapılırken diğer metotlarla da desteklenmesi önerilir.

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

Sistem; bakır(II)-neokuproin kompleksinin ortama antioksidan çözeltisi ilave edilmesi sonucunda bakır(I)-neokuproin'e indirgenmesi esasına dayanır. Analiz sonuçları içinde antioksidan bulunmayan bir referansa karşı 450 nm'de absorban değerlerinin ölçülmesiyle elde edilir [63]. Elde edilen test sonuçları Trolox[®] eşdeğeri antioksidan kapasite cinsinden, TEAC_{CUPRAC} olarak ifade edildi.

Bu yöntem daha sonra kuprik iyonu indirgeme potansiyeli ölçülmek suretiyle bitki ekstratlarında ve insan serumunda total antioksidan kapasite tayini için geliştirilmiş ve bakır iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity:CUPRAC) olarak isimlendirilmiştir [63]. Yeni geliştirilen CUPRAC yönteminde kullanılan kromojenik oksidasyon reaktifi olan bis(neokuproin) Cu(II) klorür ile antioksidan polifenol arasındaki reaksiyon aşağıdaki gibi gerçekleşmektedir:

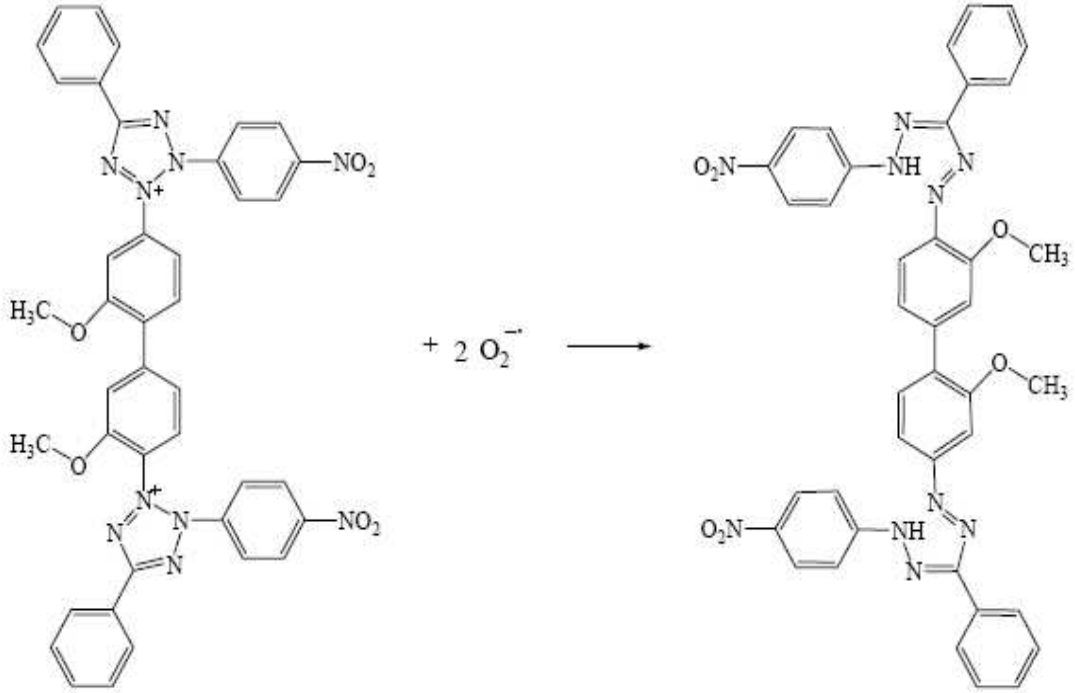


Bu reaksiyonda, Ar(O)_n hidroksi grubu içeren antioksidan polifenolden oluşan kinonu ifade etmektedir. Tepkime sonunda iki proton açığa çıkmakta ve Ar(OH)_n yapısında bulunan hidroksil grubu kinon formuna dönüşmektedir. Cu(II)-Nc ise 450 nm'de maksimum absorban veren şiddetli renk oluşumuyla birlikte Cu(I)-Nc kelatine dönüşmektedir. Bu reaksiyonda, n-OH grubu içeren antioksidan karakterli bileşikler, 2n-e donörü olarak hareket etmektedir [58], [63].

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 absorban vermezken diformazon bu dalga boyunda yüksek absorban vermektedir (Şekil 2.4).

Antioksidanlar oluşan $O_2^{\cdot-}$ 'i gidererek NBT boyasının 560 nm'deki absorbandsında azalma sağlarlar. Absorbanstaki düşüşün fazla olması antioksidanın $O_2^{\cdot-}$ 'i çok iyi giderdiğini göstermektedir [64].



Şekil 2.14.: NBT' den diformazon oluşumu

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

Knekt ve ark., 1996' a göre soğanlar büyük miktarda flavonoid kaynağıdır [65]. Üç çeşit soğanın etil asetat ekstraksiyonlarının toplam fenol ve toplam flavonoid miktarları verilmiştir. Toplam fenol miktarları beyaz soğan 115 ± 4 , kırmızı soğan 133 ± 7 , sarı soğanın ki ise 107 ± 15 olup sonuçlar kafeik asite eşdeğerdir. Toplam flavonoid değerleri ise myricetine eşdeğer olup, aynı sırayla $0,4 \pm 12$; $0,5 \pm 11$ ve $0,2 \pm 2$ şeklindedir [66].

Başka bir çalışmada ise yeşil soğanın dış, orta ve iç kısımları MeOH:Su (1:1) karışımında ayrı ayrı analiz edilerek, sonuçlar şöyle ifade edilir: mg/ g gallik asite eş

değer toplam fenolik madde miktarı sonuçları; Dış kısım: 13,4; Orta kısım: 9,5 ve İç kısım: 7,2 iken yeşil soğanın HPLC analiz sonuçları şöyledir:

Dış kısım: gallik asit miktarı 29,5 µg/gram kuru ağırlık, kuarsetin miktarı 299 µg/gram kuru ağırlık ve kaemferol miktarı 15,8 µg/gram kuru ağırlık.

Orta kısım: gallik asit miktarı 21,6 µg/gram kuru ağırlık, kuarsetin miktarı 45,3 µg/gram kuru ağırlık ve kaemferol miktarı 6,2 µg/gram kuru ağırlık.

İç kısım: gallik asit miktarı 9,3 µg/gram kuru ağırlık, kuarsetin miktarı 17,3 µg/gram kuru ağırlık ve kaemferol miktarı 5,3 µg/gram kuru ağırlık [67].

Farklı bir çalışmada çeşitli soğan türlerinin Cuprac analiz sonuçları kırmızı soğan saf su içinde $1,84 \times 10^{-4}$ ve etanol içinde $6,25 \times 10^{-4}$, taze yeşil soğan yaprak kısmının su içinde $8,54 \times 10^{-4}$ ve etanol içinde $7,06 \times 10^{-4}$ değerinde olup sonuçlar mmol kuarsetin/gram yaş soğan ekstraktı olarak verilmiştir. Aynı çalışmaya göre folin yöntemi ile toplam fenol tayini sonuçları kırmızı soğan saf su içinde $2,35 \times 10^{-3}$ ve etanol içinde $3,26 \times 10^{-3}$, taze yeşil soğan yaprak kısmının su içinde $3,01 \times 10^{-3}$ ve etanol içinde $2,24 \times 10^{-3}$ değerinde olup sonuçlar mmol kuarsetin/gram yaş soğan ekstraktı olarak verilmiştir [14].

Başka bir çalışmada; dereotu toplam fenolik madde değerleri su ekstraktında $3,12 \pm 0,06$ mg GAE/g taze bitki [68], metanol ekstraktında $12,5 \pm 0,3$ mg GAE/g kurutulmuş bitki [69], dereotu tohumunun su ekstaktında 233 mg kateşol/g kurutulmuş bitki, etanol ekstraktında 246 mg kateşol/g kurutulmuş bitki, tere tohumunun metanol ekstraktında 0,15g GAE/100g kurutulmuş bitki [70] değerlerindeki verilere rastlanmıştır.

Miliauskas ve ark. 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 [71]. Benzer şekilde Shon ve ark. sıcak su ve metanol ekstraktlarının bütanol, etil asetat ve kloroform ekstraktlarından daha iyi DPPH radikal giderdiğini bildirmişlerdir [72].

BÖLÜM 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Araç-Gereç ve Kimyasal Maddeler

3.1.1. Bitkisel materyal

Deneyleerde kullanılan bitkilerden pırasa ve yeşil soğan Adapazarı semt pazarlarından satın alınırken, çiriş Akyazı ilçesi kapalı pazarından satın alınmıştır.

3.1.2. Kimyasal maddeler

Deneyleerde kullanılan tüm kimyasal maddeler analitik kalitededir. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi analizlerinde HPLC kalitesinde çözücüler ve standart maddeler kullanılmıştır. Tüm deneyleerde kullanılan su ise bidistile sudur. Gallik asit (GA), vanillik asit (VA), kafeik asit (CA), klorojenik asit (ChA), naringin, kuarsetin (QE), kaemferol (CP), metanol, asetik asit, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Germany) ve Merck (Darmstadt, Germany) firmalarından temin edilmiştir. Folin-Ciocalteu's phenol reaktifi, sodyum karbonat Merck (Darmstadt, Germany) firmasından temin edilmiştir.

3.1.3. Kullanılan aletler

HPLC çalışmaları için bir Samsung Computer'e, FCM güç kaynağına bağlı, SIL-20A HT Prominence Auto Sampler, SPD-M20A Prominence DAD dedektör, LC-20 AD Prominence Liquid Chromatography, DGU-20 A5 Prominence degazer, CTO-10AS VP Kolon fırından ve LC Solution programından oluşan SHIMADZU marka HPLC sistemi kullanılmıştır.

Bütün bu cihazların yanı sıra, buzdolabı (Arçelik), hassas terazi (AND GR-200), vorteks karıştırıcı (Votex 2 GENIE), vakum pompası (Rocker 300), 0,45 µm selüloz nitrat membran filtre (Sartorius Stedim Biotech), pHmetre (HANNA), santrifüj (nüve-NF200, ROTINA 420-Hettich), otomatik pipet (BIOHIT PROLINE), etüv (nüve-FN 120), ultrasonik banyo (Bandelin Sonorex), 12x32 mm 2 mL silikon septum kapaklı autosampler cam vial kiti (National Scientific CERT4000), Inertsil ODS-2 GL Sciences Inc. 5 µm (4,6x250 mm) 18C ters-faz kolonu ve plastik vial filtreleri (CHROMACOL) kullanılmıştır.

3.2. Kullanılan Ana Çözeltilerin Hazırlanması

3.2.1. Toplam fenolik madde miktarı tayininde kullanılan çözeltiler

%20'lik Na₂CO₃ çözeltisinin hazırlanması: 20 g Na₂CO₃ 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 çözeltisinin hazırlanması: 17,6 g Al(NO₃)₃.9H₂O 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 çözeltisinin hazırlanması: 13,6 g CH₃COONa.3H₂O 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 Çözelti

0.1 mM DPPH çözeltisinin hazırlanması: 4 mg DPPH tartılarak 100 mL etil alkolde

çözüldü.

3.2.4. Bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini (CUPRAC) Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

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

$7,5 \times 10^{-3}$ M'lık etanolik neokuprin çözeltisinin 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 cözüldü, 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 cözüldükten 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) cözüldü.

10 μM PMS çözeltisinin hazırlanması: 6,1 mg PMS tartılarak 10 mL Tris-HCl tamponu (16 mM, pH=8) ile cözüldü. Bu cözeltiden 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) cözüldü.

3.2.6. H₂O₂ giderme aktivitesinin yönteminde kullanılan çözeltiler

0.1 M fosfat tampon (pH=7.4) çözeltisinin hazırlanması: 13.61 g/L KH₂PO₄ ve 17.80 g/L Na₂HPO₄.2H₂O çözeltilerinin pH=7.4 olacak şekilde (yaklaşık 1:4 oranında) karıştırılması ile hazırlandı.

40 mM H₂O₂ çözeltisinin hazırlanması: 0.41 mL H₂O₂ otomatik pipetle çekilerek, balon jodge 0.1 M fosfat tamponu (pH=7.4) ile 100 mL'ye tamamlandı.

3.3. Deneysel Çalışma

Bu bölümde yeşil soğan (*Allium Cepa L.*), pırasa (*Allium Porrum L.*) ve çirişin (*Asphodelus Ramosus*) topraküstü kısımları üzerinde yapılan ekstraksiyon işlemleri ve ekstrelerde yapılan antioksidan aktivite çalışmaları hakkında bilgi verilmektedir.

3.3.1. Bitkilerin ekstraksiyon aşaması

Bitkisel materyaller ortalama 35 °C ve 65 °C olmak üzere etüvde iki ayrı sıcaklıkta kurutulduktan sonra doğrayıcı ile iri toz haline getirildi. Bitki:çözücü oranı 1:20 olarak çözücüleri eklendi ve 8 saat çalkantılı su banyosunda 250 rpm'de ekstrakte edildi. Çözücü olarak metanol, su, metanol:su (1:1), etil asetat kullanıldı. Süre sonunda çözelti Whatman tipi süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntülerin evaporatörde 40 °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.

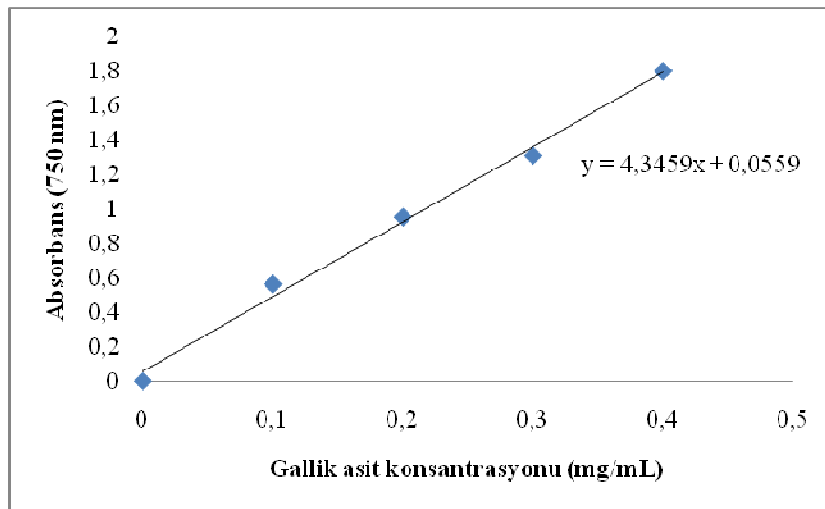
Stok çözeltilerin hazırlanmasında istenen hacme tamamlamalar etil asetat ekstraktlarının tümünde metanol ile diğerlerinde ise ultra saf su ile yapıldı.

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 [73]. ve etil asetat ekstraktları haricinde çalışılan bütün örnekler ve standart olarak kullanılan gallik asit çözeltileri ultra saf su içinde hazırlandı. Etil asetat ekstraktlarının çözeltileri metanol ile hazırlandı. Standart grafiğin hazırlanmasında bir fenolik madde olan gallik asit standardı kullanıldı. Gallik asitin farklı konsantrasyonları hazırlandı (0,05-0,50 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 $y=4,3459x + 0,0559$ olarak tespit edildi. Standart grafiğe göre tüm bitki ekstraktlarındaki toplam fenolik madde mg gallik asit/g 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 oda sıcaklığında bekletildi. Aynı işlem gallik asite de uygulandı. Süre sonunda numune ve standart çözeltilerin absorbansları UV Spektrofotometresi'nde 750 nm'de okutuldu.

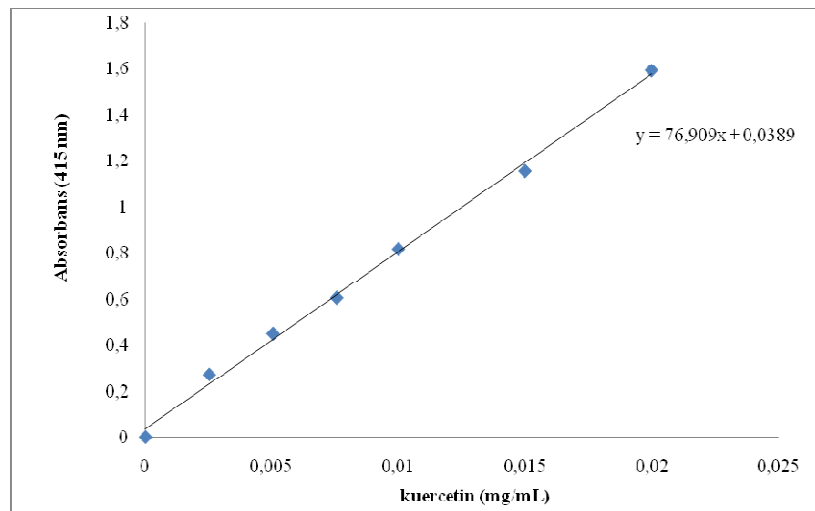


Şekil 3.1. Toplam fenolik madde tayininde standart olarak kullanılan gallik asitin kalibrasyon eğrisi (R²=0,9938)

3.4.2. Ekstraktların toplam flavonoid madde tayinleri

Bitki ekstraktlarının toplam flavonoid miktarları kuarsetine eşdeğer olarak alüminyum nitrat yöntemi ile belirlendi [74]. Yöntem modifiye edilerek kullanıldı. Toplam flavonoid madde tayini için 10 mg/ml konsantrasyonundaki bitki ekstraktlarının her birinden 500 µl alınarak üzerlerine 0,1 ml sodyum asetat eklenmiş ve 1 dakika sonra da 0,1 ml %10'luk (w/v) $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ ilave edilerek çalkalandılar. Daha sonra %96'luk (v/v) etanol ile hacimleri 5 ml'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında 40 dakika bekletilen karışımların absorbans değerleri 450 nm dalga boyunda ölçüldü. Toplam flavonoid madde içeriği mg kuarsetin eşdeğeri (QE)/gram ekstrakt olarak ifade edilmiştir. Analizler bütün denemelerde iki tekrarlı olarak yapılmıştır.

Toplam flavonoid madde analizinde standart olarak kuarsetin kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrisinin oluşturulması için 12,6 mg kuarsetin, 25 ml'lik bir balon jode 15 ml etanol ile çözüldürülmüş ve hacmi etanol ile 25 ml'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltilerden sırası ile 25, 50, 75, 100, 150 ve 200 µl alınarak %96'luk (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) $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ ilave edilerek çalkalanmışlardır. Elde edilen karışımlar 30 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildikten sonra oluşan mavi rengin absorbans değeri 415 nm dalga boyunda UV spektrofotometresi ile ölçülmüştür.



Şekil 3.2: Toplam flavonoid madde tayininde standart olarak kullanılan kuarsetinin kalibrasyon eğrisi ($R^2 = 0,9969$)

3.4.3. DPPH serbest radikali giderim aktivitesi tayini

Bitki ekstralarının ve standart maddelerin serbest radikali giderim aktiviteleri DPPH serbest radikali kullanılarak belirlendi [60]. Standart olarak troloks ve BHT kullanıldı. 50 µg ile 1000 µg arasında değişen konsantrasyonlardaki 1 mL örnek içeren örneklerin üzerine DPPH çözeltisinden 4 mL ilave edildi. Kontrol olarak 1 mL metanol kullanıldı. Oda sıcaklığında 30 dk inkübasyondan sonra 517 nm'de absorbansları ölçüldü. Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi. Serbest radikal giderim aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

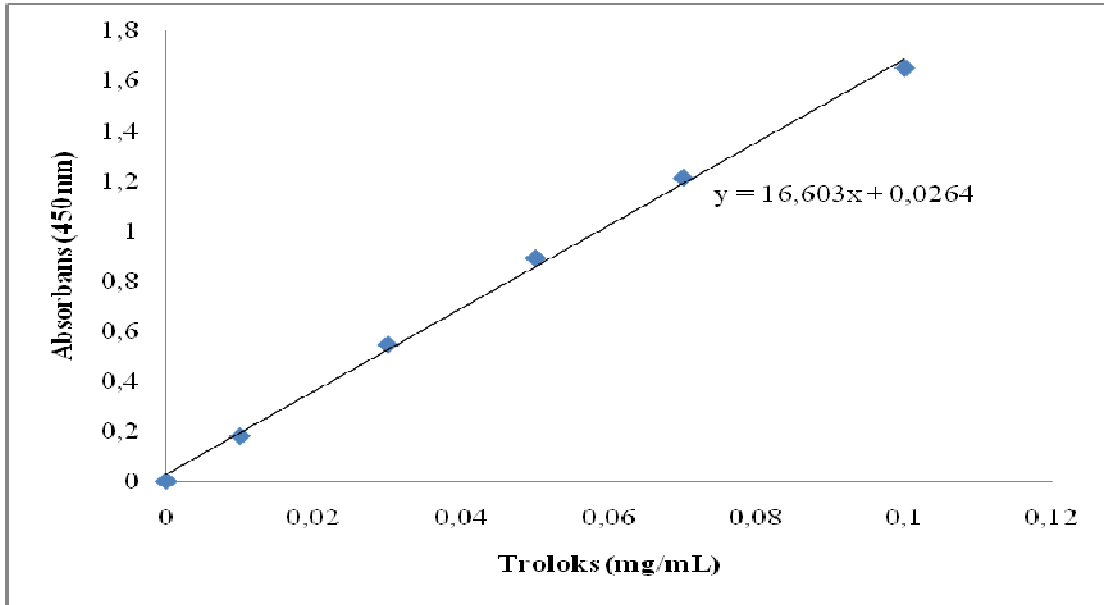
$$\text{DPPH Giderim Aktivitesi (\% İnhibisyon)} = \frac{A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}}}{A_{\text{Kontrol}}} \times 100$$

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

Konsantrasyon artışıyla absorbansın düşmesi beklenir. Çünkü azalan absorbans geriye kalan DPPH' çözeltisi miktarını yani serbest radikal giderim aktivitesini verir.

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 [75]. 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: Troloksun kalibrasyon eğrisi ($R^2 = 0,9979$)

3.4.5. Süperoksit anyon radikali giderim aktivitesi yöntemi

Bitki ekstralarının ve standart maddelerin süperoksit anyon radikali giderim aktiviteleri NADH-PMS-NBT yöntemine göre belirlendi [64]. 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:

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

3.4.6. H₂O₂ giderme aktivitesinin tayini

Bitki ekstralarının hidrojen peroksit giderme yeteneği Ruch ve ark. metoduna göre çalışıldı (Ruch vd., 1989), [76]. Bu yöntemde, reaksiyon ortamına eklenen belirli miktardaki hidrojen peroksit çözeltisinin bitki ekstraktı tarafından yıkılması 230 nm'deki absorbans değişimiyle izlenir.

Değişik konsantrasyonlarda bitki ekstraktları (50- 500 µg/mL) ve standart çözeltileri hazırlandı. Standart reaktif olarak BHT ve C vitamini kullanıldı. Çalışmalar denenerek 100 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.

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

3.4.7. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile fenolik bileşiklerin analizi

HPLC de analiz edilen bitki numunelerinin tümü 10 mg/mL derişimindedir. HPLC kolonunda tutunan ve ayrılan bileşiklerin alıkonma zamanları ve UV spektrumları standartlarla karşılaştırılarak tanımlandı. Her analiz arasında 10 dakika dengeleme zamanı bırakıldı. Bütün standart ve örnek çözeltiler ikişer kez analiz edilerek ortalama değerler verildi [77].

Cihaz	: Shimadzu Prominace sıvı kromatografisi sistemi
Dedektör	: Shimadzu SPD-M10A _{VP} PDA dedektör (270 nm)
Kolon	:Teknokroma C18 analitik kolon (250 x 4.6 mm, 5µm partikül çapı)
Sıcaklık	: 25 °C
Akış hızı	: 1 mL/dak
Enjeksiyon hacmi:	10 ml
Hareketli faz	: A) metanol:su:asetik asit (10:88:2, h/h/h) B) metanol:su:asetik asit (90:8:2, h/h/h)

Gradient program:

Tablo 3.1: Gradient akış tablosu

Zaman (dak)	Hareketli faz A (%)	Hareketli faz B (%)
0	100	0
15	85	15
20	50	50
29	30	70
35	0	100
42	100	0

Sonuçlar integrasyon alan hesabı ile değerlendirilmiştir. Alanlar, her standart için kalibrasyon eğrilerinden konsantrasyon olarak hesaplanmıştır. Standartlara ait kalibrasyon eğrilerinin denklemleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 3.2: Standart reaktifler için HPLC analiz sonucuna ait pikin geliş zamanı, standartların konsantrasyon aralığı, konsantrasyonlara ait doğru denklemleri ve korelasyon katsayısı

Antioksidan	tR(dakika)	Doğrusal Aralık (mg/mL)	Doğru Denklemi	(R ²)
Gallik Asit	3,18	0,1–0,5	y=9E+06x-127763	0,996
Klorojenik asit	12,65	0,5–2,0	y=8E+06x+494995	0,9946
Vanilik asit	14,12	0,1–1,0	y=820422x+12910	0,9969
Kafeik asit	15,30	0,1–1,0	y=2E+07x-985028	0,9926
Naringin	22,09	0,1–0,5	y=2E+06x+1489	0,9982
Kuersetin	25,62	0,1–0,5	y=3E+08x-6E+06	0,998
Kaemferol	28,56	0,1–0,5	y=1E+07x+135161	0,9934

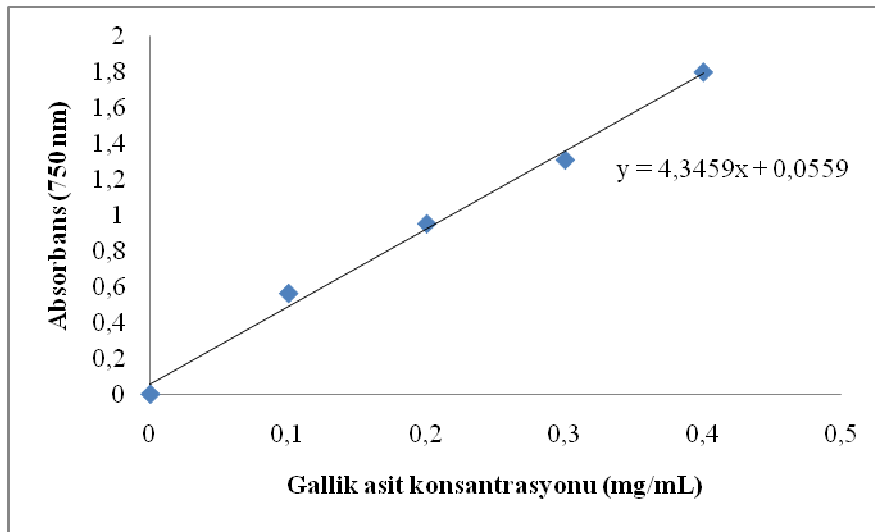
BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

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 yönetime rağmen bunlarda bir söz birliğine ulaşamamıştır. Frankel ve Meyer (2000) tarafından yapılan bir derlemede bu duruma çok fonksiyonlu besin ve biyolojik kaynaklı antioksidanların değerlendirilmesinde tek-boyutlu yöntemlerin kullanılmasının neden olduğu iddia edilmiştir. Bu araştırmacılara göre 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 [78].

4.1. Folin Yöntemiyle Toplam Fenolik Madde Tayini Sonuçları Ekstraktların Alüminyum Nitrat Yöntemi ile Toplam Flavonoid Madde Tayinleri Sonuçları

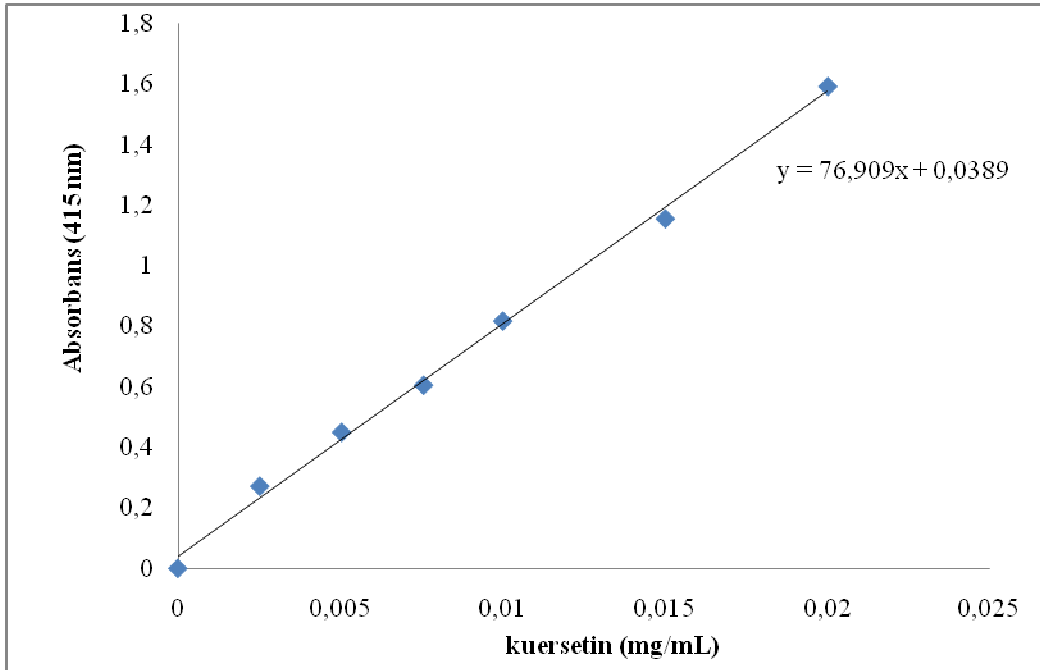
Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak yapılan toplam fenolik bileşik tayininde en sık kullanılan standart bileşik gallik asittir. Gallik asit kullanılarak elde edilen standart çalışma grafiği Şekil 4.1'de görülmektedir. Gallik asit standart grafiğinden elde edilen doğru denklemi; $y=4,3459x + 0.0559$ değerindedir.



Şekil 4.1: Toplam fenolik madde tayininde standart olarak kullanılan gallik asitin kalibrasyon eğrisi ($R^2=0,9938$)

Bu kalibrasyon denklemi kullanılarak bitki ekstraktlarındaki toplam fenolik madde tayini gallik asite eş değer olarak mg fenolik madde/gram ekstre şeklinde hesaplandı.

Ekstraktların toplam flavonoid madde tayinleri kuersetine eşdeğer olarak alüminyum nitrat yöntemi ile belirlendi. Kuersetin kullanılarak elde edilen standart çalışma grafiği Şekil 4.2'de görülmektedir. Kuersetinin standart grafiğinden elde edilen doğru denklemi; $y=76,909x + 0.0389$ değerindedir.



Şekil 4.2: Toplam flavonoid madde tayininde standart olarak kullanılan kuarsetinin kalibrasyon eğrisi ($R^2=0,9969$)

Bu kalibrasyon denklemi kullanılarak bitki ekstraktlarındaki toplam flavonoid madde tayini kuarsetine eş değer olarak μg flavonoid madde/gram ekstre şeklinde hesaplandı.

Tablo 4.1: Bitki Ekstrelerinin Toplam Fenolik Madde Miktarları (Fenolik madde miktarı: gallik asite eşdeğer olup birimi mg fenolik madde / gram ekstre olarak ifade edildi. Sonuçlar 2 paralel testin ortalaması olup, standart sapma değerleri göz önüne alındı.)

Numuneler	Sıcaklık	Su	MeOH	Su: MeOH (1:1)	Etil asetat
çiriş	35 °C	33,51 ±0,33	28,15 ±0,03	29,73 ±0,07	26,01 ±0,07
	65 °C	44,46 ±0,07	41,86 ±0,03	42,09 ±0,10	27,55 ±0,03
yeşil soğan	35 °C	25,96 ±0,07	22,09 ±0,26	22,07 ±0,03	16,23 ±0,03
	65 °C	35,85 ±0,65	32,29 ±0,36	41,86 ±0,03	38,09 ±0,03
pırasa	35 °C	27,98 ±0,98	18,48 ±0,16	22,83 ±0,13	26,95 ±1,40
	65 °C	33,65 ±0,13	23,24 ±0,26	27,50 ±0,10	27,32 ±2,51

Toplam fenolik madde tayini olarak en yüksek değeri çiriş ekstraktı gözlemlendi. Çiriş ait değerlerde; 65 °C' de kurutulan bitki numunelerinin 35 °C' de kurutulanlarından daha yüksek değerlere sahip olduğu gözlemlendi. 35 °C' de kurutulan bitkilerin çözücü farklılığına göre sıralanması ise şöyledir: su ekstraktı> su:metanol (1:1) ekstraktı > metanol ekstraktı > etil asetat ekstraktı şeklindedir. 65 °C' de kurutulan bitki numunesi için ise yine aynı sıralamayı yapmak mümkündür zira su:metanol (1:1) ekstraktı ve metanol ekstraktı değerleri çok yakındır.

Yeşil soğanda değerlerin 65 °C' de kurutulan bitki numunelerinin 35 °C' de kurutulanlarından daha yüksek değerlere sahip olduğu gözlemlendi. Bu bitki için 35 °C' de çözücü farkını izlersek değerler şöyle sıralanır: su ekstraktı> metanol ekstraktı> su:metanol (1:1) ekstraktı > etil asetat ekstraktı şeklindedir. Fakat yine su:metanol (1:1) ekstraktı ve metanol ekstraktı değerleri birbirine yakındır. 65 °C' de çözücü farkını için değerler şöyle sıralanır: su:metanol (1:1) ekstraktı > etil asetat ekstraktı> su ekstraktı> metanol ekstraktı şeklindedir.

Pırasanın genel olarak diğer iki bitkiye göre değerlerin düşük olduğu izlendi. Sıcaklık farkı sonuçları çok belirgin olarak etkilememekle beraber her iki sıcaklık için de su ekstraktlarının toplam fenolik madde bakımından daha yüksek aktivite gösterdiği sonucuna varıldı.

Fenollerin hidroksil gruplarının serbest radikalleri yok etme gücü sebebiyle çok önemli bitki bileşenleri olduğu açıklanır [79]. Çalışmalar çok çeşitli türde toplam fenol ve antioksidan aktivite arasında paralel bir ilişki olduğunu gösterir [80].

Tablo 4.2: Bitki Ekstrelerinin Toplam Flavonoid Madde Miktarları (Flavonoid madde miktarı kuarsetine eşdeğer olup birimi μg flavonoid madde / gram ekstre olarak ifade edildi. Sonuçlar 2 paralel testin ortalaması olup, standart sapma değerleri göz önüne alındı.)

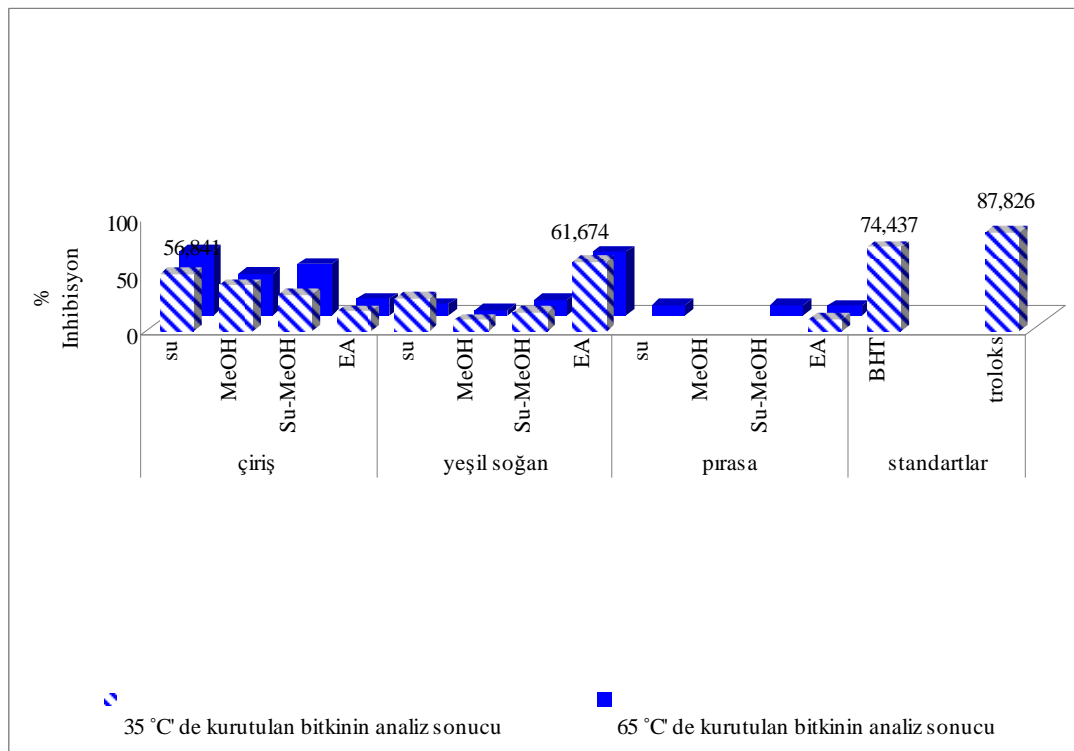
Numuneler	Sıcaklık	Su	MeOH	Su: MeOH (1:1)	Etil asetat
çiriş	35 °C	754,33 $\pm 0,83$	714,03 $\pm 1,75$	542,65 $\pm 4,87$	733,46 $\pm 1,84$
	65 °C	713,31 $\pm 2,76$	742,24 $\pm 4,14$	881,04 $\pm 2,76$	736,71 4,60
yeşil soğan	35 °C	783,52 $\pm 0,92$	735,48 $\pm 0,83$	757,19 $\pm 0,09$	657,40 $\pm 2,76$
	65 °C	797,83 $\pm 2,83$	723,13 $\pm 1,75$	773,12 $\pm 2,76$	539,21 $\pm 0,74$
pırasa	35 °C	78,01 $\pm 0,18$	46,81 $\pm 0,18$	40,63 $\pm 0,09$	75,35 $\pm 0,28$
	65 °C	238,33 $\pm 0,37$	79,57 $\pm 0,18$	77,56 $\pm 1,93$	225,98 $\pm 1,29$

Toplam flavonoid madde tayini sonuçlarında çiriş ve yeşil soğan birbirine yakın değerler gösterdi. Pırasanın ise diğer iki bitkiden oldukça düşük toplam flavonoid maddeye sahip olduğu gözlemlendi. Sıcaklıkların sonuçlar arasında farklılık oluşturacak bir parametre olmadığı sonucuna varılırken çirişin 65 °C' deki su ekstraktı haricindeki tüm bitkilerin su ekstraktları en yüksek toplam flavonoid maddeye sahip olduğu hesaplandı. Genel olarak sıralama çiriş ve yeşil soğanın değerleri yaklaşık birbirine eşitken, pırasa en az toplam flavonoid maddeye sahiptir.

4.2. DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Tayin Sonuçları

Bitki ekstratlarının 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, troloks % 87,69 ($\pm 0,19$) değerinde gösterdi. İkinci sırada gelen BHT % 74,44 ($\pm 0,15$) ve tüm bitki ekstratları standartlardan daha az DPPH serbest radikali giderme yeteneği gösterir. Sıcaklık farkının deneylere etkisi gözlenmek istendi fakat sonuçlara bakıldığında sıcaklığın her bitki ekstraktında sabit bir artış ya da azalışa

neden olmayıp sonuçların çözücüyle de değiştiği kaydedildi. Deney sonucunda en yüksek DPPH giderim aktivitesine sahip bitki sıralaması çiriş > yeşil soğan > pırasa şeklinde kaydedildi. Çirişe ait bitki ekstraktının sudaki % inhibisyon değeri en fazla olduğu, bu değerlendirme yeşil soğan için etil asetat ekstraksiyonuna ait olduğu ve pırasanın tüm ekstraktlarındaki DPPH giderim aktivitesinin pek yüksek olmadığı gözlemlendi. Öyle ki pırasanın su ve metanol ekstraktları DPPH giderim aktivitesi göstermemektedir. Sıcaklığın ise ekstraktların analizinde pek ayırım oluşturmadığı kaydedildi.



Şekil 4.3: Bitki Ekstrelerin DPPH Serbest Radikalı Giderim Aktivitesi % İnhibisyon Değerleri (Antioksidan aktivite sonuçları 2 paralel testin ortalamasıdır.)

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

CUPRAC metodu ile çalışılan örnek ekstraktları ve standart antioksidanların konsantrasyona karşı absorbans grafikleri çizildi ve grafiklerin eğimleri oranlandı. Bu çalışmada Troloks için elde edilen grafik şekil 3.3'de gösterilmiştir.

Diğer standart reaktif ve bitki numunelerinin doğru denklemleri bir tabloda gösterildi.

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

Troloks	$y=16,603x+0,0264$
C vitamini	$y=22,82x+0,0071$
BHT	$y=20,164x+0,0635$
Çiriş/35 °C/Su Ekstraktı	$y=2,5985x+0,0014$
Çiriş/35 °C/MeOH Ekstraktı	$y=2,8353x-0,0011$
Çiriş/35 °C/Su:MeOH(1:1) Ekstraktı	$y=2,6653x-0,002$
Çiriş/35 °C/Etil asetat Ekstraktı	$y=2,4929x-0,0028$
Çiriş/65 °C/Su Ekstraktı	$y=3,5741x-0,0002$
Çiriş/65 °C/MeOH Ekstraktı	$y=3,1022x+0,0013$
Çiriş/65 °C/Su:MeOH(1:1) Ekstraktı	$y=3,0994x-0,001$
Çiriş/65 °C/Etil asetat Ekstraktı	$y=2,6464x-0,0011$
Yeşil soğan/35 °C/Su Ekstraktı	$y=4,5114x8E-06$
Yeşil soğan /35 °C/MeOH Ekstraktı	$y=2,1392x-0,0002$
Yeşil soğan /35 °C/Su:MeOH(1:1) Ekstraktı	$y=4,9924x-0,0084$
Yeşil soğan /35 °C/Etil asetat Ekstraktı	$y=2,9012x-9E-05$
Yeşil soğan/65 °C/Su Ekstraktı	$y=4,4383x+0,0018$
Yeşil soğan /65 °C/MeOH Ekstraktı	$y=3,9541x-0,0005$
Yeşil soğan /65 °C/Su:MeOH(1:1) Ekstraktı	$y=5,4634x-0,0099$
Yeşil soğan /65 °C/Etil asetat Ekstraktı	$y=3,5292x-0,0002$
Pırasa/35 °C/Su Ekstraktı	$y=1,9684x-0,0012$
Pırasa /35 °C/MeOH Ekstraktı	$y=2,2209x+0,0017$
Pırasa /35 °C/Su:MeOH(1:1) Ekstraktı	$y=1,9418x-0,0014$
Pırasa /35 °C/Etil asetat Ekstraktı	$y=2,8802x-0,0021$
Pırasa/65 °C/Su Ekstraktı	$y=2,1238x+0,0009$
Pırasa /65 °C/MeOH Ekstraktı	$y=2,158x+0,0009$
Pırasa /65 °C/Su:MeOH(1:1) Ekstraktı	$y=2,0807x-0,0019$
Pırasa /65 °C/Etil asetat Ekstraktı	$y=2,8609x-0,0004$

Numune ve standartların antioksidan derişimine karşı CUPRAC yöntemi ile verdikleri absorbans sonuçlarından elde edilen garfiklerde, 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 4.3 ve 4.4'deki gibidir.

Tablo 4.4: Standart reaktifler için TEAC_{CUPRAC} değerleri

	Troloks	BHT	C vitamini
Eğim	16,603	20,164	22,82
TEAC_{CUPRAC}	1	1,2145	1,3744

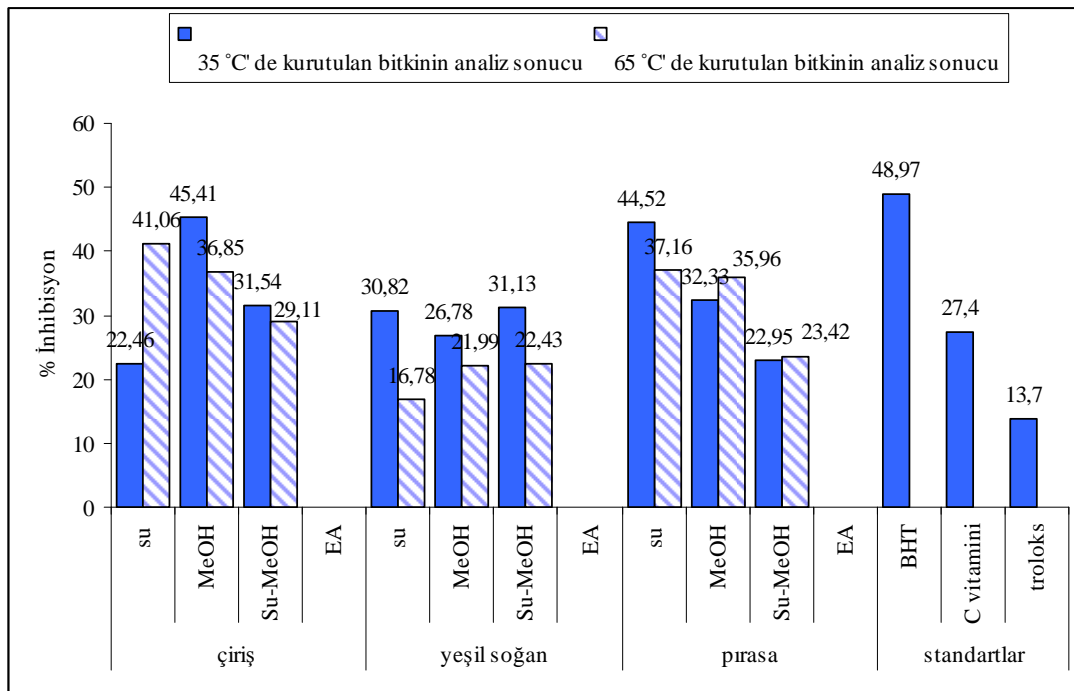
Tablo 4.5: Bitki numuneleri için TEAC_{CUPRAC} değerleri

Numuneler	Sıcaklık		Su	MeOH	Su:MeOH (1:1)	Etil asetat
çiriş	35 °C	Eğim	2,5985	2,8353	2,6653	2,4929
		TEAC_{CUPRAC}	0,1565	0,1708	0,1605	0,1501
	65 °C	Eğim	3,5741	3,1022	3,0994	2,6464
		TEAC_{CUPRAC}	0,2153	0,1868	0,1867	0,1594
yeşil soğan	35 °C	Eğim	4,5114	2,1392	4,9924	2,9012
		TEAC_{CUPRAC}	0,2717	0,1288	0,3001	0,1747
	65 °C	Eğim	4,4383	3,9541	5,4634	3,5292
		TEAC_{CUPRAC}	0,2673	0,2382	0,3291	0,2126
pırasa	35 °C	Eğim	1,9684	2,2209	1,9418	2,8802
		TEAC_{CUPRAC}	0,1185	0,1338	0,1169	0,1735
	65 °C	Eğim	2,1238	2,158	2,0807	2,8609
		TEAC_{CUPRAC}	0,1279	0,1300	0,1253	0,1723

Tabloda görüldüğü üzere yaygın olarak bilinen ve yüksek antioksidan aktivitesi özelliği ile gıdalara koruyucu katkı maddesi olarak eklenen sentetik antioksidan BHT eşdeğer miktardaki Troloks'un yaklaşık 1,21 katı daha fazla antioksidan aktivite göstermektedir. Standart olarak kullanılan diğer madde C vitamini olup eşdeğer miktardaki Troloks'un yaklaşık 1,37 katıdır. Numunelerde ise eşdeğer miktardaki Troloks bazına göre bu değere en yakın değerleri yeşil soğan, çiriş ve pırasa takip eder. Çözücü farklılığı hesaplamalarda kayda değer bir farka neden olmazken, 65 °C' de kurutulmuş olarak ekstrakte edilen sonuçların daha yüksek TEAC_{CUPRAC} değere sahip olduğu sonucuna varılır.

4.4. Süperoksit Anyon Radikali Giderim Aktivitesi Sonuçları

Bitki ekstraların 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 48,97 ($\pm 0,48$) olarak gösterdi. 35 °C' de kurutulan çirişin metanol ekstresinin ikinci sırada aktiflik gösterdiği kaydedildi. Sıcaklık ve çözücü farkının bitkiler arasında sabit bir değişiklik oluşturmadığı gözlenirken, etil asetatla yapılan tüm bitki ekstralarında süper oksit anyon radikalının hiç giderilmediği kaydedildi.



Şekil 4.4: Bitki Ekstrelerinin Süper Oksit Anyon Radikali Giderim Aktivitesi % İnhibisyon Değerleri (Antioksidan aktivite sonuçları 2 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 [81]. Yani süperoksit radikali doku hasarı oluşturan ve biyoaktif makromolekülleri harekete başlaması için gerekli potansiyele sahip aktif serbest radikaller için bir öncüdür [82]. Süperoksit anyonu lipidlerde, proteinlerde ve DNA da oksidatif zarara neden olan reaktif oksijen türlerindedir [83].

4.5. H₂O₂ Giderme Aktivitesinin Tayini Sonuçları

Bitki ekstraktlarının H₂O₂ giderim aktivitesi Ruch vd.'nin (1989) metoduna göre analiz edildi [76]. Ekstraktlardan hiçbiri reaksiyon ortamındaki H₂O₂'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 100 µg/mL konsantrasyonlarından elde edilen sonuçlar hesaplandı. Standart olarak kullanılan;

BHT % inhibisyon sonucu; **62,80 ± 0,10** ve C vitamini % inhibisyon sonucu; **49,93 ± 0,20**'dir.

Tablo 4.6: % H₂O₂ Giderme Aktivitesi

Numuneler	Sıcaklık	Su Ekstraktı % İnh.	MeOH Ekstraktı % İnh.	Su:MeOH (1:1) Ekstraktı % İnh.	Etil asetat Ekstraktı % İnh.
çiriş	35 °C	44,51±0,10	69,13±0,10	41,53±0,03	33,52±0,12
	65 °C	33,12±0,10	30,73±0,10	21,10±0,20	24,96±0,10
yeşil soğan	35 °C	46,41±0,99	40,89±1,04	38,19±1,29	17,16±0,40
	65 °C	56,82±0,99	41,63±0,20	40,58±0,30	40,54±0,94
pırasa	35 °C	37,11±0,01	35,53±0,02	37,88±0,03	30,21±0,02
	65 °C	29,99±0,04	34,02±1,47	41,34±0,94	35,63±0,15

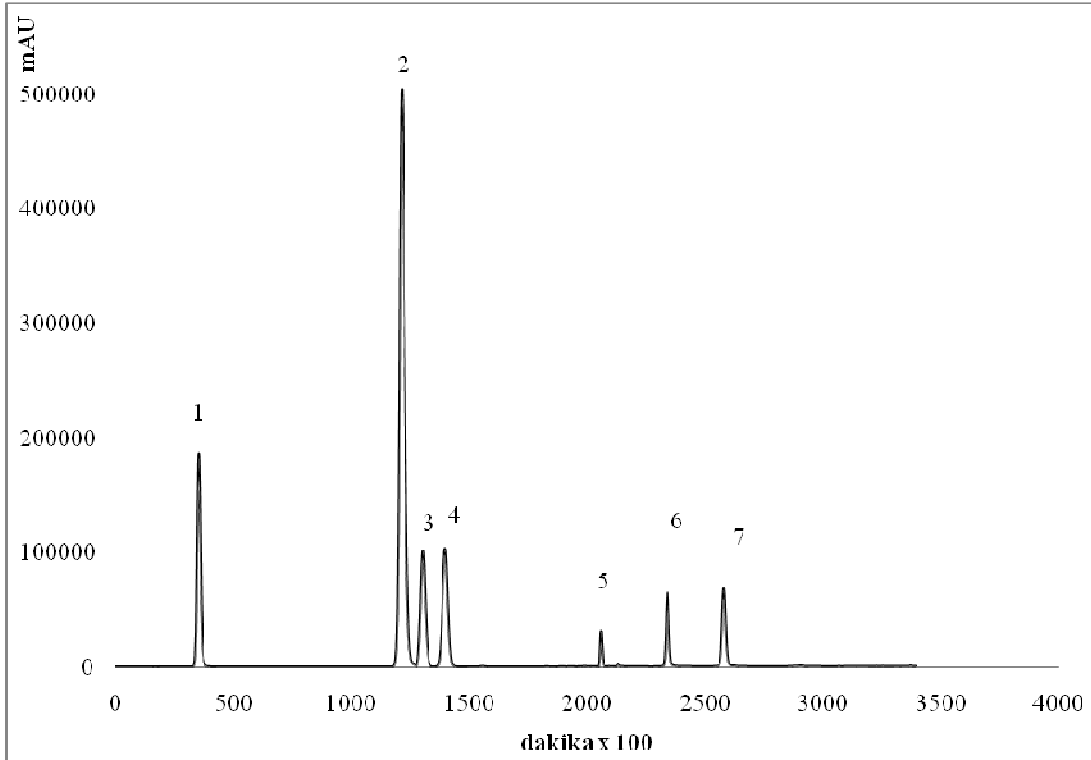
En yüksek aktiviteye sahip olanlar; 35 °C' de kurutulmuş çirişin metanol ekstraksiyonu ve 65 °C' de kurutulmuş yeşil soğanın su ekstraksiyonu olup her ikisinin de standart olarak kullanılan BHT ve C vitamininden daha fazla H₂O₂ giderme yeteneğine sahip olduğu gözlemlendi. Bitkilerin farklılığının yanı sıra çözücü ve sıcaklık farkının her ekstraksiyonun analiz sonucuna sabit bir değişkenlik oluşturmadığı sonucuna varıldı.

4.6. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Fenolik Madde Profillerinin Belirlenmesi

Fenolik madde miktarları ve antioksidan aktiviteleri çeşitli metotlar ile belirlenmiş olan bitkisel numunelerin, bu özelliklerini ortaya koyan fenolik madde profillerinin belirlenmesi için HPLC sisteminde kromatografik ayrımları yapılmıştır. Fenolik asitlerin tanınması ve miktarının belirlenmesi için UV spektrumları ve alıkonma zamanları standartlarla karşılaştırıldı. Standart reaktiflerin kolonda tutunma zamanları tablo 4,6' da verilmiştir. HPLC analizinde ayrımlar bir ters faz kolonu olan Inertsil ODS-2 GL Sciences Inc. 5 µm (4,6x250 mm) ₁₈C ters-faz kolonu ile yapıldı. Şekil 4.2.1 de fenolik asit standartlarının HPLC ile optimizasyonu gösterilmektedir. HPLC' ye enjekte edilen örnek ekstraktları için 270 nm kromatogramlar incelendi. Çoğu fenolik asitler bu dalga boyunda maksimum UV absorbans yaparlar [84].

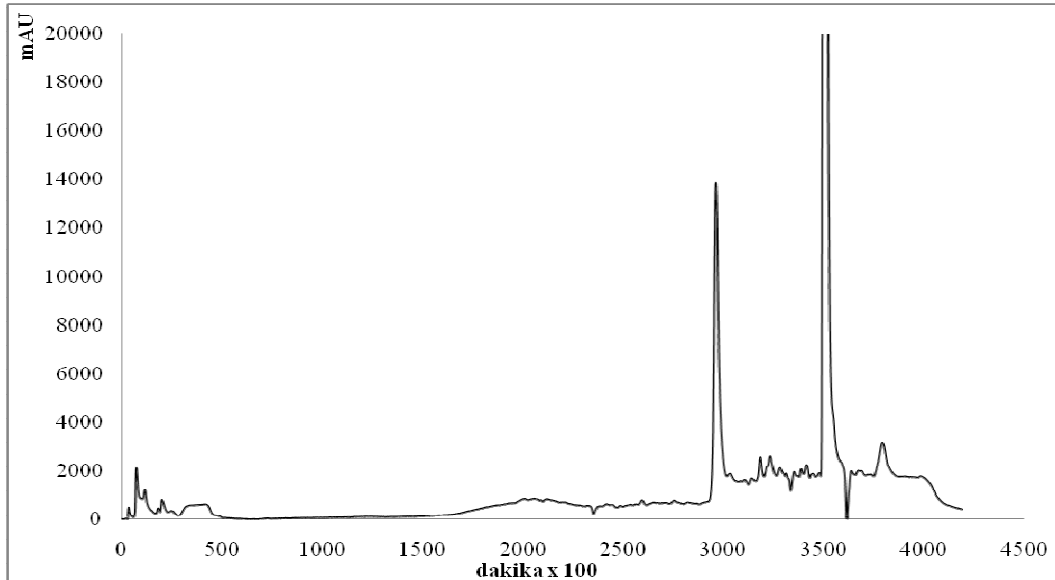
Tablo 4.7: Standart reaktiflerin alıkonma zamanları

Antioksidan	tR(dakika)
Gallik Asit	3,18
Klorojenik asit	12,65
Vanilik asit	14,12
Kafeik asit	15,30
Naringin	22,09
Kuersetin	25,62
Kaemferol	28,56

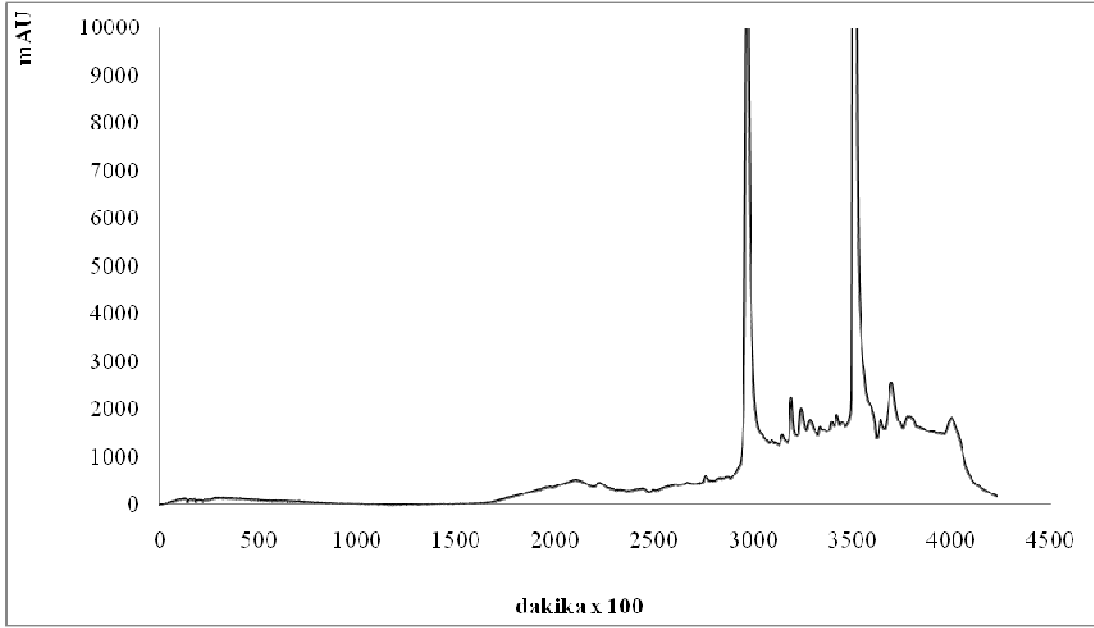


Şekil 4.5: Bazı fenolik asitlerin optimum HPLC şartlarının belirlenmesi. 1: Gallik asit, 2: klorojenik asit, 3: vanilik asit, 4: kafeik asit, 5: naringin, 6: kuersetin, 7: kaemferol

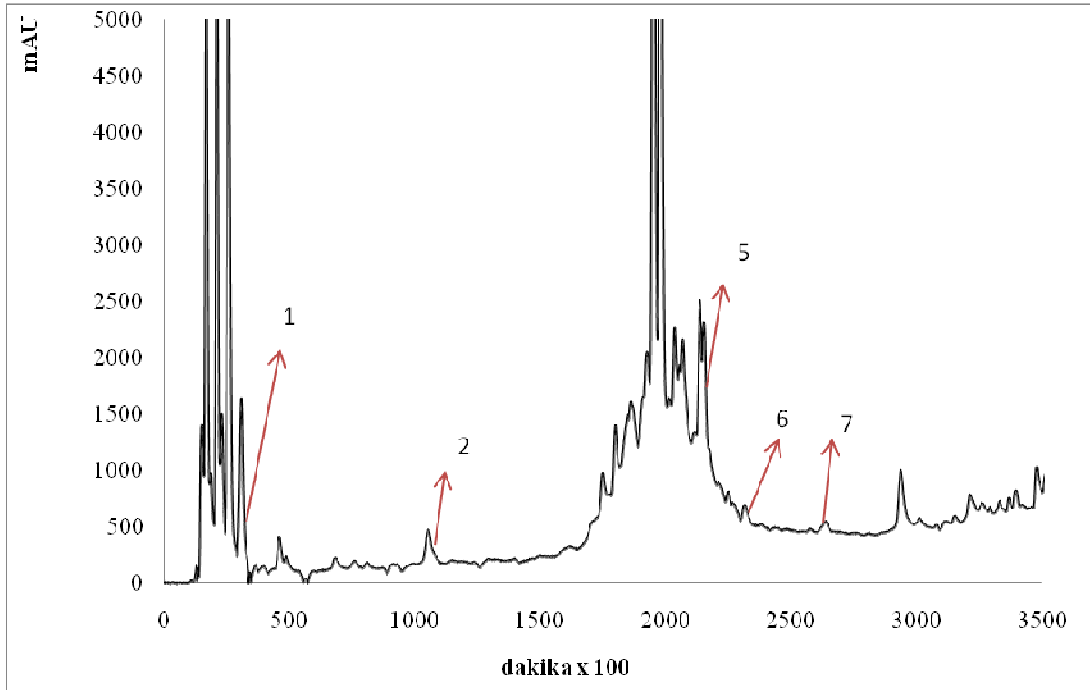
HPLC analizlerinde kullanılan solventler de kolondo tutunabilir ki bu sebeple solventleri de numune gibi cihazda okutmak onlardan kaynaklanan pikleri tanımlar.



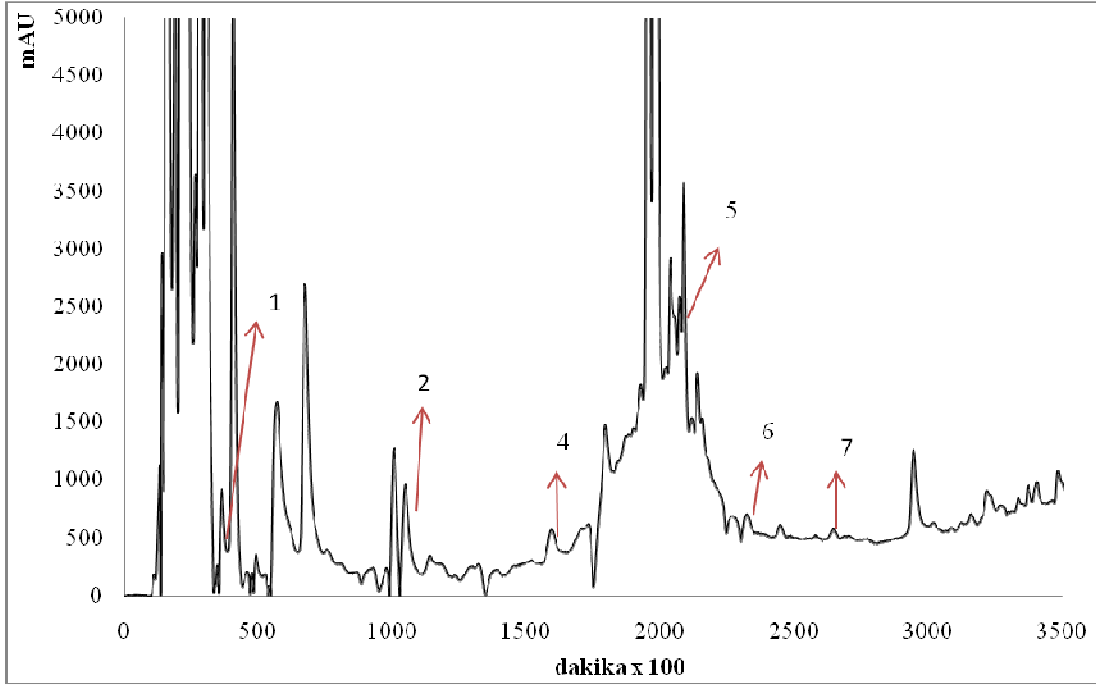
Şekil 4.6: Solventde yer alan asetik asit kromatogramı



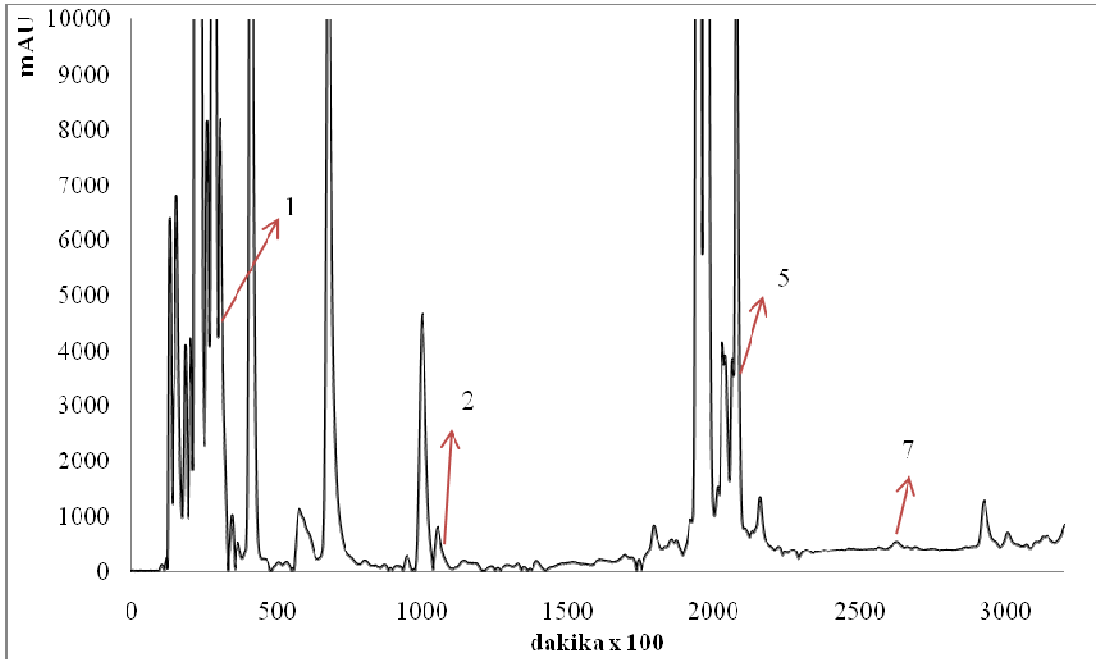
Şekil 4.7: Solventde yer alan metanol kromatogramı



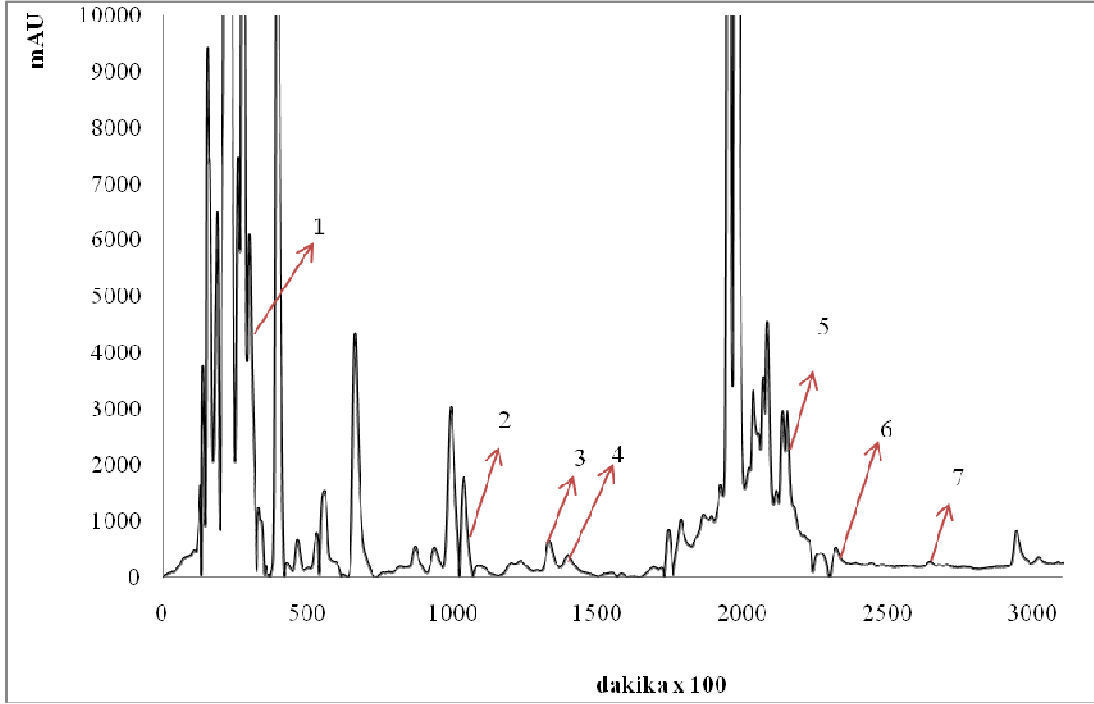
Şekil 4.8: 35 °C'de kurutulmuş çiriş bitkisinin sudaki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı



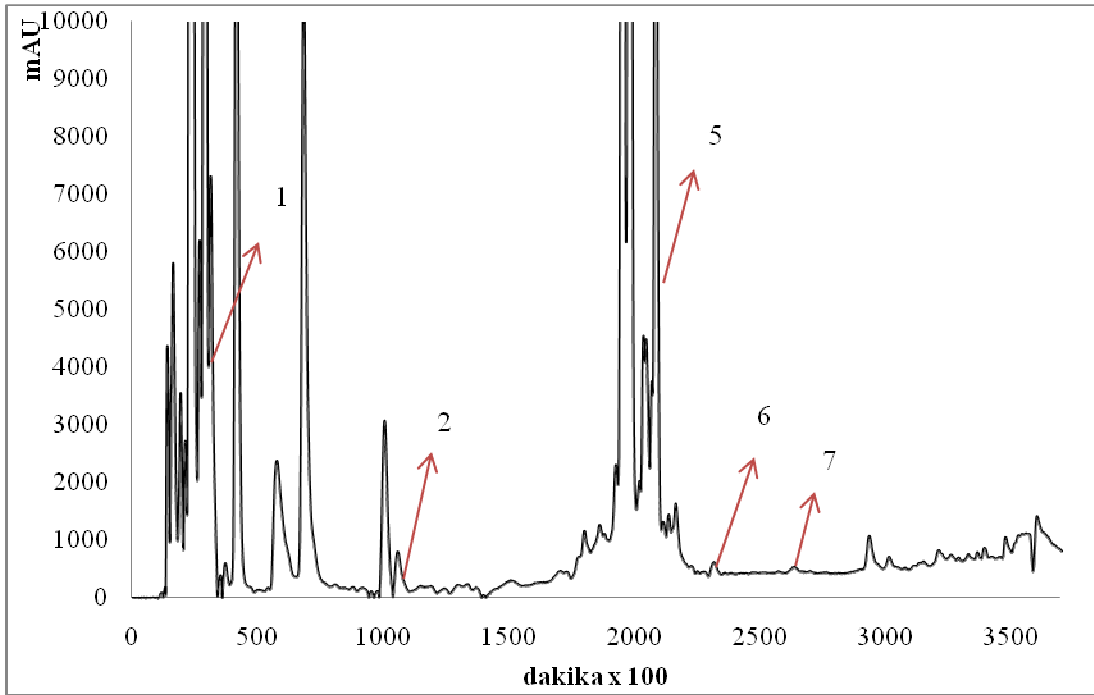
Şekil 4.9: 65 °C’de kurutulmuş çiriş bitkisinin sudaki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı



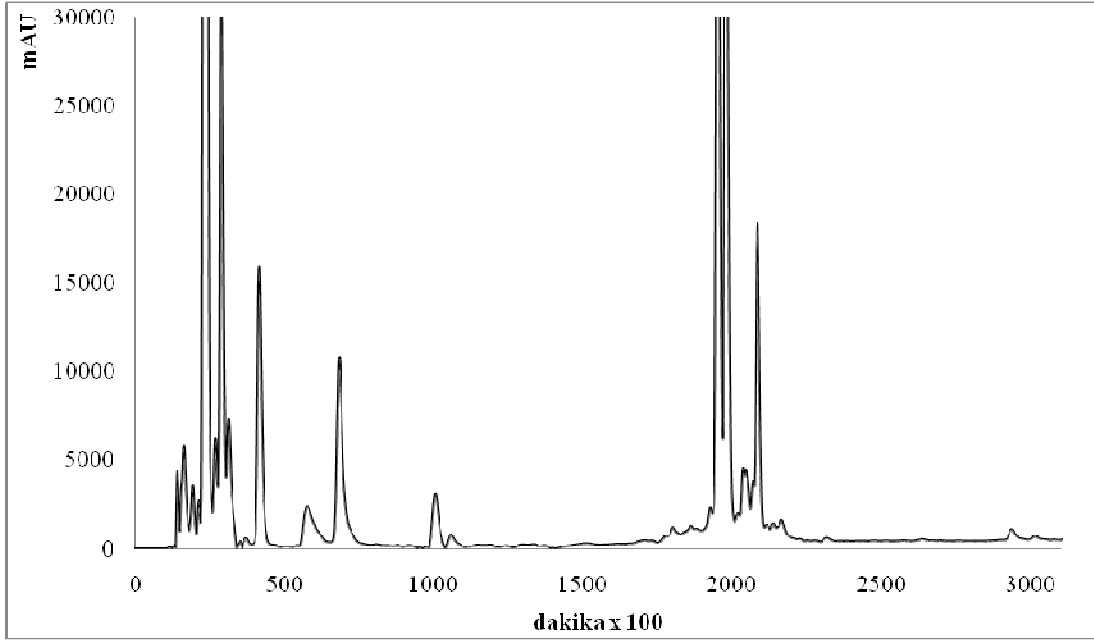
Şekil 4.10: 35 °C’de kurutulmuş çiriş bitkisinin metanoldeki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı



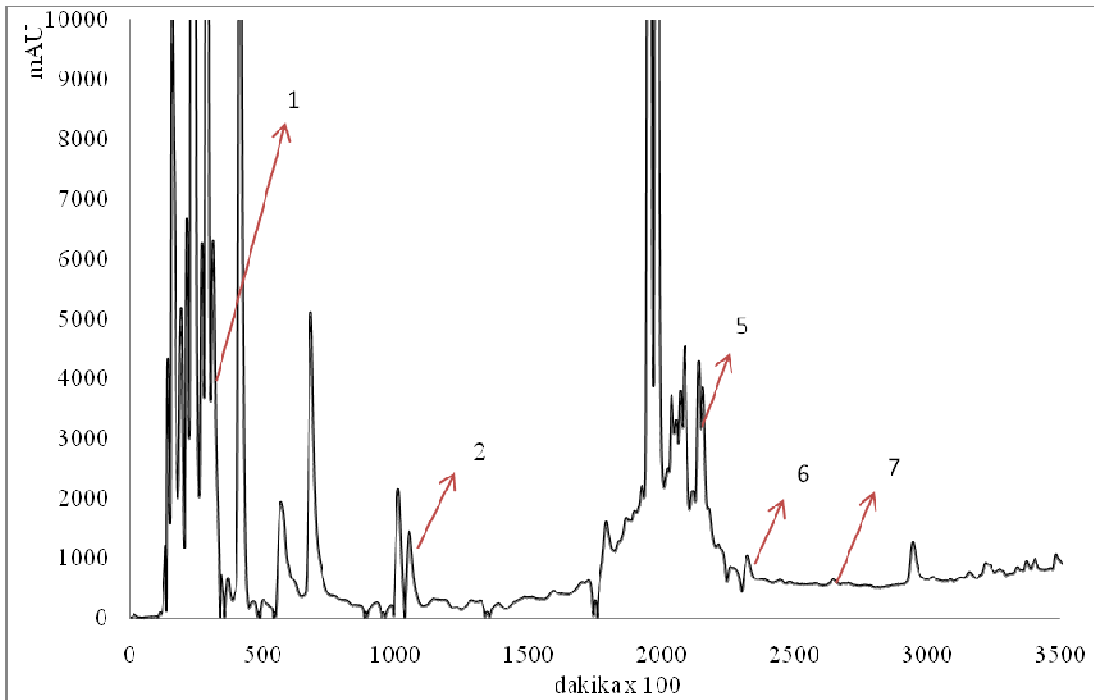
Şekil 4.11: 65 °C’de kurutulmuş çiriş bitkisinin metanoldeki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı



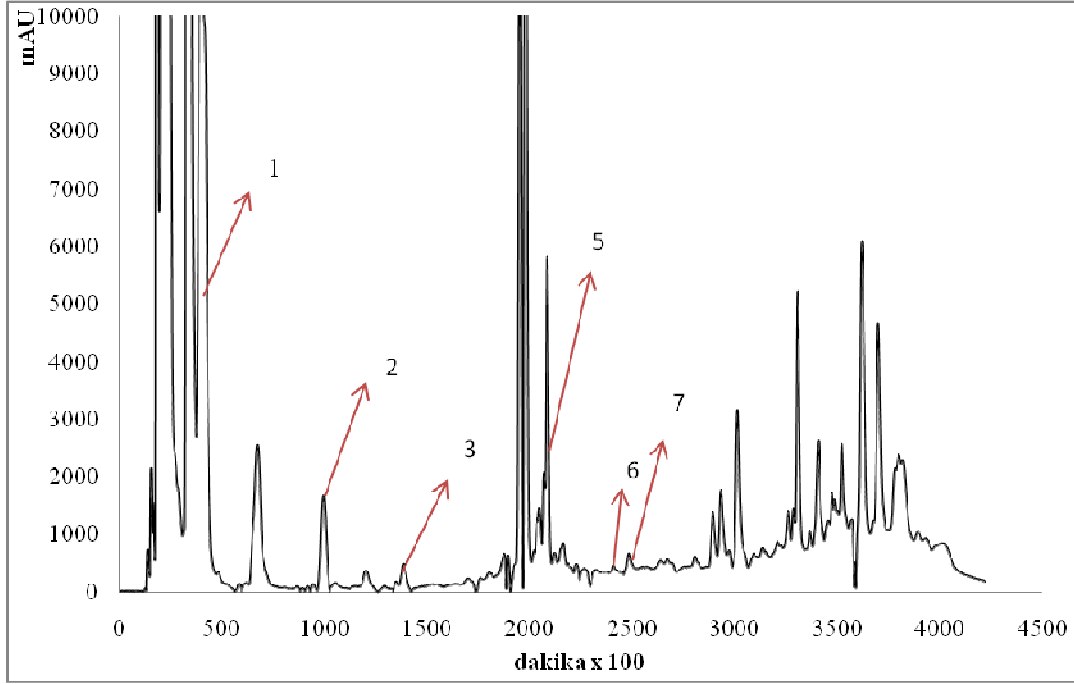
Şekil 4.12: 35 °C’de kurutulmuş çiriş bitkisinin su:metanol (1:1) karışımındaki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı



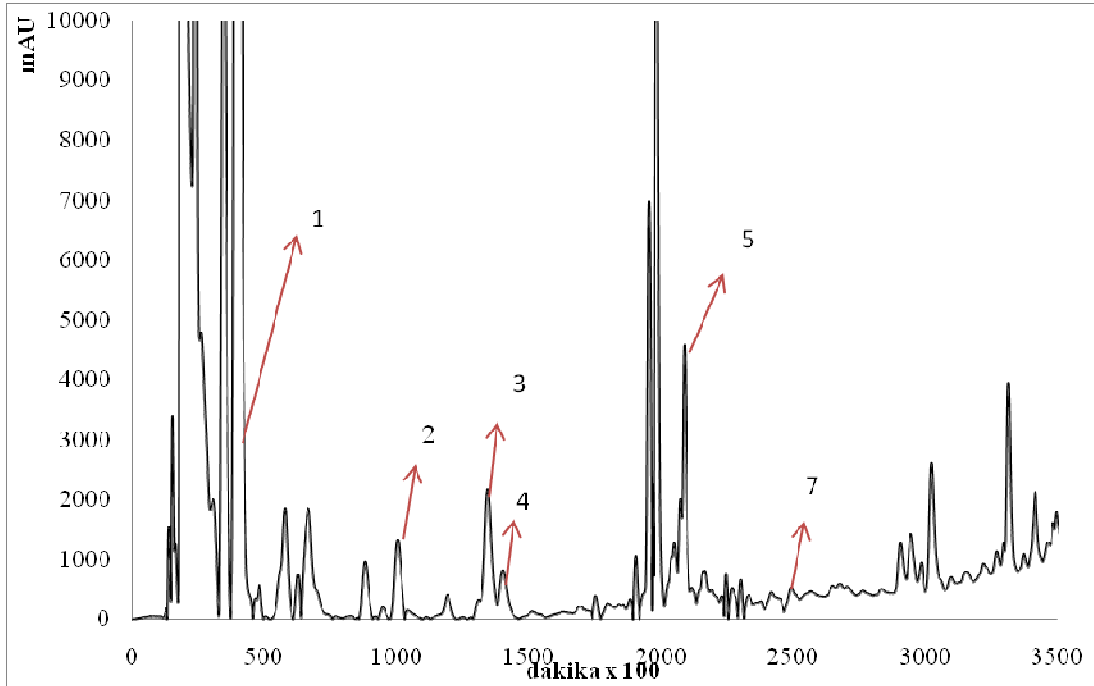
Şekil 4.13: 35 °C'de kurutulmuş çiriş bitkisinin su:metanol (1:1) karışımındaki ekstraksiyonuna ait gerekli pik boyunun görülmesi için daha geniş skalalı HPLC kromatogramı



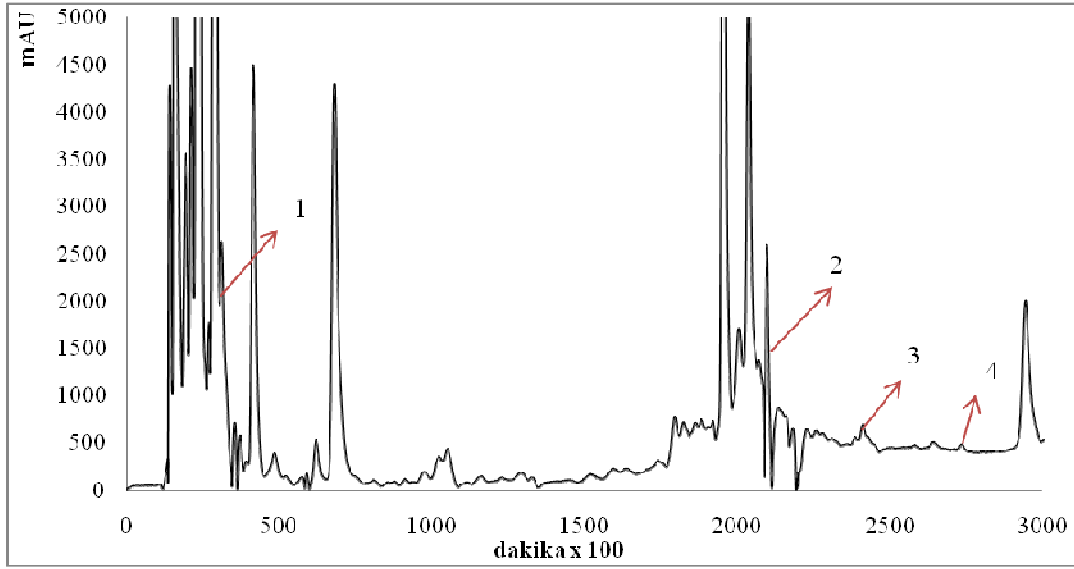
Şekil 4.14: 65 °C'de kurutulmuş çiriş bitkisinin su:metanol (1:1) karışımındaki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı



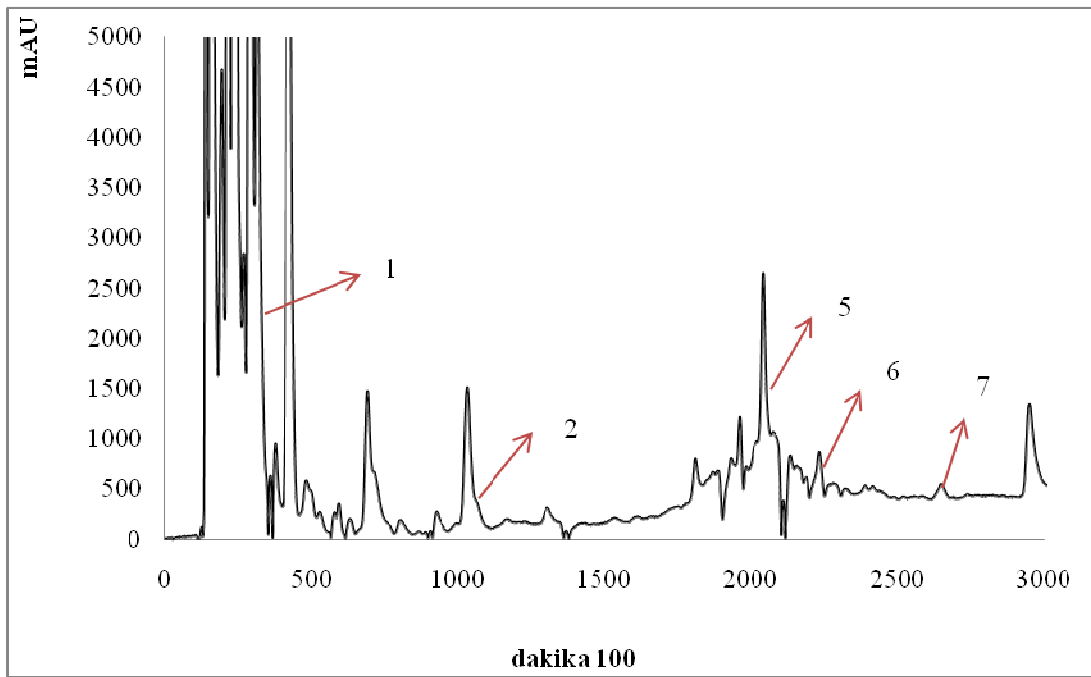
Şekil 4.15: 35 °C'de kurutulmuş çiriş bitkisinin etil asetat içindeki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı



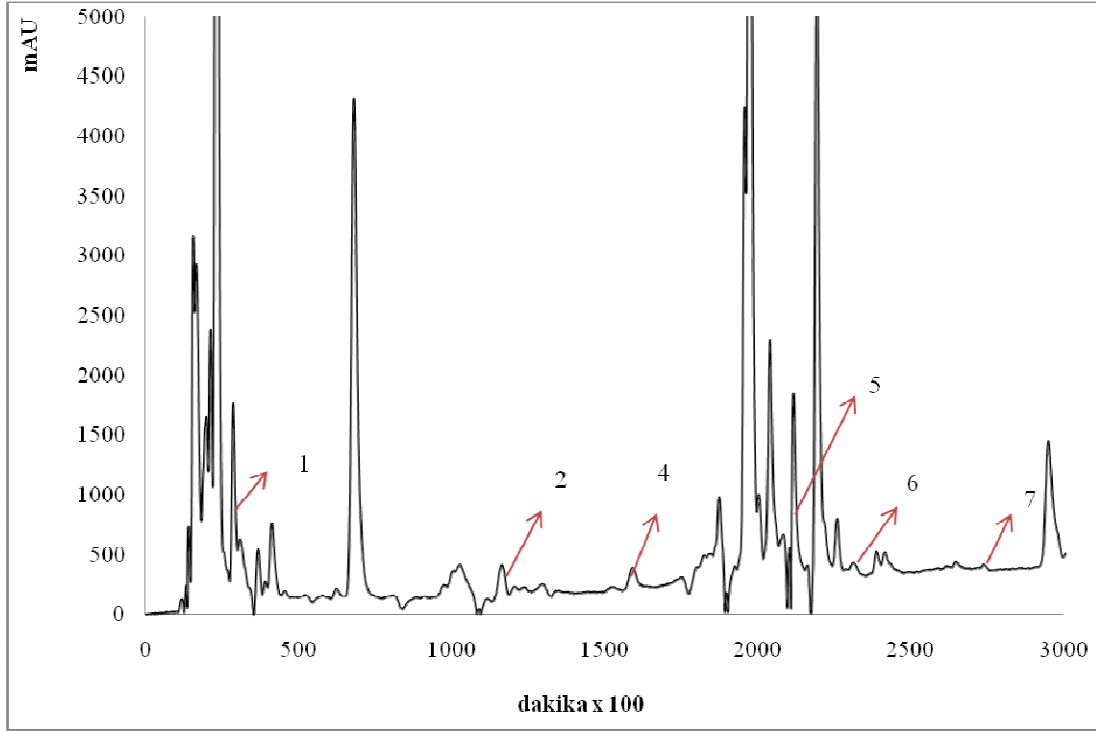
Şekil 4.16: 65 °C'de kurutulmuş çiriş bitkisinin etil asetat içindeki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı



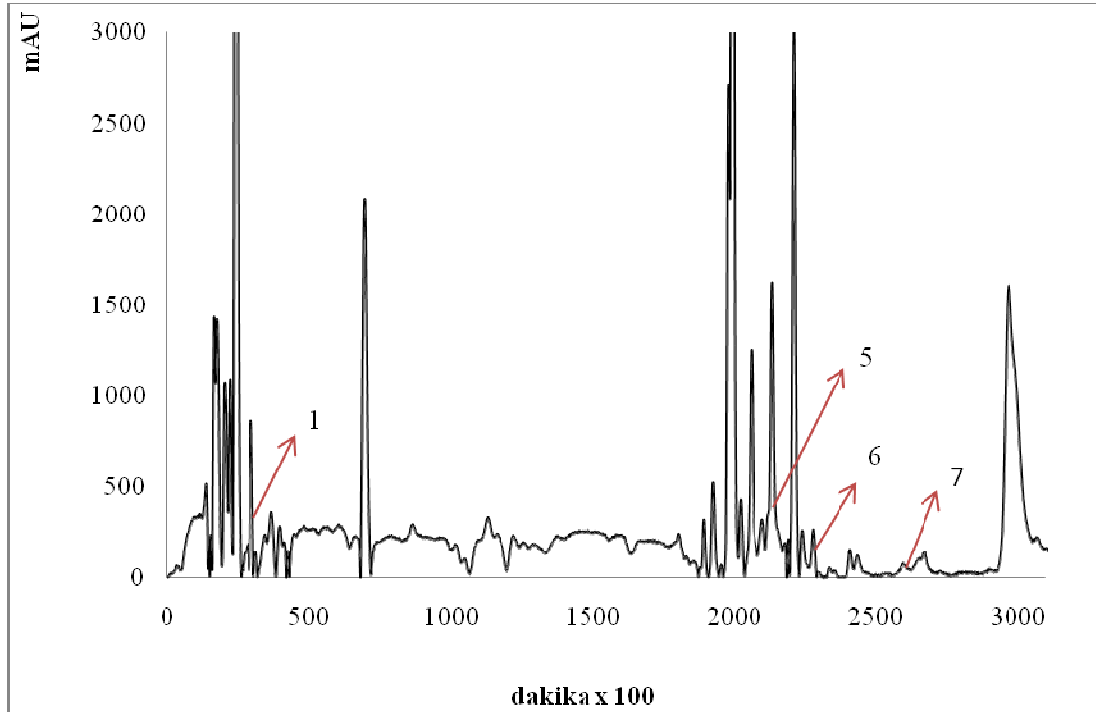
Şekil 4.17: 35 °C'de kurutulmuş yeşil soğan bitkisinin sudaki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı



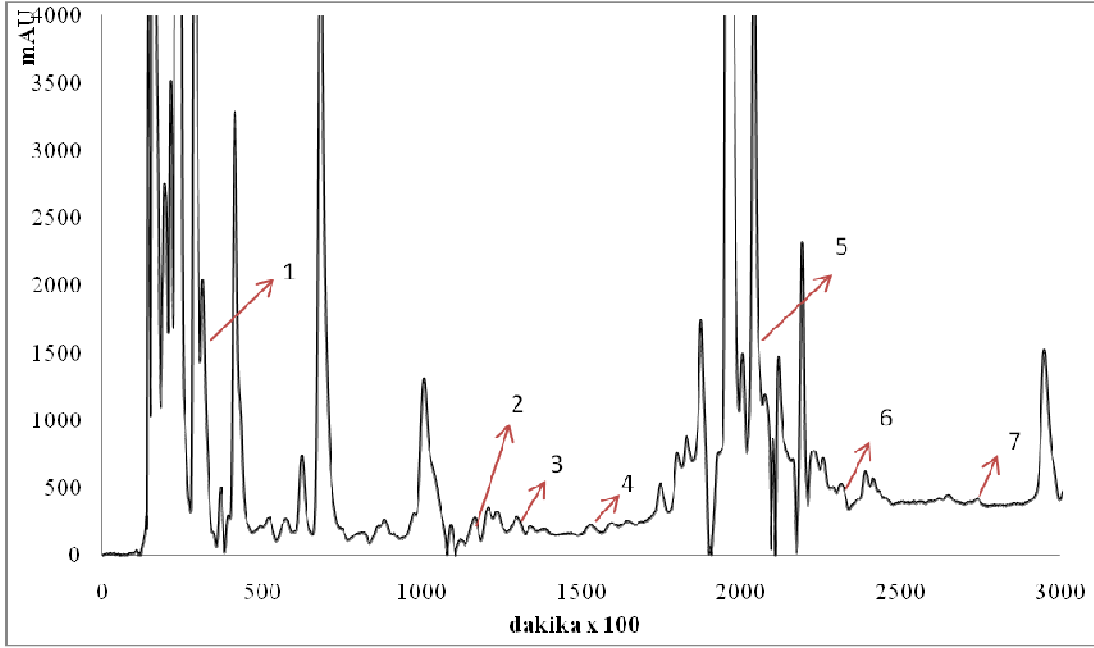
Şekil 4.18: 65 °C'de kurutulmuş yeşil soğan bitkisinin sudaki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı



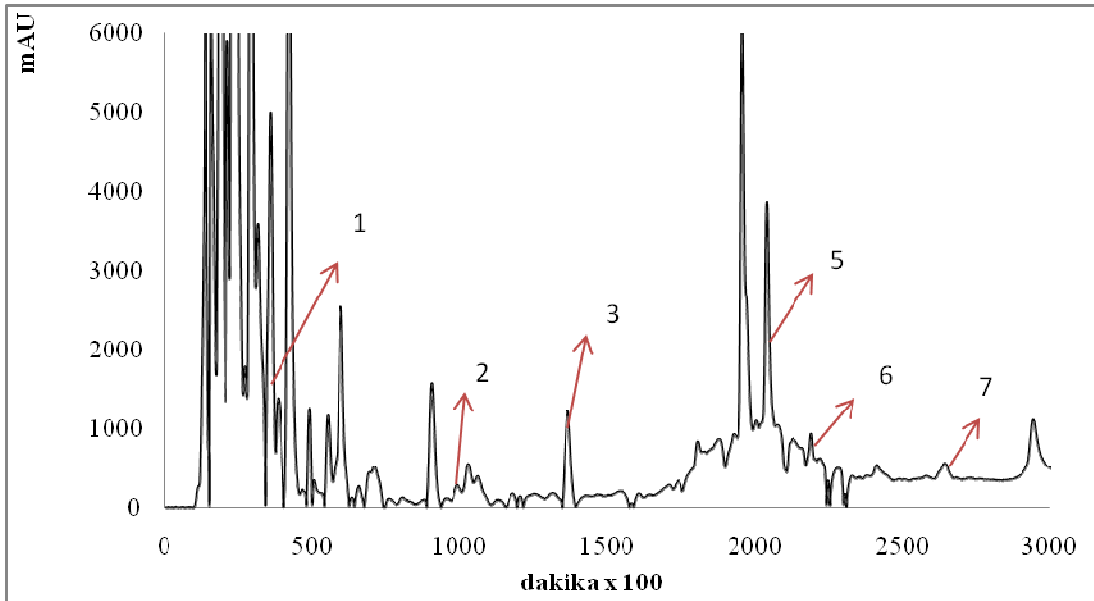
Şekil 4.19: 35 °C'de kurutulmuş yeşil soğan bitkisinin metanoldeki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı



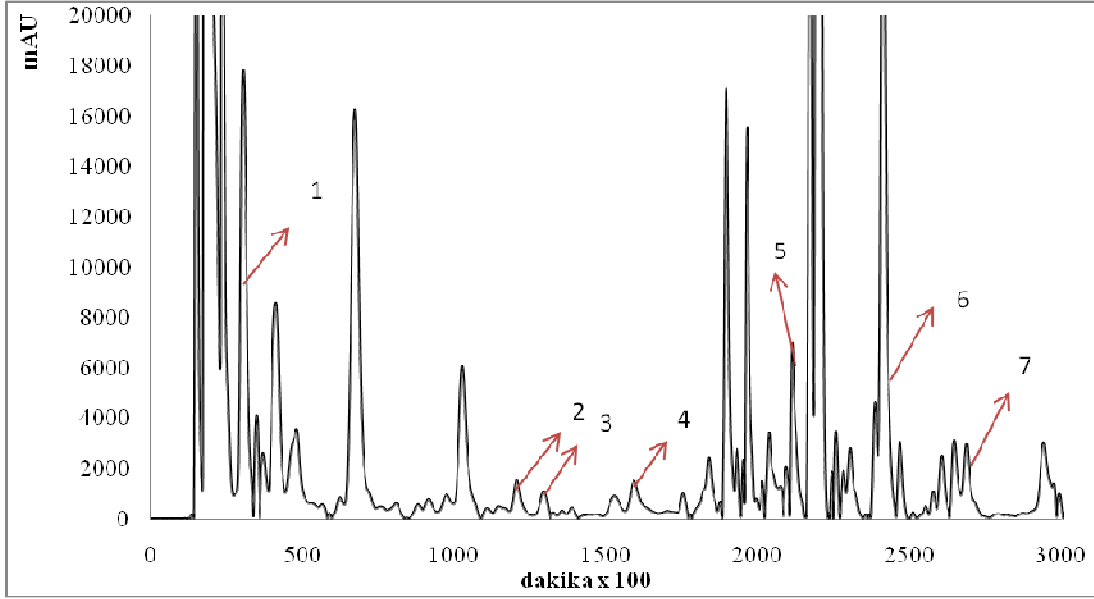
Şekil 4.20: 65 °C'de kurutulmuş yeşil soğan bitkisinin metanoldeki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı



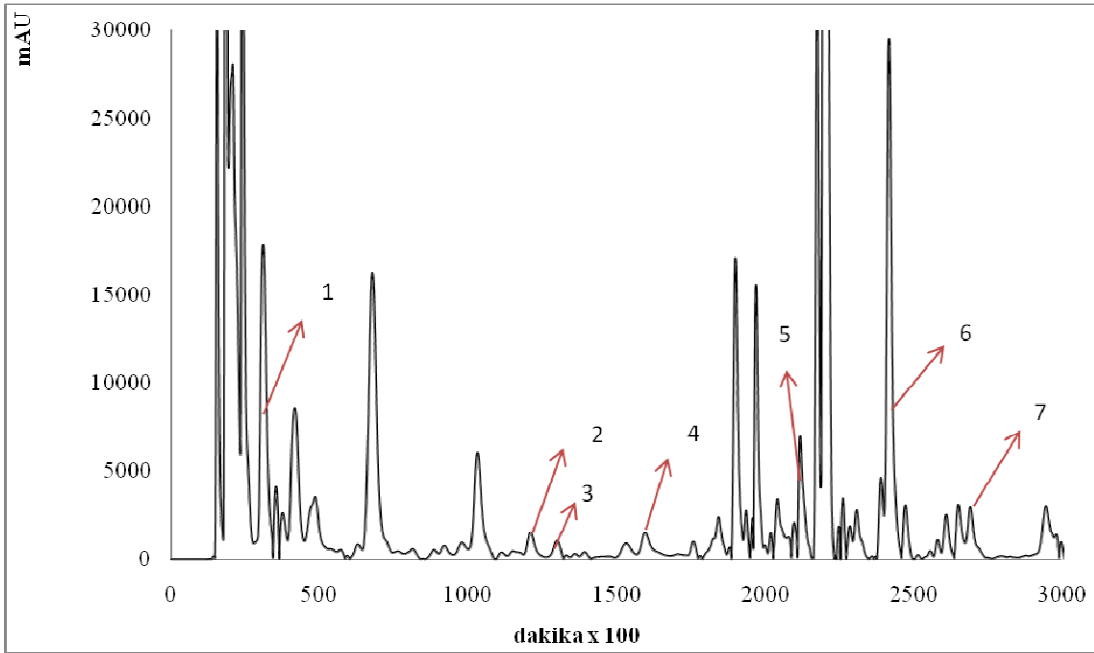
Şekil 4.21: 35 °C’de kurutulmuş yeşil soğan bitkisinin su:metanol (1:1) karışımındaki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı



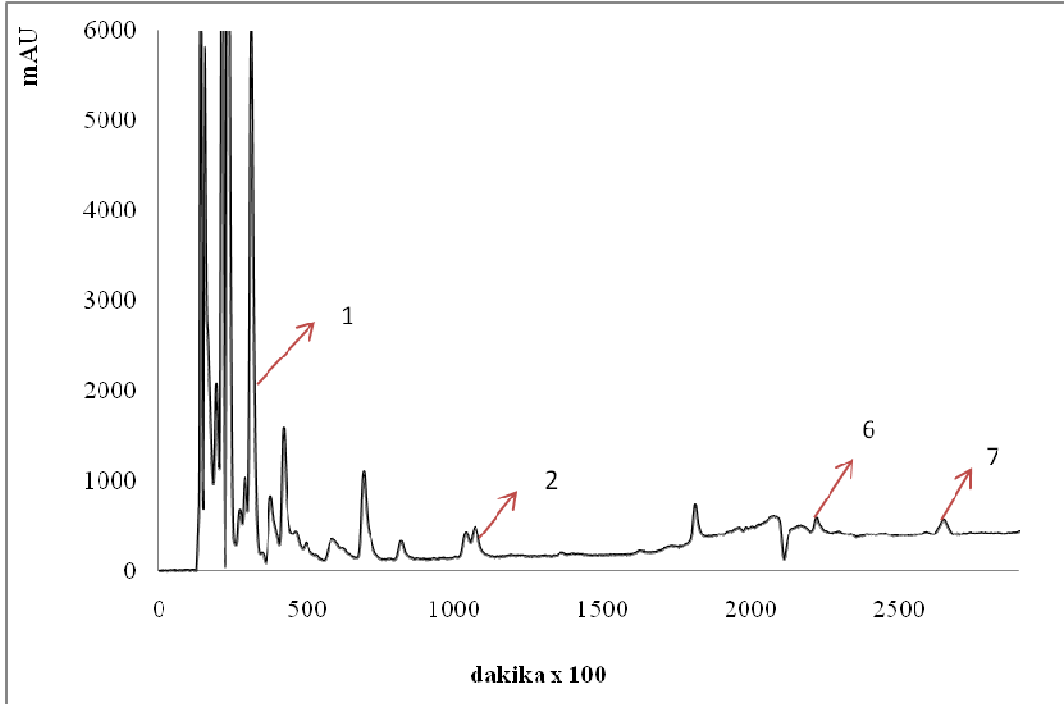
Şekil 4.22: 65 °C’de kurutulmuş yeşil soğan bitkisinin su:metanol (1:1) karışımındaki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı



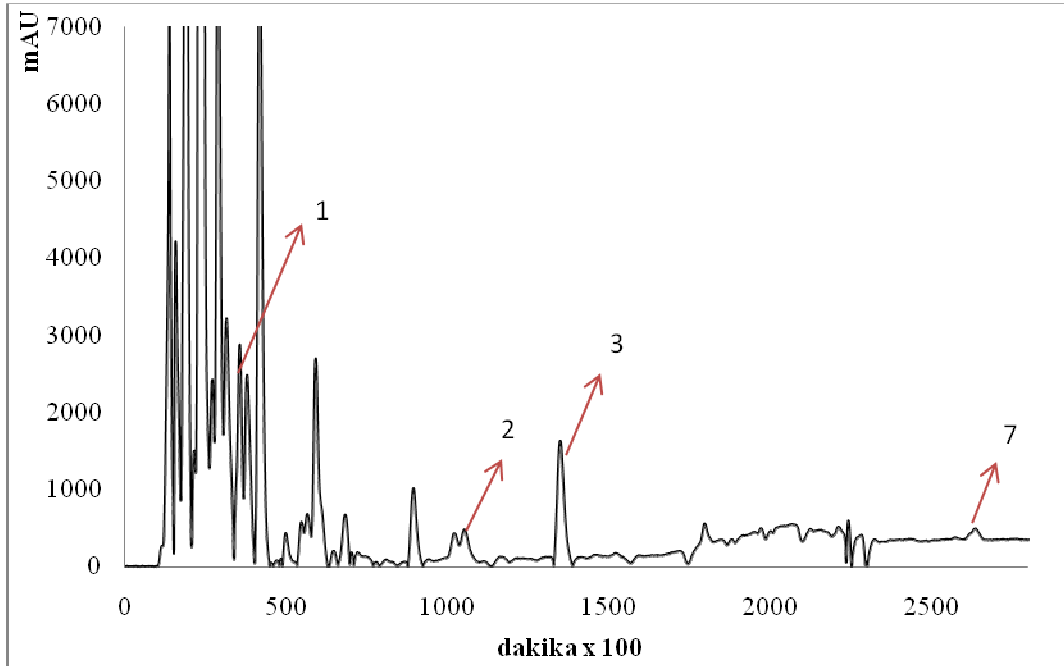
Şekil 4.23: 35 °C’de kurutulmuş yeşil soğan bitkisinin etil asetat içindeki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı



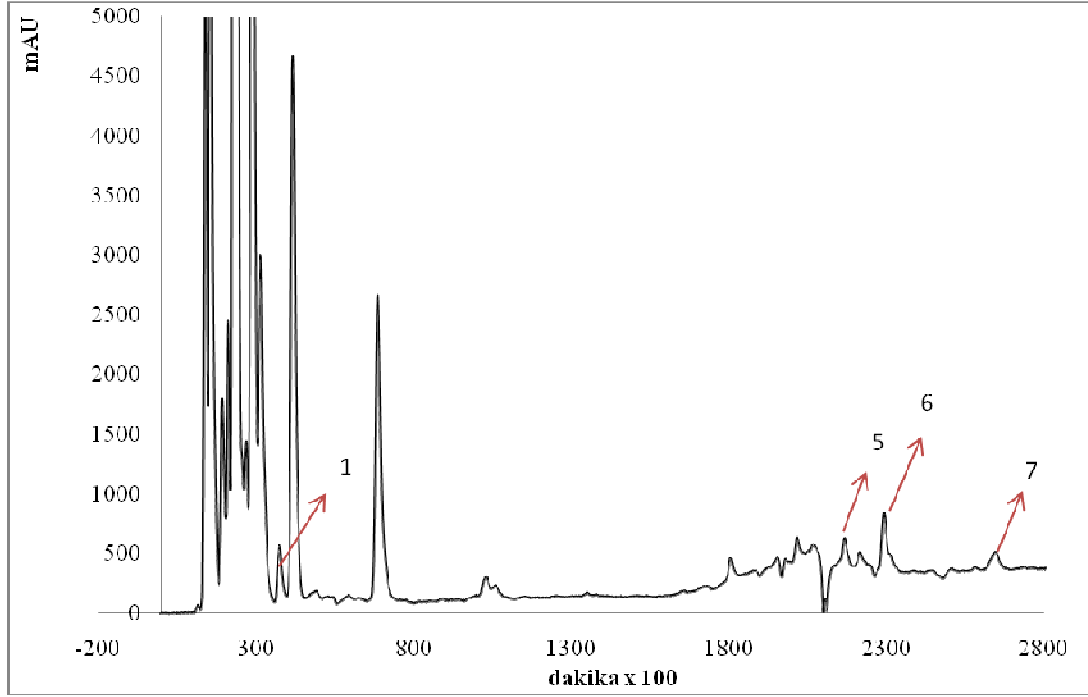
Şekil 4.24: 65 °C’de kurutulmuş yeşil soğan bitkisinin etil asetat içindeki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı



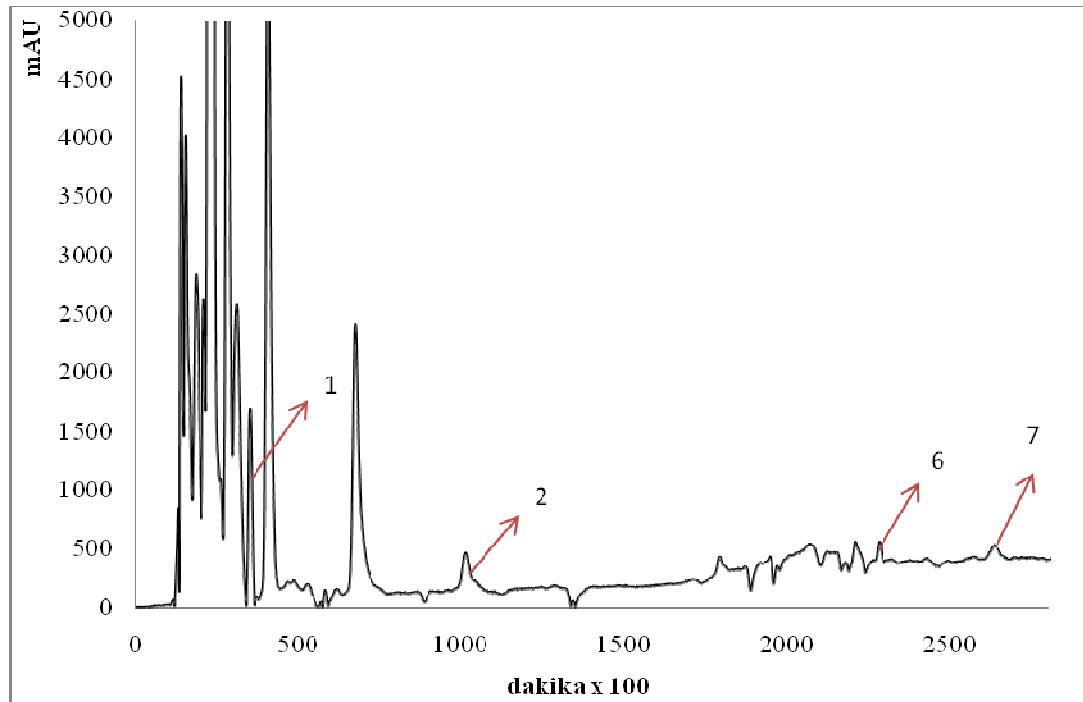
Şekil 4.25: 35 °C’de kurutulmuş pırasa bitkisinin sudaki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı



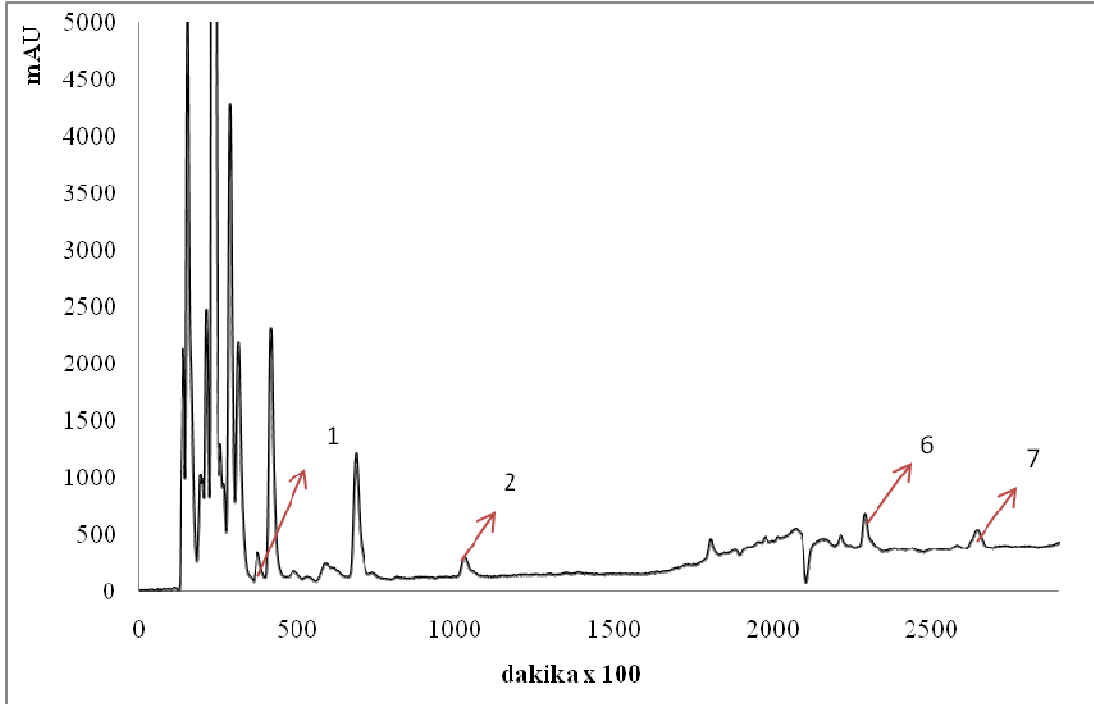
Şekil 4.26: 65 °C’de kurutulmuş pırasa bitkisinin sudaki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı



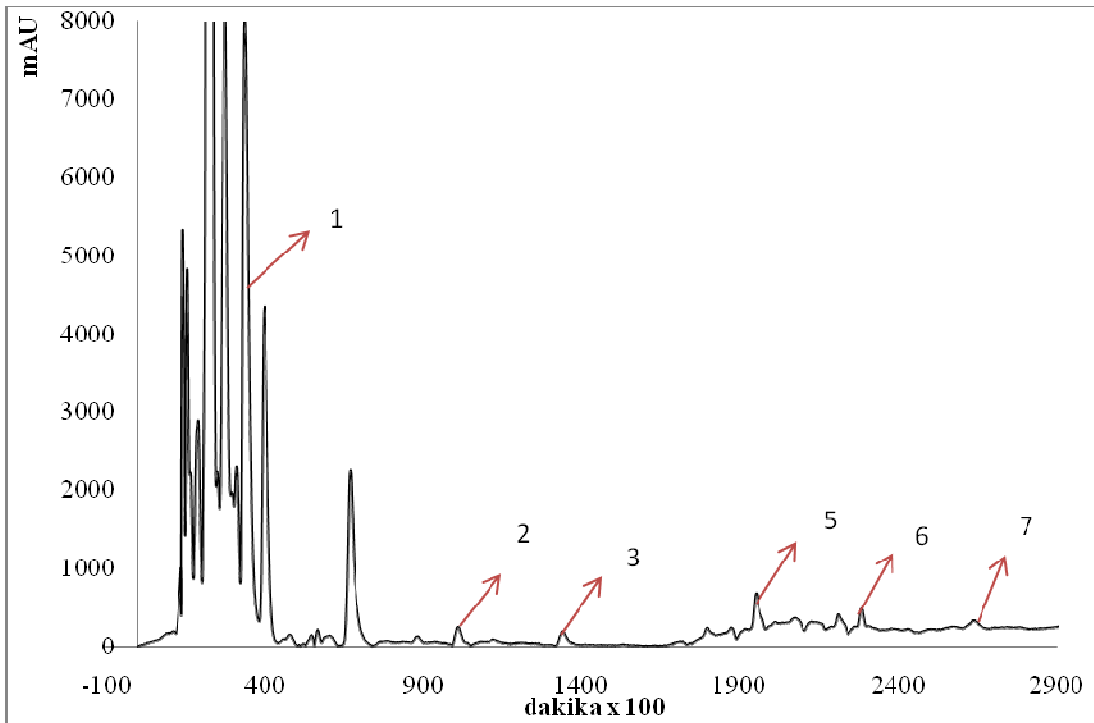
Şekil 4.27: 35 °C'de kurutulmuş pırasa bitkisinin metanoldeki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı



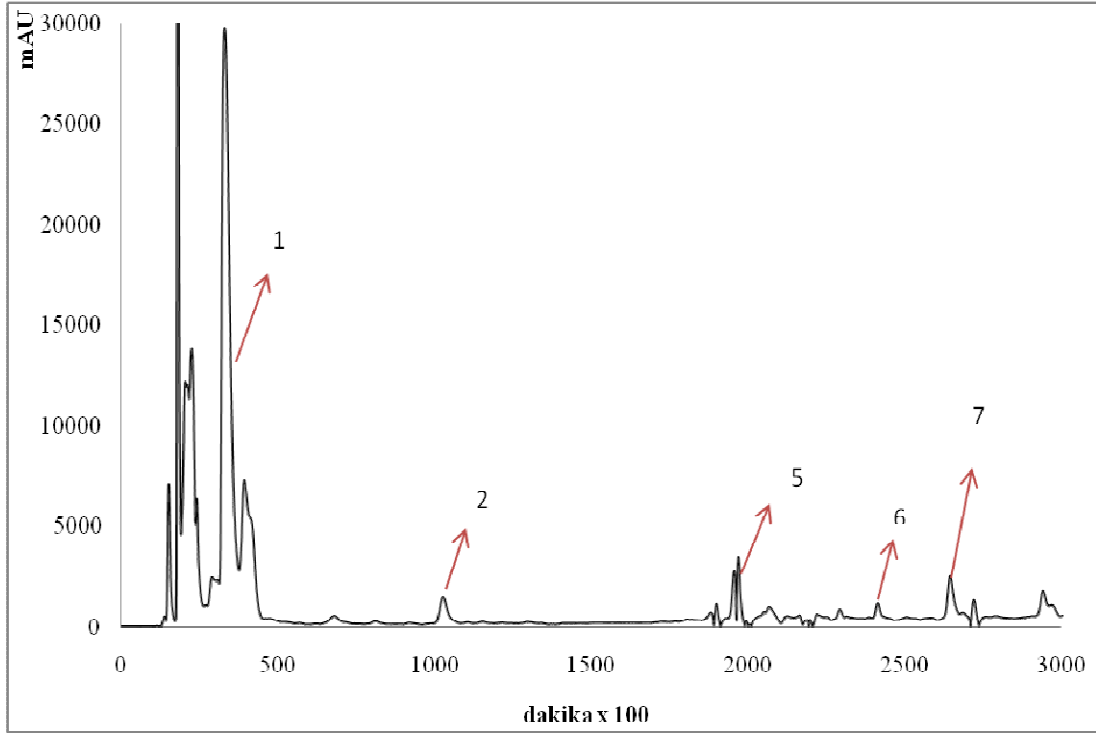
Şekil 4.28: 65 °C'de kurutulmuş pırasa bitkisinin metanoldeki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı



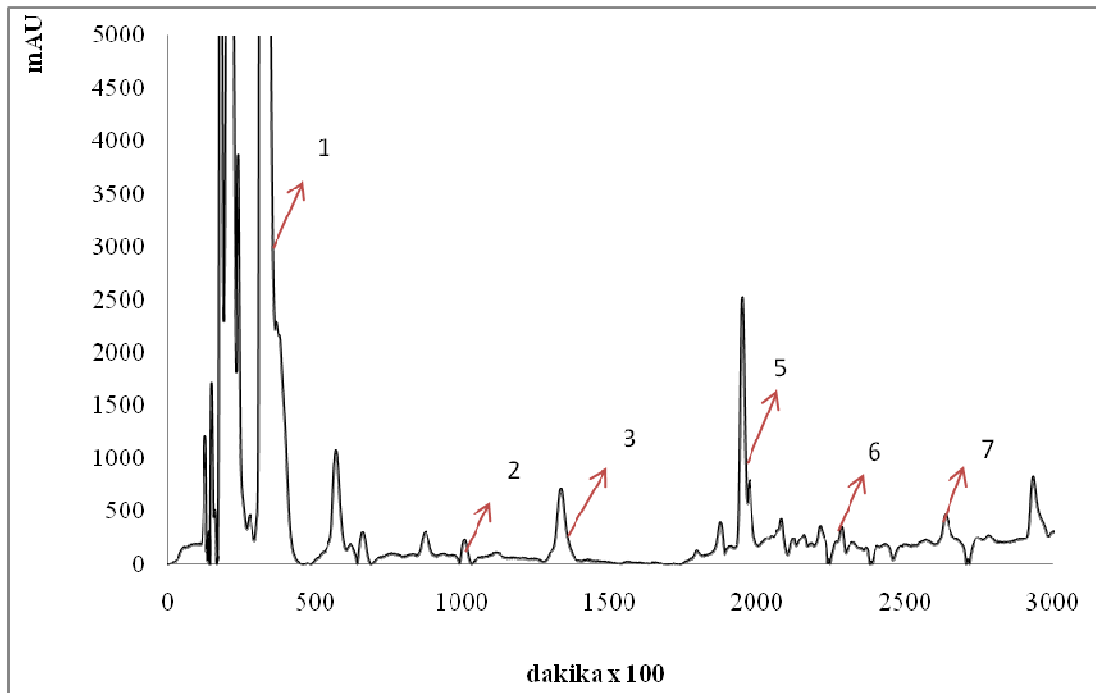
Şekil 4.29: 35 °C'de kurutulmuş pırasa bitkisinin su:metanol (1:1) karışımındaki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı



Şekil 4.30: 65 °C'de kurutulmuş pırasa bitkisinin su:metanol (1:1) karışımındaki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı



Şekil 4.31: 35 °C'de kurutulmuş pırasa bitkisinin etil asetat içindeki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı



Şekil 4.32: 65 °C'de kurutulmuş pırasa bitkisinin etil asetat içindeki ekstraksiyonuna ait HPLC kromatogramı

Tablo 4.8: 35 °C' de kurutulmuş çirişin tüm ekstraktlarındaki fenolik bileşikler

		Pik no	Fenolik madde ve flavonoid	Alınma süresi (dakika)	Alan	Miktar (mg/10mg/mL ekstraktta)	
Çiriş 35 °C	Su Ekstraktı	1	Gallik asit	3,03	13586	0,016	
		2	Klorojenik asit	11,04	5599	0,002	
		5	Naringin	22,79	3864	0,001	
		6	Kuersetin	24,32	1980	0,020	
		7	Kaemferol	27,76	1221	0,004	
	Metanol Ekstraktı	1	Gallik asit	3,25	222522	0,039	
		2	Klorojenik asit	11,01	73642	0,009	
		5	Naringin	22,03	95022	0,047	
		7	Kaemferol	27,58	85432	0,013	
	Su:metanol (1:1) Ekstraktı	1	Gallik asit	2,93	252355	0,042	
		2	Klorojenik asit	11,06	59407	0,008	
		5	Naringin	22,35	120093	0,059	
		6	Kuersetin	24,35	2678	0,020	
		7	Kaemferol	27,72	56789	0,010	
	Etil asetat Ekstraktı	1	Gallik asit	3,95	487356	0,068	
		2	Klorojenik asit	10,48	31573	0,050	
		3	Vanilik asit	14,15	15456	0,030	
		5	Naringin	22,14	325	0,016	
6		Kuersetin	25,06	1430	0,020		
7		Kaemferol	27,00	4143	0,005		

Tablo 4.9: 65 °C' de kurutulmuş çirişin tüm ekstraktlarındaki fenolik bileşikler

		Pik no	Fenolik madde ve flavonoid	Alınma süresi (dakika)	Alan	Miktar (mg/10mg/mL ekstraktta)	
Çiriş 65 °C	Su Ekstraktı	1	Gallik asit	3,53	67124	0,022	
		2	Klorojenik asit	11,43	10579	0,002	
		4	Kafeik asit	16,86	3813	0,049	
		5	Naringin	22,44	179299	0,089	
		6	Kuersetin	25,65	2163	0,020	
		7	Kaemferol	27,80	1174	0,004	
	Metanol Ekstraktı	1	Gallik asit	3,12	172045	0,033	
		2	Klorojenik asit	10,94	86789	0,011	
		3	Vanililik asit	14,05	92768	0,129	
		4	Kafeik asit	14,90	76890	0,053	
		5	Naringin	22,74	394728	0,197	
		7	Kaemferol	27,89	98763	0,014	
	Su:metanol (1:1) Ekstraktı	1	Gallik asit	2,93	184874	0,035	
		2	Klorojenik asit	10,89	56276	0,008	
		5	Naringin	22,74	310154	0,154	
		6	Kuersetin	24,40	3456	0,020	
		7	Kaemferol	27,79	59890	0,010	
Etil asetat Ekstraktı	1	Gallik asit	3,85	165099	0,033		
	2	Klorojenik asit	10,61	25593	0,004		
	3	Vanilik asit	14,24	31535	0,023		
	4	Kafeik asit	14,80	30345	0,051		
	5	Naringin	22,21	23969	0,011		
	7	Kaemferol	26,40	10467	0,005		

İki farklı sıcaklıkta kurutulmuş çirişin farklı ekstraktlarındaki HPLC ile tanımlama analizlerine göre çiriş bitkisinin fenolik maddece zengin bir bitki sonucuna varılmıştır. Standart reaktif olarak kullanılan yedi fenolik bileşiğe de bitki de rastlanmıştır. 65 °C' dekinin su ekstraksiyonunda 35 °C' den farklı olarak kafeik asit tespit edilmiştir (0,049 mg kafeik asit/ 10mg/mL bitki ekstraktı). Tablo 4,7 ve 4,8'de görüldüğü gibi su ekstraktındaki fenolik madde değerleri birbirine oldukça yakın çıkmıştır. Bitkilerin kurutulduğu sıcaklık farklılığı değerlerde çok ayrı sonuçlar oluşturmamıştır. 65 °C' dekinin metanol ekstraksiyonunda 35 °C' den farklı olarak vanilin ve kafeik asit tespit edilmiştir. Bu sonuç 65 °C sıcaklığında kurutulmuş bitkide bazı maddelerin daha iyi ekstraksiyon çözgenine geçtiği sonucunu göstermiştir. MeOH:Su (1:1) karışımında sıcaklık farkı sonuçlar arasında değişkenlik oluşturmamış ve sonuçlara göre naringinin her iki ekstraktta da temel bileşik olduğu gözlenmiştir. 65 °C' dekinin etil asetat ekstraksiyonunda 35 °C' den farklı olarak kafeik asite rastlanırken, kuersetin varlığı gözlenememiştir. 65 °C'de kurutulmuş

çirişin diğer tüm ekstraktlarında kuersetin olduğuna göre etil asetatın maddenin ekstrakte edilmesinde uygun çözügen olmadığı sonucuna varılır.

Tablo 4.10: 35 °C' de kurutulmuş yeşil soğanın tüm ekstraktlarındaki fenolik bileşikler

		Pik no	Fenolik madde ve flavonoid	Alıkoma süresi (dakika)	Alan	Miktar (mg/10mg/mL ekstraktta)
Yeşil soğan 35 °C	Su Ekstraktı	1	Gallik asit	2,96	104453	0,026
		5	Naringin	22,03	30766	0,015
		6	Kuersetin	25,29	1886	0,020
		7	Kaemferol	28,67	529	0,004
	Metanol Ekstraktı	1	Gallik asit	2,96	9753	0,015
		2	Klorogenik asit	12,22	4055	0,002
		4	Kafeik asit	16,68	3495	0,049
		5	Naringin	22,52	16927	0,008
		6	Kuersetin	24,34	3793	0,020
		7	Kaemferol	28,24	392	0,004
		Su:metanol (1:1) Ekstraktı	1	Gallik asit	3,23	55056
	2		Klorogenik asit	12,19	5118	0,002
	3		Vanilik asit	13,52	6587	0,008
	4		Kafeik asit	16,02	8745	0,050
	5		Naringin	21,66	32793	0,016
	6		Kuersetin	24,30	17321	0,020
	7		Kaemferol	28,72	3543	0,005
	Etil asetat Ekstraktı	1	Gallik asit	3,46	233459	0,040
		2	Klorogenik asit	12,73	21424	0,004
		3	Vanilik asit	13,57	20717	0,024
		4	Kafeik asit	16,68	20345	0,050
		5	Naringin	22,54	213425	0,106
		6	Kuersetin	35,63	298198	0,021
		7	Kaemferol	28,36	30,756	0,007

Tablo 4.11: 65 °C' de kurutulmuş yeşil soğanın tüm ekstraktlarındaki fenolik bileşikler

		Pik no	Fenolik madde ve flavonoid	Alınma süresi (dakika)	Alan	Miktar (mg/10mg/mL ekstraktta)
Yeşil soğan 65 °C	Su Ekstraktı	1	Gallik asit	3,01	112898	0,027
		2	Klorojenik asit	10,85	24008	0,004
		5	Naringin	21,67	14304	0,006
		6	Kuersetin	24,0	2575	0,020
		7	Kaemferol	27,9	2417	0,005
	Metanol Ekstraktı	1	Gallik asit	2,98	7006	0,015
		5	Naringin	22,33	7278	0,003
		6	Kuersetin	23,84	1675	0,020
		7	Kaemferol	27,09	839	0,004
	Su:metanol 1 (1:1) Ekstraktı	1	Gallik asit	3,55	90321	0,024
		2	Klorojenik asit	12,21	4085	0,002
		3	Vanilik asit	14,43	22455	0,026
		5	Naringin	21,68	23763	0,011
		6	Kuersetin	23,0	7664	0,020
		7	Kaemferol	27,74	3771	0,005
		Etil asetat Ekstraktı	1	Gallik asit	3,44	21316
	2		Klorojenik asit	12,70	18393	0,003
	3		Vanilik asit	13,49	18086	0,021
	4		Kafeik asit	16,56	22456	0,050
	5		Naringin	22,52	235538	0,117
	6		Kuersetin	25,67	287645	0,021
	7		Kaemferol	28,34	16789	0,006

Yeşil soğanın 65 °C sıcaklıkta kurutulmuş yapılan sudaki ekstraksiyonunda 35 °C'dekinden farklı olarak klorojenik asit varlığı gözlenmiştir. Bu sıcaklığın bu maddenin ekstraksiyonu için daha uygun olduğu sonucuna varılır. Ortak bulunan fenolik yapıların sayısal değerleri ise çok farklılık oluşturmamaktadır. Ve yine bitkinin 65 °C sıcaklıkta kurutulmuş yapılan metanol ekstraksiyonunda 35 °C'dekinden farklı olarak klorojenik asit ve kafeik asite rastlanmamıştır ve kafeik asitin sayısal değeri diğerlerine göre en yüksektir (0,049 mg kafeik asit/ 10mg/mL bitki ekstraktı). MeOH:Su (1:1) karışımında sıcaklık farkı naringin değerinde açık bir farklılık oluşturmuş, bitkinin 65 °C sıcaklıkta kurutulmuş yapılan bu ekstraksiyonunda daha yüksek değer göstermiştir. Her iki sıcaklığın da etil asetat ekstraktlarında referans kabul edilen tüm fenolik yapıların varlığı gözlenmiştir ve rakamsal değerleri arasında yakınlık olduğu sonucuna varılır.

Tablo 4.12: 35 °C' de kurutulmuş pırasanın tüm ekstraktlarındaki fenolik bileşikler

		Pik no	Fenolik madde ve flavonoid	Alınma süresi (dakika)	Alan	Miktar (mg/10mg/mL ekstraktta)
Pırasa 35 °C	Su Ekstraktı	1	Gallik asit	3,27	46843	0,019
		2	Klorojenik asit	10,92	1241	0,001
		6	Kuersetin	23,22	1669	0,020
		7	Kaemferol	27,78	2964	0,005
	Metanol Ekstraktı	1	Gallik asit	3,60	72173	0,022
		5	Naringin	22,84	7025	0,003
		6	Kuersetin	24,35	2639	0,020
		7	Kaemferol	27,79	2575	0,005
	Su:metanol (1:1) Ekstraktı	1	Gallik asit	3,65	12936	0,016
		2	Klorojenik asit	10,65	2878	0,002
		6	Kuersetin	23,22	2310	0,020
		7	Kaemferol	27,88	2884	0,005
	Etil asetat Ekstraktı	1	Gallik asit	3,84	469687	0,066
		2	Klorojenik asit	10,78	23424	0,004
		5	Naringin	20,93	4977	0,002
		6	Kuersetin	25,40	2809	0,020
7		Kaemferol	28,08	26302	0,004	

Tablo 4.13: 65 °C' de kurutulmuş pırasanın tüm ekstraktlarındaki fenolik bileşikler

		Pik no	Fenolik madde ve flavonoid	Alınma süresi (dakika)	Alan	Miktar (mg/10mg/mL ekstraktta)
Pırasa 65 °C	Su Ekstraktı	1	Gallik asit	3,45	59976	0,021
		2	Klorojenik asit	10,85	1948	0,002
		3	Vanilik asit	14,22	30998	0,036
		7	Kaemferol	27,68	2540	0,005
	Metanol Ekstraktı	1	Gallik asit	3,44	15306	0,016
		2	Klorojenik asit	10,60	6629	0,002
		6	Kuersetin	24,02	13,59	0,020
		7	Kaemferol	27,80	1799	0,004
	Su:metanol (1:1) Ekstraktı	1	Gallik asit	3,45	94454	0,025
		2	Klorojenik asit	10,85	2815	0,002
		3	Vanilik asit	13,89	2588	0,003
		5	Naringin	20,65	5569	0,002
		6	Kuersetin	24,05	1945	0,020
		7	Kaemferol	27,68	1860	0,004
	Etil asetat Ekstraktı	1	Gallik asit	3,44	394909	0,058
		2	Klorojenik asit	10,33	5907	0,02
3		Vanilik asit	13,98	13506	0,016	
5		Naringin	20,66	2783	0,001	
6		Kuersetin	24,08	2118	0,020	
7		Kaemferol	27,74	3338	0,005	

Pırasanın 65 °C sıcaklıkta kurutulmuş olarak yapılan sudaki ekstraksiyonunda 35 °C'den farklı olarak kuersetin bulunmayıp, vanilin varlığı gözlenmiştir. Diğer bölümlerde de bahsedildiği gibi kuersetinin soğansu bitkilerde bulunması ve bu analizde de tüm ekstraktlarda gözlenmesi üzerine şu yorum yapılabilir: 65 °C sıcaklık su ekstraksiyonunda kuersetinin varlığının gözlenmesini engellemiştir. 65 °C'nin metanol ekstraktında naringin gözlenemezken klorojenik asit gözlenmiş ve diğer yapıların değerleri de birbirlerine yakındır. Bitkinin 65 °C sıcaklıkta kurutulmuş olarak yapılan MeOH:Su (1:1) ekstraksiyonunda 35 °C'den farklı olarak vanilin ve naringin gözlenmiş, kuersetinin ise her iki sıcaklıkta kurutulmuş bitki ekstresi için de etkin fenolik bileşen olduğu sonucuna varılmıştır. Etil asetat ekstraksiyonlarında ise 65 °C' dekinde farklı olarak çok az miktarda naringin gözlenmiştir (0,001 mg naringin/ 10mg/mL bitki ekstraktı).

BÖLÜM 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR

Bu çalışma ile, soğansu bitkilerden olan üç farklı bitkinin, (çiriş, yeşil soğan ve pırasanın) çeşitli çözenlerdeki ekstraksiyonlarında toplam fenolik madde içerikleri ve fenolik madde profilleri ortaya konularak antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir.

Soğansu bitkilerin fenolik bileşikler bakımından zengin olduğu, yüksek antioksidan aktivite gösterdiği bilinmektedir. Tez çalışmasında fenolik bileşikleri ve dolayısıyla antioksidan kapasitesi hakkında daha önceden çalışılmamış olan çiriş (*Asphodelus Ramosus*) analiz edildi. Çiriş, yeşil soğan (*Allium Cepa L.*) ve pırasanın (*Allium Porrum L.*) fenolik yapı miktarı çeşitli spektrofotometrik yöntemlerle ve bu sonuçları desteklemek adına fenolik profilleri HPLC ile analiz edildi. Soğan ve pırasanın analiz değerleri literatürde yer alan sonuçlarla da karşılaştırılırken, hesaplanan değerlerin çirişin fenolik miktarıyla ilişkisi incelendi.

Örneklerin içeriğindeki fenolik bileşiklerin eldesinde ve buna bağlı olarak maksimum antioksidan aktivitesine ulaşılmasında ekstraksiyon yönteminde kullanılan çözen farklılığının, sonuçları ne oranda etkileyip etkilemediği araştırıldı. Buna göre sonuçlar kullanılan yöntemlerle en genel varılan sonuç şekilde 65 °C'de kurutulan bitkilerin su ekstresi analiz değerleri > metanol:su (1:1) ekstresi > metanol ekstresi > etil asetat ekstresi şeklinde olup bu sıra değişmeksizin 35 °C'de kurutulan bitkilerin ekstrelerinden daha büyük değerlere sahip olduğudur. Bitkisel örneklerin yapısal farklılıkları nedeniyle ekstraksiyon yöntemlerinde her örnek için tek bir çözen sisteminin kullanımından bahsetmek mümkün olamamaktadır. Elde edilen sonuçların da açıkça ortaya koyduğu gibi, analizlerde farklı çözenlerle çalışarak en uygun çözen seçilebilir 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. Fenolik asitler ve flavonoidler polar çözücülerde çözünürler ve polar sistemlerde güçlü aktivite gösterirler. Demir(III)'ü indirgeme reaksiyonu ve DPPH• radikal süpürücü etki testleri polar ortamlarda yapılmaktadır. Bu nedenle de bu bileşiklerce zengin ekstraksiyonlar bu deney sistemlerinde etkili olarak bulunmuşlardır. 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.

Ekstreler üzerinde yapılan HPLC analizleri sonucunda gallik asit ve kaemferol tüm ekstrelerde tanımlanan fenolik bileşiklerdir. Gallik asit en yüksek değere sahip (0,066 mg gallik asit/ 10mg/mL bitki ekstraktı ikinci fenolik yapı iken birinci sırada 65 °C'de kurutulmuş çirşin metanol ekstraktında yer alan naringin olduğu gözleniyor (0,197 mg naringin/ 10mg/mL bitki ekstraktı). Bu sırayı kuersetin ve kaemferol devam ettirirken en az değerde bulunan fenolik bileşik vanilin olarak bulunmuştur.

Sonuçlara göre, çalışılan bitkilerin fenolik madde içeriğindeki farklılıkların, gösterdikleri antioksidan özelliklerini etkilediği açıkça görülmüştür. Yüksek fenolik miktarına veya yüksek radikal yakalama aktivitesine sahip olmanın, tüm antioksidan aktivitesi çalışmalarında yüksek sonuç vermediği açıkça görülmüştür. Böylelikle 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 tip sonuçların *in vivo* çalışmalar ve klinik çalışmalar ile desteklenmesi biyoyararlılığın belirlenmesi açısından da önem taşımaktadır. Özetle antioksidan yapılar antioksidan aktivitelerini geçiş metal iyonlarını bağlama, peroksitleri parçalama, hidrojen abstraksiyonunu engelleme, radikal giderme gibi farklı mekanizmalar ile ortaya koyabilirler.

Bu kapsamdaki antioksidan aktivite çalışmalarında; çirişin en az yeşil soğan ve pırasa kadar hatta bazı metotlarda analiz sonuçlarının bu iki bitkiden daha yüksek olduğu görüldü. Antioksidan kapasiteyi ölçen testler olan toplam fenolik madde ve toplam flavonoid madde içeriklerine göre tüm ekstrelerde 65 °C'deki değerler 35 °C'den daha yüksek olup fenolik yapılarına göre çiriş, pırasa, yeşil soğan olarak sıralanırken flavonoid yapılarına göre yeşil soğan, çiriş ve pırasa şeklinde sıralandı. Bu veri ve sonuçlara göre antioksidan aktivitesi sebebiyle çiriş bitkisinin besin olarak kullanılması ve diğer iki bitki kadar kolay ve sık bulunabilmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] KÖKSAL, E., Karnabahar (*Brassica oleracea L.*) Peroksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, antioksidan ve antiradikal aktivitesinin belirlenmesi, Doktora tezi, Atatürk üniversitesi, Fen bilimler enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 2007
- [2] 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*, 25: S559, 1997
- [3] 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*, 273:22165-8, 1998
- [4] GHOSH, J., MYERS, CE., Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells, *Proc Natl Acad Sci*, 95: 13182-7, 1998
- [5] YIN, GY., YIN, YF., HE, XF., Effect of zhuchun pill on immunity and endocrine function of elderly with kidney-yang deficiency, *Chung Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*, 15: 601-3, 1995
- [6] BAE, YS., KANG, SW., SEO, MS., et al. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. *J Biol Chem*, 272: 217-21, 1997.
- [7] LEE, YJ., GALOFORO, SS., BERNS, CM., et al. Glucose deprivation-induced cytotoxicity and alterations in mitogen-activated protein kinase activation are mediated by oxidative stress in multidrug-resistant human breast carcinoma cells, *J Biol Chem*, 273: 5294-9, 1998
- [8] CHOPRA, S., WALLACE, HM., Induction of spermidine/spermine N1-acetyltransferase in human cancer cells in response to increased production of reactive oxygen species, *Biochem Pharmacol*, 55: 1119-23, 1998
- [9] WOJTASZEK, P., Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection, *Biochem J*, 322: 681-92, 1997
- [10] 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

- [11] PRAKASH. D. *, SINGH, B.N., UPADHYAY G., Antioxidant and free radical scavenging activities of phenols from onion (*Allium cepa*), Food chemistry 102: 1389–1393, 2007
- [12] DIAZ LIFANTE, Z., Reproductive biology of *Asphodelus aestivus* (Asphodelaceae). Plant Systematics and Evolution, 200:177–191, 1996
- [13] MORTIMER, C.E., Modern Üniversite Kimyası, Cilt 1, 30-42, 2004
- [14] GÖÇ., B., Türkiye’deki yenilebilir soğansız bitkilerin toplam antioksidan içeriklerinin araştırılması, Yüksek lisans tezi, İstanbul Teknik üniversitesi, Fen bilimleri enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 2009
- [15] 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
- [16] MCCORD, J.M. ve DAY, E.D., Superoxide- Depent Production of Hydroxyl Radical Catalyzed by Iron EDTA complex, FEBS Letters, 86,1, 139-142, 1978
- [17] 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
- [18] GILBERT, D.L. and COLTON, C.A., Reactive Oxygen Species in Biological Systems, p.12, 16, Kluwer Academic Publishers, USA, 1999
- [19] SCANDALIOS, J.G., Oxidative Stress and The Molecular Biology of Antioxidant Defenses, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, p.1, 1997
- [20] HALLIWELL, B., AESCHBACH, R., LÖLİGER, J., ARUOMA, O.I., The characterization of antioxidants, Food and Chemical Toxicology, 33, 601-617, 1995
- [21] HALLIWELL B., Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? Free Radic Res., 25: 439-54, 1996
- [22] ARUOMA, 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, **60**, 149-156, 1997
- [23] WAYNER, D.D.M., BURTON, G.W., INGOLD, K.U., LOCKE, S., 1985, Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capacity of human blood plasma by controlled peroxidation, FEBS Letters, 187 (1) 33,37, BAKİ, S., Spektroflorimetrik Analiz Yöntemlerinin Toplam Antioksidan Kapasite Tayinlerine Uygulanması,

Yüksek lisans tezi, İstanbul üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 2009

- [24] KESKİN, H., ERKMEN, G., Besin kimyası, Güryay matbaacılık, Beşinci basım, İstanbul, 1987
- [25] 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*, 187 (1), 33–37, 1985
- [26] BACHMAYER, O., Antioxidant Properties of Aqueous Extracts from Selected Culinary Herbs, Yüksek Lisans Tezi, University of Helsinki, Division of Pharmacognosy, Helsinki, Finland, 2004
- [27] Shahidi F., Natural Antioxidant: Chemistry, Health Effects and Applications, AOCS Press, Champaign, 1997
- [28] VERMERRIS W., NICHOLSON R., Phenolic compound Biochemistry, Springer, 2-14, 2006.
- [29] Huang, D., Ou, B. ve Prior, R. L., 2005. The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 1841-1856
- [30] HEIM, K.E., TAGLIAFERRO, R., BOBILYA, D.J., Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584, 2002
- [31] RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., PAGANGA, G., Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends in Plant Science*, 2, 152-159, 1997
- [32] ROSS JA, KASUM CM., Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety, *Annu Rev Nutr*, 22: 19-34, 2002
- [33] HERTOGE MG, FESKENS EJ, HOLLMAN PC, KATAN MB, KROMHOUT D., Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study, *Lancet*; 342: 1007-1011, 1993
- [34] KNEKT P, JARVINEN R, REUNANEN A, MAATELA J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *Br Med J*; 312: 478-481, 1996., 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*; 48: 69-84, 2005
- [35] RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., PAGANGA, G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 933-956 1996

- [36] CONNER ve BEUCHAT 1984, AKGÜL 1997, ARORA ve KAUR 1999, Griffiths ve ark. 2002
- [37] RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., BOLWELL, P.G., BRAMLEY, P.M., PRIDHAM, J.B., The relative activities of plant-derived poliphenolic flavonoids, *Free Radical Research*, 22, 375-383, 1995
- [38] KALAYCIOĞLU, A., ÖNER, C., Bazı bitki ekstraksiyonlarının antimujenik etkilerinin Amest_Salmonello test sistemi ile araştırılması, *Tr. Botany*, 18, 117-122, 1994
- [39] BRONWEN G. Smith, CHARMIAN J. O'Connor, LAURENCE D. M., Effect of raw and cooked onion dietary fibre on antioxidant activity of ascorbic acid and quarcetin, *Food chemistry* 111, 580-585, 2008
- [40] BLOCK, E., S. NAGANATHAN, D. PUTMAN ve S. H. ZHAO .1992. Allium Chemistry: HPLC Anaysis of Thiosulfinates from Onion, Garlic, Wild garlic (Ramsoms), Leek, Scallion, Shallot, Elephant Garlic, Chieve and Chinese Chieve. Uniquely High Allyl Methyl Raios in Some Garlic Samples. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 40, 2418-2430
- [41] Anomim 2000, Garlic Market. *Agricultural Outlook*, Economic Research Service/USDA; page 7-10, 2000
- [42] Sharma ve ark. 1979, Elnima ve ark. 1983, BLACK 1985, Sahu ve ark. 2006
- [43] MAU, J. L., C. P. CHEN ve P.C. HSIEH, Antimicrobial Effect of Extracts from Chinese Chieve, Cinnamon and Corni Fructus. *Journal Agricultural Food Chemistry* 49, 183-188, 2001
- [44] www.wikipedia.com/leek
- [45] www.westcrete.com
- [46] ZEYBEK. N, ZEYBEK. U, Farmosetik botanik Angiaspermae sistemetiği ve önemli maddeleri, Ege üniversitesi., Eczacılık fakültesi., yayın no:2 Ege üniversitesi basımevi, İzmir, 1994
- [47] UÇAN, S. Büyük şifalı bitkiler ve emraz, Seda yayınları, İstanbul, 1997, Ecz. Zeki Erdil, Bingöl Medya 2009
- [48] 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, 13: 8-19, 2002
- [49] LOPEZ-ALARCON, C. and LISSI, E., Interaction of pyrogallol red with

- peroxyl radicals, A basis for a simple methodology for the evaluation of antioxidant capabilities, *free radical research*, 39(7): 729-736, 2005
- [50] 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*, 83(2): 255-262, 2003
- [51] MILIAUSKAS, G., VENSKUTONIS, P. R. and VAN BEEK, T. A., Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts, *Food chemistry*, 85 (2): 231-237, 2004
- [52] 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*, 80(3): 399-407, 2003
- [53] 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*, 299: 152-178, 1999
- [54] 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*, 24(1): 44-50, 2005
- [55] RAO, G. R., KONJILAL, G. and MOHAN, K. R., extended application of Folin-Ciocalteu reagent in the determination of drugs, *The Analyst*, 103: 993-994, 1978
- [56] ROURA, E., ANDERS-LACUEA, C., ESTRUCH, R. and LAMUEALA-RASENTO, R. M., Total polyphenol intake estimated by a modified Folin-Ciocalteu assay of Urine, *Clinical chemistry*, 52: 749-752, 2006
- [57] MOGALHAES, L. M., SEGUNDO, M. A., REIS, S., LIMA, L. L. F. C. and RANGEL, O. S. S., Automatic method for the determination of Folin-Ciocalteu reducing capacity in food products, *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 54 (15): 5241-5246, 2006
- [58] ARDAĞ, A., Antioksidan kapasite tayin yöntemlerinin analitik açıdan karşılaştırılması, Yüksek lisans tezi, Adnan Menderes üniversitesi, Fen bilimler enstitüsü, Analitik anabilim dalı, 2008
- [59] 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*, 80, 1925-1941, 2000

- [60] BLOIS M. S., Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 181: 1199–1200, 1958
- [61] HUANG, D. B. and PRIOR, R. L., The chemistry behind antioxidant capacity assays, *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 53: 1841-1856, 2005
- [62] MOLYNEUX, P., The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Journal of science and technology*, 26(2): 211-219, 2004
- [63] 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*, 52: 7970-7981, 2004
- [64] LIU F, OOI VEC, CHANG ST., Free radical scavenging activity of mushroom polysaccharide extracts., *Life Sci*; 60: 763–771, 1997
- [65] KNEKT, P., HOPIA, A., JARVINEN, R., REUNANEN, A., MAATELA, J., Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *British Medical Journal* 312, 478–481, 1996
- [66] Mi-Yae SHONA, Sang-Do Choib, Goon-Gjung Kahngb, Sang-Hae Namb, Nak-Ju Sunga, Antimutagenic, antioxidant and free radical scavenging activity of ethyl acetate extracts from white, yellow and red onions
- [67] PRAKASH D. *, SINGH B. N., UPADHYAY G., Antioxidant and free radical scavenging activities of phenols from onion (*Allium cepa*), *Food Chemistry* 102; 1389–1393, 2007
- [68] ZHENG W., WANG SY.; “Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5165-5170, 2001
- [69] 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*, 53, 1190-1195, 2005
- [70] AL-İSMAİL K.M., ABURJAI T.: “Antioxidant activity of water and alcohol extracts of chamomile flowers, anise seeds and dill seeds”. *Journal of The Science of Food and Agriculture.*, 84, 173-178, 2004
- [71] MILIAUSKAS G., VENSKUTONIS PR., VAN BEEK TA., “Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts.” *Food Chemisrty*, 85, 231-237, 2004

- [72] SHON MY., KIM TH., SUNG NJ.: “Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of *Hymenochaetaceae*) extracts.” *Food Chemistry*, 82, 593-597, 2003
- [73] GAMEZ-MEZA, N., NORIEGA-RODRIGUEZ, J.A., MEDINA-JUAREZ, L.A., ORTEGA-GARCÍA, J., CAZAREZ-CASANOVA, R., ANGULO-GUERRERO, O.: *J.A.O.C.S.*, 76, 1445, 1999
- [74] 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
- [75] GÜÇLÜ, K., ALTUN, M., ÖZYÜREK, M., KARADEMİR, S. E. and APAK, R., Antioxidant capacity of fresh, sun-and sulphited-dried Malatya apricot (*Prunus armeniaca*) assayed by CUPRAC, ABTS/ TEAC and folin methods; *International Journal of Food Science and Technology*, 41: 76-85, 2006
- [76] 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*, 10(6), 1003-1008, 1989
- [77] RODRIGUEZ-DELGADO, M.A., MALOVANA, S., PEREZ, J.P., BORGES, T. ,GARCIA MONTELONGA, F.J.: *J.Chromatog. A.*, 912, 249,2001
- [78] FRANKEL, E. N. and MEYER, A. S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants, *Journal of the Science of Food and Agricultural*, 80: 1925-1941, 2000
- [79] 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* 37, 2016–2021, 1989
- [80] VINSON, J.A., YONG, H., XUCHUI, S., ZUBÍK, L.; Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 3631–3634, 1998
- [81] AKKUŞ, İ., Serbest radikaller ve fizyolojik etkileri, S.Ü., Tıp Fak., Biyokimya, A.B.D., Konya, 1995

- [82] YUAN, Y.V., BONE, D.E., CARRINGTON, M.F., Antioxidant activity of dulse (*Palmaria palmata*) extract evaluated in vitro. *Food Chem.* 91, 483–495.12, 2005
- [83] PIETTA, P.G., Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63,1036–1042, 2000
- [84] ÖZTÜRK, N., TUNCEL M. ve TUNCEL N.B., Determination of Phenolic Acids by a Modified HPLC: Its Application to Various Plant Materials, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 30, 587-596, 2007.

ÖZGEŞMİŞ

Elif EREN, 25.10.1986'da Elbistan'da doğdu. İlkokulu Elbistan'da, Orta ve Lise eğitimini Sakarya'da tamamladı. 2005 yılında başladığı 19 Mayıs Üniversitesi Kimya Bölümünü 2009 yılında bitirdi. 2009 yılında Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı.