

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ASMA VE YONCA YAPRAKLARININ *IN VITRO* ANTİOKSİDAN
ÖZELLİKLERİ**

Sezer GÜLEN

Yüksek Lisans Tezi

KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Yeşim YEŞİLOĞLU

Edirne, 2013

**ASMA VE YONCA YAPRAKLARININ *IN VITRO* ANTİOKSİDAN
ÖZELLİKLERİ**

Sezer GÜLEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

2013

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Mustafa ÖZCAN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

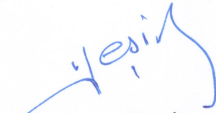
Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığımı onaylıyorum.



Prof. Dr. Ayten SAĞIROĞLU

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımca (tarafımızca) okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Yeşim YEŞİLOĞLU

Tez Danışmanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Kimya Anabilim Dalında bir Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ayten SAĞIROĞLU

Prof. Dr. Yeşim YEŞİLOĞLU

Yrd.Doç.Dr. Sedat ŞENGÜL

İmza



11/09/2013

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.



11/09/2013

Sezer GÜLEN

Yüksek Lisans Tezi

Asma ve Yonca Yapraklarının *In Vitro* Antioksidan Özellikleri

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Bu yüksek lisans tezinde; çeşitli *in vitro* sistemlerle yonca (*Medicago sativa* L.) ve asma (*Vitis vinifera* L.) yapraklarının su, aseton ve metanol ekstraktlarının antioksidan özellikleri incelenmiştir. Bunun için toplam fenolik bileşik miktarı, toplam flavonoid içeriği, indirgeme kapasitesi, prolin tayini, süperoksit radikali giderme aktivitesi, DPPH• serbest radikali giderme aktivitesi, klorofil içeriği, H₂O₂ giderme aktivitesi, FTC ve fosfomolibden metodu ile toplam antioksidan aktivitesi, karotenoid miktarı, Fe⁺² iyonlarını şelatlama aktivitesi, ABTS•⁺ radikali giderme aktivitesi tayin edildi. Elde edilen sonuçlar α -tokoferol, askorbik asit, kateşin, pirogallol, trolox, gallik asit, BHT ve BHA gibi standart maddelerle kıyaslanarak değerlendirilmiştir.

Su, aseton ve metanol çözücüleriyle gerçekleştirilen ekstraksiyonlar sonucunda, çalışılan her iki kurutulmuş bitkiden ekstrakte edilebilen madde miktarları 20-227.2 mg/g bulundu. En yüksek ekstraksiyon verimi su ve metanol ekstraktlarında gözlemlendi.

Toplam fenolik madde tayini sonucunda, ekstraktların toplam fenolik madde miktarlarının gallik asit eşdeğeri olarak 16.67±1.53–70.67±1.15 mg/g aralığında; pirogallol eşdeğeri olarak 13.67±1.53–67.67±1.15 mg/g aralığında değiştiği belirlendi. En yüksek miktarlar asma yaprağı ekstraktlarında tayin edildi.

Toplam flavonoid madde miktarı ise kateşin eşdeğeri olarak 26.02±0.22–72.90±0.40 mg/g aralığında; gallik asit eşdeğeri olarak 342.33±2.89–951.67±5.13 mg/g aralığında bulunmuştur. En yüksek miktarlar asma yaprağı ekstraktlarında tayin edildi.

H₂O₂ giderme aktivitesi denemesinde, en yüksek H₂O₂ giderme oranı yonca su ekstraktında belirlendi.

İndirgeme kapasitesi tayininde; her bir bitki ekstraktının aktivitesi standartlarla kıyaslandığında standartlardan daha düşük aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi. İndirgeme kapasitesi yetenekleri asma>yonca şeklinde sıralama gösterdi.

Metal şelatlama aktivitesi tayininde; Fe²⁺ çözeltisi kullanıldı ve sonuçlar EDTA çözeltisi ile kıyaslandı. Yonca metanol ekstraktı asma metanol ekstraktından daha yüksek metal şelatlama aktivitesi gösterdi. Ayrıca metanol ekstraktlarının diğer tüm ekstraktlara göre daha yüksek metal şelatlama aktivitesine sahip oldukları tespit edildi.

Serbest radikal giderme aktivitesinden elde edilen verilere göre; yonca su ve asma metanol ekstraktlarının standartlarla karşılaştırılabilir düzeyde DPPH•⁺ giderme aktivitesi gösterdikleri belirlendi.

Süperoksit radikali giderme aktivitesinde; PMS/NADH/O₂ sisteminde O₂•⁻ radikali oluşturuldu ve ekstraktların bu radikali giderebilme kapasiteleri incelendi. Yonca aseton ve asma aseton ekstraktlarının diğer ekstraktlara göre daha yüksek süperoksit anyon radikali giderme aktivitesi gösterdi.

ABTS•⁺ radikali giderme aktivitesi tayininden elde edilen sonuçlara göre; asma ekstraktları, yonca ekstraktlarından daha yüksek oranda radikal giderme aktivitesi gösterdi.

Fosfomolibden metoduyla toplam antioksidan aktivitesi denemesinde; ekstraktların 25-125 µg/mL konsantrasyonlarında aktiviteleri tayin edildi. Yonca ve asma ekstraktlarının hemen hemen bütün konsantrasyonlarından elde edilen antioksidan aktivite sonuçlarının birbirlerine çok yakın değerlerde oldukları görüldü.

Prolin içeriği tayininde; yonca su ekstraktının, asma su ekstraktından daha fazla miktarda prolin içerdiği tespit edildi. Karotenoid tayininde; yonca ve asma yapraklarının toplam karotenoid içeriğini belirleyebilmek için kuru örneklerin 405.2 mg'ı ile çalışıldı. Yonca bitkisinin asmaya göre daha fazla karotenoid miktarına sahip olduğu bulundu.

Klorofil içeriğinin belirlenmesi analizinde; her iki bitkinin klorofil miktarları arasında büyük bir fark olmadığı gözlemlendi. Bitki ekstraktlarının toplam antioksidan aktivitesi; linoleik asit emülsiyonunda değerlendirildi. Elde edilen sonuçlara göre; yonca ve asma ekstraktlarının toplam antioksidan aktivitelerinin su>aseton>metanol ekstraktı sırasında azaldığı tespit edildi.

Yıl : 2013

Sayfa Sayısı :127

Anahtar Kelimeler :Antioksidan, radikal, yonca, aktivite, asma, karotenoid, giderme

Master Thesis

In Vitro Antioxidant Properties of Vine and Clover leaves

Trakya University Institute of Natural Sciences

Chemistry The name of Department

ABSTRACT

In this master thesis; the antioxidant properties of water, acetone and methanol extracts of clover (*Medicago sativa* L.) and vine (*Vitis vinifera* L.) leaves was investigated by using various established *in vitro* systems. For this, total phenolic compound, total flavonoid content, reducing power, proline content, superoxide anion scavenging activity, DPPH• free radical scavenging activity, chlorophyll content, H₂O₂ radical scavenging activity, total antioxidant activity by using FTC and phosphomolybdenum method, carotenoid content, Fe⁺² ions chelating activity, ABTS•⁺ radical scavenging activity. The obtained results were compared by using α -tocopherol, ascorbic acid, catechin, pyrogallol, trolox, gallic acid, BHT and BHA as standard.

The result of the extractions with water, acetone and methanol solvent; the extractable compound of all studied dried plants were found in the range of 20-227.2 mg/g. The best extraction yield was observed in water and methanol extracts.

In the total phenolic compound assay, total phenolic compound amounts of extracts were determined to be 16.67 \pm 1.53–70.67 \pm 1.15 mg/g as gallic acid equivalent; 13.67 \pm 1.53–67.67 \pm 1.15 mg/g as pyrogallol equivalent. The highest amounts were found in vine leaf extracts.

Total flavonoid content found between 26.02 \pm 0.22–72.90 \pm 0.40 mg/g as catechin equivalent and 342.33 \pm 2.89–951.67 \pm 5.13 mg/g as gallic acid equivalent. The highest amounts were found in vine leaf extracts.

In the H₂O₂ scavenging activity assay, the high H₂O₂ scavenging effects were observed the water extract of clover.

When the reductive capabilities of each one plant samples were compared to reference compounds, it was observed they haven't high activities. The reducing capacity of all extracts followed the order: vine leaf>clover.

Metal chelating effect of samples were carried out by using Fe^{2+} solution, and the results were compared with EDTA. Methanol extract of clover showed the higher chelating activity Fe^{2+} ions than the methanol extract of vine leaf. In addition, methanol extracts were found to be having higher metal chelating activity than all extracts.

According to obtained results from the assay of free radical scavenging activity; the water extract of clover and methanol extract of vine leaf showed $\text{DPPH}\cdot^+$ scavenging activity, which is comparable with standard compounds.

For measurement of superoxide anion scavenging activity; $\text{O}_2\cdot^-$ radical was generated by PMS/NADH/ O_2 system, and the abilities of all extracts to scavenge $\text{O}_2\cdot^-$ activity were determined. The acetone extracts of clover and vine leaf showed the higher superoxide anion scavenging activity than the other extracts.

According to the results of the determination of $\text{ABTS}\cdot^+$ radical scavenging activity; vine leaf extracts showed the higher radical scavenging activity than the clover extracts.

Total antioxidant capacity by phosphomolybdenum method assay; the activities of extracts determined at concentrations of 25-125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The results of the antioxidant activity of clover and vine extracts obtained from almost all concentrations were very close to each other in value.

The determination of proline content; it is found that water extract of clover contains more a greater amount of proline than water extract of vine leaf. The determination of carotenoid; To determine the total carotenoid content of clover and vine plants, with 405.2 mg of dried samples were studied. It is found that clover plant has more the amount of carotenoid than vine leaf.

The analysis of determination of chlorophyll content; it is observed that there wasn't a big difference between the amounts of chlorophyll in both the plant. Total antioxidant activities of plant extracts; were assayed by using linoleic acid emulsion. According to obtained results; total antioxidant activity of extracts of clover and vine leaf were in descending order of water extract>acetone extract>methanol extract.

Year : 2013

Number of Pages : 127

Keywords : Antioxidant, radical, clover, activity, vine, carotenoid, scavenging

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam süresince, gerek bilimsel konularda gerekse manevi anlamda benden yardımlarını esirgemeyen çok değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Yeşim YEŞİLOĞLU'na bana her zaman gösterdiği ilgi, sabır, iyi niyeti ve güler yüzü için en içten dileklerle teşekkür ederim.

Her türlü konuda desteğini ve anlayışını esirgemeyen sayın hocam Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ayten SAĞIROĞLU'na minnet ve şükranlarımı sunarım.

Yüksek lisansımın her aşamasında bana yardımcı olan desteğini gördüğüm sayın hocam Doç. Dr. Yüksel BAYRAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuar çalışmalarında yardımcı olan sayın hocam Araş. Gör. Dr. Çiğdem BATIGÖÇ'e ve Yrd. Doç. Dr. Murat TÜRKYILMAZ'a da teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Deney aşamalarımda yardımlarını ve desteklerini benden bir an olsun esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Yüksek lisans öğrencisi Aytül PEHLİVAN ve Emine Tuğçe DUMAN'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Hayatım ve tüm eğitim yaşantım boyunca, başarımla beraber, her türlü zor zamanıma da ortak olan, sürekli benimle olduklarının vermiş olduğu düşünce ile beni mutlu ve huzurlu hissettiren, arkadaştan öte kardeş bildiğim dostlarım Zeliha ÖZGÜR ve Ayşe AKSAKAL'a tüm destekleri ve her zaman yanımda oldukları için sonsuz teşekkür ederim. Hayatımın her aşamasında moral ve motivasyonumu arttıran, benden her türlü desteğini esirgemeyen sevgili ablam Neslihan UZUN 'a sonsuz minnettarlarımı sunarım.

İnsan sevgisi, saygı, vicdan ve merhamet gibi kavramları kendilerinden öğrendiğim, beni koşulsuz sevgi ve özveri ile yetiştiren aileme tüm destekleri ve varlıkları için teşekkür ederim.

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından desteklenen "Çeşitli Bitkilerin Farklı Ekstraktlarının Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi" başlıklı TÜBAP 37- no'lu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Sezer GÜLEN, 2013

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xiii
KISALTMALAR	xiv

1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. Serbest Radikaller	4
2.1.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROT).....	5
2.1.1.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet-}$).....	8
2.1.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2).....	9
2.1.1.3. Hidroksil Radikali ($\bullet OH$).....	10
2.1.1.4. Singlet Oksijen (1O_2).....	11
2.1.1.5. Nitrik Oksit ($NO\bullet$).....	12
2.1.1.6. Hipoklorik Asit (HOCl).....	12
2.1.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynakları.....	13
2.1.2.1. Serbest Radikallerin Hücre İçi Kaynakları.....	13
2.1.2.2. Serbest Radikallerin Hücre Dışı Kaynakları.....	16
2.1.3. Serbest Radikallerin Etkileri.....	16
2.1.3.1. Serbest Radikallerin Pozitif Etkileri.....	16
2.1.3.2. Serbest Radikallerin Negatif Etkileri.....	17
2.1.3.2.1. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri.....	17
2.1.3.2.2. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara	

Etkileri.....	18
2.1.3.2.3. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri.....	18
2.1.3.2.4. Serbest Radikallerin Nükleik Asitlere ve DNA'ya Etkileri.....	20
2.2. Antioksidanlar.....	20
2.2.1. Antioksidanların Sınıflandırılması.....	22
2.2.1.1. Enzimler.....	22
2.2.1.2. Yağda ve Suda Çözünen Radikal Tutucular.....	24
2.2.1.3. Metal İyonlarını Bağlayan Proteinler.....	28
2.2.1.4. Eksojen Antioksidanlar.....	28
2.3. Besin Maddeleri ve Antioksidanlar.....	29
2.3.1. Besin Maderlerinde Doğal Olarak Bulunan Antioksidanlar.....	30
2.3.2. Besinlere İlave Edilen Sentetik Antioksidanlar.....	31
2.4. Antioksidan Aktivitesi Tayin Metodları.....	32
2.4.1. HAT-Temelli Metodlar.....	32
2.4.2. ET-Temelli Metodlar.....	33
2.4.3. Lipid Oksidasyon Markerlerini Ölçen Metodlar.....	35
2.4.4. Diğer ROT Giderici Kapasiteleri Ölçen Metodlar.....	35
2.5. Çalışmada Kullanılan Bitkiler ve Özellikleri.....	36
2.5.1. Yonca (<i>Medicago sativa</i> L.).....	36
2.5.2. Asma (<i>Vitis vinifera</i> L.).....	38
3. MATERYAL VE METODLAR.....	40
3.1. Materyal.....	40
3.1.1. Bitki Örnekleri.....	40
3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Ekipmanlar.....	40
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Çözeltiler.....	40

3.2. Metodlar	43
3.2.1. Ekstraktların Hazırlanışı.....	43
3.2.2. Toplam Fenolik Bileşik (TPC) Tayini.....	43
3.2.3. Toplam Flavonoid İçeriğinin Tayini.....	44
3.2.4. H ₂ O ₂ Giderme Aktivitesinin Tayini.....	44
3.2.5. Toplam Ferrik İyonlarını (Fe ⁺³) İndirgeme Kapasitesinin Tayini.....	45
3.2.6. Demir (II) İyonlarını Şelatlama Aktivitesinin Tayini.....	45
3.2.7. DPPH• Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini.....	46
3.2.8. Süperoksit Anyon Radikalini Giderme Aktivitesinin Tayini.....	46
3.2.9. ABTS• ⁺ Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini.....	47
3.2.10. Fosfomolibden Metodu ile Total Antioksidan Aktivite Tayini.....	47
3.2.11. Prolin Tayini.....	48
3.2.12. Karotenoid Tayini.....	48
3.2.13. Klorofil Tayini.....	48
3.2.14. Linoleik Asit Sisteminde Ferrik Tiyosiyanat (FTC) Metodu ile Toplam Antioksidan Aktivite Tayini.....	49
3.2.15. İstatistik analizler.....	50

4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....51

4.1. Toplam Fenolik Bileşik (TPC) Tayini.....	52
4.2. Toplam Flavonoid İçeriğinin Tayini.....	56
4.3. H ₂ O ₂ Giderme Aktivitesinin Tayini.....	60
4.4. Toplam Ferrik İyonlarını (Fe ⁺³) İndirgeme Kapasitesinin Tayini.....	62
4.5. Demir (II) İyonlarını Şelatlama Aktivitesinin Tayini.....	63
4.6. DPPH• Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini.....	66
4.7. Süperoksit Anyon Radikalini Giderme Aktivitesinin Tayini.....	69
4.8. ABTS• ⁺ Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini.....	71
4.9. Fosfomolibden Metodu ile Toplam Antioksidan Aktivite Tayini.....	74

4.10. Prolin Tayini.....	77
4.11. Karotenoid Tayini.....	78
4.12. Klorofil Tayini.....	79
4.13. Linoleik Asit Sisteminde Ferrik Tiyosiyanat (FTC) Metodu ile Toplam Antioksidan Aktivite Tayini.....	80
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	83
5.1. Toplam Fenolik Bileşik (TPC) Tayini.....	84
5.2. Toplam Flavonoid İçeriğinin Tayini.....	85
5.3. H ₂ O ₂ Giderme Aktivitesinin Tayini.....	87
5.4. Toplam Ferrik İyonlarını (Fe ⁺³) İndirgeme Kapasitesinin Tayini.....	88
5.5. Demir (II) İyonlarını Şelatlama Aktivitesinin Tayini.....	89
5.6. DPPH• Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini.....	90
5.7. Süperoksit Anyon Radikalini Giderme Aktivitesinin Tayini.....	91
5.8. ABTS• ⁺ Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini.....	92
5.9. Fosfomolibden Metodu ile Toplam Antioksidan Aktivite Tayini.....	93
5.10. Prolin Tayini.....	94
5.11. Karotenoid Tayini.....	94
5.12. Klorofil Tayini.....	95
5.13. Linoleik Asit Sisteminde Ferrik Tiyosiyanat (FTC) Metodu ile Toplam Antioksidan Aktivite Tayini.....	96
6. KAYNAKLAR.....	99
7. ÖZGEÇMİŞ.....	108

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Oksidatif stresin oluşumu.....	2
Şekil 2.1. Moleküler oksijen.....	6
Şekil 2.2. Delta O ₂	7
Şekil 2.3. Sigma O ₂	7
Şekil 2.4. Moleküler oksijenden ROT üretimi.....	7
Şekil 2.5. Nötrofilde fagositoz, solunumsal patlama sırasında serbest radikal oluşumu	15
Şekil 2.6. Hücrede serbest radikallere bağlı hasarlar.....	17
Şekil 2.7. Lipid peroksidasyonu.....	19
Şekil 2.8. Lipid radikallerinin oluşumu.....	19
Şekil 2.9. Malondialdehit (MDA) yapısı.....	20
Şekil 2.10. Vücutta bulunan bazı antioksidanlar.....	21
Şekil 2.11. Glutatyonun indirgenmesi.....	23
Şekil 2.12. α-tokoferol yapısı.....	24
Şekil 2.13. Askorbik asit yapısı.....	24
Şekil 2.14. β-karoten yapısı.....	25
Şekil 2.15. Likopen yapısı.....	25
Şekil 2.16. Temel flavonoid yapısı.....	26
Şekil 2.17. Glutatyon yapısı.....	26
Şekil 2.18. Ürik asit yapısı.....	26
Şekil 2.19. Bilirubin yapısı.....	27
Şekil 2.20. Melatonin yapısı.....	27
Şekil 2.21. N- asetil sistein yapısı.....	28
Şekil 2.22. Gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılan bazı sentetik antioksidanların yapısı.....	31
Şekil 2.23. Yonca (<i>Medicago sativa</i> L.) bitkisi.....	37
Şekil 2.24. Asma (<i>Vitis vinifera</i> L.) bitkisi.....	38
Şekil 4.1. Gallik asit standart grafiği.....	53
Şekil 4.2. Pirogallol standart grafiği.....	53
Şekil 4.3. Yonca bitkisinin gallik asit eşdeğeri olan fenolik madde içerikleri.....	54
Şekil 4.4. Asma bitkisinin gallik asit eşdeğeri olan fenolik madde içerikleri.....	55

Şekil 4.5. Yonca bitkisinin pirogallol eşdeğeri olan fenolik madde içerikleri.....	55
Şekil 4.6. Asma bitkisinin pirogallol eşdeğeri olan fenolik madde içerikleri.....	56
Şekil 4.7. Kateşin standart grafiği.....	57
Şekil. 4.8. Gallik asit standart grafiği.....	57
Şekil 4.9. Yonca bitkisinin kateşin eşdeğeri olan flavonoid madde içerikleri.....	58
Şekil 4.10. Asma bitkisinin kateşin eşdeğeri olan flavonoid madde içerikleri.....	59
Şekil 4.11. Yonca bitkisinin gallik asit eşdeğeri olan flavonoid madde içerikleri.....	59
Şekil 4.12. Asma bitkisinin gallik asit eşdeğeri olan flavonoid madde içerikleri.....	60
Şekil 4.13. Yonca ekstraktlarının H ₂ O ₂ giderme aktivitelerinin standart antioksidanlarla karşılaştırılması.....	61
Şekil 4.14. Asma ekstraktının H ₂ O ₂ giderme aktivitesinin standart antioksidanlarla karşılaştırılması.....	61
Şekil 4.15. Yonca ekstraktlarının Fe ⁺³ ,ü Fe ⁺² ,ye indirgeme kapasiteleri.....	62
Şekil 4.16. Asma ekstraktlarının Fe ⁺³ ,ü Fe ⁺² ,ye indirgeme kapasiteleri.....	63
Şekil 4.17. Yonca ekstraktlarının metal şelatlama kapasiteleri.	64
Şekil 4.18. Asma ekstraktlarının metal şelatlama kapasiteleri.....	65
Şekil 4.19. Yonca ekstraktlarının DPPH• radikali giderme aktiviteleri.....	66
Şekil 4.20. Asma ekstraktlarının DPPH• radikali giderme aktiviteleri.....	67
Şekil 4.21. Yonca ekstraktlarının süperoksit radikalini giderme aktiviteleri.....	69
Şekil 4.22. Asma ekstraktlarının süperoksit radikalini giderme aktiviteleri.....	70
Şekil 4.23. Yonca ekstraktlarının ABTS• ⁺ radikali giderme etkileri.....	72
Şekil 4.24. Asma ekstraktlarının ABTS• ⁺ radikali giderme etkileri.....	72
Şekil 4.25. Askorbik asit standart grafiği.	74
Şekil 4.26. Yonca bitkisinin su, aseton ve metanol ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri.....	75
Şekil 4.27. Asma bitkisinin su, aseton ve metanol ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri.....	76
Şekil 4.28. Prolin standart grafiği.....	77
Şekil 4.29. Yonca ve asma bitkilerinin su ekstraktlarının prolin içerikleri.....	78
Şekil 4.30. Yonca ve asma bitkilerinin toplam karotenoid içerikleri.....	79
Şekil 4.31. Yonca ve asma bitkilerinin klorofil içerikleri..	79
Şekil 4.32. Yonca ekstraktlarının ve standartların linoleik asit peroksidasyonunun	

zamanla değişimi.....	80
şekil 4.33. Asma ekstraktlarının ve standartların linoleik asit peroksidasyonunun zamanla değişimi.....	81
şekil 4.34. Yonca bitkisinin su, aseton ve metanol ekstrelerinin 75 µg/mL konsantrasyonunda lipid peroksidasyonunu inhibe yüzdelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, askorbik asit ve α-tokoferol ile karşılaştırılması.....	81
şekil 4.35. Asma bitkisinin su, aseton ve metanol ekstrelerinin 75 µg/mL konsantrasyonunda lipid peroksidasyonunu inhibe yüzdelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, askorbik asit ve α-tokoferol ile karşılaştırılması.....	82

Tablo 2.1. Biyolojik sistemde sık görülen serbest radikaller ve özellikleri.....	8
Tablo 2.2. Serbest radikallerin hücre dışı kaynakları.....	16
Tablo 2.3. Çalışmada kullanılan bitkiler ve özellikleri.....	36
Tablo 4.1. Yonca bitkisinden ekstrakte edilen bileşiklerin verimleri.....	51
Tablo 4.2. Asma bitkisinden ekstrakte edilen bileşiklerin verimleri.....	52
Tablo 4.3. Yonca ekstraktlarının Fe^{+2} iyonlarını şelatlama aktivitesi.....	64
Tablo 4.4. Asma ekstraktlarının Fe^{+2} iyonlarını şelatlama aktivitesi.....	65
Tablo 4.5. Çalışılan bitki ekstraktlarının ve standartların DPPH• radikali giderme aktivitesi sonuçlarından elde edilen EC_{50} değerleri.....	68
Tablo 4.6. Yonca ekstraktlarının süperoksit radikalini giderme aktiviteleri.....	70
Tablo 4.7. Asma ekstraktlarının süperoksit radikalini giderme aktiviteleri.....	71
Tablo 4.8. Çalışılan bitki ekstraktlarının ve standartın ABTS• ⁺ radikali giderme aktivitesi sonuçlarından elde edilen EC_{50} değerleri.....	73
Tablo 5.1. Bitki ekstraktları ve standartların çalışılan antioksidan aktivite sonuçlarından elde edilen EC_{50} ($\mu g/mL$) değerleri.....	98

KISALTMALAR

AA	Asma aseton ekstraktı
AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihidroklorit
A. asit	Askorbik asit
ABTS	2,2'-Azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat)
ADP	Adenozin di fosfat
AM	Asma metanol ekstraktı
AS	Asma su ekstraktı
BHA	Bütillendirilmiş hidroksianisol
BHT	Bütillendirilmiş hidroksitoluen
CAT	Katalaz
DPPH	1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil
EPO	Eozinofil peroksidaz
EPR	Elektron para-manyetik rezonans
ESR	Elektron spin rezonans
ETS	Elektron transport zinciri
FCR	Folin-Ciocalteu reaktifi
FRAP	Demir (III) iyonu indirgeme gücü
FTC	Ferrik tiyosiyanat
GAE	Gallik asit eşdeğeri
GSH	Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GSH-Red	Glutasyon redüktaz
GSSG	Okside glutasyon
GST	Glutasyon-S-transferaz
IgG	İmmünoglobülin G

KE	Kateşin eşdeğeri
LPI	Lipid peroksidasyonunu inhibe etme derecesi
MDA	Malondialdehit
MLT	Melatonin
MPO	Miyeloperoksidaz
NADH	Nikotinamidadenindinükleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinükleotid fosfat
NAS	N-asetin sistein
NBT	Nitrotetrazolium blue klorür
NOS	Nitrik oksit sentaz
ORAC	Oksijen radikalini absorblama kapasitesi
PG	Propil galat
PGE	Piropilgallol eşdęeri
PLGSH-Px	Fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz
PMNL	Polimorfonükleer lökositler
PMS	Fenazin metasülfat
ROT	Reaktif oksijen türleri
RNT	Reaktif azot türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
SR	Serbest radikal
TBHQ	t-Bütil hidroksikinon
TEAC	Trolox ekivalenti antioksidan kapasite
TPC	Toplam fenolik madde
TRAP	Toplam radikal tutma parametresi
Trolox	6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilikasit
YA	Yonca aseton ekstraktı
YM	Yonca metanol ekstraktı
YS	Yonca su ekstraktı

1. GİRİŞ

Serbest radikaller (SR) ve neden oldukları radikalik reaksiyonlar insan metabolizmasında yani biyolojik sistemlerde önemli yer tutmaktadır. SR etkilerinden tamamen uzak kalabilmek imkansızdır. Çünkü oksijene bağlı yaşamın bir parçası olduğumuzdan çeşitli etkilere bağlı olarak metabolik faaliyetler sonucu sürekli reaktif oksijen türleri oluşabilmektedir. Bunlar oksijene dayalı yaşamımızın kaçınılmaz bir parçası olmuştur. Hücrelerde metabolik faaliyetler sonucunda zararlı atık maddeler olarak meydana gelmektedirler. Reaktif oksijen türlerinin çoğunu SR'ler oluşturmaktadır. Bu reaktif oksijen türlerinin kimyasal aktivitesi normal oksijen molekülüne göre oldukça yüksektir. Çok kısa ömürlü olsalar bile, birçok hücre bileşeniyle reaksiyona girebilme özelliğine sahip olup onları da radikal yapabildiklerinden ve devamında bir dizi radikalik zincir reaksiyonunu başlattıklarından dolayı çok zararlıdır [24].

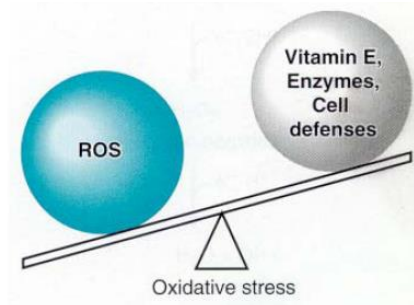
SR'lerin en dış yörüngelerinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron bulunmaktadır. Radikal olmayan bir atom ya da moleküle elektron ilavesi ya da elektron kaybı sonucu serbest radikaller meydana gelmektedir. Metabolizmamızda radikal oluşumuna çeşitli endojen ve eksojen kaynaklar sebep olmaktadır. Dolayısıyla vücudumuza ki birçok yararlı biyomoleküllere zarar vermektedirler [46].

SR'leri oluşturan sebepler endojen (bazı küçük moleküllerin otooksidasyonu, bazı enzimlerin katalitik döngüsü, peroksizomlar, solunumsal patlama ve mitokondriyal elektron transferi gibi) ve eksojen (aşırı gıda tüketimi, hava kirliliği yapan fitokimyasal maddeler, karbon tetra klorür, radyasyon, ozon, fosil yakıtlar, alloksan gibi kimyasalların etkisinde kalma, UV ışınları, tarım ilaçları, enfeksiyon, sigara dumanı, solventler, aşırı spor, travma ve stres gibi faktörler) kaynaklar olarak isimlendirilmektedir [54].

SR'ler hücrenin protein, lipid, nükleik asit ve DNA gibi birçok önemli hücre bileşeniyle reaksiyona girerek bu bileşenlerin yapılarına zarar vermektedirler. Ayrıca hücrelerde devamlı oluşumu hücre ölümü ve doku hasarlarını oluşturmaktadır. Bu hasarlar kalp-damar hastalıkları, çeşitli kanser türleri, katarakt, bağışıklık sisteminde zayıflama, nörodejeneratif hastalıklar (iskemi, Alzhemier, Parkinson, Şizofreni), diyabet, inflamasyon, gut, böbrek hastalıkları, solunum sistemi hastalıkları, sindirim

sistemi hastalıkları ve kardiyovasküler rahatsızlıklar gibi birçok hastalıkların sebebi olduğundan tedbirlerin alınması gerekmektedir.

Endojen doğal savunma sistemleri, vücudu SR'lerden ve sebep oldukları birçok olumsuz etkilerden korumaktadır [24]. SR'lerin neden olduğu oksidasyon reaksiyonlarını engelleyen, SR'leri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip olan maddelere "antioksidan" adı verilmektedir. Sağlıklı bireylerde SR'ler ile bu antioksidan savunma sistemi arasında bir denge bulunur. SR'lerin meydana gelmesi ve bunların antioksidan maddeler tarafından etkisiz hale getirilmesi arasında daima bir denge vardır ve bu dengenin korunması önemlidir. Aksi halde antioksidan savunma mekanizmasının aşırı radikal oluşumunu önleyememesi "oksidatif stres" adı verilen tehlikeli durumun oluşmasına sebep olur (Şekil 1.1). Antioksidan savunma sisteminin yetersizliği ile oluşan oksidatif stres ile DNA mutasyonları, hücre ölümleri, bağışıklık sisteminin çökmesi gibi çok çeşitli hastalıklar meydana gelmektedir.



Şekil 1.1. Oksidatif stresin oluşumu

SR'lerin doğrudan ölçümü zor olduğundan, araştırmacılar biyomoleküllerde oksidatif hasar sonucu meydana gelen ürünlerin ölçümüne yönelmişlerdir. Dolayısıyla bu ölçümler için de çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Metabolizmada SR'lerin çok fazla meydana gelişi, lipid peroksidlerinin oluşmasına sebep olduğu için lipid hücre membranlarını etkilemektedir. Dolayısıyla hücresel, mitokondriyal, nükleer ve endoplazmik zarlarda lipid peroksidasyonunu meydana getirirler. SR'lerin doğrudan ölçümü için ESR, EPR, Kemilüminesans ve enzimsel yöntemler kullanılmakta, bu yöntemler deneysel modellerde ve kontrollü sistemlerde iyi sonuç vermektedir [23].

İnsan vücudu hücre bileşenlerini reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hasarlardan koruyabilmek için birden fazla endojen mekanizmaya sahiptir. Fakat bu endojen savunma sistemi SR oluşum hızı ile bunların nötralize edilebilme hızı arasındaki dengeyi koruyamayabilir. Bu durumda oksidatif stres koşullarının kontrol

altına alınabilmesi için vitaminler, ilaçlar, sentetik gıda antioksidanları gibi eksojen antioksidanlara başvurulur. BHA, BHT, propilgallat ve TBHQ en çok kullanılan sentetik antioksidanlardır. BHA ve BHT'nin karaciğer hasarına yol açmasından ve kanserojen etkisinden dolayı gıda endüstrisindeki kullanımı sınırlandırılmıştır. Japonya ve Avrupa ülkeleri gibi bazı ülkelerde en güçlü sentetik gıda antioksidanı olan TBHQ'nun kullanımı da yasaklamıştır.

Doğal antioksidan kaynağı olan bitkisel, hayvansal ürünler, enzimler ve bazı mikroorganizmaların antioksidan özellikleri içerdikleri C vitamini, E vitamini, fenolik bileşikler, karotenoidler, glutasyon, flavonoidler gibi doğal bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Sentetik antioksidanların birçok olumsuz etkilerinden dolayı bunların yerine besinsel bitkilerde mevcut olan polifenoller gibi doğal antioksidanların gıda, kozmetik, tıp alanındaki kullanımı giderek artmaktadır. SR giderme aktivitesinde polifenoller ideal bir kimyasal yapıya sahiptir ve *in vitro* da α - tokoferol (E vitamini) ve askorbik asitten (A vitamini) daha etkili doğal antioksidanlar olduğu kanıtlanmıştır. Bu yüzden fenolikçe zengin meyve, sebze, bitki, tahıl ve diğer bitki materyallerinin ham ekstraktları besinlerin kalite ve besin değerini yükselttiği için gıda endüstrisinde giderek artan bir ilgiyle kullanılmaktadır.

Çalışmamızda SR'leri giderme aktivitesinde sentetik antioksidanların yerine kullanılmak üzere yonca ve asma bitkilerinin su, aseton ve metanol ekstraktlarının *in vitro* antioksidan özellikleri çeşitli metodlarla incelenmiştir. Farklı bitki ekstraktlarının toplam fenolik bileşik tayini, toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesi, Fe^{+3} iyonlarını indirgeme potansiyelleri, prolin tayini, süperoksit radikali giderme aktiviteleri, antiradikal aktiviteleri, klorofil içerikleri, H_2O_2 giderme aktiviteleri, FTC metodu ile toplam antioksidan aktiviteleri, karotenoid içerikleri, Fe^{+2} iyonlarını şelatlama aktiviteleri, $ABTS^{\bullet+}$ radikali giderme aktiviteleri ve fosfomolibden metoduyla toplam antioksidan aktiviteleri tayin edilmiştir. Sonuçlar α - tokoferol, askorbik asit, kateşin, pirogallol, trolox, gallik asit, BHT ve BHA gibi çeşitli standart antioksidan maddeler ve benzer literatürlerdeki verilerle kıyaslanarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

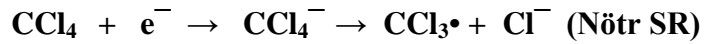
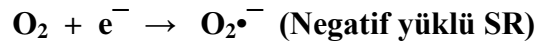
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRILMASI

2.1. Serbest Radikaller

Yüksek aktiviteli SR'ler en dış orbitallerinde bir ya da daha fazla tek elektron bulundurlar ve bu elektron ihtiyaçlarını karşılayabilmek için başka bileşiklerin elektronlarını paylaşmaya çalışırlar. Kuantum kimyasına göre, bir bağ oluşumu için iki elektron gereklidir. Aynı zamanda bu iki elektronun doğrultuları zıt yönlü olmak zorundadır. Yani yukarıya doğru dönen bir elektronun eşi aşağıya doğru dönen bir elektrondur. Bir bağ koptuğunda elektronlar ya ikisi de bir atoma katılır ya da biri bir atomda, diğeri diğeri atomda kalır. Elektronların birlikte kalması durumunda atom iyon haline, elektronların ayrılması durumunda ise atom SR haline dönüşür. Yüksek enerjili bu eşleşmemiş elektronlar, eşleşmiş elektronları etkilemektedirler.

SR'ler bu eşleşmiş elektronları ayırarak reaksiyonu engellerler. Böylece SR kendine bir çift elektron alarak elektron çifti haline dönüşürken, diğeri elektron SR'in oluşmasına sebep olur. Eşleşmemiş tek elektron, SR'lere düşük molekül ağırlıklı, kısa ömürlü ve kararsız yapıda olma gibi kimyasal özellikler kazandırır. Yaşam için gerekli olan SR'ler elektron transferi, enerji üretimi ve pek çok diğeri metabolik faaliyetlerde işlev göstermektedir.

Bir molekülün veya grubun tek elektronunu, yani SR olduğunu göstermek için sağ önüne bir nokta (X•) konur. SR'ler tek elektronu ile pozitif yüklü, negatif yüklü veya yüksüz olabilirler [51, 32, 13].

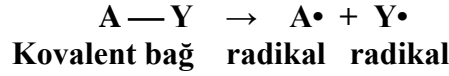


SR'ler 3 temel mekanizma ile oluşmaktadır [15]:

1) Kovalent bağın homolitik kırılması ile:

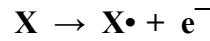
Kovalent bir bağ, bağı oluşturan atomların birer elektron alacağı şekilde kırılırsa buna "**homolitik kırılma**" denir. Homolitik kırılma sonucu "radikaller" oluşur ve

radikal ara ürünler üzerinden yürüten bu tür reaksiyonlara "**serbest-radikal reaksiyonları**" denir.

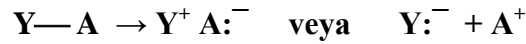


2.) Normal bir molekülün elektron kaybetmesi ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ile:

Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa radikal formu oluşur.

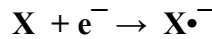


Kovalent bir bağ, bağ elektronlarının bağı oluşturan atomlardan birinin üzerinde kalacak şekilde kırılırsa bu mekanizmaya "**polar veya heterolitik mekanizma**" denir.



3.) Normal bir moleküle tek bir elektron transferi ile:

Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna neden olabilir. Örneğin moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan süperoksitin oluşumuna neden olur.

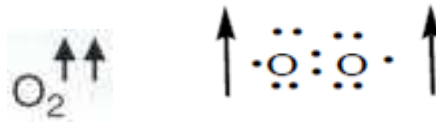


2.1.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Havasız yerde yaşayamayız. Oksijen, hem yaşamın hem de ölümün molekülüdür. Yaşamımızı sürdürmek için havanın moleküler oksijenini (O₂) tükettiğimizi biliyoruz. Toplam oksijen tüketimimizin %90'ından fazlasından elektron transport zinciri (solunum zinciri), %5-10'undan da diğer oksijen gerektiren reaksiyonlar sorumludur. Elektron transport zincirinde moleküler oksijen, yakıtlardan (glukoz, yağ asidi ve amino asitlerin karbon iskeleti) türeyen NADH ve FADH₂'den elektronları alarak suya indirgenir. Bu yolda oksijen molekülünün kuvvetli oksitleyici gücü, ATP'nin yüksek enerjili fosfat bağı haline dönüştürülür.

Moleküler oksijen gerektiren fakat ATP'nin oluşumu reaksiyonuyla eşleşmeyen diğer reaksiyonlar, amino asitlerin katabolizması, ilaçların detoksifikasyonu ve steroid hormonların sentezi gibi spesifik metabolik yollar için önemlidirler. Bu reaksiyonlarda diğer oksidazlar (oksijeni suya veya hidrojen perokside indirgeyen enzimler) ve oksijenazlar (oksijeni okside olan moleküle bağlayan enzimler) görev alırlar.

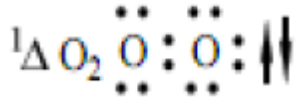
O₂, dış orbitallerinde paylaşılmamış iki elektron içerir (Şekil 2.1). Bu elektronlar, spinleri aynı yönde ve farklı orbitallerde iken minimum enerji seviyesindedirler. Radikal tanımına göre oksijen “diradikal” yapıya sahip bir moleküldür. Oysa oksijenin reaktivitesi beklenenin aksine çok düşüktür. Diradikal bir yapıya sahip olan oksijenin herhangi bir molekül ile tepkimeye girebilmesi için, tepkimeye gireceği molekülün de benzer yapıya (farklı orbitallerde spinlerin aynı yönde elektron içermesi) sahip olması gerekir. Oysa başta organik moleküller olmak üzere atom ve moleküller orbitallerinde elektronları antiparalel ve eşleşmiş olarak içerirler. Veya paylaşılmamış elektronlar kovalent bağlara katılmışlardır. Bunun sonucu olarak oksijenin diğer moleküllere olan reaktivitesi son derece kısıtlanmıştır. Bu kısıtlama “**spin kısıtlaması**” olarak adlandırılır.



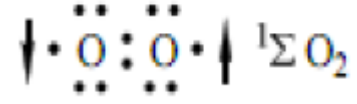
Şekil 2.1. Moleküler oksijen

Eşleşmemiş elektron içeren atom, atom grubu veya moleküller SR olarak tanımlanırlar. Radikaller eşleşmemiş elektronları eşleştirme eğiliminde oldukları için kararsızdırlar ve bu kararsızlıkları onların kimyasal olarak aktif olmalarını sağlar [50]. Ancak Fe³⁺, Cu²⁺, Mn²⁺ ve Mo⁵⁺ gibi geçiş metalleri de ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde SR olarak kabul edilmezler, bunlar Fenton ve Haber-Weiss reaksiyon hızlarını arttırarak SR oluşumunda önemli rol oynarlar.

O₂ radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde diğer SR'lerle kolayca reaksiyona girer. Diradikal oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle singlet oksijen oluşur. Singlet oksijen, eşleşmemiş elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür, delta ve sigma olmak üzere iki şekli vardır (Şekil 2.2 ve Şekil 2.3).



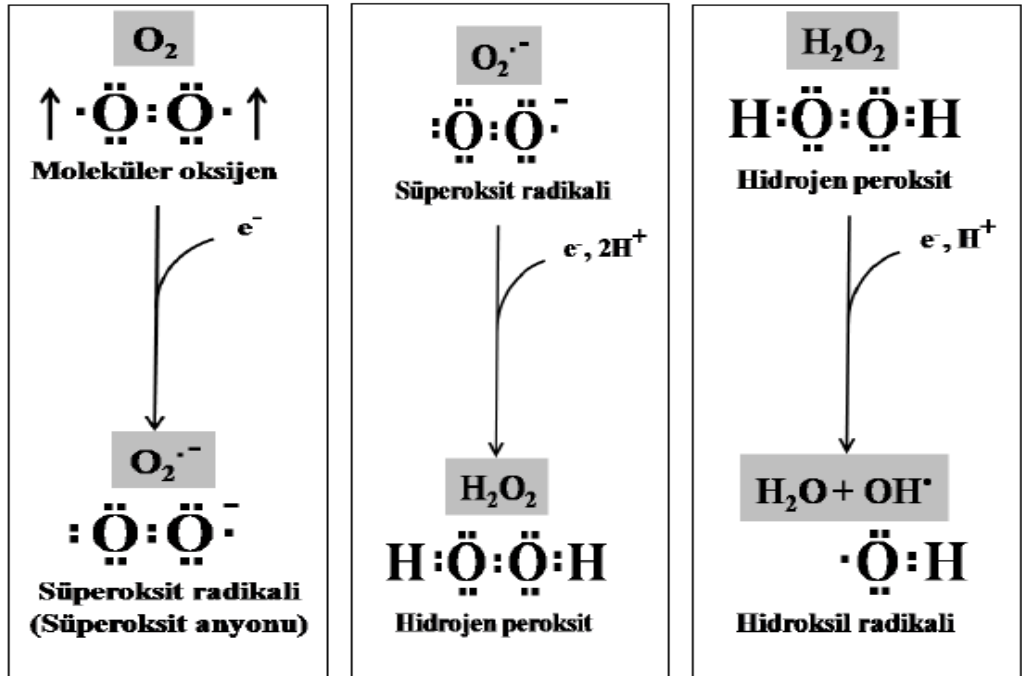
Şekil 2.2. Delta O₂



Şekil 2.3. Sigma O₂

Eşleşmemiş elektron biyolojik önemi olan birçok atomda bulunabilir; sülfür, karbon, hidrojen veya nitrojen merkezli radikaller oluşabilir. Canlılar için hayati önemi olan oksijen ve azot en önemli SR kaynaklarıdır. Oksijen (ROT) ve azot (RNT) içeren SR'ler canlıda fizyolojik düzeyde oluşarak yararlı etkiler gösterirken, bu düzeyin patolojik seviyeye yükselmesiyle zararlı etkiler göstermeye başlamaktadırlar [27]. Biyokimyasal tepkimelerde kullanılabilmesi için reaktif formlara çevrilmesi zorunlu olan oksijen, mitokondride aerobik solunum sırasında kullanılırken toplam oksijenin %2–5'i ROT radikallerine dönüştürülmektedir [19].

Normal oksijen metabolizması sırasında O₂, hem tetravalan hem de univalan redüksiyona uğrayabilir (Şekil 2.4). Oksijenin univalan redüksiyonu ve suya dönüşümü esnasında az miktarda ve oldukça reaktif maddeler olan süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali oluşmaktadır.



Şekil 2.4. Moleküler oksijenden ROT üretimi

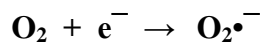
Serbest oksijen radikali biyokimyasın da anahtar rolü oynayan maddeler; oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metallerinin iyonları, nitrik oksit ve hidroksil radikalidir. Reaktif oksijen türleri, çeşitli SR'lerin oluştuğu SR zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli organik radikaller (R•), peroksil radikalleri (ROO•), alkoksil radikalleri (RO•), tiyol radikalleri (RS•), sülfenil radikalleri (RSO•), tiyol peroksit radikalleri (RSO₂•) gibi çeşitli SR'lerin oluşumuna neden olurlar. Ayrıca, singlet oksijen (¹O₂), H₂O₂ ve hipoklorik asit (HOCl) gibi bazı bileşiklerde kimyasal olarak SR olmamakla birlikte, onlar gibi yüksek aktiviteye sahiptirler [19].

Tablo 2.1. Biyolojik sistemde sık görülen SR'ler ve özellikleri

Radikaller	Özellikleri
Hidrojen radikali H•	Bilinen en basit radikal
Süperoksit radikali O ₂ • ⁻	Oksijen metabolizmasının ilk ana ürünü
Hidroksil radikali HO•	En toksik oksijen metaboliti
Singlet oksijen ¹ O ₂	Yarılanma ömrü kısa, güçlü oksidatif oksijen formu
Hidrojen peroksit H ₂ O ₂	Reaktivitesi çok düşük, moleküler hasar yeteneği zayıf
Perhidroksi radikali HO ₂ •	Lipidlerde hızlı çözünerek lipid peroksidasyonunu artırır
Peroksil radikali ROO•	Perhidroksile oranla daha zayıf ekili, lipidlere lokalize olur
Triklorometil radikali CCl ₃ •	CCl ₄ metabolizması ürünü, karaciğerde üretilen bir radikal
Tiyol radikali RS•	Sülfürlü ve çiftlenmemiş elektron içeren türlerin genel adı
Alkoksil RO•	Organik peroksitlerin yıkımı ile üretilen oksijen metaboliti
Nitrojen oksit NO	L-arjinin aminoasitinden <i>in vivo</i> üretilir
Nitrojen dioksit NO ₂	NO'in oksijen ile reaksiyonundan üretilir

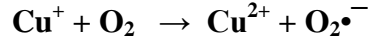
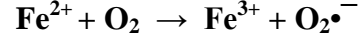
2.1.1.1. Süperoksit Radikali (O₂•⁻)

Canlılarda oluşan ilk ve temel oksijen radikali süperoksit radikalidir. Hemen hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur [26].



Başlıca şu mekanizmalarla üretilmektedir [15]:

1.) İndirgeyici özellikteki biyomoleküler oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken süperoksit radikali oluşur.



2.) Çeşitli dehidrogenazlar ve oksidazlar olmak üzere, yüzlerce enzimin katalitik etkisi sırasında süperoksit radikali bir ürün olarak oluşabilir.

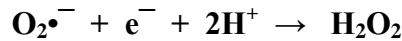
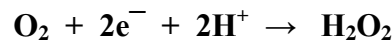
3.) Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken, tüketilen oksijenin %1-5 kadarı süperoksit yapımı ile sonlanır. Buradaki radikal yapımının nedeni NADH-dehidrogenaz ve koenzim-Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçağının olmasıdır.

4.) Aktive edilen fagositik lökositler bol miktarda süperoksit üreterek fagozom içine ve buldukları ortama verirler. Antibakteriyel etki için gerekli olan bu radikal yapımı, daha reaktif türlerin oluşumunu da başlatır.

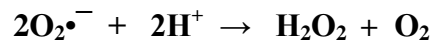
Süperoksit anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır [17, 48, 49].

2.1.1.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi ya da süperoksitlerin enzimatik ve non-enzimatik dismutasyonu tepkimeleri sonucu oluşur [15].



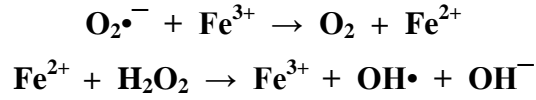
Biyolojik sistemlerde H₂O₂'in asıl üretimi, süperoksidin dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü, süperoksidin dismutasyonu reaksiyonunda iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar [1].



Bu reaksiyon, radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir, ya spontan gerçekleşir ya da SOD enzimi tarafından

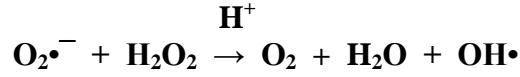
katalizlenir.

H₂O₂ yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özelliği taşımaz ancak reaktif oksijen türleri kapsamına girer. Dolayısıyla SR biyokimyasında önemli bir rol oynar. H₂O₂'in oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni, Fe²⁺, bakır gibi geçiş metallere varlığında en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmaktır (Fenton reaksiyonu). H₂O₂ özellikle proteinlerdeki HEM grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki ferril demir (Fe^{IV}) ve perferril demir (Fe^V) oluşumuna neden olur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir [15].



Fenton reaksiyonu

Ayrıca H₂O₂, süperoksit radikali varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu yine hidroksil radikalini (OH•) oluşturur [3].



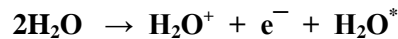
Haber-Weiss reaksiyonu

Oksitleyici özelliği nedeniyle, biyolojik sistemlerde oluşan H₂O₂'nin derhal ortamdaki uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi hücrelerdeki katalaz, peroksidaz ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi önemli antioksidan enzimler yerine getirir. Su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz kılınır [54].

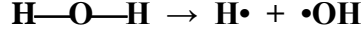
2.1.1.3. Hidroksil Radikali (•OH)

Biyolojik ve kimyasal sistemlerde üretilen hidroksil radikali canlılarda iki temel mekanizma ile oluşabilir [15].

1.) İyonlaştırıcı radyasyonun etkisi ile sulu ortamda su moleküllerinin iyonlaşması gerçekleşir.

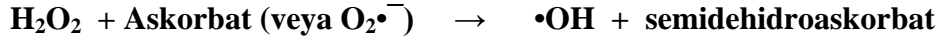


Uyarılmış su molekülü (H_2O^*) homolitik yıkım ile; H_2O^+ ise bir su molekülü ile tepkimeye girerek hidroksil radikali oluştururlar. Bu tepkimeler çok kısa sürede gerçekleşir ve üretilen $\bullet\text{OH}$, radyasyonun canlılardaki toksik etkisinden sorumlu başlıca kimyasal türdür.

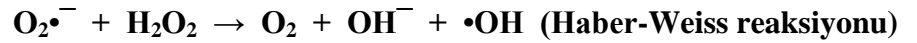


2.) H_2O_2 'nin iki elektron ile indirgenmesi ile su oluşurken, tek elektron ile indirgenmesi $\bullet\text{OH}$ yapımına neden olur. Bu tür indirgenme Fe, Cu gibi metal iyonları tarafından katalizlenir.

Fe, Cu



Haber-Weiss tepkimesi ya da Fenton tepkimesi olarak adlandırılan bu tepkime ile $\bullet\text{OH}$ oluşacağı, vücutta üretilen H_2O_2 derişimi ve serbest metal iyonunun varlığına bağlıdır. Süperoksit hem H_2O_2 'nin öncülü hem de metalleri indirgeyici bir tür olduğundan; süperoksit proteinlere bağlı metallerin indirgenip serbest kalmasına da neden olabildiğinden, biyolojik koşullarda süperoksit oluşumunun arttığı ortamda $\bullet\text{OH}$ üretimi kaçınılmazdır.



Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan $\bullet\text{OH}$, su dahil ortamda rastladığı her biyomolekülle tepkimeye girer. Her tür biyolojik molekül $\bullet\text{OH}$ 'ın bir hedefi ise de özellikle elektronca zengin bileşikler tercihli hedeflerdir. Hücre içine diffüzyon hızı kontrollüdür. Yarılanma ömrü çok kısadır ama yaptığı hasar büyüktür. Hidroksil radikali olasılıkla “ROT”lerinin en güçlüsüdür.

2.1.1.4. Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$)

Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$), ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Oksijenin enerjetik olarak uyarılan bu formunda reaktivite çok yüksektir. Aldığı enerjiyi çevreye dalga enerjisi şeklinde verip yeniden oksijene dönebilir. Başlıca şu mekanizmalarla vücutta oluşabilir [15]:

- (a) Pigmentlerin oksijenli ortamda ışığı absorplamasıyla,
- (b) Hidroperoksitlerin metaller varlığındaki tepkimelerinde,
- (c) Kendiliğinden dismutasyon tepkimeleri sırasında,
- (d) Prostaglandin endoperoksit sentaz, sitokrom P₄₅₀ tepkimeleri, laktoperoksidaz enziminin etkileri sırasında [44, 47, 55].

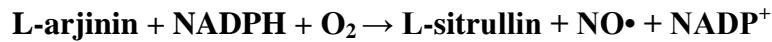
Oksijenin bu enerjetik reaksiyonu sonucunda iki tip singlet oksijen üretilir.

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

2.1.1.5. Nitrik Oksit (NO•)

Nitrik oksit, çok önemli biyolojik fonksiyonları yerine getirmek üzere üretilen nitrojen merkezli bir radikaldir. Paylaşılmamış elektron aslında nitrojen atomuna ait ise de, bu elektronun hem nitrojen hem de oksijen atomu üzerinde delokalize olması nedeniyle tam radikal özelliği taşımaz. Bunun sonucu, bilinen diğer radikallere göre reaktivitesi baskılandığından oldukça uzun ömürlüdür.

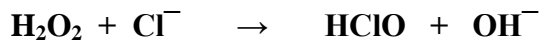
Oksijen radikalleri çok sayıdaki enzimatik ve enzimatik olmayan yollar ile fiziksel/kimyasal mekanizmalarla oluşturulurlar. Oysa vücudumuzda NO• sentezini sağlayan mekanizmalar son derece kısıtlıdır. Vücuda giren nitro bileşiklerinin metabolize edilmesi sırasında oluşan NO• bir tarafa bırakılacak olursa, endojen NO• oluşturan tek kaynak nitrik oksit sentaz (NOS, EC 1.14.13.39) enzimidir. NOS enzimi L-arginini sitrüllin ve NO• radikaline çevirir.



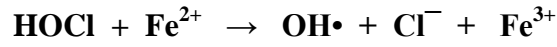
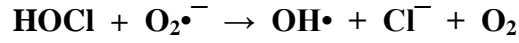
2.1.1.6. Hipoklorik Asit (HOCl)

Enflamasyon boyunca polimorfonükleer lökositler (PMNL) tarafından salınan miyeloperoksidaz (MPO) enzimi bu radikalın oluşmasında etkilidir.

MPO



Elektron vericisi olan indirgeyiciler ile HOCl'nin reaksiyona girmesi ile yüksek reaktiviteye sahip OH• meydana gelir. Önemli bir örneği aşağıdaki tepkimeler de gösterilen süperoksit radikali ve ferröz iyonları ile gerçekleşen reaksiyonlardır.



2.1.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynakları

2.1.2.1. SR'lerin Hücre İçi Kaynakları

SR'ler hücrelerde genel olarak elektron transfer reaksiyonları ile üretilirler. Enzim aracılı veya enzim katalizi olmadan oluşabilirler. Bu reaksiyonlar geçiş metal iyonlarının kimyasal redoksu ile birliktedir [30].

Hücrede normal metabolik yollardaki enzimatik reaksiyonlarda enzimlerin aktif yerinde ara ürünler olarak devamlı şekilde SR'ler oluşabilir. Bazen bu SR ara ürünler enzimlerin aktif yerinden sızarlar, moleküler oksijenle tesadüfen etkileşirler ve sonuçta serbest oksijen radikalleri oluşur. Bunlar:

1.) Mitokondriyal elektron transport zinciri: Normalde hücrelerde en büyük serbest oksijen radikali kaynağı mitokondriyal elektron transport zincirinden sızıntıdır. Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgenmiş zaman mitokondriyal süperoksit radikal üretimi artar. İç mitokondri membranındaki elektron transport zinciri (ETS) ATP formunda enerji üretmek için oksijeni kullanır. ETS'de oksijen terminal elektron alıcısı rolü oynar ve H₂O'a indirgenir. Elektronlar ETS'den ubikinon-sitokrom c seviyesinde koparlar.

2.) Mikrozomal elektron transport zinciri: Endoplazmik retikulumda özellikle ksenobiyotiklerin metabolizmaları esnasında ve diğer endojen maddelerin metabolizmaları esnasında yan ürün olarak SR'ler üretilir. Burada elektronların kaçak yaptığı en önemli yapı nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) sitokrom P₄₅₀ redüktaz enzimidir.

3.) Küçük moleküllerin otooksidasyonu: Koenzimler, askorbik asitler, tiyoller ve katekolaminler gibi bileşiklerin otooksidasyonu ile süperoksit radikali oluşur. Tiyoller, askorbat vb. ile Fe⁺³, Fe⁺²'ye indirgenir. Fe⁺² ise otookside olur ve süperoksit üretir. Süperoksitin dismutasyonu ile de ikinci ürün olarak hidrojen peroksit oluşur [40].

4.) Geçiş metallerinin görev aldığı oksido-redüksiyon reaksiyonları: Özellikle demir ve bakır olmak üzere geçiş metalleri, fizyolojik şartlarda elektron alışverişi şeklinde gerçekleşen oksido-redüksiyon reaksiyonlarında görev alırlar. Bakır

dışındaki tüm geçiş metalleri en dış tabakalarında tek elektron taşırlar, bakırın dış tabakası doludur ancak çok kolay elektron alıp vererek SR'e dönüşebilir. Geçiş metalleri bu özellikleri nedeniyle SR reaksiyonlarını hızlandıran katalizör vazifesi görürler. Demir ve bakır, tiyollerden tiyil sentezini; H₂O₂ ve O₂^{•-} den, hidroksil radikali sentezini katalizlerler. Mn²⁺'nin, O₂ tarafından oksidasyonu Mn³⁺ veya Mn-Oksijen kompleksinin oluşumunu sağlar, bunlar da O₂^{•-}'den daha çok oksitleyicidirler.

5.) Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transfer sistemleri: Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda SR üretimi, membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır. Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda üretilen SR'ler organellerin içine girebilir ve sitozolik reaksiyonlara katılabilir. Nükleer membranda oluşan SR'ler özellikle DNA'da hasar oluştururlar [30].

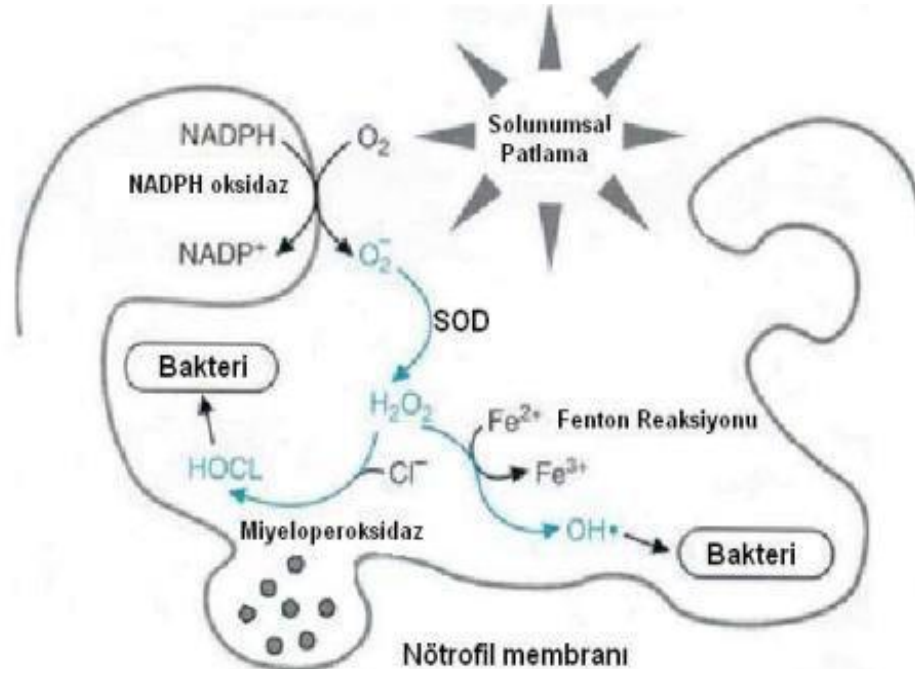
6.) Peroksizomlar: Peroksizomlar çok önemli hücre içi H₂O₂ kaynağıdır. Peroksizomlardaki D-amino asit oksidaz, urat oksidaz, L-hidroksil asit oksidaz ve yağ asidi açıl-CoA oksidaz gibi oksidazlar, süperoksit üretmeden bol miktarda H₂O₂ üretimine neden olurlar. Ancak peroksizomlarda hidrojen peroksidin suya ayrışmasını katalizleyen katalaz (CAT) enziminin aktivitesi de çok yüksek olduğundan peroksizomlardan sitozole ne kadar H₂O₂ geçtiği bilinmemektedir [85].

7.) Çözünür enzimler ve proteinler: Birçok enzimin katalitik döngüsü sırasında da SR'ler ortaya çıkar. Bu enzimlerden biri ksantin oksidazdır. Pürinlerin yıkılım yolunda en son iki reaksiyonu katalizleyen enzim ksantin oksidazdır. Ksantin oksidazın oksidaz olarak aktivite göstermesi durumunda hipoksantin ksantine ve ksantin ürik aside dönüşürken moleküler oksijen kullanılmakta, moleküler oksijen hidrojen peroksitde indirgenmektedir. İskemi durumlarında oksijen seviyesi düşük olduğundan önemli hasar olmaz. Ancak oksijen seviyesi reperfüzyon sırasında normale dönünce iskemi yerinde ksantin oksidaz etkisiyle fazla miktarda hidrojen peroksit ve süperoksit radikali oluşur, bunların etkisiyle de "iskem-reperfüzyon hasarı" denen durum ortaya çıkar. Ksantin oksidazın özellikle intestinal mukoza hücrelerinde görülen iskemi-reperfüzyon hasarında önemli faktör olduğu düşünülmektedir.

8.) Plazma membranı: Ekstrasellüler olarak üretilen SR'ler plazma membranından geçerken membranda toksik reaksiyonlar başlatabilirler. Membrandaki doymamış yağ asitleri ve transmembran proteinlerdeki aminoasitler SR hasarına duyarlıdır. H₂O₂ membrandan kolayca geçebilir. O₂^{•-} ise transmembran anyon

kanalları ile geçer. Fagositik hücrelerin plazma membranındaki nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz aracılı SR üretimi de SR'lerin önemli bir biyolojik kaynağını oluşturur. Mikrozomal ve plazma membranlarında enzimlerle ilişkili SR üretimi mevcuttur. Fagositik hücrelerin uyarılması, fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonuna ve plazma membranından araşidonik asidin serbestleşmesine yol açar. Araşidonik asit metabolizması sonucu SR üretimine "**enzimatik lipid peroksidasyonu**" denir. Araşidonik asit metabolizması sonucu lipooksijenaz yolu ile süperoksit radikali üretilir. Siklooksijenaz yolunda SR ara ürünler oluşur. Araşidonik asidin biyoaktif ürünlere çevrimi sırasında hemoprotein-oksijen ve karbon-merkezli SR ara ürünleri üretilir ve bunlar doku hasarına öncülük ederler [30].

9.) Solunumsal patlama: Aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller ve eozinofillerde fagositik solunumsal patlama sırasında çeşitli SR'ler oluşur (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Nötrofilde fagositoz, solunumsal patlama sırasında SR oluşumu

Fagositik lökositler opsonize mikroorganizmalar, C5a kompleman fragmanı, lökotrien B₄, bakteriyel orjinli N-formil oligopeptitler gibi partiküler ya da çözünebilir bir uyarıcıyla uyarıldıklarında lizozomal komponentleri dışarıya vermeye başlarlar ve reaktif oksijen metabolitlerinin oluşumuyla birlikte mitokondri dışında oksijen tüketiminde bir patlama (solunumsal patlama) gösterirler. Fagosit edilmiş bakteri,

solunumsal patlama ürünlerinin etkisiyle öldürülür. Ancak bu oksidan ürünler hücrelerin antioksidan savunma güçlerini aştığında normal konak hücrelere zarar verirler ve çeşitli hastalıkların patogenezinde rol oynarlar.

Nötrofiller ve monositlerin primer lizozomal granüllerinde Fe-HEM içeren miyeloperoksidaz (MPO) ve eozinofillerde eozinofil peroksidaz (EPO) enzimi bulunur. Çeşitli uyarıcıların etkisiyle fagositler MPO ve EPO içeren granüllerini ekstrasellüler aralıktaki fagositik vakuol içine boşaltırlar. MPO ve EPO, hidrojen peroksit varlığında klorür, iyodür ve bromürün oksidasyonunu katalizleyerek hipoklorik asit (HOCl), hipoyodik asit (HOI) ve hipobromik asit (HOBr) oluşturur.

2.1.2.2. SR'lerin Hücre Dışı Kaynakları

Bazı yabancı toksik maddeler hücrede SR üretimini artırır (Tablo 2.2). Bu maddeler ya doğrudan SR üretirler ya da SR'lerin ortadan kaldırılmasını sağlayan antioksidan aktiviteyi düşürürler.

Tablo 2.2. SR'lerin hücre dışı kaynakları

Çevresel faktörler	Toksik kimyasallar	Radyasyon	İlaçlar
Hiperoksi	Karbon tetraklorür (CCl ₄)	Elektromanyetik radyasyon	Antineoplastik
Hava kirliliği Azot dioksit (NO ₂) Ozon Sülfür dioksit	Halojenlenmiş hidrokarbonlar: Kloroform, Bromobenzen, Halotan	Partiküler radyasyon	Antibiyotikler: Kinolon, Tetrasiklin, Aminoglikozid Kininler
Tütün	Paraquat		
Sigara içimi	Alloksan		
Böcek ilaçları	Difenoller		
Metaller (Titanyum- Alüminyum- Kurşun-Molibden- Nikel- Krom-Kobalt-Civa- Kadmiyum- Arsenik)			Anestezikler

2.1.3. SR'lerin Etkileri

2.1.3.1 SR'lerin Pozitif Etkileri

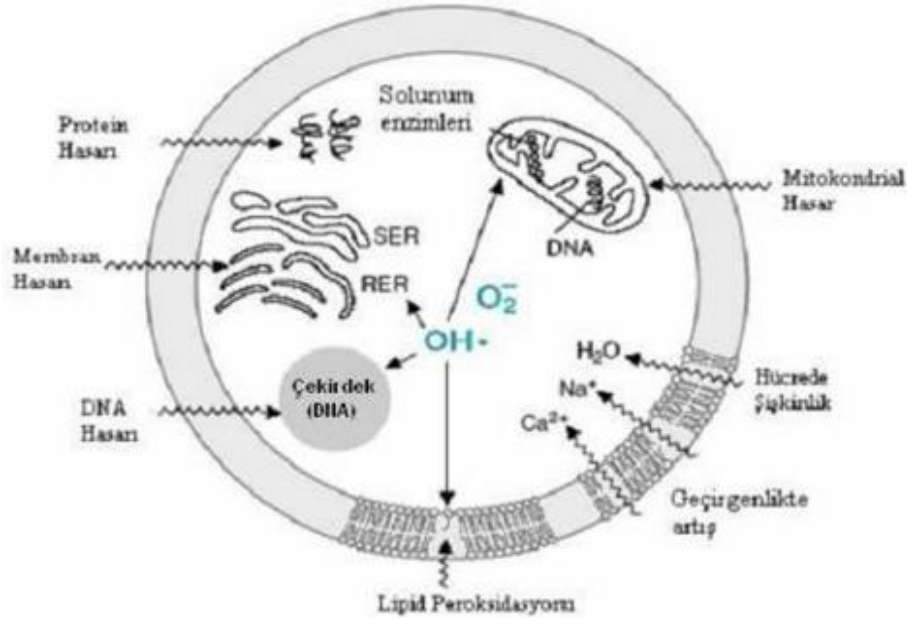
SR'lerin belirli miktarlardaki üretimi, sağlık için gereklidir ve başta bağışıklık

sistemi olmak üzere, hücresel sinyal iletiminde, enzim aktivasyonlarında, kimyasal reaksiyonların seyrinde, hücrelerin biyogenezinde ve kas kasılmasında rol oynarlar [72].

2.1.3.2. SR'lerin Negatif Etkileri

SR'lerin fazla üretimi, hücre zehirlenmesine, doku yaralanmasına, iltihaplanmaya ve fonksiyon bozukluğuna yol açar. Son yıllarda yapılan çalışmalar, serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarının birçok kronik hastalığın komplikasyonlarına katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Çeşitli patolojik durumlarda normalden daha fazla serbest oksijen radikali oluşmasıyla veya organizmanın savunma sisteminin yetersiz kalmasıyla artan SR'ler hücrenin çeşitli bileşenleri ve hücre dışı makromoleküller ile etkileşerek hücrede metabolik, yapısal ve fonksiyonel bozukluğa neden olur ve bu da hücre ölümüyle sonlanabilir. SR'lerden etkilenebilecek başlıca hücresel komponentler arasında proteinler (enzimler ve kollajen), nörotransmitterler, nükleik asitler, DNA ve hücre membranlarının başlıca bileşenleri olan yağ asitleri bulunmaktadır [40, 22] (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Hücrede SR'lere bağlı hasarlar

2.1.3.2.1. SR'lerin Proteinlere Etkileri

SR'lerin proteinlere etkisi proteinlerin aminoasit içeriğine göre değişir. Protein molekülleri üzerindeki sülfidril veya amino gruplarıyla SR'lerin etkileşmesi sonucu proteinlerde oluşan yapısal değişiklikler üçe ayrılır:

- 1.) Aminoasitlerin modifikasyonu
- 2.) Proteinlerin fragmantasyonu
- 3.) Proteinlerin agregasyonu veya çapraz bağlanmaları.

SR'lerin proteinlerde yaptığı hasarın büyüklüğü; aminoasit kompozisyonların, protein konformasyonuna, aminoasitlerin lokalizasyonuna ve de hasar gören proteinin tamir kabiliyetine bağlıdır. Proteinler SR'lere karşı poliansatüre yağ asitlerinden daha az hassastırlar. Proteinin hücrel lokalizasyonuna ve radikal toksisite gücüne göre protein harabiyetinin boyutları değişebilir.

Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein, sistin gibi aminoasitlere sahip proteinler SR'lere karşı çok hassastırlar ve kolaylıkla etkilenirler. Bu etki sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur.

2.1.3.2.2. SR'lerin Karbonhidratlara Etkileri

SR'lerin karbonhidratlara etkisiyle çeşitli ürünler meydana gelir ve bunlar, çeşitli patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu H_2O_2 peroksitler ve okzaldehitler oluşabilir. Bunlar diyabet ve sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıklar gibi patolojik süreçlerde ayrıca okzalaldehyitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanarak antimitotik etki göstererek kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar.

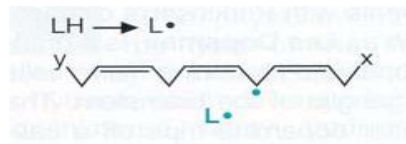
Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının gelişimi, kalp hastalığı, hipertansiyon, psöriyazis, romatoid artrit, behçet hastalığı, çeşitli deri ve göz hastalıkları, kanser gibi birçok hastalıkta ve yaşlılıkta SR üretimini arttırdığı, antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir. Ancak bu hallerde SR artışının sebep mi yoksa sonuç mu olduğu tam olarak bilinmemektedir [1].

2.1.3.2.3. SR'lerin Lipidlere Etkileri

SR'lerin en önemli etkisi lipidlere yaptığı etkidir. Hücre membranları poliansatüre yağ asitlerinden (PUFA) ve kolesterolden zengindir ve kolaylıkla oksidan radikallerden etkilenirler. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, SR'lerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. PUFA'nın oksidatif yıkımı "**lipid peroksidasyonu**" olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve

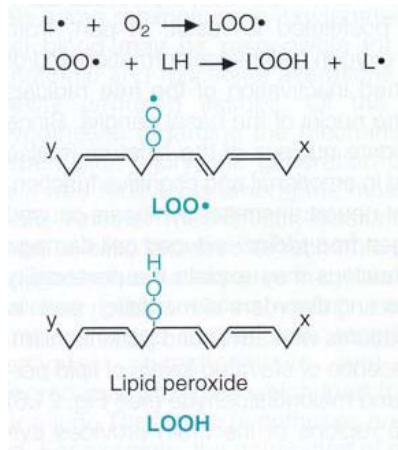
oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipid SR'leri (L•) ve lipid peroksit radikallerinin (LOO•) oluşması, ROT'nin neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. SR'lerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna "**nonenzimatik lipid peroksidasyonu**" denir.

Hücre membranlarında lipid peroksidasyonuna uğrayan başlıca yağ asitleri poliansatüre yağ asitleridir. Lipid peroksidasyonu genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipid radikali niteliği kazanmasıyla başlar (Şekil 2.7).



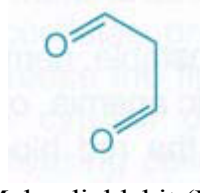
Şekil 2.7. Lipid peroksidasyonu

Lipid radikallerinin moleküler oksijenle (O₂) etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikalleri (LOO•) oluşur. Lipid peroksit radikalleri, membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid peroksitlerine (LOOH) dönüşürler ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Lipid radikallerinin oluşumu

Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit (MDA) meydana gelir (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Malondialdehit (MDA) yapısı

Biyolojik materyalde MDA ölçülmesi lipid peroksit seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır. Bu nedenle günümüzde belirteç olarak lipid türevleri yerine, daha kararlı ve uzun ömürlü protein oksidasyon ürünlerinin kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır.

2.1.3.2.4. SR'lerin Nükleik Asitlere ve DNA'ya Etkileri

ROT, DNA'da farklı mekanizmalar ile bir takım değişikliklere neden olur [93]. Memeli hücrelerinde DNA moleküllerinin mutasyonları nükleusta, mitokondride ve her ikisinde de oluşabilir. Ancak mitokondriyal DNA, nükleer genoma göre 17 kez daha fazla oranda mutasyona uğramaya eğilimlidir. Mitokondriyal DNA küçük moleküldür ve oksidatif yıkıma oldukça hassastır. ROT, mitokondriyal DNA da birçok bölgede fragmentasyona ve silinmeye neden olur. DNA mutasyonunun çoğunun hidroksil radikallerine bağlı olduğu düşünülmektedir. Hidroksil radikali bazlarla ve deoksiribozlarla kolayca reaksiyona girebilir. En yaygın mutasyon hidroksilasyondur ki bu ATP depleksiyonuna ve gen mutasyonuna yol açabilir. Bu hücrenin ya malign transformasyonuna ya da ölümüne neden olur. Hidrojen peroksit ise membranlardan kolayca geçebileceğinden hücre çekirdeğindeki DNA'ya ulaşır ve hücre disfonksiyonuna hatta ölümüne yol açar.

2.2. Antioksidanlar

Aerobik organizmalarda SR oluşumunu kontrol altında tutmak ve bu moleküllerin zararlı etkilerine engel olmak üzere antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir. Ancak bazı durumlarda mevcut antioksidan savunma sistemi SR'lerin etkisini tamamen önleyemez ve oksidatif stres olarak adlandırılan durum ortaya çıkar. ROT oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizması vardır. Bu mekanizmalar "**antioksidan savunma sistemleri**" ya da "**antioksidanlar**" olarak bilinen; SR'leri nötralize eden, SR hasarlarını tamir etmeye

yardımcı olan ve vücudun onlardan etkilenmesini minimize eden veya kendini yenilemesini sağlayan besinlerin bir sınıfıdır.

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler;

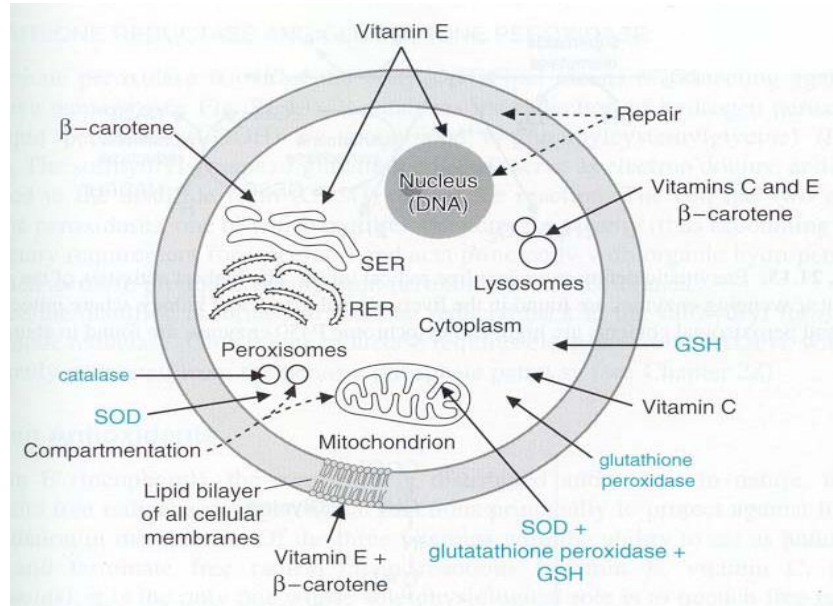
1.) Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme **toplayıcı etkidir**. Antioksidan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküller bu tip etki gösterirler.

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

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

4.) SR'lerin oluşturdukları hasarın onarılması **onarıcı etkidir**.

Antioksidan özelliği bilinen birçok farklı madde vardır. Bu maddelerin bir kısmını özellikle bitkilerden alırken, bir kısmını vücut kendisi üretir. Hücrelerin hem sıvı hem membran kısımlarında bulunabilirler (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Vücutta bulunan bazı antioksidanlar

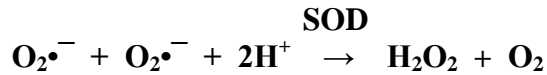
2.2.1. Antioksidanların Sınıflandırılması

Antioksidanlar, doğal ve sentetik olmak üzere iki grupta toplanabilirler. Doğal antioksidanlar arasında enzimler (süperoksit dismutaz, katalaz, sitokrom-C-oksidad, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon S-transferazlar, hidroperoksidaz), makromoleküller (seruloplazmin, transferin, miyoglobin) ve mikromoleküller (β -karoten, A-vitamini, C-vitamini, E-vitamini, tokoferoller, glutatyon, N-asetil sistein, metiyonin, ubikinon) sayılabilir. Sentetik antioksidan olarak kullanılanlar ise BHA, BHT, TBHQ, NDGA, trolox, alkil gallatlardır. Antioksidanların sınıflandırılması çeşitlilik göstermektedir. Endojen kaynaklı (doğal) ve eksojen kaynaklı [1] olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabilirdiği gibi SR'in meydana gelişini önleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler şeklinde de ikiye ayrılabilirler. Ayrıca enzim olanlar ve olmayanlar şeklinde de sınıflandırılabilirler.

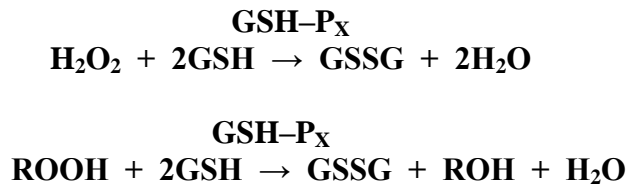
Vücudumuzdaki antioksidan savunma sisteminde yer alan başlıca elemanlar ise; enzimler, metal iyonlarını bağlayan proteinler ve suda ile yağda çözünen radikal tutuculardır [67].

2.2.1.1. Enzimler

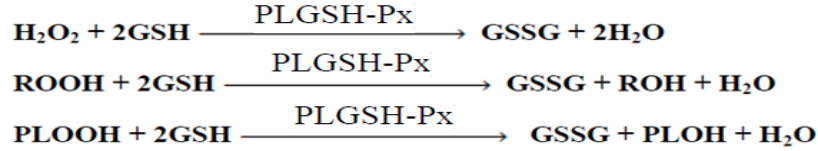
Süperoksit Dismutaz (SOD): Süperoksit dismutaz oksidatif strese karşı ilk savunma hattıdır. SOD, oksijeni metabolize eden tüm hücrelerde bulunur ve katalitik aktivitesi çok yüksek olan bir enzimdir. Süperoksit radikallerinin, H_2O_2 ve moleküler oksijene hızlıca dismutasyonunu katalize eder [31].



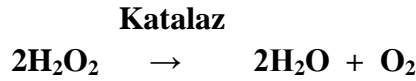
Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px): Glutatyon peroksidaz sitozolde bulunur, dört selenyum atomu içerir ve tetramerik yapıdadır, lipid peroksidasyonunun başlamasını ve gelişmesini engelleyici özellikte olan bir enzimdir [48]. Glutatyon peroksidaz, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu bir enzimdir.



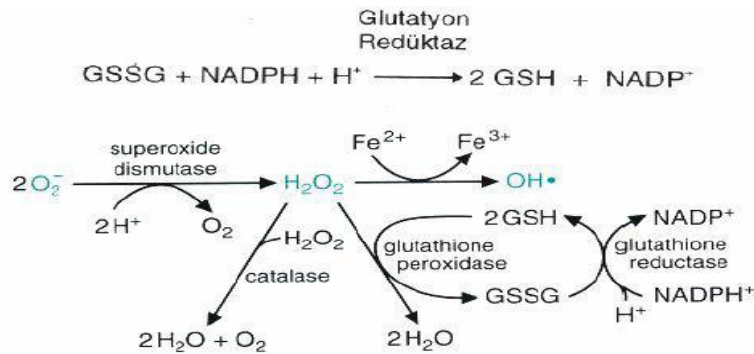
Fosfolipid Hidroperoksit Glutasyon Peroksidaz (PLGSH-Px) adı verilen enzim ise membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkollere indirger. Membrana bağlı en önemli antioksidan olan vitamin E yetersiz olduğunda membranın peroksidasyona karşı korunmasını sağlar.



Katalaz Enzimi (CAT): Katalaz yapısında dört tane HEM grubu bulunan bir hemoproteindir. Esas olarak peroksizomlarda, daha az olarak sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur. Hidrojen peroksidi suya ve oksijene parçalar.

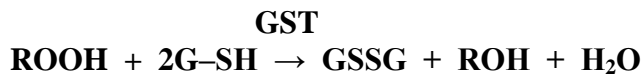


Glutasyon Redüktaz (GSH-Red): Glutasyon redüktaz, GSH-Px vasıtasıyla hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutasyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüşümünü katalize eder (Şekil 2.11). Reaksiyonun gerçekleşmesi için NADPH gereklidir [1].

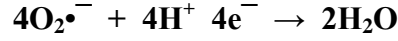


Şekil 2.11. Glutasyonun indirgenmesi

Glutasyon-S-Transferaz (GST): Glutasyon S-transferazlar, her biri iki alt birimden oluşmuş bir enzim ailesidir. GST, başta araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı selenyum-bağımsız GSH-Px aktivitesi göstererek bir antioksidan savunma mekanizması oluştururlar.



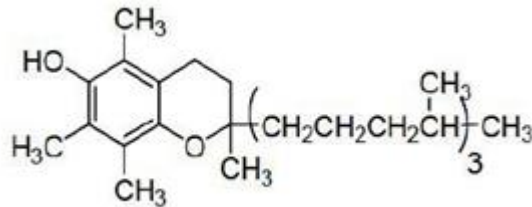
Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz: Solunum zincirinin son enzimidir ve süperoksiti ($O_2^{\bullet-}$) detoksifiye eder.



Bu reaksiyon fizyolojik şartlarda sürekli cereyan eden normal bir reaksiyondur, bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol miktarda enerji üretimi (ATP) sağlanır.

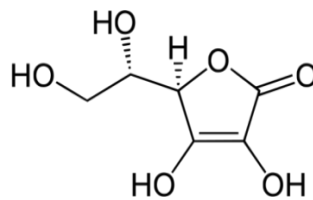
2.2.1.2. Yağda ve Suda Çözünen Radikal Tutucular

α -tokoferol (E Vitamini): Doğada en yaygın bulunan antioksidanlardandır ve bitkisel yağlardaki başlıca antioksidanları oluşturur. Yağda çözünen vitamin olduğu için hem sellüler hem de subsellüler membranlarda ve lipoproteinlerde bulunur. Mitokondri membranında yaklaşık 2000 fosfolipid başına bir α -tokoferol bulunmaktadır. Hücre membran fosfolipidlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerini SR etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur. Süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksit radikallerini ve diğer radikalleri indirger. α , β , γ , δ olmak üzere dört farklı tokoferol formu bulunur. En aktif formu α -tokoferoldür (Şekil 2.12).



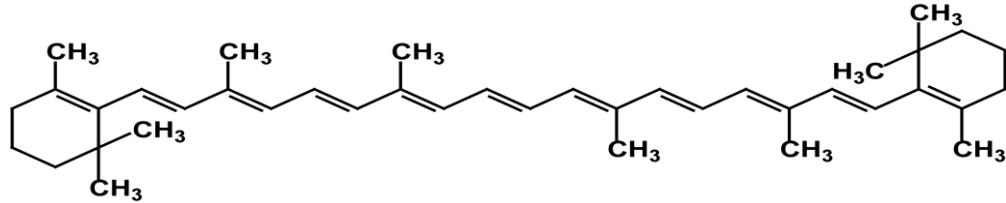
Şekil 2.12. α -tokoferol yapısı

Askorbik Asit (C-Vitamini): Sulu ortamlarda SR'lerle reaksiyona girebilme kabiliyetinde olan suda eriyen bir vitamindir. Güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı güçlü bir antioksidandır (Şekil 2.13). Süperoksit ve hidroksil radikalleriyle reaksiyona girip onları temizleyen bir antioksidan olmasının yanı sıra tokoferoksil radikalının tekrar tokoferole dönüşmesini sağlar.



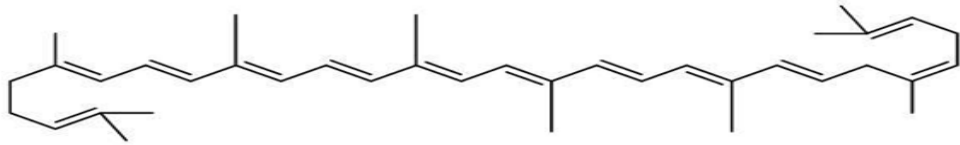
Şekil 2.13. Askorbik asit yapısı

Karotenoidler: Yağda çözünen, sarıdan kırmızıya kadar renk veren, bitkilerde ve bazı diğer fotosentetik mikroorganizmalarda (yosunlar, bazı mantarlar ve bazı bakterilerde) bulunan pigmentlerdir. Altı yüzün üzerinde bilinen karotenoid çeşidi vardır. En yaygın karotenoidler A vitamininin öncülü olan β -karoten (Şekil 2.14) ve likopendir (Şekil 2.15).



Şekil 2.14. β -karoten yapısı

β -karoten, α -tokoferol gibi peroksil ve alkoksil radikalleri ile reaksiyona girebilen bir moleküldür. Singlet oksijeni bastırabildiği, süperoksit radikalini temizlediği ve peroksit radikalleriyle direkt olarak etkileşerek antioksidan görev gördüğü saptanmıştır [38].



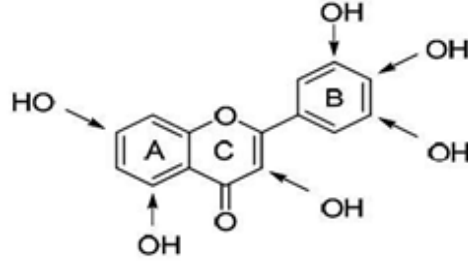
Şekil 2.15. Likopen yapısı

Likopen, hücreleri SR hasarından korumasının yanı sıra, hücreler arasındaki bağları güçlendirmekte ve hücre metabolizmasını geliştirmektedir.

Flavonoidler: Flavonoidler bitkiler tarafından sentezlenen fenolik yapıdaki bileşiklerdir. Birçok meyve ve sebze yüksek oranlarda bulunan sarı-beyaz pigmentlerdir. Bitkilerde şekerlerle bağlı halde ve değişik glikozid kombinasyonları halinde bulunmaktadır. Antosiyaninler, lökoantosiyanidinler, flavonoller, flavonlar, glukoflavonlar, biflavoniller, kalgonlar, auronlar, flavononlar, izoflavonlar olarak 10 sınıfta incelenebilir.

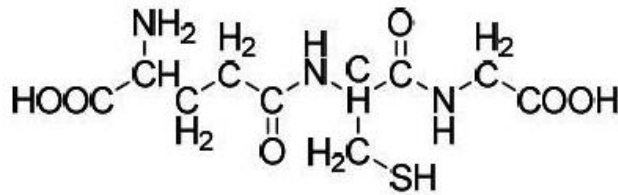
Fenolik yapılarından dolayı antioksidan özellik göstermektedirler. Bileşiğin yapısı ile antioksidan kapasitesi ilişkilidir, fenolik bileşiklerde $-OH$ grubu sayısı, flavonoidlerde B halkasının 5-OH, 4-OH ve 3-OH grupları olması antioksidan aktivite

üzerinde etkilidir (Şekil 2.16). Bazı flavonoidler, etkili bir şekilde hücreleri ve dokuları reaktif oksijen türlerinin olumsuz etkilerinden korur



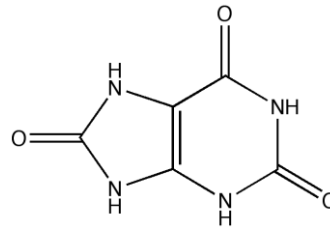
Şekil 2.16. Temel flavonoid yapısı

Glutasyon (GSH): Karaciğerde genetik bilgiye ihtiyaç olmadan sentezlenebilen, L-sistein, L-glutamik asit ve glisin içeren bir tripeptittir (Şekil 2.17). SR'ler ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur.



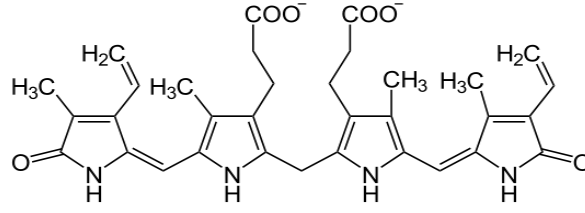
Şekil 2.17. Glutasyon yapısı

Ürik Asit: Normal plazma konsantrasyonunda urat, hidroksil, süperoksit, peroksit radikalleri ve singlet oksijeni temizler (Şekil 2.18). Fakat lipid radikalleri üzerine etkisi yoktur. Ayrıca vitamin C oksidasyonunu engelleyici etkisi vardır.



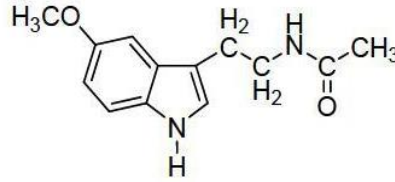
Şekil 2.18. Ürik asit yapısı

Bilirubin: Hemoglobin moleküllerinin (HEM proteinleri) parçalanmasıyla oluşan son üründür (Şekil 2.19). Yüksek düzeylerde bir doku toksini olmasına rağmen, zincir kırıcı bir antioksidan olarak görev yapabilir. Plazmadaki üç temel antioksidandan birisidir. Süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır.



Şekil 2.19. Bilirubin yapısı

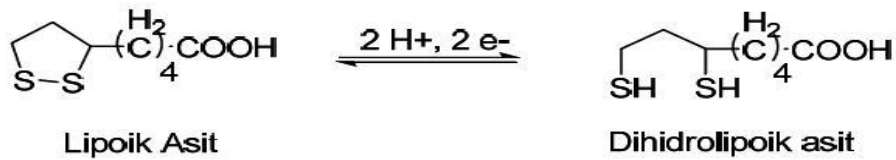
Melatonin (MLT): Epifiz bezinin pineolasit adı verilen hücrelerinden salgılanır (Şekil 2.20). Melatonin, kişiden kişiye değişse de yaklaşık olarak 23:00 ile 03:00 saatleri arasında salgılanan bir hormondur. Hormonun temel görevi vücudun biyolojik saatini koruyup ritmini ayarlamaktır.



Şekil 2.20. Melatonin yapısı

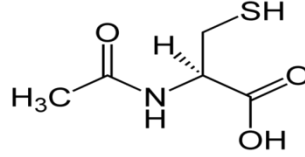
Melatonin en zararlı SR olan hidroksil SR'ini ortadan kaldıran çok güçlü bir antioksidandır. Günümüze kadar bilinen antioksidanların en güçlüsü olarak kabul edilmektedir. Kanserin ilerleme ve gelişme safhalarını geciktirir [33].

Lipoik Asit: Alfa lipoik asit ağır metallere oluşan zehirlenmelerde detoksifikasyon ajanı olarak kullanılan bir antioksidandır. Antioksidan özelliği kendisinin dihidrolipoik aside indirgenirken, SR'leri temizlemesinden ve de ağır metallere şelat oluşturarak (kurşun, civa, kadmiyum gibi) bu ağır metalleri vücuda zarar vermeden uzaklaştırmasından kaynaklanmaktadır [84].



N-asetil Sistein (NAS): Çok güçlü bir antioksidandır (Şekil 2.21). Vücudun ürettiği aminoasitlerden sistein'in bir formu olan NAS önemli bir antioksidan olan

glutasyon'un üretilmesine de yardım eder. GSH-Px aktivitesini arttırarak endojen antioksidan sisteme katkıda bulunur. Süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır.



Şekil 2.21. N- asetil sistein yapısı

2.2.1.3. Metal İyonlarını Bağlayan Proteinler

Ferritin: Birçok dokuda bulunan ve demir deposu işlevi gören bir proteindir. Küçük miktarlarda kan dolaşımında da bulunur ve ölçümü ile vücudun demir depolarının durumu kesin olarak anlaşılabilir.

Transferrin ve Laktoferrin: Dolaşımdaki serbest demiri bağlarlar.

Albumin: LOOH ve HClO toplayıcısıdır. Aynı zamanda Cu^{+2} ve HEM bağlayıcı bileşiktir. Bilirubin gibi suda çözünmeyen bazı toksik metabolizma ürünlerine bağlanarak onları zararsız kılar.

Seruloplazmin: Kan plazmasında bulunan bir proteindir. Ferro demiri (Fe^{2+}) ferri demire (Fe^{3+}) yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu ve böylece hidroksil radikali oluşumunu inhibe eder.

2.2.1.4. Eksojen Antioksidanlar

Eksojen antioksidanlar vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olmak üzere sınıflandırılabilirler.

Vitamin eksojen antioksidanlar şunlardır: **1.)** α -tokoferol (vitamin E) **2.)** β -karoten **3.)** Askorbik asit (vitamin C) **4.)** Folik asit (folat)

İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar şunlardır: **1.)** Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten) **2.)** NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestetikler, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid anti-inflamatuvar ilaçlar) **3.)** Rekombinant süperoksit dismutaz **4.)** Trolox-C (vitamin E analogu) **5.)** Endojen antioksidan aktiviteyi arttıranlar (GSH-Px aktivitesini arttıran ebselen ve asetil sistein) **6.)** Nonenzimatik SR toplayıcılar (mannitol, albümin) **7.)** Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin) **8.)** Nötrofiladezyon inhibitörleri **9.)** Sitokinler (TNF ve IL-1) **10.)** Barbitüratlar **11.)** Demir şelatörleri

Gıdalardaki eksojen antioksidanlar şunlardır: 1.) BHT 2.) BHA 3.) Sodyum benzoat 4.) Ethoxyquin 5.) Propilgallat 6.) Fe-süperoksit dismutaz

Ksantin Oksidaz İnhibitörleri (Allopurinol, Oksipurinol): Oksipuranol allopürinölün metabolitidir, doğrudan hidroksil radikali ve hipokloriti azaltıcı yönde etki eder.

Demir Şelatörleri: Hücre içine girerek serbest demiri bağlamak suretiyle onu etkisizleştirirler, böylece Fenton reaksiyonunu ve sonuçta hidroksil radikali oluşumunu inhibe ederler. Bu özelliklerinden dolayı reperfüzyonda kullanılmalarının faydalı olduğu kaydedilmiştir.

Desferroksamin: Serbest Fe³⁺'i bağlar.

Probukol: Kan kolesterolünü düşürmede kullanılır. Lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonunu kırıcı etkisi vardır.

Ebselen: Selenyumlu bir bileşiktir. Glutasyon peroksidaz aktivitesini güçlendirir ve lipoksijenaz yolunu inhibe eder.

Sitokinler: Başta katalaz olmak üzere antioksidan enzimleri aktive ederler. Ancak proteolitik enzimleri de aktive ettiklerinden dolayı zararlı olabilirler.

Mannitol: Hidroksil radikalini toplayıcı özelliği vardır.

Trolox: Vitamin E'nin suda çözülebilir analogudur. Antioksidan aktivite için yaygın olarak kabul edilen bir standarttır.

2.3. Besin Maddeleri ve Antioksidanlar

Birçok gıdada ürününü oluşturan bileşenler ile havanın oksijeni arasında kendiliğinden ortaya çıkan ve "otooksidasyon" adı verilen tepkimeler oluşur. Her zaman, az ya da çok hissedilebilir kalite düşmelerine neden olan bu tür tepkimeler gıda endüstrisi açısından istenmeyen olaylardır. Burada sözü edilen kalite düşmesi renk, koku ve tatda meydana gelen değişimler ile bazı besin öğelerindeki parçalanmalar ve hatta toksik bileşik oluşması biçiminde ortaya çıkmaktadır. Yağ ve yağlı gıdalardaki otooksidasyon olayı, hem beslenme fizyolojisi açısından hem de teknolojik-ekonomik açıdan büyük önem taşımaktadır. Otoksidasyonun fiziksel ve teknolojik yöntemlerle önlenemediği durumlarda antioksidanlar ve sinerjistler kullanılmaktadır. Sinerjistler antioksidan etkisini arttıran maddelerdir.

Antioksidan grubu katkı maddeleri, gıda sanayiinde bitkisel ve hayvansal yağ içeren maddelerin üretimi, depolanması, taşınması ve pazarlanması sırasında meydana gelecek otooksidasyondan kaynaklanan zararları önlemede kullanılan en önemli katkı maddeleridir. Antioksidanlar, diğer stabilizörler gibi düşük kaliteli gıda maddesinin kalitesini arttırmaz ve gıdalara herhangi bir yabancı tat ve koku da vermezler. Ancak bu maddeler, iyi kalitede ham madde, uygun bir imalat tekniği, elverişli ambalajlama ve depolama yöntemleri ile birlikte kullanıldığında ürünün kalitesini arttırırlar. Buna karşılık antioksidan özelliği yüksek fakat zehirleyici oluşlarından besin maddelerinde kullanılmayan antioksidanlar da vardır. Bir antioksidanın, besin maddelerinde kullanılmadan önce, sağlığa zararı olmadığı kesin olarak saptanmış olmalıdır. Ayrıca kullanılan antioksidanın adı ve miktarı da besin maddesinin etiketinde yazılı olmalıdır.

2.3.1. Besin Maderlerinde Doğal Olarak Bulunan Antioksidanlar

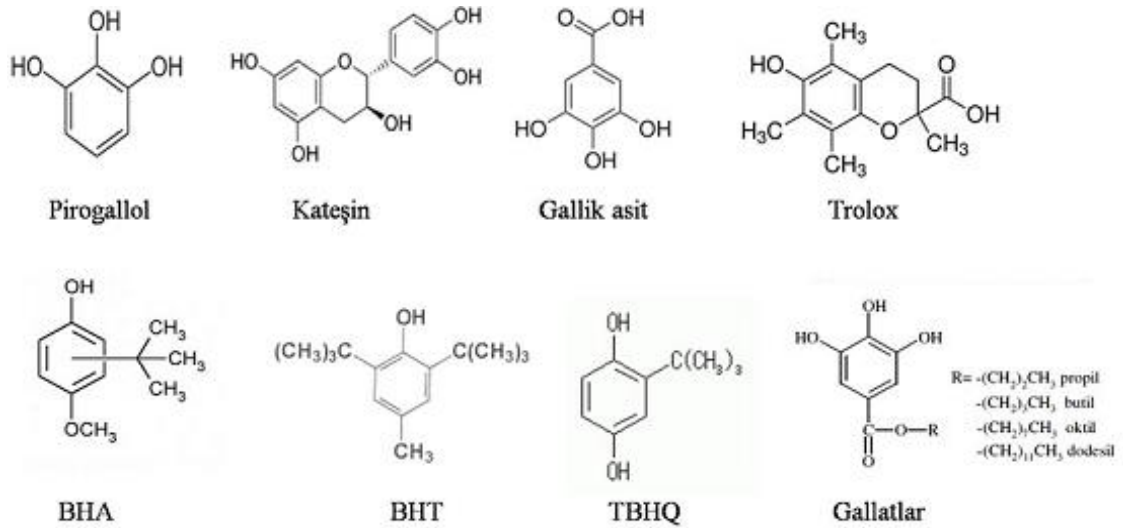
Antioksidan olarak kullanılan kimyasalların toksisiteleri nedeniyle, son yıllarda ilgi doğal antioksidanlar üzerine yoğunlaşmıştır. Çünkü doğal antioksidanlar, insanların yıllardır tükettikleri veya gıdalara karıştırdıkları katkılardır. Bitkiler (yağlı tohumlar, tahıllar, sebzeler, baklagiller, meyveler, baharatlar), hayvansal ürünler (peptidler, aminoasitler ve karotenoidler), enzimler (glutasyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz) ve bazı mikroorganizmalar en önemli doğal antioksidan kaynakları arasında yer almaktadır. Bunların antioksidan aktivitelerinin askorbik asit, α - tokoferol, β -karotenoidler, glutasyon, flavonoidler, kumarinler, fenolik asitler, selenyum, izotiyosiyanatlar ve alkaloit, klorofil, protein, amin gibi azotlu bileşikler gibi antioksidan özellikli bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir [53]. En aktif antioksidanlar fenolik ve polifenolik bileşiklerdir; askorbik asit, tokoferoller, karotenoidler ve squalen sayılabilir.

Maliyet nedeniyle doğal kaynaklı antioksidanlar yerine sentetik antioksidanlar yirminci yüzyılın başlarından beri kullanılmaktadır. Ancak sentetik antioksidanların toksik ve kanserojen olabileceğini ortaya koyan çalışmalar sonucunda bazı ülkelerde kullanılmalarına dair ciddi sınırlama veya yasaklar getirilmiştir. Sentetik antioksidanlar hakkındaki bu şüpheler, doğal antioksidanlara olan eğilimi arttırmış ve bu alandaki çalışmalar ise bitki kaynaklı antioksidanlar üzerinde yoğunlaşmıştır. Ancak α -tokoferol ve askorbik asidin antioksidan aktivitesi nispeten sentetik antioksidanlardan daha düşük olduğu bulunmuştur.

Doğal antioksidan bileşikler; sebzelerde, kabuklu ve kabuksuz meyvelerde, tohumlarda, yapraklarda, çiçeklerde, köklerde ve kabuklarda bol miktarda bulunmaktadır. Bundan dolayı bol miktarda sebze ve meyve tüketimi hastalıklara yakalanma riskini azalttığı gibi, kanser ve ölüm oranında düşüş meydana getirmektedir. Günlük hayatta taze olarak tüketilen birçok bitkinin antioksidan aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Yaygın bir şekilde kullandığımız brokoli, rezene, anason, nane, defne, reyhan, lavanta, karabiber, karanfil, mantar, ışgın ve kızılıcık bu bitkiler arasında sayılabilir.

2.3.2. Besinlere İlave Edilen Sentetik Antioksidanlar

Sentetik antioksidanlar genellikle gıda sektöründe, gıdaların raf ömrünün uzatılması amacı ile kullanılır. Gıda maddelerinde, peroksidasyon prosesini geciktirmek veya önlemek ancak antioksidan bileşiklerin ilavesiyle mümkün olabilir. Bu ise pahalı bir methodur. Gıda maddelerinin bozulmalarını engellemek için yıllardan beri sentetik antioksidan olarak BHT, BHA, TBHQ, gallatlar, trolox ve diğer sentetik antioksidanlar (pirogallol, gallik asit, kateşin) kullanılmaktadır (Şekil 2.22). Fenolik bileşik olmaları, onların etkili birer antioksidan olmalarını sağlar.



Şekil 2.22. Gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılan bazı sentetik antioksidanların yapısı

En yaygın olarak kullanılan bu sentetik antioksidanların bazı yan etkilere sahip olduğu bildirilmektedir. Bunun sonucu olarak tüketiciler bunların sağlık açısından güvenilirlikleri hakkında ciddi endişeler taşımaktadır [36]. Sentetik antioksidanlar geniş

bir kullanım alanına sahip olmasına rağmen, istenilmeyen yan etkilerinden dolayı son zamanlarda kullanımları ciddi bir şekilde sınırlandırılmıştır [37]. Birer doğal antioksidan olan α -tokoferol ve askorbik asit, BHA, BHT, TBHQ ve PG gibi sentetik antioksidanlardan daha düşük aktivite göstermelerine rağmen, besin maddelerinin üretim ve muhafazasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

2.4. Antioksidan Aktivitesi Tayin Metodları

Antioksidanlar, oksidatif stresle ilgili hastalıkları önleyebildikleri için, son yıllarda çok önemli bir konu haline gelmiştir. Gıdalardaki antioksidanların karmaşık bir yapıya sahip olmasından dolayı bu bileşiklerin ayrılması, çalışılması pahalı ve zordur. Buna rağmen in vitro koşullarda antioksidan kapasiteyi ölçmeyi amaçlayan birçok metod bulunmaktadır. Toplam radikal tutma parametresi (TRAP), trolox ekivalenti antioksidan kapasite (TEAC), oksijen radikalini absorplama kapasitesi (ORAC) ve demir III iyonu indirgeme gücü (FRAP) bunlardan bazılarıdır.

Bu metodlar kimyasal reaksiyonlarına göre başlıca iki gruba ayrılırlar:

Hidrojen atomu transferine (HAT) dayanan metodlar ve bir tek elektron transferine (ET) dayanan metodlardır. Bu metodlar, örneğin koruyucu antioksidan kapasitesi yerine radikal veya oksidan giderici kapasitesini ölçmeyi hedefler.

2.4.1. HAT-Temelli Metodlar

ORAC, TRAP ve crocin ağartma metodu HAT-temelli metodlardır. Bu metodlarda peroksil radikali üretmek üzere bir radikal başlatıcı kullanılır. Eklenen antioksidanlar radikaller için ortamdaki substrat ile yarışır. Peroksil radikali antioksidandan bir hidrojen atomu alır. Sonuç olarak peroksil radikali ve hedef molekül arasındaki reaksiyon inhibe edilir veya geciktirilir [43].

ORAC (Oksijen Radikalini Absorplama Kapasitesi) Metodu

Çeşitli ekstraktlar ve fitokimyasalların antioksidan aktivitesini ölçmek için kullanılır. Metod ilk olarak kullanılmaya başlandığında prob olarak fluoresan protein olan β -fikoeritrin ve peroksil radikal başlatıcısı olarak AAPH ile çalışılmıştır. Ama kullanılan probun fotostabil olmaması ve polifenolik maddelerle etkileşimi nedeniyle β -PE yerine fluoressein kullanılmıştır. Floressein protein olmayan sentetik bir probtur. Bu metodta AAPH, fluoressein fluoresansında azalmaya neden olur. Reaksiyon ilerledikçe

fluoresseini tüketilir. Antioksidan varlığında AAPH radikalleri giderilir ve fluoresans azalması inhibe edilir.

TRAP (Linoleik Asit Oksidasyonunun İnhibisyonu) Metodu

Plazma ve serumun toplam antioksidan kapasitesini ölçmek için geliştirilmiştir. Bu metod plazma antioksidanlarını okside etmek için ABAP radikal başlatıcısı tarafından peroksil radikallerinin üretilmesi ve meydana gelen oksidasyon sırasında tüketilen oksijenin ölçülerek izlenmesine dayanır. Daha sonra metod, oksitlenebilir bir lipid substratı olan linoleik asidin eklenmesiyle modifiye edilmiştir.

Crocin Ağartma Metodu

Crocin, doğal karotenoid türevidir. Metod SR başlatıcı AAPH tarafından, crocinin ağartmasını önlemede antioksidanların inhibisyon kapasitesini ölçer. Crocin safrandan elde edilen doğal pigment karışımı olduğu için çok fazla çeşitliliğe sahiptir. Karotenoidler gibi diğer gıda pigmentleri aynı dalga boyunda ışık absorblar. Bu da crocinin endüstriyel uygulamasını sınırlar [43].

2.4.2. ET-Temelli Metodlar

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

FCR ile Toplam Fenolik Bileşik Tayini

Metod başlangıçta proteinlerde fenol grubu içeren tirozin kalıntısı ile Folin-Ciocalteu ayırıcının etkileşiminden dolayı protein analizi için düşünülmüştür. Daha sonraları daha genişletilerek toplam fenol metodu olarak kullanımı artmıştır. FCR Cu^{+} , C vitamini gibi fenolik olmayan bileşikler tarafından da indirgenebildiği için fenolik bileşiklere spesifik değildir. Ancak fenolik bileşikler sadece bazik şartlar altında FCR ile reaksiyon verir. Fenolik antioksidanların varlığında ayıraçtaki Mo^{5+} 'in indirgenmesiyle renk sarıdan maviye döner ve 760 nm'de absorbans ölçülür. Basit ve

tekrarlanabilir bir metod olduğundan, fenolik antioksidan çalışmalarında rutin olarak kullanılmaktadır [43].

TEAC (Trolox Ekvivalenti Antioksidan Kapasite) Metodu

İlk kez 1993 yılında bulunan metod daha sonraki yıllarda geliştirilmiştir. Bu metotta metmiyoglobin/H₂O₂ sisteminin oluşturduğu ferrilmiyoglobin radikali ABTS ile etkileşerek bu maddenin katyonik radikalini üretir. Oluşan radikalın antioksidan tarafından giderilmesi 734 nm’de absorbansın azalmasıyla takip edilir. Antioksidan kapasite suda çözünen E vitamini analogu olan trolox konsantrasyonu (mM) olarak tayin edilir. TEAC, 1 mM troloxunla aynı aktiviteyi göstermek için gerekli olan antioksidan konsantrasyonunu ifade eder. En büyük dezavantajı sentetik ABTS radikalının biyolojik sistemlerde bulunmamasıdır [43].

FRAP (Fe³⁺ İyonu İndirgeme Gücü) Metodu

Bu metotta düşük pH’da ferrik tripiridiltriazin kompleksi (Fe³⁺-TPTZ) antioksidanların etkisiyle ferröz kompleksine (Fe²⁺-TPTZ) indirgenir. Oluşan kompleksin 593 nm’de absorbansı ölçülür. Böylece elektron vermenin antioksidanların toplam indirgeme kapasitesiyle lineer olduğu varsayılır. Bu yaklaşımın dezavantajı, metod okside olabilen bir substrat içermediğinden antioksidanların koruyucu özellikleri hakkında bilgi sağlamamasıdır [12, 43].

DPPH Radikali Giderme Metodu

DPPH radikali ticari olarak mevcut, stabil radikallerden biridir. Fenolik antioksidanların aktiviteleri üzerinde yapı etkisini çalışmak için kullanılan ilk sentetik antioksidanlardan biridir. Etanoldeki çözeltisi mor renklidir ve 515 nm’de maksimum absorbans verir. Antioksidan tarafından indirgenince rengi soluk olduğu için reaksiyonun ilerleyişi spektrofotometre ile izlenir. DPPH’in renginin solması antioksidan konsantrasyonu ile orantılıdır. Başlangıçtaki ilk DPPH konsantrasyonunu %50 azaltmak için gerekli antioksidan miktarı antiradikal etkinliği ifade eder ve EC₅₀ (mg/mL) olarak isimlendirilir. EC₅₀ değeri antioksidan aktiviteyi ölçmek için daha yaygın olarak kullanılan bir parametredir.

2.4.3. Lipid Oksidasyon Markerlerini Ölçen Metodlar

Lipid model sistemlerinde reaktantların kaybı, SR oluşumu, primer ve sekonder oksidasyon ürünlerinin oluşumunun tayin edilmesi lipid oksidasyonunda en yaygın kullanılan indikatörlerdir. Peroksit değeri (POV), tiyobarbütirik asit reaktif türlerin (TBARS) tayini ve kısa zincirli yağ asitlerinden kaynaklanan iletkenliğin (Ransimat metodu) ölçümü lipid oksidasyonunun tayininde en sık kullanılan metodlardır. POV tayininde iki farklı metod kullanılır. İyodometrik yöntem; oluşan peroksitlerin iyodür ile reaksiyona girerek iyot oluşturması ve oluşan iyodun titrimetrik yöntemle tayin edilmesi esasına dayanır. Ferrik tiyosiyanat metodu ise, oluşan peroksitlerin Fe^{2+} iyonlarını Fe^{3+} iyonlarına yükseltgemesi ve ortama eklenen tiyosiyanat ile oluşturulan kompleksin spektrofotometrik olarak tayinine dayanır [65]. TBARS tayini ile aldehitler, ketonlar, asitler ve hidrokarbonlar gibi sekonder oksidasyon ürünlerinin oluşumu tayin edilir. Sadece lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehite spesifik olmayıp, diğer okso bileşikleri de ölçer. Ransimat yönteminde antioksidan aktivite, yağlarda bulunan doymamış yağ asitlerinin yüksek sıcaklıkta peroksidasyonu sonucu oluşan bozunma ürünlerinin su içine absorbe edilerek, Ransimat cihazı ile suyun iletkenliği tayin edilir.

2.4.4. Diğer ROT Giderici Kapasiteleri Ölçen Metodlar

In vitro koşullarda çeşitli radikal üretici sistemler kullanılarak antioksidanların SR tuzaklama yeteneklerinin ölçümü için bazı metodlar kullanılmaktadır.

$O_2^{\bullet-}$ Radikali Giderme Kapasitesi Tayini

NADH/PMS/ O_2 sistemi ve riboflavin/metiyonin sisteminde flavinin fotokimyasal indirgenmesi ile non-enzimatik olarak [21] veya hipoksantin/ksantin oksidaz sistemi ile enzimatik olarak [88] süperoksit radikali üretilir. Radikal giderme aktivitesi substrat olarak kullanılan NBT'nin indirgenmesiyle tayin edilir.

OH^{\bullet} Radikali Giderme Kapasitesi Tayini

Biyolojik olarak hidroksil radikali büyük ölçüde Fenton reaksiyonu ile oluştuğu için in vitro koşullarda Fe^{2+}/H_2O_2 sistemiyle üretilir ve antioksidanın hidroksil radikalini giderebilme gücü ölçülür. Ancak pek çok antioksidan aynı zamanda metal şelatörü olduğu için Fe^{2+} aktivitesini değiştirebilir. Bu yüzden değerlendirilen antioksidanın iyi

bir şelatlayıcı mı yoksa hidroksil radikali giderici mi olduğu kesin olarak anlaşılamaz buda metodun dezavantajıdır [11].

Peroksinitrit (ONOO⁻) Giderici Kapasitenin Tayini

Güçlü bir antioksidan değildir, ancak fizyolojik pH'ta protonlanmış hali olan peroksinitroz asit çok güçlü bir antioksidandır. Özellikle protein hasarından sorumlu olduğu düşünülür. Bu ölçümler peroksinitrit tarafından tirozinin nitrolanmasının inhibisyonuna dayanır. Nitrozaminlerin HPLC ile ayırımına dayanan ve uzun süren bir metottur [11].

2.5. Çalışmada Kullanılan Bitkiler ve Özellikleri

Bu tez çalışmasında yonca ve asma yapraklarının *in vitro* koşullarda antioksidan aktiviteleri çeşitli metodlarla incelenmiştir.

Tablo 2.3. Çalışmada kullanılan bitkiler ve özellikleri

TÜRKÇE ADI	YONCA	ASMA
LATİNCE ADI	<i>Medicago sativa</i> L.	<i>Vitis vinifera</i> L.
FAMİLYASI	<i>Fabaceae</i> (Baklagiller)	<i>Vitaceae</i> (Asmagiller)
KULLANILAN KISIM	Yaprak	Yaprak

2.5.1. Yonca (*Medicago sativa* L.)

Günümüzde ekonomik değeri olmayan yabancı bitkilerin daha sonraki yıllarda farklı kullanım alanlarında besinsel ve ekonomik değer kazanması söz konusu olabileceğinden bu bitkilerin bitkisel özelliklerinin belirlenmesi ve muhafaza altına alınması gereklidir [64]. 60'dan fazla tür içeren *Fabaceae* familyasına ait olan yonca bu bitkilerden birisi olabilir (Şekil 2.23).



Şekil 2.23. Yonca (*Medicago sativa* L.) bitkisi

Protein, vitaminler (A, C, E, K, B₁, B₆) ve mineraller (folik asit, kalsiyum, potasyum, demir, magnezyum, çinko gibi) açısından zengindir. Yağ, protein ve karbonhidrat sindirimini kolaylaştıran sekiz sindirim enzimi ayrıca saponin ve yüksek oranda demir içermektedir.

Alternatif tıpta; vücuda kuvvet ve enerji verir. Kanı ve karaciğeri detoksifiye edici özellikleri bulunmaktadır. Toksik maddeleri vücuttan uzaklaştırması ve enfeksiyonlara karşı iyi bir savaşım vermesi gibi önemli fonksiyonları vardır. Besin değeri yüksek bir besin olduğu için kansızlık çekenlere faydalıdır. Romatizmal ve baş ağrılarını giderir. İshali önler. Şeker hastalığında faydalı bir besindir. Ateş düşürücüdür. Irak ve Türkiye’de eklem iltihaplanması tedavisinde, ABD’de kansere karşı kullanılmaktadır. Çinliler onu 6. yüzyıldan beri böbrek taşı düşürmeye yardımcı, vücuttaki fazla suyu atmak, romatizmal rahatsızlıklar, şişkinlik ve gaz gidermek için kullanmaktadır. İngilterede de ise saç dökülmelerini önlemek amaçlı şampuan şeklinde kullanılır. İdrar yolları enfeksiyonlarına iyi gelir. Sinirleri teskin eder. Mide ve bağırsakların düzenli çalışmasını sağlar. Astım, prostat, ülser gibi birçok sağlık sorununda etkilidir. Hipertansiyona iyi gelen yonca, yüksek fiber düzeyi nedeniyle kolesterol düzeyleri üzerinde dengeleyici etki yapar ve kandaki kolesterol seviyesinin düşürülmesine de yardımcı olur. Damar sertliği sorununa karşı da etkili çözümler sunmaktadır. İçerdiği yüksek demir oranı nedeni ile anemi rahatsızlığına karşı da kullanılan yonca cildi yeniler ve daha genç görünmeye yardımcı olur. Ayrıca kadınlarda östrojen seviyesini artırır ve menopoz dönemi belirtilerinin azaltılmasında etkilidir.

2.5.2. Asma (*Vitis vinifera* L.)

Kaynak ve literatür taramaları sonucunda **fenolik bileşikler** yönünden; asma yaprakları, antosiyanidinden dolayı renklidir ve tanen yönünden zengindir. Yapılan kromatografik analizlerde meyve ve yapraklarında kateşin, epikateşin, gallokateşin ve epikateşin 3-O-gallat gibi kondanse tanenler ile quersetin, rutin, luteolin gibi flavonların da bulunduğu tespit edilmiştir [81]. **Organik asit** yönünden; tartarik asit, malik asit, oksalik asit ve az miktarda gliserik asit içerir. **Vitaminler ve mineraller** yönünden; bitkinin meyve ve yapraklarında bulunan B vitamini bileşiklerinin miktarı bitkinin gelişim evrelerine ve yetiştiği bölgedeki çevresel faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Yapraklarındaki C vitamini oranı ise meyvedekinden fazladır. Karotenoidler açısından zengindir. Karotenoid miktarı özellikle bitkinin çiçek açtığı dönemde en yüksek miktara ulaşmaktadır. **Enzim** yönünden ise; bitkinin değişik kısımlarında katalaz, askorbik asit oksidaz, peroksidaz, polifenol oksidaz, pektin metil esteraz ve pektin esteraz mevcuttur [94]. **Terpenoid bileşikler** yönünden; kök ve yapraklarında 16 β -hidroksioleanolik asit ve türevleri, α - ve β -amirenol, tarakserol, taraksasterol, sikloartenol, 24-metilsikloartenol, oleanolik asit ve ursolik asit gibi triterpenik bileşikler eser miktarda bulunmaktadır. Yapılan araştırmalarda bazı *V. vinifera* L. türlerinin yaprak ve filizlerinde uçucu yağa rastlanmıştır (Şekil 2.24).



Şekil 2.24. Asma (*Vitis vinifera* L.) bitkisi

Geleneksel tıpta; asma yaprakları ishal, sarılık, dizanteri, karaciğer iltihabı, göz nezlesi, varis ve hemoroid, inflamatuvar ve SR'lere bağlı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Asma yaprağının kaynatılması ile elde edilen su düzenli olarak

içilmeye devam edilirse alkolü bırakmaya yardımcı olur. Vücuda kuvvet ve rahatlık verir. Toplardamarları güçlendirici etkiye sahip olan asma yaprakları bacak damarlarındaki şişmelere karşı ve rahim kanamalarını durdurmaya yardımcı olur. Ayrıca, gerek asma yaprağı gerekse kuru üzüm beynin daha iyi çalışmasını sağlar ve dolayısıyla hafızayı kuvvetlendirir. [9, 52].

3. MATERYAL VE METODLAR

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki Örnekleri

Deneyleerde kullanılan bitkisel materyallerden; asma Marmaracık'tan (Çorlu-İstanbul) yonca ise Vakıflar köyündeki (Çorlu-İstanbul) bahçelerden temin edildi. Bitkilerin yaprak kısımları saplarından ayrıldıktan sonra güneş almayan bir yerde oda sıcaklığında tamamen kuruması için bekletildi. Ardından kurutulmuş materyaller öğütülerek toz haline getirildi ve kullanılıncaya kadar renkli kaplarda ve karanlıkta muhafaza edildi.

3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Ekipmanlar

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

Çalışmada çalkalamalı su banyosu (Clifton 100-400rpm; termostatl), spektrofotometre (Shimadzu UV-1601), pH-metre (WTW pH 330i), analitik terazi (Gec Avery), vortex (Fisons), ev tipi blender (Tefal 400W) evaporatör (Buchi R-200), santrifüj (Nüvefuge CN180), soğutmalı santrifüj (Hettich 38 R), ısıtıcı ve manyetik karıştırıcı (Chiltern HS31), mikro pipetler ve eppendorflar kullanılan başlıca ekipmanlardır.

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Çözeltiler

% 2'lik Na₂CO₃ Çözeltisi: 2 g Na₂CO₃ tartılarak destile su ile balon jodede 100 mL'ye tamamlandı.

Folin-Ciocalteau Reaktifi: Ticari olarak satın alındığı şekilde kullanıldı.

% 5'lik Sodyum Nitrit Çözeltisi: 2.5 g NaNO₂ tartılarak balon jodede destile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

% 10'luk Al(NO₃)₃.9H₂O Çözeltisi: 5 g Al(NO₃)₃.9H₂O tartılarak balon jodede destile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

% 4.3'lük NaOH Çözeltisi: 4.3 g NaOH tartılarak balon jodede destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

0.1 M Fosfat Tamponu (pH=7.4): KH_2PO_4 (13.609 g/L) ve Na_2HPO_4 (14.196 g/L) çözeltilerinin pH=7.4 olacak şekilde (yaklaşık 60/225 mL oranında) karıştırılması ile hazırlandı.

40 mM H_2O_2 Çözeltisi: 0.409 mL H_2O_2 otomatik pipetle çekilerek balon jodede 0.1 M fosfat tamponu (pH=7.4) ile 100 mL'ye tamamlandı.

0.2 M Fosfat Tamponu (pH=6.6): KH_2PO_4 (27.218 g/L) ve Na_2HPO_4 (28.392 g/L) çözeltilerinin pH=6.6 olacak şekilde karıştırılması ile hazırlandı.

% 1'lik $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ Çözeltisi: 1 g $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ tartılarak balon jodede destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

% 10'luk TCA Çözeltisi: 10 g Trikloroasetik asit tartılarak destile suda çözüldü ve balon jodede 100 mL'ye tamamlandı.

% 0.1'lik FeCl_3 Çözeltisi: 0.1666 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tartılarak destile suda çözüldü ve balon jodede 100 mL'ye tamamlandı.

2 mM FeCl_2 Çözeltisi: 0.0398 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ tartılarak destile suda çözüldü ve balon jodede 100 mL'ye tamamlandı.

5 mM Ferrozin Çözeltisi: 0.0616 g ferrozin tartılarak destile suda çözüldü ve balon jodede 25 mL'ye tamamlandı. (Ferozin: 3,2-piridil-5,6-difenil 1,2,4 triazin 4'-4" sülfonilik asit sodyum tuzu)

1 mM DPPH Çözeltisi: 0.01972 g DPPH tartılarak etanolde çözüldü ve balon jodede 50 mL'ye tamamlandı.

0.1 mM DPPH Çözeltisi: 1 mM DPPH çözeltisinden 10 mL alınarak etanolle balon jodede 100 mL'ye tamamlandı. (Günlük hazırlanır ve ışıktan korunur)

156 μM NBT Çözeltisi (Nitrotetrazolium blue klorür): 0.0128 g NBT tartılarak 0.1 M fosfat tamponunda (pH=7.4) çözüldü ve balon jodede 100 mL'ye tamamlandı.

468 μM NADH Çözeltisi (Nikotin amid adenin di nükleotid): 0.0332 g NADH tartılarak 0.1 M fosfat tamponunda (pH=7.4) çözüldü ve balon jodede 100 mL'ye tamamlandı.

60 μM PMS Çözeltisi (Phenazine metha sülfat): 0.0018 g PMS tartılarak 0.1 M fosfat tamponunda (pH=7.4) çözüldü ve balon jodede 100 mL'ye tamamlandı.

4 mM Amonyum Molibdat Çözeltisi: 0.2964 g Amonyum molibdat tartılarak destile suda çözüldü ve balon jodede 60 mL'ye tamamlandı.

28 mM Sodyum Fosfat Çözeltisi: 0.2754 g Sodyum fosfat tartılarak destile suda çözüldü ve balon jojede 60 mL'ye tamamlandı.

0.6 M Sülfürik Asit Çözeltisi: 1.92 mL der. H₂SO₄ (18.76 M) çözeltisinden pipetle alınarak içinde bir miktar destile su bulunan 60 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve destile su ile tamamlandı.

Belirteç Çözeltisi (Fosfomolibden Deneyi): Eşit miktarlarda alınan amonyum molibdat, sodyum fosfat ve sülfürik asit çözeltilerinin karıştırılmasıyla hazırlandı.

7 mM ABTS Çözeltisi: 8 mg ABTS alınır 1 mL suda çözülür. 13.2 mg potasyum persülfat 10 mL suda çözülür. Çözeltilerden, 0.5'er mL karıştırılır ve 12-16 saat oda sıcaklığında karanlıkta bekletilir. ABTS çözeltisi kullanılmadan önce absorbanı 734 nm'de 0.7±0.025 olacak şekilde 0.1 M fosfat tamponuyla (pH=7.4) seyreltilir.

0.04 M Fosfat Tamponu (pH=7): KH₂PO₄ (5.44 g/L) ve Na₂HPO₄ (5.68 g/L) çözeltileri pH=7 olacak şekilde karıştırıldı.

Linoleik Asit Emülsiyonu: 175 mg Tween-20 ve 155 µL linoleik asidin fosfat tamponuyla 50 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.

% 75'lik Etanol Çözeltisi: 375 mL saf etil alkol alınarak destile su ile balon jojede 500 mL'ye tamamlandı.

% 30'luk NH₄SCN Çözeltisi: 30 g NH₄SCN tartılarak destile suda çözüldü, balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

20 mM FeCl₂ Çözeltisi: 0.398 g FeCl₂.4H₂O tartılarak % 3.5'luk HCl ile balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

% 3.5'luk HCl Çözeltisi: 9.46 mL der. HCl (% 37'lik) çözeltisinden pipetle alınarak içinde bir miktar destile su bulunan 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve destile su ile tamamlandı.

% 80'lik Aseton Çözeltisi: 40 mL saf aseton alınarak destile su ile balon jojede 50 mL'ye tamamlandı.

% 3'lük Sülfosalisilik Asit Çözeltisi: 3 g 5-sülfosalisilik asit.2H₂O tartılarak destile suda çözüldü, balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

6 M H₃PO₄ Çözeltisi: 7.95 mL H₃PO₄ alınarak destile su ile 20 mL'ye tamamlandı.

Ninhidrin Çözeltisi: 1.25 g ninhidrinin 30 mL glacial asetik asit ve 20 mL H₃PO₄ (6 M) çözeltilerinde çözülmesiyle hazırlandı.

3.2. Metodlar

3.2.1. Ekstraktların Hazırlanışı

Kurutulan bitkisel materyaller, blender yardımıyla öğütülerek toz haline getirildikten sonra su, aseton ve metanol çözücüleri kullanılarak ekstraktları hazırlandı.

Su ekstraksiyonu için 25 g öğütülmüş bitki örneği, 400 mL suda yaklaşık 30 dk boyunca manyetik karıştırıcıda ısıtılarak karıştırıldı. Elde edilen su ekstraktları süzgeç kağıdından süzüldü ve süzüntülerin çözücüleri evaporatörde 40°C’de uçuruldu.

Aseton ve metanol ekstraksiyonu için 25’şer g bitki örneği 500 mL çözücü içinde oda sıcaklığında çalkalamalı su banyosunda 200-300 rpm’de 3 saat inkübe edildi. Elde edilen ekstraktlar, süzgeç kağıdından süzüldü ve süzüntülerin çözücüleri evaporatörde 40°C’de uçuruldu.

Ekstrelerin susuz kalıntıları 0.001 g’lık porsiyonlara ayrılarak eppendorflara konuldu ve antioksidan ile ilgili analiz çalışmalarında kullanılmaya kadar +4°C’de derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.2.2. Toplam Fenolik Bileşik (TPC) Tayini

Yonca ve asma bitkilerinin su, aseton ve metanol ekstraktlarında bulunan toplam fenolik madde içerikleri Slinkard ve Singleton tarafından modifiye edilen Folin-Ciocalteau metoduna (FCR) göre belirlenmiştir [80]. FC reaktifi fosfotungstik ($H_3PW_{12}O_{40}$) ve fosfomolibdik ($H_3PMO_{12}O_{40}$) asitlerin karışımı olup fenol oksidasyonu sırasında bu oksitler mavi renkli bileşiklere indirgenir. Bu renk değişimi polifenolik bileşik miktarı ile orantılı olup 760 nm’de spektrofotometrede takip edilir. Standart fenolik bileşik olarak pirogallol ve gallik asit kullanıldı.

Bitkilerin 1000 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan su, aseton ve metanol ekstraktlarından 1 mL alındı. Destile su ile hacimler 46 mL’ye tamamlandıktan sonra 1 mL Folin belirteci eklendi. 3 dk sonra % 2’lik Na_2CO_3 çözeltisinden 3 mL katılarak oda şartlarında 2 saat çalkalamalı su banyosunda 250 rpm’de tutuldu. Örnek yerine destile su içeren şahit denemeye karşı, 760 nm’de absorbans ölçüldü (3 ölçüm alındı).

50-250 µg/mL olacak şekilde hazırlanan standartlar (gallik asit ve pirogallol) için de aynı deneme yapıldı. Okunan absorbans ile konsantrasyon arasında çizilen grafiklerin denklemlerinden, örneklerin toplam fenolik madde miktarları mg olarak hesaplandı.

3.2.3. Toplam Flavonoid İçeriğinin Tayini

Bitkilerin su, aseton ve metanol ekstraktlarında bulunan toplam flavonoid madde içeriği Zhishen ve arkadaşlarının uyguladığı metoda göre belirlendi [97].

Bitkilerin 1000 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan su, aseton ve metanol ekstraktlarından 10 mL alındı. Üzerine 1 mL sodyum nitrit (% 5'lik) ilave edilerek 6 dk bekletildi ve flavonoid-alüminyum kompleksi oluşturmak için 1 mL alüminyum nitrat (% 10'luk) eklendi. 6 dk sonra 10 mL NaOH (% 4.3'lük) ilave edildi ve toplam hacim destile su ile 25 mL'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında 15 dk sonra, son çözelti iyice karıştırıldı ve 510 nm'de şahite karşı absorbansı ölçüldü.

Standartlar (gallik asit ve kateşin) için de aynı deneme yapıldı. Okunan absorbans ile konsantrasyon arasında çizilen grafiklerin denklemlerinden, örneklerin toplam flavonoid madde miktarları mg kateşin/g kuru ekstrakt ve mg gallik asit/g kuru ekstrakt olarak tanımlandı.

3.2.4. H₂O₂ Giderme Aktivitesinin Tayini

Bitki ekstraktlarının H₂O₂ giderme aktivitesi Ruch ve arkadaşlarının belirledikleri metoda göre yapıldı [73]. Bu metotta, reaksiyon ortamına eklenen belirli miktardaki hidrojen peroksit çözeltisinin bitki ekstraktı tarafından yıkılması 230 nm'deki absorbans değişimiyle izlenir.

3.4 mL fosfat tamponu (100 mM, pH=7.4) ve 0.6 mL H₂O₂ çözeltisine (100 mM, pH=7.4 fosfat tamponunda 40 mM) 1 mL bitki ekstraktı ilave edildi. Absorbans 10 dk sonra 230 nm'de okundu. Kontrol; fosfat tamponu (100 mM, pH=7.4) ve H₂O₂ çözeltisi içermektedir. Bitki örnekleri 125 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlandı. Standart olarak BHA, BHT, trolox, askorbik asit ve α-tokoferol kullanıldı. Aşağıdaki denkleme göre, % H₂O₂ giderme etkisi değerleri hesaplandı. Burada,

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ giderme etkisi (\%)} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

A_{kontrol} = Kontrolün absorbansı

$A_{\text{örnek}}$ = Örnek ya da standartların absorbansı

göstermektedir.

3.2.5. Toplam Ferrik İyonlarını (Fe⁺³) İndirgeme Kapasitesinin Tayini

Bitki ekstraktlarının toplam indirgeme kapasitesi tayini Oyaizu metoduna göre yapıldı [61]. Ortamdaki indirgen madde Fe³⁺ iyonlarını Fe²⁺ iyonlarına indirger ve FeCl₃ ilavesiyle oluşan Prusya mavisi rengindeki kompleksin absorbansı ölçülür. Yüksek absorbans değeri yüksek indirgeme kapasitesinin göstergesidir.

1 mL örneğe, 2.5 mL fosfat tamponu (0.2 M, pH=6.6) ve 2.5 mL % 1'lik K₃Fe(CN)₆ eklendi. Karışım 50°C'de 20 dk inkübe edildikten sonra 2.5 mL TCA (% 10'luk) ilave edildi ve 2000 rpm'de 10 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası çözeltilinin üst tabakasından 2.5 mL alınarak 2.5 mL destile su ve 0.5 mL FeCl₃ (% 0.1'lik) çözeltisi ile karıştırıldı. 700 nm'de absorbans ölçüldü. Standart olarak BHA, BHT, α-tokoferol ve askorbik asit kullanıldı.

3.2.6. Demir (II) İyonlarını Şelatlama Aktivitesinin Tayini

Farklı konsantrasyonlardaki bitki ekstraktlarının Fe⁺² iyonlarını şelatlama aktivitesi Zhao ve arkadaşları tarafından modifiye edilen metoda göre belirlendi [98]. Metod Fe²⁺ iyonlarını bağlamak üzere, güçlü bir demir şelatlayıcı olan ferrozin reaktifi ile ortamda bulunan metal bağlayıcı bileşiklerin yarışmasına dayanır. Şelatlama gücü yüksekse kırmızı renkli Fe²⁺/ferrozin kompleksinin oluşumu engellenir.

0.4 ml bitki örneğine 0.05 mL FeCl₂ (2 mM) çözeltisi eklendi. Reaksiyon 0.2 mL ferrozin (5 mM) çözeltisi ilavesiyle başlatıldı. Toplam hacim etil alkolle ya da metil alkolle 4 mL'ye ayarlandı. Sonra karışım vorteksle hızlıca karıştırılıp 10 dk oda sıcaklığında bekletildi. Bu süre sonunda absorbansları 562 nm'de okundu. Kontrol; FeCl₂ ve ferrozin içermektedir. Standart olarak askorbik asit, EDTA, BHA ve BHT kullanıldı. Aşağıdaki denkleme göre, % metal şelatlama etkisi değerleri hesaplandı. Burada,

$$\text{Metal şelatlama etkisi (\%)} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

A_{kontrol} = Kontrolün absorbansı

A_{örnek} = Örnek ya da standartların absorbansı

göstermektedir.

3.2.7. DPPH• Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini

SR yakalama etkinliği deneyi DPPH• (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikali kullanılarak Blois'in metoduna göre çalışıldı [14]. Metod ekstraktların bir proton veya bir elektron verebilme yeteneğinin, mor renkli DPPH özeltisinin rengini aması esasına dayanır. Reaksiyon karışımının absorbansının düşmesi yüksek SR giderme aktivitesinin göstergesidir.

1mL 0.1 mM DPPH üzerine farklı konsantrasyonlardaki bitki ekstraktı ve standart çözeltilerden 3 ml eklendi. Vorteksle karıştırıldıktan sonra oda şartlarında karanlıkta 30 dk bekletildi. 517 nm'de absorbansları okundu. Kontrol olarak sadece etil alkol kullandı. Bitki örnekleri 25-125 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlandı. Standart olarakta aynı konsantrasyonlarda askorbik asit, α-tokoferol ve BHA kullandı. Aşağıdaki denkleme göre, % DPPH• yakalama etkisi değerleri hesaplandı. Burada,

$$\text{DPPH}\bullet \text{ yakalama etkisi (\%)} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

A_{kontrol} = Kontrolün absorbansı

$A_{\text{örnek}}$ = Örnek ya da standartların absorbansı

göstermektedir.

3.2.8. Süperoksit Anyon Radikalini Giderme Aktivitesinin Tayini

Bitki ekstraktlarının süperoksit anyon radikallerini giderme aktivitesi, nitroblue tetrazolium (NBT) ürününün spektrofotometrik ölçümüyle belirlendi. [59, 97]. Deney koşullarında NADH/PMS/O₂ sistemi ile üretilen süperoksit radikali sarı renkli NBT'yi mavi-mor renkli formazon türevine indirger. Süperoksit radikali giderme aktivitesi olan bileşikler varlığında düşük absorbans değerleri elde edilir.

1 mL NBT özeltisi (0.1M, pH=7.4 fosfat tamponunda 156 µM) ve 1 mL NADH özeltisi (0.1M, pH=7.4 fosfat tamponunda 468 µM) ve 1 mL bitki ekstraktı karıştırıldı. Karışıma 100 µL PMS özeltisi (0.1M, pH=7.4 fosfat tamponunda 60 µM) ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. Karışım 25°C'de 5 dk inkübe edildi ve absorbansı 560 nm'de ölçüldü. Bitki örnekleri 50 ve 125 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlandı. Standart olarakta aynı konsantrasyonlarda BHA, BHT ve askorbik asit kullandı. Aşağıdaki denkleme göre, % inhibisyon değerleri hesaplandı. Burada,

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

A_{kontrol} = Kontrolün absorbansı
göstermektedir.

$A_{\text{örnek}}$ = Örnek ya da standartların absorbansı

3.2.9. ABTS•⁺ Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini

Bitki ekstraktlarının ABTS•⁺ radikali giderme aktivitesi Re ve arkadaşlarının metoduna göre belirlendi [71].

ABTS•⁺ radikali, 7mM ABTS çözeltisi ve 2.45 mM potasyum persülfat çözeltisi arasındaki reaksiyonla oluşturuldu. 12 saat oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. Kullanmadan önce fosfat tamponuyla (0.1M, pH=7.4), absorbans 734 nm'de 0.7 ± 0.025 olacak şekilde seyreltildi.

1 mL ABTS çözeltisi, 3mL standart çözeltilerine (25-125 µg/mL α-tokoferol) eklendi. 30 dk sonra 734 nm'de absorbans okundu. Aşağıdaki denkleme göre, % inhibisyon değerleri hesaplandı. Burada,

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

A_{kontrol} = Kontrolün absorbansı
göstermektedir.

$A_{\text{örnek}}$ = Örnek ya da standartın absorbansı

3.2.10. Fosfomolibden Metodu ile Toplam Antioksidan Aktivite Tayini

Bitki ekstraktlarının toplam antioksidan kapasiteleri Prieto ve arkadaşlarının metoduna göre belirlendi [70].

Değişik konsantrasyonlardaki bitki ekstraktları ve standart çözeltilerin 400 µL'sine, amonyum molibdat (4 mM), sodyum fosfat (28 mM) ve sülfürik asit (0.6 M) içeren belirteç çözeltisinden 3.6 mL ilave edilerek karıştırıldı. Reaksiyon karışımı su banyosunda 90°C'de 90 dk inkübe edildi. Soğutulduktan sonra fosfomolibden kompleksinin absorbansı şahite karşı 695 nm'de ölçüldü.

Bitki örnekleri 25-125 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlandı. Standart olarak askorbik asit ve α-tokoferol kullanıldı. Askorbik asit için yapılan denemeden okunan absorbans ile konsantrasyon arasında çizilen grafik denkleminde bitki ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri askorbik asit ekivalenti (mg A.asitE/g ekstrakt) olarak ifade edildi.

3.2.11. Prolin Tayini

Prolin içeriği Bates tarafından geliştirilen bu metoda göre yapıldı [10]. Standart olarak 20-100 µg/mL konsantrasyonlarındaki prolin çözeltisi kullanıldı.

50 mg bitki ekstraktı, 10 mL sülfosalisilik asit (% 3'lük) içinde homojenize edildi ve filtre kağıdından süzüldü. 2 mL süzüntü, 2 mL ninhidrin çözeltisi (1.25 g ninhidrin + 30 mL glasial asetik asit + 20 mL 6 M H₃PO₄) ve 2 mL glasial asetik asitle karıştırıldı ve 100°C'de 1 saat tutuldu. Reaksiyon, karışım buz banyosuna alınarak durduruldu. Reaksiyon karışımına 4 mL toluen ilave edildi ve 15-20 sn vortekslendi. Toluene fazı emdirildi ve şahit saf toluene karşı absorban 520 nm'de okundu.

Saf prolinle de aynı deneme yapıldı ve okunan absorban ile konsantrasyon arasında çizilen kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklemden bitki ekstraktlarının içerdiği prolin miktarları µg prolin/g kuru ekstrakt olarak hesaplandı.

3.2.12. Karotenoid Tayini

Bitkisel materyallerin karotenoid içeriğinin tayini Alasalvar ve arkadaşlarının belirledikleri yöntemle yapıldı [2].

300-500 mg kuru bitki örneği, aseton-su (9:1 v/v) karışımının 5 mL'si ile ekstrakte edildi ve 4°C'de 10 dk 3000 rpm'de santrifüjlendi. Açık renkli süpernatant alındı ve ekstraksiyon, 3 mL aseton-su (9:1 v/v) karışımı ile 5-6 kez renksiz oluncaya kadar tekrarlandı. Ekstraktlar birleştirildi ve şahit olarak asetona karşı 471 nm'de absorban ölçümü yapıldı. Aşağıdaki denkleme göre toplam karotenoid madde miktarının % değerleri hesaplandı.

$$\text{Toplam Karotenoid İçeriği (\%)} = \frac{A_{\text{max}} \times 25 \text{ mL aseton} \times 100}{\text{örnek ağırlığı (mg)}}$$

3.2.13. Klorofil Tayini

Bu çalışmada bitkilerin klorofil içeriği Arnon tarafından modifiye edilen bu metoda göre belirlendi [5].

100 mg taze bitki materyali, eser miktardaki CaCO₃ ve 6 mL soğuk asetonla (% 80'lik) homojenize edildi. Yaprak homojenatları 20 dk boyunca 15°C'de 3500 rpm'de santrifüjlendi. Süpernatantların yaklaşık olarak 4.8-5.8 mL'si alındı. Toplam klorofil içeriği, süpernatantların 645 ve 663 nm'de absorbanlarının ölçümü ile belirlendi.

Analiz 3 kez yapıldı. Bitkilerin klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil içerikleri aşağıdaki formüllere göre taze ağırlık göz önünde bulundurularak mg/kg cinsinden hesaplandı. Burada,

$$\text{Klorofil a miktarı (mg/kg)} = 12.7 \times A_{663} - 2.69 \times A_{645}$$

$$\text{Klorofil b miktarı (mg/kg)} = 22.9 \times A_{645} - 4.68 \times A_{663}$$

$$\text{Toplam klorofil miktarı (mg/kg)} = 20.2 \times A_{645} + 8.02 \times A_{663}$$

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

Bu metodta linoleik asitin antioksidan madde varlığında ve antioksidan madde olmadığı durumda okside olma derecesi belirlenerek antioksidan aktivitesi ölçülmektedir. Metod oksidasyon sonucu oluşan peroksitleri ölçmeye dayanır [34]. Linoleik asit ve antioksidan madde içeren bir sistem oluşturulur ve antioksidan maddenin lipid peroksidasyonunu inhibe etme derecesi (LPI) antioksidan aktivitesinin bir göstergesi olarak kabul edilir. Belirli aralıklarla inkübasyondaki karışımdan örnek alınarak spektrofotometrik ölçüm ile peroksitlerin oluşumu takip edilir. Yüksek absorbans değeri yüksek peroksit konsantrasyonunu ifade eder. Analiz Pan vd., (2007), Mitsuda vd., (1966)'nin uyguladığı yöntemler temel alınarak uygulanmıştır [56, 65].

Değişik konsantrasyonlardaki bitki ekstraktları ve standart çözeltilerin 1 mL'sine 1.5 mL fosfat tamponu (0.04 M, pH=7) ve 2.5 mL linoleik asit emülsiyonu eklendi. Çözeltiler karıştırıldıktan sonra 37°C'de karanlıkta inkübe edildi. 10 saatte bir bu çözeltilerden 0.1 mL alınıp üzerine 3.7 mL % 75'lik etil alkol ve 0.1 mL % 30'luk NH₄SCN eklendi. 3 dk sonra reaksiyon karışımlarına 0.1 mL FeCl₂ (20 mM) çözeltisi eklendi. 5 dk sonra oluşan rengin absorbansı 500 nm'de okundu. Lipid oksidasyonu sonucu oluşan peroksitler Fe⁺² iyonlarını Fe⁺³ yükseltgeç ve oluşan Fe⁺³ tiyosiyanat ile reaksiyona girerek 500 nm'de maksimum renge sahip bir kompleks oluşturur. Bu nedenle karışımın absorbansı 500 nm'de ölçülmüştür. Aynı koşullar antioksidan madde içermeyen kontrol örneği için de uygulanmıştır. Kontrol; 2.5 mL fosfat tamponu (0.04 M, pH=7) ve 2.5 mL linoleik asit emülsiyonu içerir. Bitki örnekleri 75 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlandı. Standart olarak aynı konsantrasyonda α-tokoferol, askorbik asit, BHA ve BHT kullandı. Lipid peroksidasyonu inhibisyonu aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır.

$$\text{Lipid peroksidasyonu inhibisyonu (\%)} = [1 - (A_{\text{örnek}}/A_{\text{kontrol}})] \times 100$$

Burada A_{kontrol} , kontrolün maksimuma ulaştığı inkübasyon anındaki kontrolün verdiği absorbans değeri, $A_{\text{örnek}}$ ise kontrol değerinin maksimuma ulaştığı inkübasyon anındaki numunenin ya da standartların verdiği absorbans değerini ifade eder.

3.2.15. İstatistik analizler

Tüm deneylerde üç paralel ölçüm alındı ve standart sapmalar hesaplandı. Grafikler Windows 7 Excell programında çizildi ve Origin 8.6 32 Bit programından yararlanıldı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Yonca (*Medicago sativa* L.) ve asma (*Vitis vinifera* L.) bitkilerinin su, aseton ve metanol ekstraktlarının *in vitro* antioksidan özellikleri çeşitli metodlarla incelendi.

Su, aseton ve metanol çözücüleri ile yapılan ekstraksiyon işlemleri sonucunda yonca bitkisinden ekstrakte edilebilen bileşiklerin miktarı sırasıyla 227.2, 20, 154 mg/g kurutulmuş bitki materyali olarak elde edildi. En yüksek verim Tablo 4.1’de görüldüğü gibi su ekstraktında gözlemlendi.

Tablo 4.1. Yonca bitkisinden ekstrakte edilen bileşiklerin verimleri

YONCA			
Ekstrakt	Su	Aseton	Metanol
Ham Madde (g)	25	25	25
Ekstraksiyon Verimi (mg)	227.2	20	154
Ekstraksiyon Verimi (%)	22.72	2	15.4

Su, aseton ve metanol çözücüleri ile yapılan ekstraksiyon işlemleri sonucunda asma bitkisinden ekstrakte edilebilen bileşiklerin miktarı sırasıyla 118.8, 61.2, 131.2 mg/g kurutulmuş bitki materyali olarak elde edildi. En yüksek verim Tablo 4.2’de görüldüğü gibi metanol ekstraktında gözlemlendi.

Tablo 4.2. Asma bitkisinden ekstrakte edilen bileşiklerin verimleri

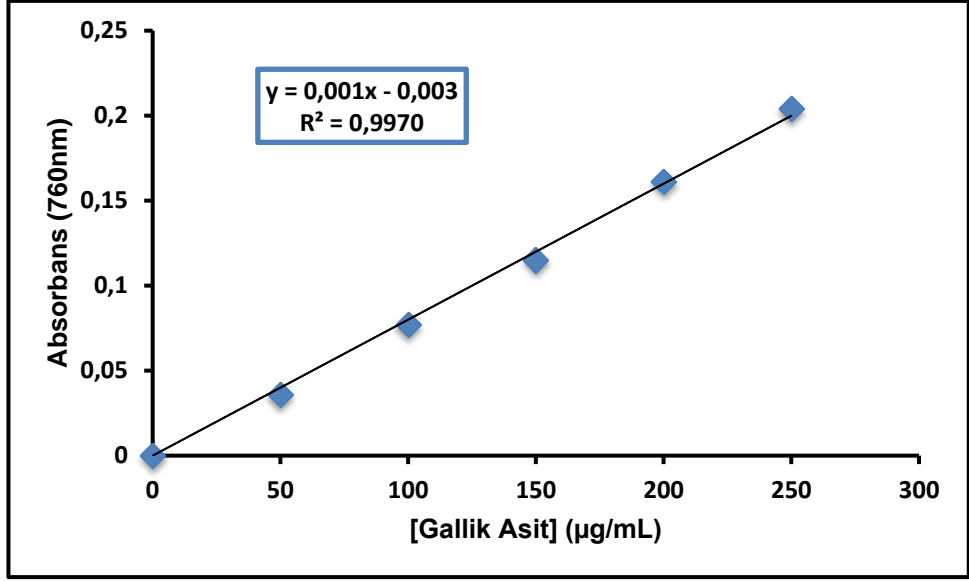
ASMA			
Ekstrakt	Su	Aseton	Metanol
Ham Madde (g)	25	25	25
Ekstraksiyon Verimi (mg)	118.8	61.2	131.2
Ekstraksiyon Verimi (%)	11.88	6.12	13.12

4.1. Toplam Fenolik Bileşik (TPC) Tayini

Yonca ve asma bitkilerinin su, aseton ve metanol ekstraktlarındaki toplam çözünebilen fenolik bileşik miktarı Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile tayin edildi. Gallik asit ve pirogallol kullanılarak standart grafikler hazırlandı (Şekil 4.1 ve 4.2). Bu standart grafikler kullanılarak örneklerin toplam fenolik madde miktarları mg gallik asit (mg GAE/g ekstrakt) ve mg pirogallol (mg PGE/g ekstrakt) eşdeğeri şeklinde hesaplandı.

Gallik asit standart grafiğinden elde edilen formülden su, aseton ve metanol ekstraktlarında bulunan toplam fenolik bileşik miktarları gallik asit ekivalent (GAE) olarak hesaplandı (R^2 : 0.9970). Bu amaçla hazırlanan standart gallik asit grafiği Şekil 4.1’de verilmiştir. Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

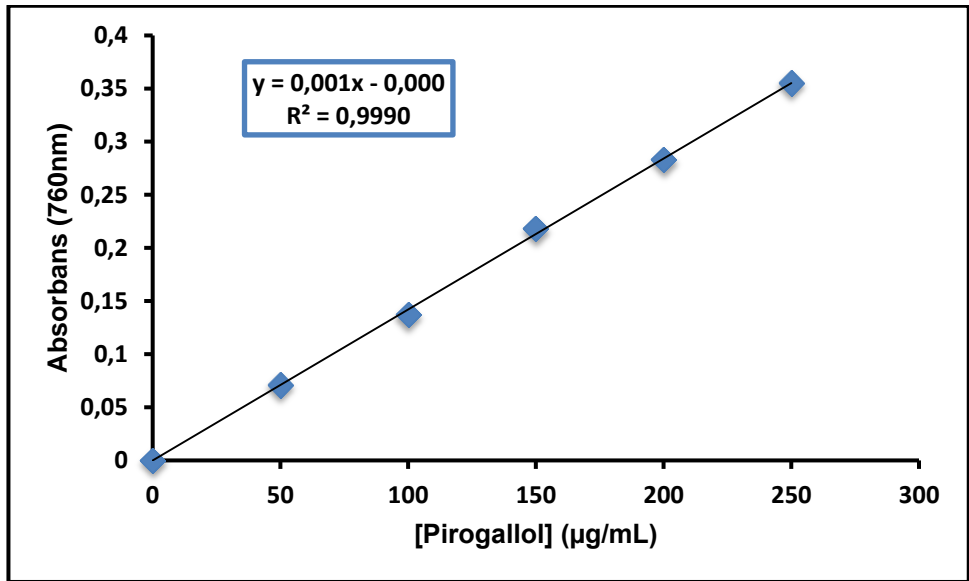
$$\text{Absorbans } (\lambda: 760 \text{ nm}) = 0.001 [\text{Gallik asit}] - 0.003$$



Şekil 4.1. Gallik asit standart grafiği

Pirogallol standart grafiğinden elde edilen formülden su, aseton ve metanol ekstraktlarında bulunan toplam fenolik bileşik miktarları pirogallol ekivalent (PGE) olarak hesaplandı (R^2 : 0.9990). Bu amaçla hazırlanan standart pirogallol grafiği Şekil 4.2'de verilmiştir. Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

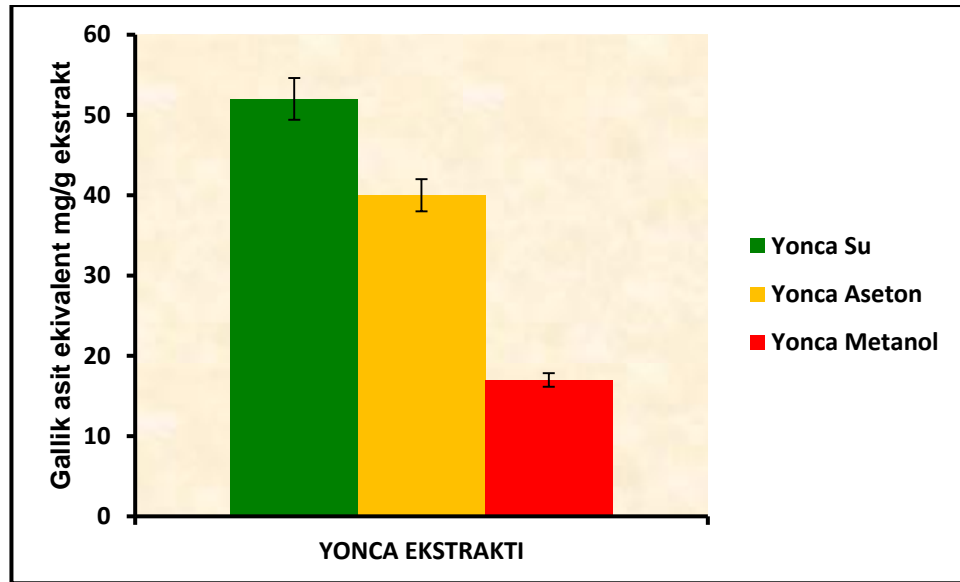
$$\text{Absorbans } (\lambda: 760 \text{ nm}) = 0.001 [\text{Pirogallol}] - 0.000$$



Şekil 4.2. Pirogallol standart grafiği

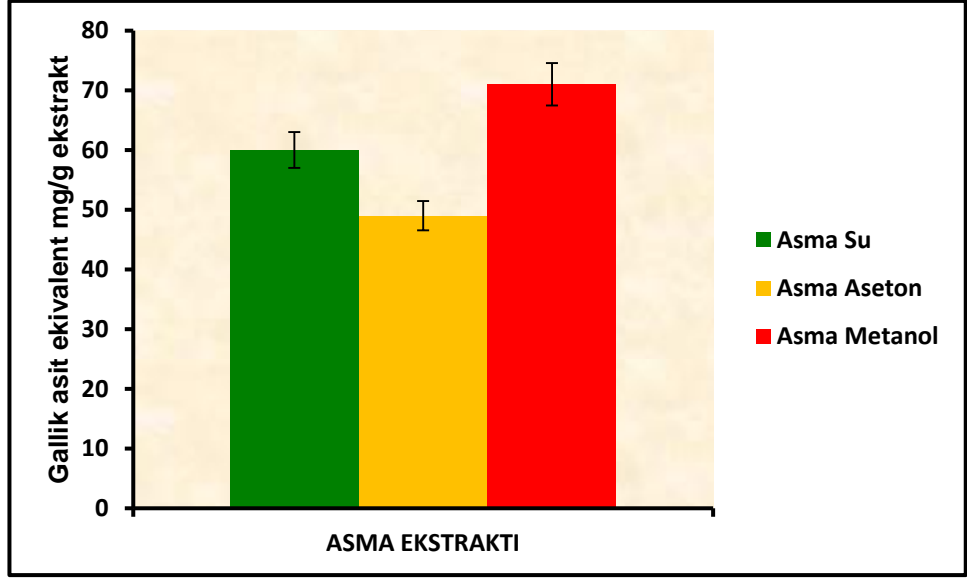
Yonca ve asma bitkilerinin su, aseton ve metanol ekstraktlarının gallik asit ve pirogallol eşdeğeri olan fenolik madde miktarlarına ait değerler Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6’da verilmiştir. Bu grafiklerde görüldüğü gibi, çalışılan bitkilerden ekstrakte edilebilen toplam fenolik bileşik içerikleri karşılaştırıldığında; gallik asit ve pirogallol için asma bitkisinin daha yüksek fenolik madde içerdiği, yonca bitkisinin ise daha düşük değerlerde fenolik madde içerdiği belirlenmiştir.

Standart grafik denklemlerinden hesaplanan sonuçların gallik asit ekivalenti olarak 16.67 ± 1.53 – 70.67 ± 1.15 mg/g ve pirogallol ekivalenti olarak 13.67 ± 1.53 – 67.67 ± 1.15 mg/g arasında değiştiği belirlendi.



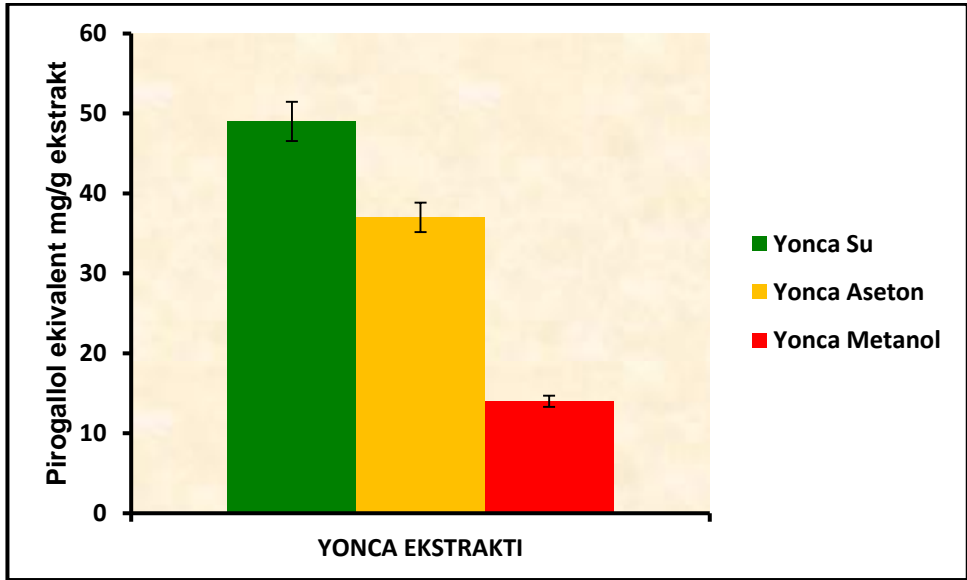
Şekil 4.3. Yonca bitkisinin gallik asit eşdeğeri olan fenolik madde içerikleri

Yonca bitkisinin gallik asit eşdeğeri olarak Şekil 4.3’te görüldüğü gibi su ekstraktının 52 ± 0.00 mg/g, aseton ekstraktının 40 ± 0.71 mg/g ve metanol ekstraktının 16.67 ± 1.53 mg/g fenolik madde içerdiği belirlendi.



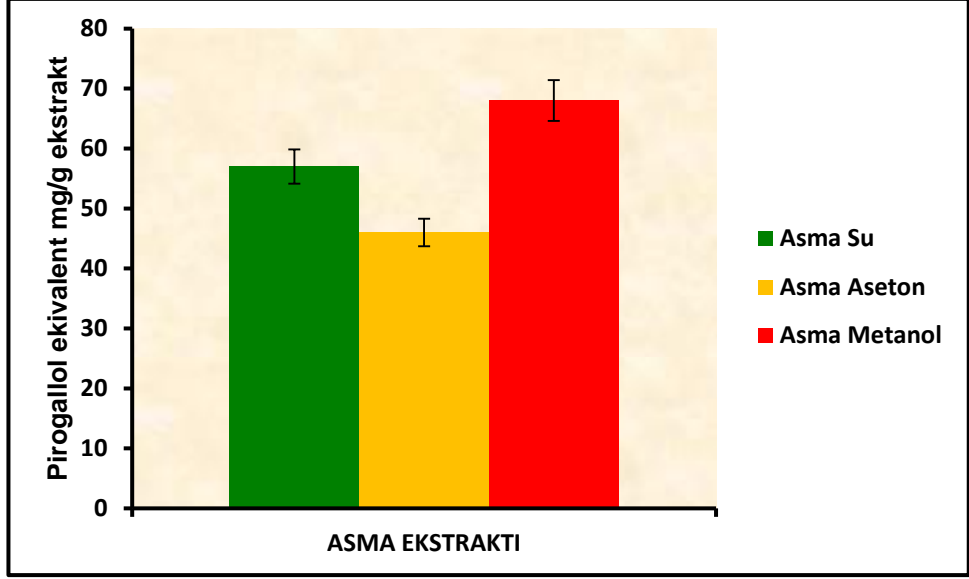
Şekil 4.4. Asma bitkisinin gallik asit eşdeğeri olan fenolik madde içerikleri

Asma bitkisinin gallik asit eşdeğeri olarak Şekil 4.4'te görüldüğü gibi su ekstraktının 60.33 ± 0.58 mg/g, aseton ekstraktının 48.67 ± 1.15 mg/g ve metanol ekstraktının 70.67 ± 1.15 mg/g fenolik madde içerdiği belirlendi.



Şekil 4.5. Yonca bitkisinin pirogallol eşdeğeri olan fenolik madde içerikleri

Yonca bitkisinin pirogallol eşdeğeri olarak Şekil 4.5'te görüldüğü gibi su ekstraktının 49 ± 0.00 mg/g, aseton ekstraktının 37 ± 1.00 mg/g, metanol ekstraktının 13.67 ± 1.53 mg/g fenolik madde içerdiği belirlendi.



Şekil 4.6. Asma bitkisinin pirogallol eşdeğeri olan fenolik madde içerikleri

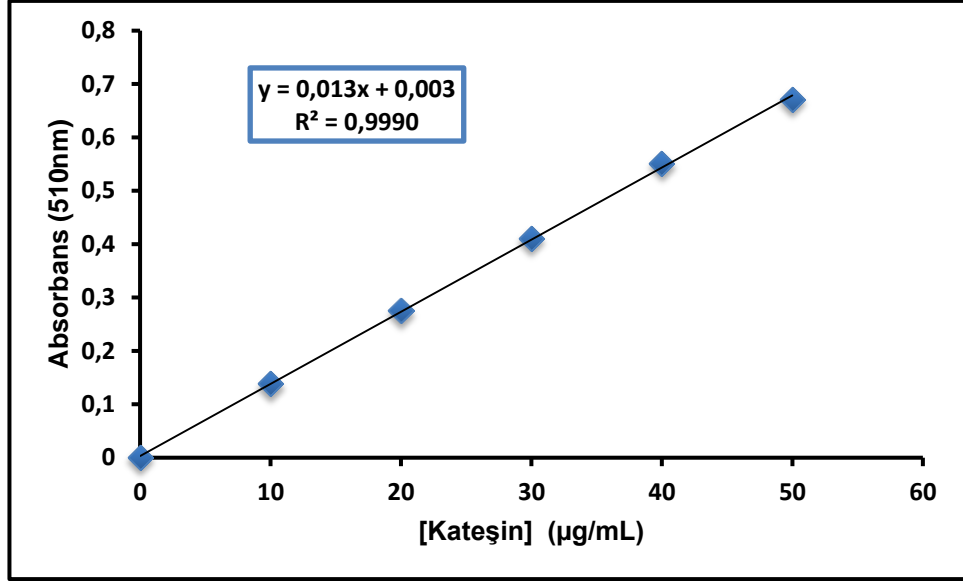
Asma bitkisinin pirogallol eşdeğeri olarak Şekil 4.6’da görüldüğü gibi su ekstraktının 57.33 ± 0.58 mg/g, aseton ekstraktının 45.67 ± 1.15 mg/g, metanol ekstraktının 67.67 ± 1.15 mg/g fenolik madde içerdiği belirlendi.

4.2. Toplam Flavonoid İçeriğinin Tayini

Yonca ve asma bitkilerinin su, aseton ve metanol ekstraktlarındaki toplam çözünebilir flavonoid içeriğini belirlemek için kateşin ve gallik asit kullanılarak standart grafikler hazırlandı (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8). Bu standart grafikler kullanılarak örneklerin toplam flavonoid madde miktarları mg kateşin (mg KE/g ekstrakt) ve mg gallik asit (mg GAE/ g ekstrakt) eşdeğeri şeklinde hesaplandı.

Kateşin standart grafiğinden elde edilen formülden su, aseton ve metanol ekstraktlarında bulunan toplam flavonoid bileşik miktarları kateşin ekvivalent (KE) olarak hesaplandı (R^2 : 0.9990). Bu amaçla hazırlanan standart kateşin grafiği Şekil 4.7’de verilmiştir. Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

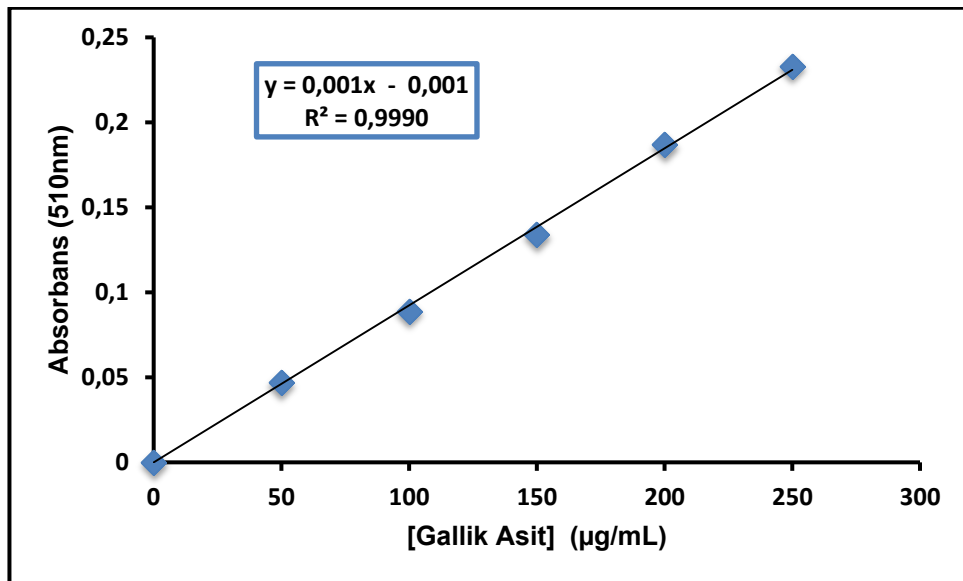
$$\text{Absorbans } (\lambda: 510 \text{ nm}) = 0.013 [\text{Kateşin}] + 0.003$$



Şekil 4.7. Kateşin standart grafiği

Gallik asit standart grafiğinden elde edilen formülden su, aseton ve metanol ekstraktlarında bulunan toplam flavonoid bileşik miktarları gallik asit ekivalent (GAE) olarak hesaplandı (R^2 : 0.9990). Bu amaçla hazırlanan standart gallik asit grafiği Şekil 4.8'de verilmiştir. Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

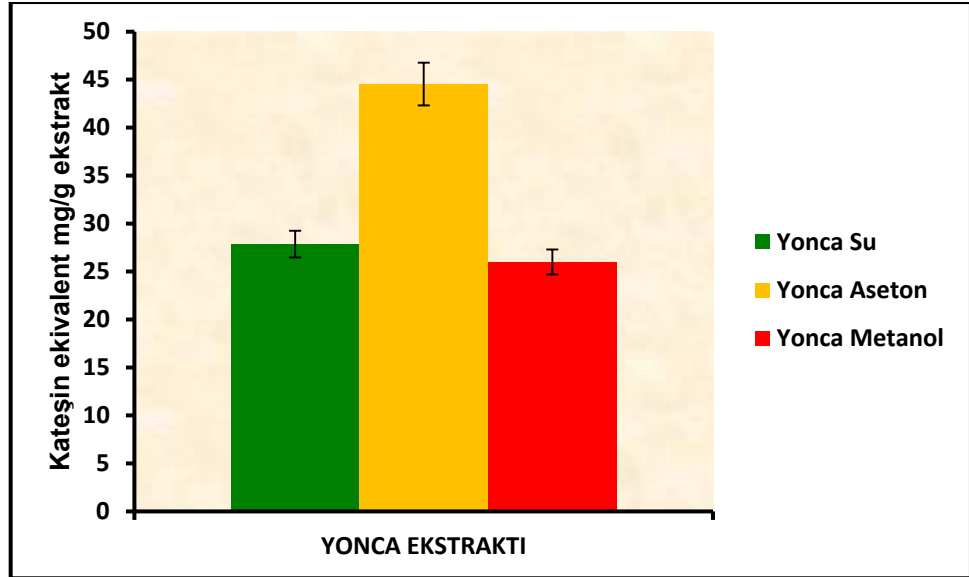
$$\text{Absorbans } (\lambda: 510 \text{ nm}) = 0.001 [\text{Gallik asit}] - 0.001$$



Şekil. 4.8. Gallik asit standart grafiği

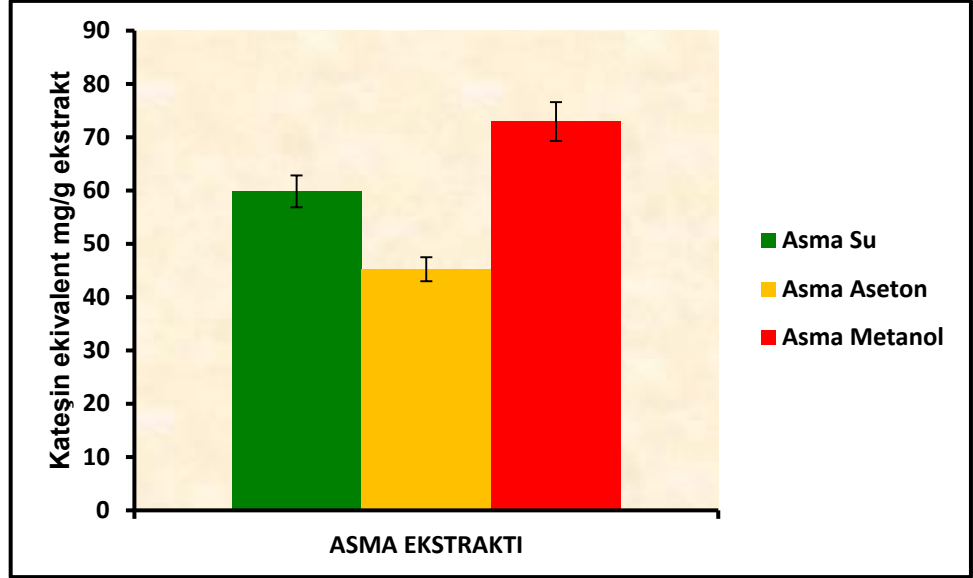
Yonca ve asma bitkilerinin su, aseton ve metanol ekstraktlarının kateşin ve gallik asit eşdeğeri olan flavonoid madde miktarlarına ait değerler Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12’de verilmiştir. Bu grafiklerde görüldüğü gibi, çalışılan bitkilerden ekstrakte edilebilen flavonoid bileşik içerikleri karşılaştırıldığında; gallik asit ve kateşin için asma bitkisinin daha yüksek flavonoid madde içerdiği, yonca bitkisinin ise daha düşük değerlerde flavonoid madde içerdiği belirlenmiştir.

Standart grafik denklemlerinden hesaplanan sonuçların kateşin ekivalenti olarak 26.02 ± 0.22 – 72.90 ± 0.40 mg/g ve gallik asit ekivalenti olarak 342.33 ± 2.89 – 951.67 ± 5.13 mg/g arasında değiştiği belirlendi.



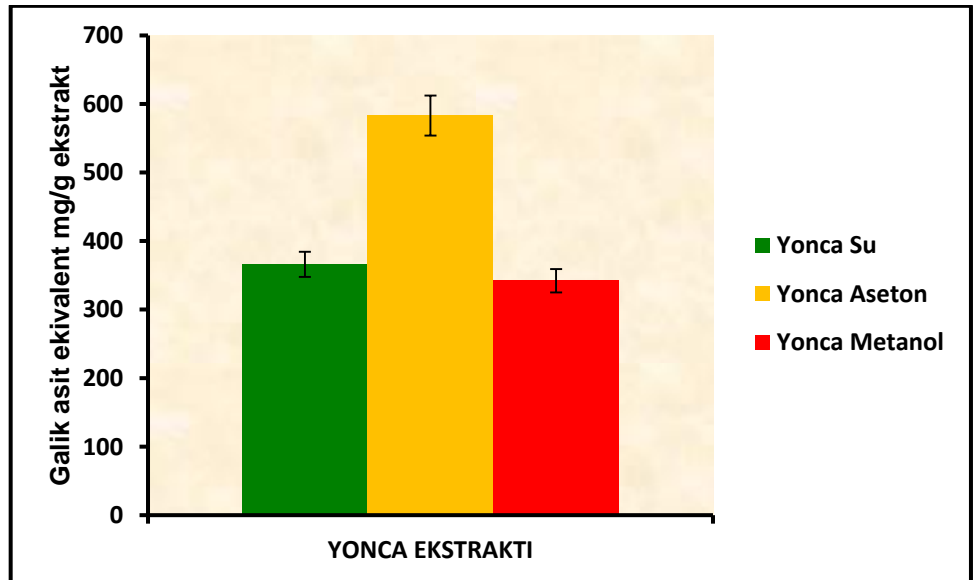
Şekil 4.9. Yonca bitkisinin kateşin eşdeğeri olan flavonoid madde içerikleri

Yonca bitkisinin kateşin eşdeğeri olarak Şekil 4.9’da görüldüğü gibi su ekstraktının 27.87 ± 0.76 mg/g, aseton ekstraktının 44.51 ± 0.12 mg/g ve metanol ekstraktının 26.02 ± 0.22 mg/g flavonoid madde içerdiği belirlendi.



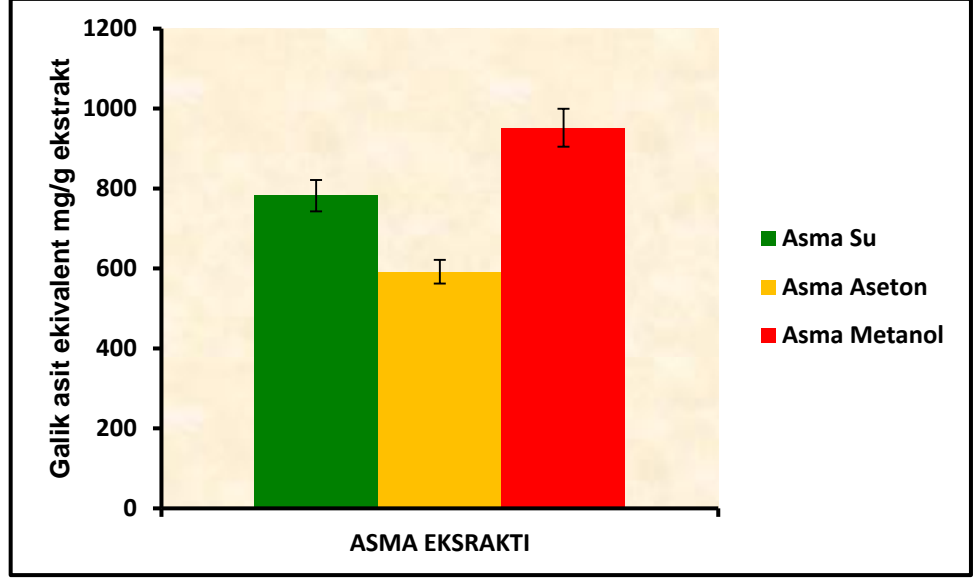
Şekil 4.10. Asma bitkisinin kateşin eşdeğeri olan flavonoid madde içerikleri

Asma bitkisinin kateşin eşdeğeri olarak Şekil 4.10'da görüldüğü gibi su ekstraktının 59.87 ± 0.23 mg/g, aseton ekstraktının 45.20 ± 0.86 mg/g ve metanol ekstraktının 72.90 ± 0.40 mg/g flavonoid madde içerdiği belirlendi.



Şekil 4.11. Yonca bitkisinin galik asit eşdeğeri olan flavonoid madde içerikleri

Yonca bitkisinin galik asit eşdeğeri olarak Şekil 4.11'de görüldüğü gibi su ekstraktının 366.33 ± 9.81 mg/g, aseton ekstraktının 582.67 ± 1.53 mg/g ve metanol ekstraktının 342.33 ± 2.89 mg/g flavonoid madde içerdiği belirlendi.



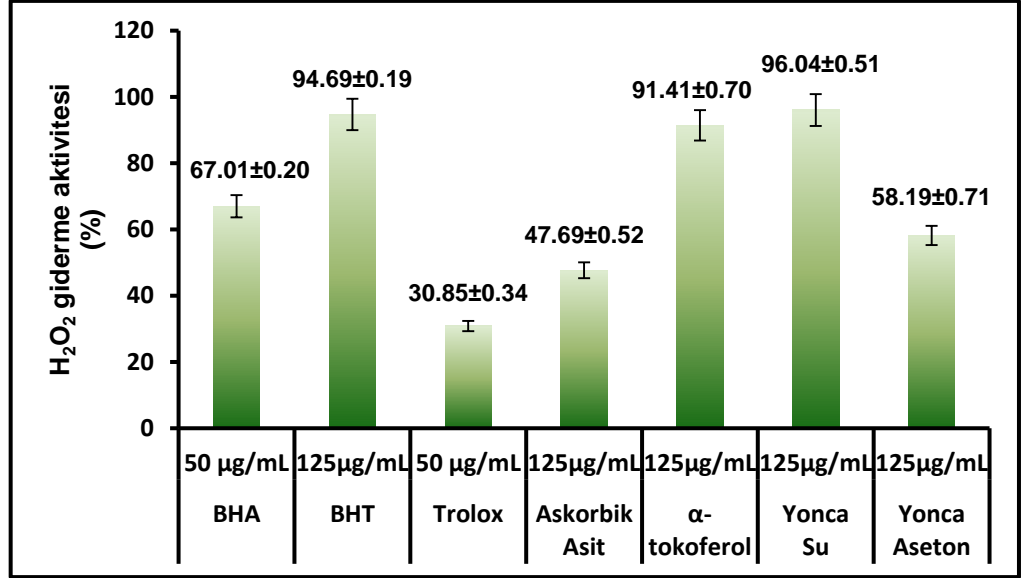
Şekil 4.12. Asma bitkisinin gallik asit eşdeğeri olan flavonoid madde içerikleri

Asma bitkisinin gallik asit eşdeğeri olarak Şekil 4.12’de görüldüğü gibi su ekstraktının 782.33 ± 3.06 mg/g, aseton ekstraktının 591.67 ± 11.24 mg/g ve metanol ekstraktının 951.67 ± 5.13 mg/g flavonoid madde içerdiği belirlendi.

4.3. H₂O₂ Giderme Aktivitesinin Tayini

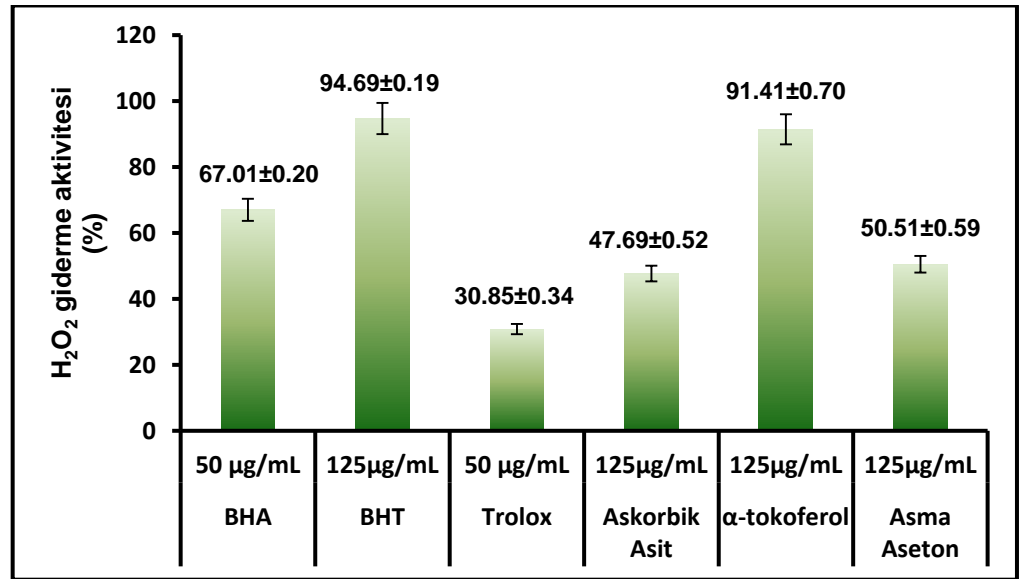
Canlı organizmalarda hidrojen peroksit, süperoksit dismutaz gibi birçok enzim tarafından oluşturulabilir. Hidrojen peroksit hücre membranında bir uçtan diğer uca geçerek birçok bileşiği oksitleyebilir. Çok reaktif değildir, fakat hücrede SR’lerin artmasına sebep olduğundan dolayı zamanla hücre için toksik olabilir. Lipid oksidasyonunda düşük aktiviteye sahip olmasına rağmen, aktif oksijen türü olarak, Fenton reaksiyonlarındaki, DNA hasarlarına sebep olan yüksek reaktif hidroksil radikallerinin oluşumunda etkilidir. Bu nedenle hidrojen peroksidin mutlaka vücuttan uzaklaştırılması gerekir.

Bitki ekstraktlarının H₂O₂ giderme aktivitesi Ruch ve arkadaşlarının belirledikleri metoda göre tayin edildi [73]. Yonca bitkisinin su ekstraktının 125 µg/mL konsantrasyonunun H₂O₂ giderme aktivitesi, standartlar ve diğer bitki ekstraktlarıyla karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 4.13 ve Şekil 4.14).



Şekil 4.13. Yonca ekstraktlarının H₂O₂ giderme aktivitelerinin standart antioksidanlarla karşılaştırılması

Yonca ekstraktlarının ve standartların H₂O₂ giderme yetenekleri belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak Şekil 4.13'te verilmiştir. Yonca bitkisinin 125 µg/mL konsantrasyondaki metanol ekstraktında H₂O₂ giderme aktivitesi gözlenmezken, yonca bitkisinin aynı konsantrasyondaki su ve aseton ekstraktlarında sırasıyla %96.04±0.51 ve %58.19±0.71 H₂O₂ giderme aktivitesi gösterdiği belirlendi.



Şekil 4.14. Asma ekstraktının H₂O₂ giderme aktivitesinin standart antioksidanlarla karşılaştırılması

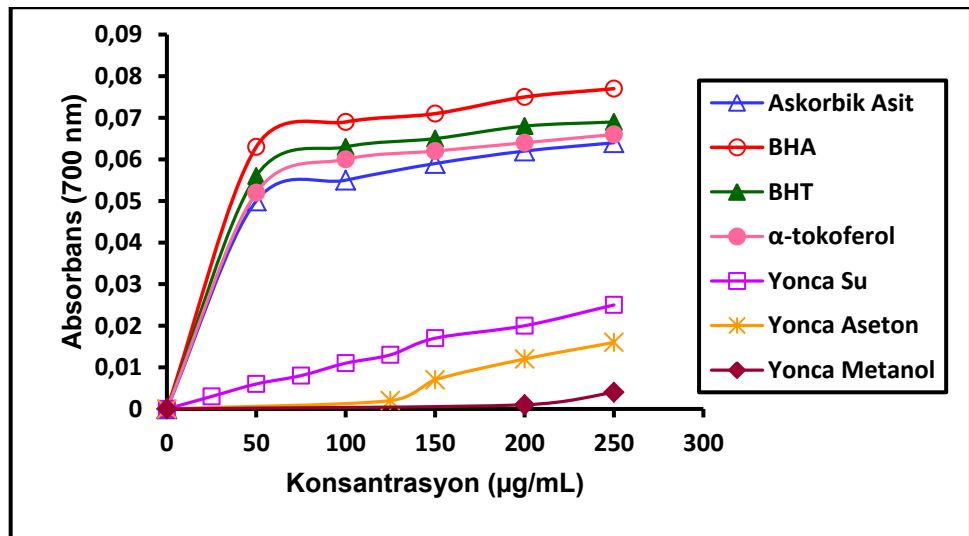
Asma bitkisinin 125 µg/mL konsantrasyondaki su ve metanol ekstraktlarında H₂O₂ giderme aktivitesi gözlenmezken, asma bitkisinin aynı konsantrasyondaki aseton ekstraktında %50.51±0.59 H₂O₂ giderme aktivitesi gösterdiği belirlendi (Şekil 4.14).

Sonuçlar gösteriyor ki; H₂O₂ giderme aktivitesinden elde edilen değerler konsantrasyona bağımlı değildir.

4.4. Toplam Ferrik İyonlarını (Fe⁺³) İndirgeme Kapasitesinin Tayini

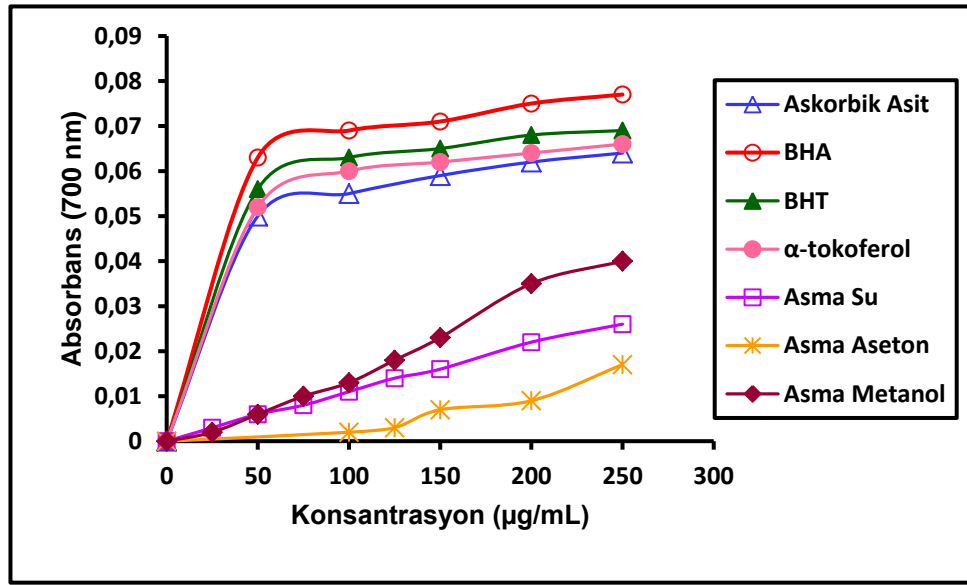
Antioksidan çalışmalarda kullanılan bu biyoanalitik metotta, test çözeltisinin sarı rengi ortamda bulunan antioksidan maddelerin indirgeme aktivitelerinden dolayı farklı tonlardaki yeşil renge dönüşmektedir. Fe³⁺ iyonlarının indirgenmesi, bir bileşiğin antioksidan aktivite gösterebilmesi için önemli bir mekanizma olan elektron verebilme yeteneğinin göstergesidir ve diğer antioksidan özellikler ile de yakından ilişkilidir. Bitki ekstraktının ortamdaki Fe⁺³'ü indirgeme yeteneğini belirlemek üzere değişen ekstrakt ve standart konsantrasyonlarında çalışıldı ve oluşan komplekslerin absorbansı 700 nm'de ölçüldü. BHA, BHT, α-tokoferol ve askorbik asit standartlarıyla karşılaştırılarak her bir bitki ekstraktı için konsantrasyon-absorbans grafikleri çizildi (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16).

İndirgeme kapasitesi tayininde yüksek absorbans değerinin yüksek indirgeme gücünün göstergesi olduğu kabul edilmektedir. Yonca ve asma bitkilerinin su, aseton, metanol ekstraktları ile standartların indirgeme kapasiteleri örneklerin konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artmaktadır.



Şekil 4.15. Yonca ekstraktlarının Fe⁺³'ü Fe⁺²'ye indirgeme kapasiteleri

Şekil 4.15'ten görülebileceği gibi yonca bitkisinin su ekstraktı, aseton ve metanol ekstraktlarından daha fazla indirgeme kapasitesine sahip olmakla birlikte BHA, BHT, askorbik asit ve α -tokoferole göre düşük indirgeme kapasitesine sahiptir. Standartların ve bitki ekstraktlarının indirgeme kapasitelerinin BHA>BHT> α -tokoferol>A.asit>YS>YA>YM sırasında azaldığı ve 250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda sırasıyla 0.077 ± 0.0015 , 0.069 ± 0.003 , 0.066 ± 0.0031 , 0.064 ± 0.0006 , 0.025 ± 0.003 , 0.016 ± 0.0025 ve 0.004 ± 0.0023 absorbans değerlerine sahip oldukları belirlendi.



Şekil 4.16. Asma ekstraktlarının Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeme kapasiteleri

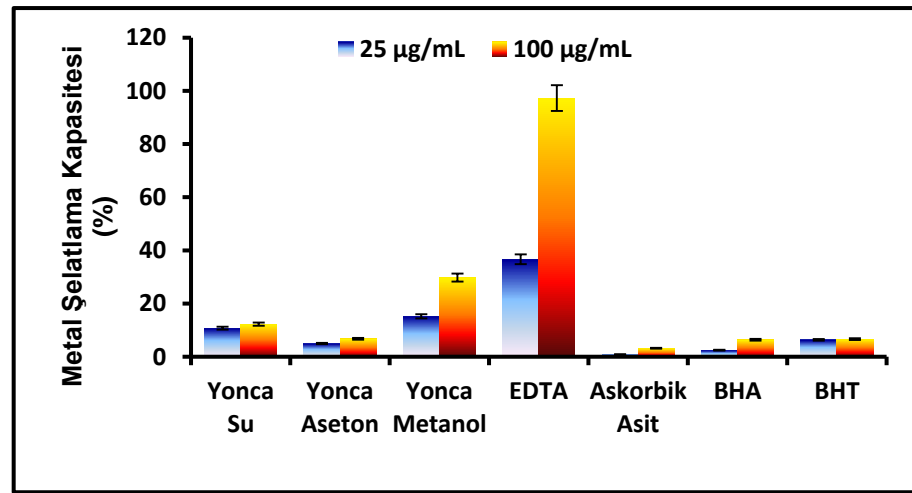
Şekil 4.16'dan görülebileceği gibi asma metanol ekstraktının indirgeme gücünün su ve aseton ekstraktlarından daha fazla olduğu belirlendi ve tüm asma ekstraktlarının BHA, BHT, askorbik asit ve α -tokoferole göre daha düşük indirgeme kapasitesine sahip olduğu tespit edildi. Standartların ve bitki ekstraktlarının indirgeme kapasitelerinin BHA>BHT> α -tokoferol>A.asit>AM>AS>AA sırasında azaldığı ve 250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda sırasıyla 0.077 ± 0.0015 , 0.069 ± 0.003 , 0.066 ± 0.0031 , 0.064 ± 0.0006 , 0.04 ± 0.0289 , 0.026 ± 0.004 ve 0.017 ± 0.008 absorbans değerlerine sahip oldukları belirlendi.

4.5. Demir (II) İyonlarını Şelatlama Aktivitesinin Tayini

Metal iyonu şelatlama aktivitesi; bitki ekstraktlarının çözeltideki Fe^{+2} iyonlarını bağlayabilmek için ferrozin ile yarışmasına göre değerlendirildi. Metal şelatlama

aktivitesinde azalan absorbands ferrozün bağlanmadan önce metal iyonlarının şelatlandığını gösterir. Kıyaslama maddesi olarak iyi bir şelatör olan EDTA çözeltisi seçildi. Standart olarak askorbik asit, BHA ve BHT kullanıldı. Çalışmada kullanılan yonca ve asma bitkilerinin her bir ekstraktının metal şelatlama potansiyelini gösteren konsantrasyon-% inhibisyon grafikleri oluşturuldu (Şekil 4.17 ve Şekil 4.18).

Grafiklerden görüldüğü gibi; çalışmada kullanılan ekstraktların konsantrasyon arttıkça artan şelatlama aktivitesi gösterdiği belirlendi. Yonca ve asma bitkilerinin 25 µg/mL konsantrasyondaki aseton ekstraktları hariç diğer tüm ekstraktlarının Fe⁺² iyonlarını şelatlama aktivitesi standart olarak kullanılan askorbik asit, BHA ve BHT'den daha yüksek olduğu belirlendi.

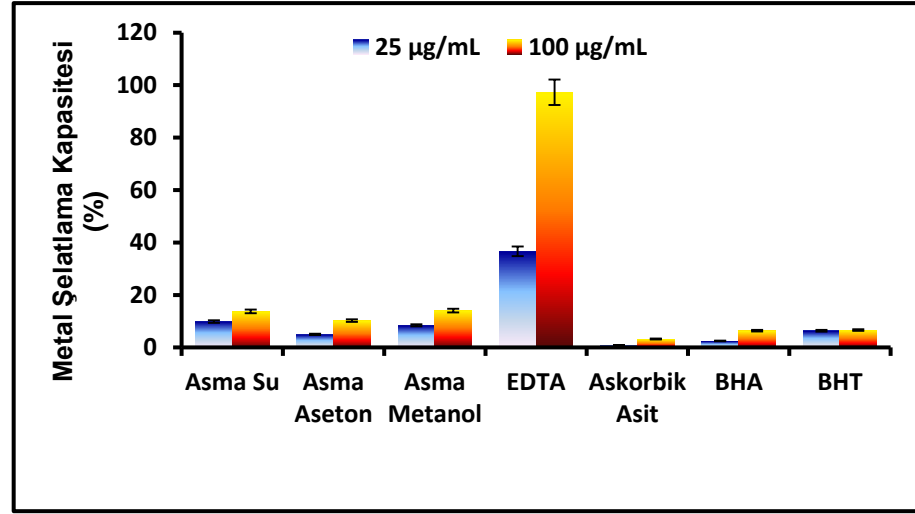


Şekil 4.17. Yonca ekstraktlarının metal şelatlama kapasiteleri

Daha düşük absorbands daha yüksek metal şelatlama aktivitesini gösterir. Şekil 4.17'de görüldüğü gibi yonca bitkisinin 100 µg/mL konsantrasyondaki su, aseton ve metanol ekstraktlarının Fe⁺² iyonlarını şelatlama aktivitesi sırasıyla %12.26±0.52, %6.78±0.14 ve %29.78±0.29 olarak tespit edildi (Tablo 4.3)

Tablo 4.3. Yonca ekstraktlarının Fe⁺² iyonlarını şelatlama aktivitesi

100 µg/mL Bitki Ekstraktı	Yonca Su	Yonca Aseton	Yonca Metanol	EDTA	Askorbik Asit	BHA	BHT
Metal İyonlarını Şelatlama Aktivitesi (%)	12.26±0.52	6.78±0.14	29.78±0.29	97.28±0.64	3.23±1.04	6.41±0.40	6.64±0.14



Şekil 4.18. Asma ekstraktlarının metal şelatlama kapasiteleri

Şekil 4.18’de görüldüğü gibi asma bitkisinin 100 µg/mL konsantrasyondaki su, aseton ve metanol ekstraktlarının Fe^{+2} iyonlarını şelatlama aktivitesi sırasıyla %13.74±0.66, %10.24±0.83 ve %14.06±0.56 olarak tespit edildi (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Asma ekstraktlarının Fe^{+2} iyonlarını şelatlama aktivitesi

100 µg/mL Bitki Ekstraktı	Asma Su	Asma Aseton	Asma Metanol	EDTA	Askorbik Asit	BHA	BHT
Metal İyonlarını Şelatlama Aktivitesi (%)	13.74±0.66	10.24±0.83	14.06±0.56	97.28±0.64	3.23±1.04	6.41±0.40	6.64±0.14

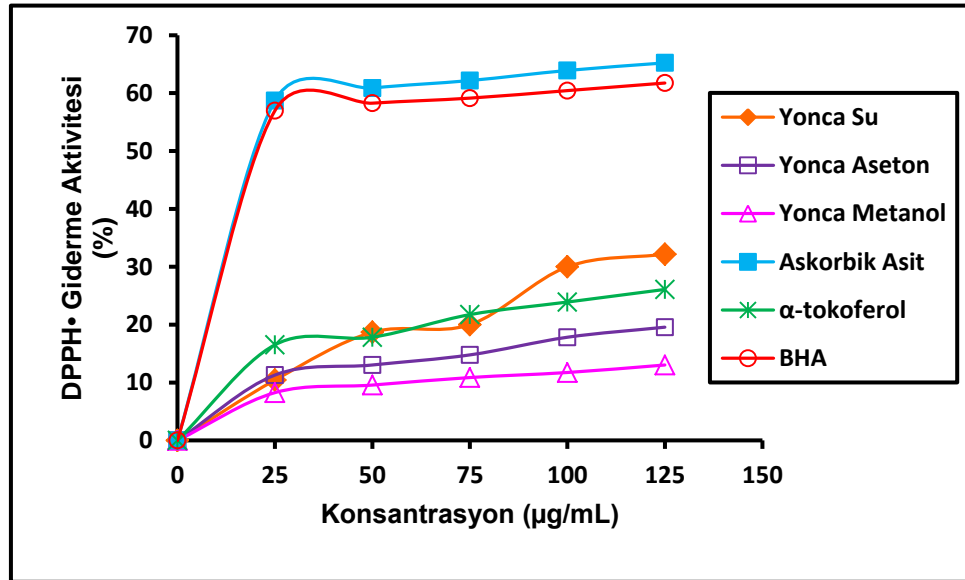
Şekil 4.17 ve 4.18’den görüldüğü gibi; çalışmada kullanılan tüm ekstraktların konsantrasyonu arttıkça azalan absorbanslarına bağlı olarak Fe^{+2} iyonlarını şelatlama aktivitelerinin arttığı gözlemlendi. Yonca ve asma bitkilerinin tüm ekstraktlarının metal şelatlama kapasiteleri çok iyi bir şelat ajanı olan EDTA’dan daha düşük olduğu belirlendi.

4.6. DPPH• Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini

Uzun ömürlü bir azot radikali olan DPPH• radikali, doğal antioksidanların SR yakalama aktivitesini değerlendirmek için kullanılır. DPPH•, antioksidanlar tarafından sarı renkli difenilpikril hidrazine indirgenebilen ticari bir oksitleyici radikaldir. Kararlı bir diamanyetik molekül olabilmek için bir elektron ya da hidrojen radikali alır. Bu metod, hidrojen veren gruplara sahip antioksidan maddelerin varlığında alkolde çözünen DPPH• radikallerinin redüksiyonuna dayanmaktadır. Redüksiyon sonucu 517 nm'de absorbans vermeyen ve bir radikal olmayan DPPH-H oluşmaktadır. Dolayısıyla DPPH• radikali miktarındaki azalma 517 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek antioksidan aktivitenin antiradikal gücünü belirlemek mümkündür.

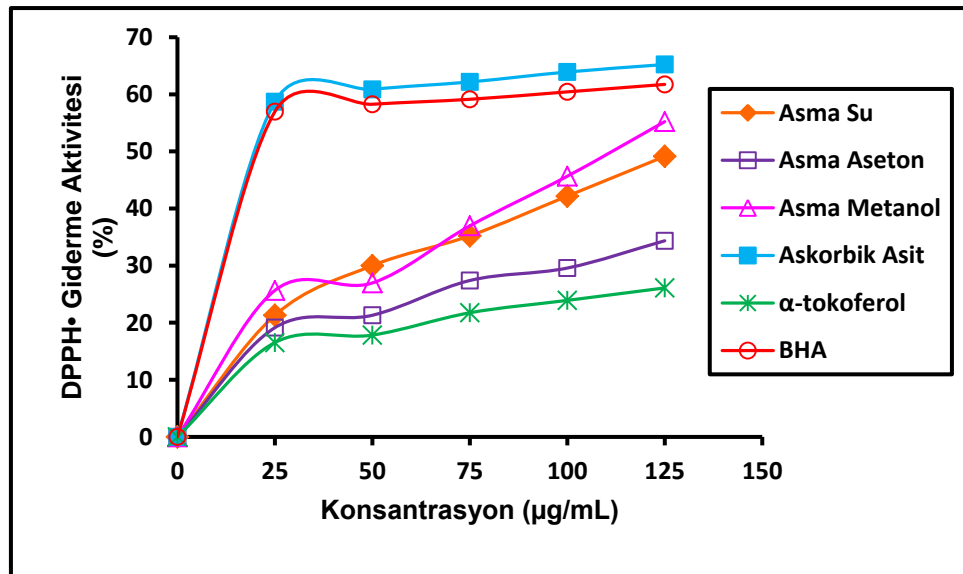
Çalışmada kullanılan yonca ve asma ekstraktlarının SR giderici etkileri DPPH• radikali üzerinden tayin edildi. Standart olarak BHA, α - tokoferol ve askorbik asit kullanıldı. Ekstraktların DPPH• SR' i giderme aktiviteleri konsantrasyon - % inhibisyon grafikleri ile belirlendi (Şekil 4.19 ve Şekil 4.20).

Yonca ve asma bitkisinin tüm ekstraktlarında konsantrasyonun artmasıyla % inhibisyon değerinin arttığı gözlemlendi. Standartlarla karşılaştırıldığında; BHA ve askorbik asitin daha yüksek inhibisyona sebep oldukları tespit edildi.



Şekil 4.19. Yonca ekstraktlarının DPPH• radikali giderme aktiviteleri

Yonca bitkisinin 25-125 µg/mL konsantrasyon aralığındaki su ekstraktlarının; %10.43, %18.7, %20, %30, %32.17, aseton ekstraktlarının; %11.3, %13.04, %14.78, %17.83, %19.57, metanol ekstraktlarının; %8.26, %9.57, %10.87, %11.74, %13.04, askorbik asitin; %58.7, %60.87, %62.17, %63.91, %65.22, BHA'nın; %56.96, %58.26, %59.13, %60.43, %61.74, α-tokoferolün; %16.52, %17.83, %21.74, %23.91, %26.09 SR giderme aktivitesi açısından % inhibisyon değerlerine sahip oldukları görüldü. Standartların ve yonca bitkisinin su, aseton ve metanol ekstraktlarının DPPH• giderme aktivitesinin A.asit>BHA>YS>α-tokoferol>YA>YM sırasında azaldığı ve 125 µg/mL konsantrasyonda sırasıyla %65.22, %61.74, %32.17, %26.09, %19.57, %13.04 olduğu belirlendi (Şekil 4.19).



Şekil 4.20. Asma ekstraktlarının DPPH• radikali giderme aktiviteleri

Asma bitkisinin 25-125 µg/mL konsantrasyon aralığındaki su ekstraktlarının; %21.3, %30, %35.22, %42.17, %49.13, aseton ekstraktlarının; %19.13, %21.3, %27.39, %29.57, %34.35, metanol ekstraktlarının; %25.65, %26.96, %36.96, %45.65, %55.22, askorbik asitin; %58.7, %60.87, %62.17, %63.91, %65.22, BHA'nın; %56.96, %58.26, %59.13, %60.43, %61.74, α-tokoferolün; %16.52, %17.83, %21.74, %23.91, %26.09 SR giderme aktivitesi açısından % inhibisyon değerlerine sahip oldukları görüldü. Standartların ve asma bitkisinin su, aseton ve metanol ekstraktlarının DPPH• giderme aktivitesinin A.asit>BHA>AM>AS>AA>α-tokoferol sırasında azaldığı ve 125 µg/mL konsantrasyonda sırasıyla %65.22, %61.74, %55.22, %49.13, %34.35, %26.09 olduğu belirlendi (Şekil 4.20).

Şekil 4.19 ve Şekil 4.20’de görüldüğü gibi, DPPH• SR’i giderme aktivitesi yönünden yonca ve asma ekstraktlarının standartlarla karşılaştırılabilir başarılı aktiviteler gösterdiği belirlendi.

Reaksiyon ortamındaki DPPH• radikalinin %50’sinin yok edilmesi için gereken etkili antioksidan konsantrasyonu EC₅₀ değeri olarak tanımlanır ve düşük EC₅₀ değeri yüksek radikal giderme aktivitesinin göstergesidir. Çalışmada kullanılan bitki ekstraktlarının her biri için ayrı ayrı çizilen konsantrasyon-% inhibisyon grafiklerinden EC₅₀ değerleri belirlendi. Elde edilen değerler aşağıdaki tabloda verildi (Tablo 4.5).

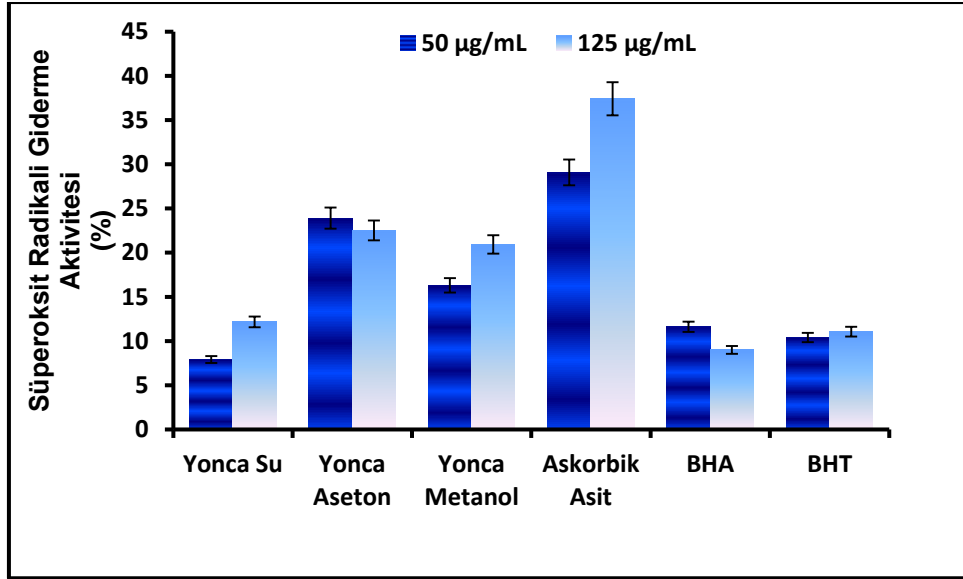
Tablo 4.5. Çalışılan bitki ekstraktlarının ve standartların DPPH• radikali giderme aktivitesi sonuçlarından elde edilen EC₅₀ değerleri

EC ₅₀ (µg/mL)			
Ekstrakt	Su	Aseton	Metanol
Yonca	39.22±0.57	19.84±1.63	17.75±0.62
Asma	31.04±0.38	20.84±0.71	53.61±1.31
Askorbik asit	11.74±0.29		
BHA	17.50±0.23		
α-tokoferol	11.14±0.09		

Tablo 4.5’e göre; çalışılan ekstraktlar içinde en düşük EC₅₀ değeri yoncanın metanol ve aseton ekstraktlarında, en yüksek EC₅₀ değeri ise asma metanol ve yonca su ekstraktlarında tayin edildi. Yonca metanol ekstraktının, BHA standartı ile kıyaslanabilecek ölçüde etkili EC₅₀ değeri olduğu görülmektedir. Standartlar arasından en düşük EC₅₀ değerine sahip olan α-tokoferolün en yüksek DPPH• radikali giderme aktivitesine sahip olduğu görülmektedir.

4.7. Süperoksit Anyon Radikalini Giderme Aktivitesinin Tayini

Çalışmada kullanılan bitki ekstraktlarının süperoksit radikali giderme aktivitesi *in vitro* koşullarda PMS/NADH/O₂ çözelti sisteminde süperoksit radikali oluşturularak çalışıldı ve ekstraktların bu radikali etkisizleştirebilme kapasiteleri belirlendi. Çalışılan örneklerden yonca ve asma bitkilerinin su-aseton-metanol ekstraktlarının süperoksit radikali giderme aktivitesi gösterdiği belirlendi. Bu nedenle bitkilerin su-aseton-metanol ekstraktlarının ve standart olarak seçilen askorbik asit, BHA ve BHT'nin 50 ve 125 µg/mL konsantrasyonlarına karşılık süperoksit radikali giderme aktiviteleri (% inhibisyon) grafiğe geçirildi (Şekil 4.21 ve Şekil 4.22).



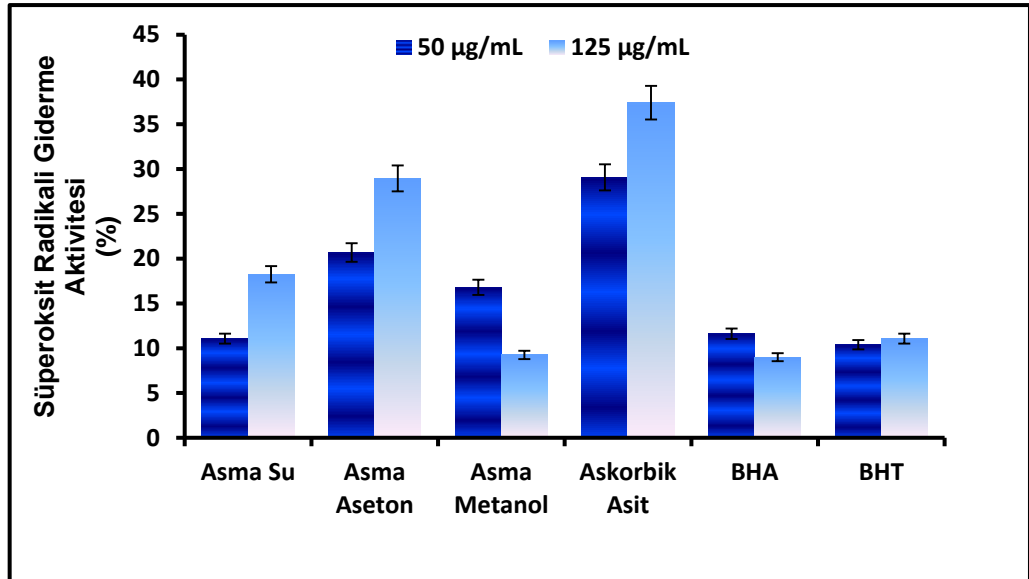
Şekil 4.21. Yonca ekstraktlarının süperoksit radikalini giderme aktiviteleri

Süperoksit anyonu diğer oksijen radikalleri ile karşılaştırıldığında daha uzun yaşam ömrüne sahiptir. Yonca bitkisinin 50 ve 125 µg/mL konsantrasyonlardaki su ekstraktlarının; %7.91±0.17, %12.17±0.18, aseton ekstraktlarının; %23.91±0.09, %22.51±0.18, metanol ekstraktlarının; %16.31±0.35, %20.93±0.18, askorbik asitin; %29.08±1.03, %37.41±0.78, BHA'nın; %11.62±0.25, %9±0.17, BHT'nin; %10.4±0.08, %11.07±0.17 oranlarında süperoksit radikali oluşumu üzerine inhibisyon etkisi gösterdikleri bulundu (Şekil 4.21). Standartların ve yonca bitkisinin su, aseton ve metanol ekstraktlarının süperoksit radikali giderme aktivitesinin A.asit>YA>YM>YS>BHT>BHA sırasında azaldığı ve 125 µg/mL konsantrasyonda

sırasıyla %37.41±0.78, %22.51±0.18, %20.93±0.18, %12.17±0.18, %11.07±0.17, %9±0.17 olduğu belirlendi (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Yonca ekstraktlarının süperoksit radikalini giderme aktiviteleri

125 µg/mL Bitki Ekstraktı	Yonca Su	Yonca Aseton	Yonca Metanol	Askorbik Asit	BHA	BHT
Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi (%)	12.17±0.18	22.51±0.18	20.93±0.18	37.41±0.78	9±0.17	11.07±0.17



Şekil 4.22. Asma ekstraktlarının süperoksit radikalini giderme aktiviteleri

Asma bitkisinin 50 ve 125 µg/mL konsantrasyonlardaki su ekstraktlarının; %11.07±0.17, %18.25±1.38, aseton ekstraktlarının; %20.68±0.34, %28.96±0.69, metanol ekstraktlarının; %16.80±0.52, %9.25±0.52, askorbik asitin; %29.08±1.03, %37.41±0.78, BHA'nın; %11.62±0.25, %9±0.17, BHT'nin; %10.4±0.08, %11.07±0.17 oranlarında süperoksit radikali oluşumu üzerine inhibisyon etkisi gösterdikleri bulundu (Şekil 4.22). Standartların ve asma bitkisinin su, aseton ve metanol ekstraktlarının süperoksit radikali giderme aktivitesinin A.asit>AA>AS>BHT>AM>BHA sırasında azaldığı ve 125 µg/mL konsantrasyonda sırasıyla %37.41±0.78, %28.96±0.69, %18.25±1.38, %11.07±0.17, %9.25±0.52, %9±0.17 olduğu belirlendi (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Asma ekstraktlarının süperoksit radikalini giderme aktiviteleri

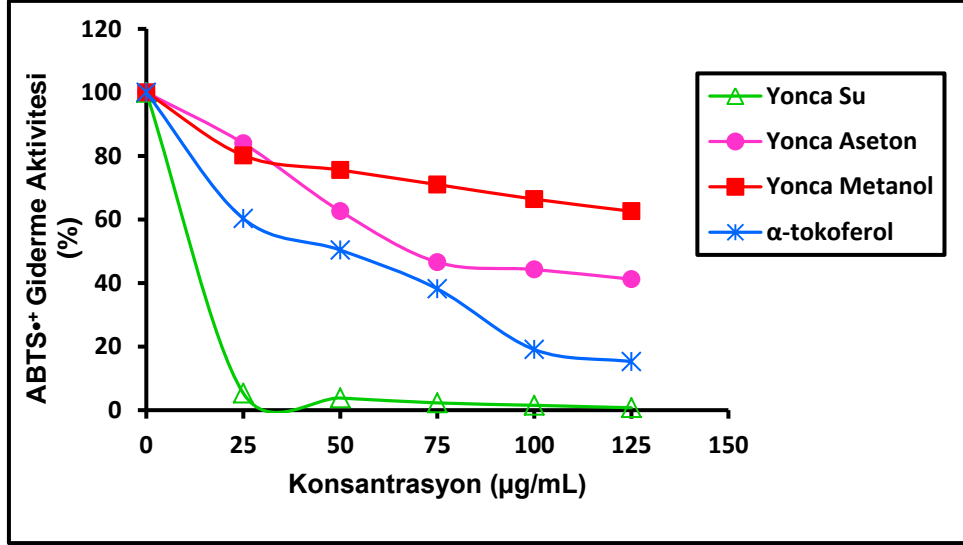
125 µg/mL Bitki Ekstraktı	Asma Su	Asma Aseton	Asma Metanol	Askorbik Asit	BHA	BHT
Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi (%)	18.25±1.38	28.96±0.69	9.25±0.52	37.41±0.78	9±0.17	11.07±0.17

Grafiklerde de görüldüğü gibi, örneklerin konsantrasyon artışı ile radikal giderme aktivitesi artışı bütün konsantrasyonlarda orantılı değildir. Dolayısıyla yonca ve asma ekstraktlarının süperoksit radikali oluşumu üzerine inhibisyon değerlerinin konsantrasyona bağımlı olmadıkları bulundu.

4.8. ABTS^{•+} Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini

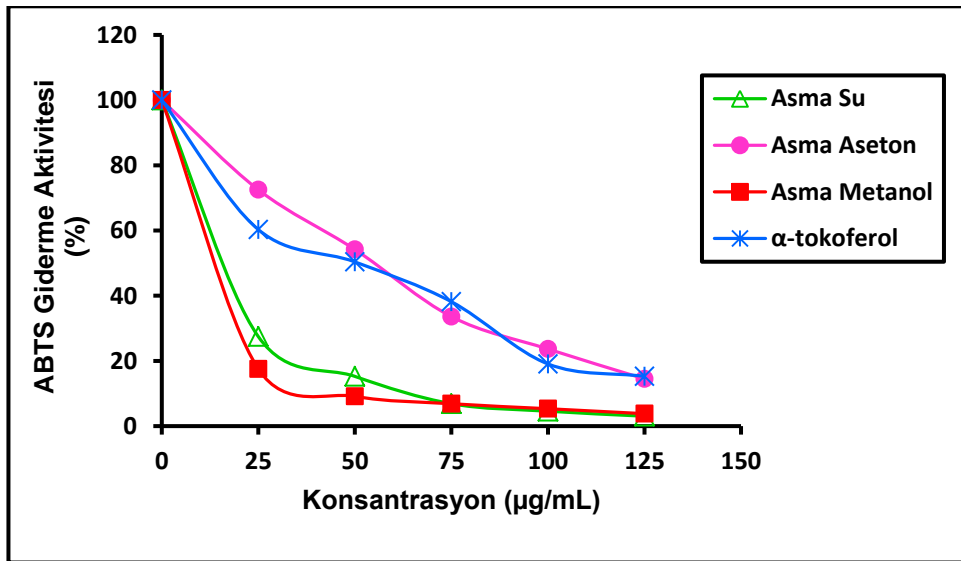
Yonca ve asma bitkilerinin ABTS^{•+} radikali giderme aktivitelerinin spektrofotometrik analizi Re ve arkadaşlarının tanımladığı metoda göre yapıldı [71]. Bitkilerin su, aseton ve metanol ekstraktlarının ABTS^{•+} radikali giderme aktiviteleri 25-125 µg/mL konsantrasyon aralığında ölçüldü. Sonuçlar α - tokoferolün inhibisyon oranları ile karşılaştırıldı (Şekil 4.23 ve Şekil 4.24).

Bu metotta öncelikle ABTS^{•+} radikali oluşturmak gerekmektedir. Burada tanımlanan ABTS^{•+} oluşumu için geliştirilmiş olan bu yöntem, ABTS ve potasyum persülfat arasındaki reaksiyon sonucu mavi/yeşil ABTS^{•+} kromoforunun doğrudan oluşumu ve oluşan bu radikal katyonun spektrofotometrik olarak ölçülmesini içerir. Bu metodun esası oluşturulan ABTS^{•+} katyonunun 734 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanır. Örneklerle uygulanan ABTS yöntemi sonuçları % radikal giderme şeklinde değerlendirilmiştir.



Şekil 4.23. Yonca ekstraktlarının ABTS•⁺ radikali giderme etkileri

ABTS•⁺ radikali giderme aktivitesi yönünden yonca bitkisinin su, aseton ve metanol ekstraktları incelendiğinde; 25-125 µg/mL konsantrasyon aralığındaki su ekstraktlarının; %94.66, %96.18, %97.71, %98.47, %99.24, aseton ekstraktlarının; %16.03, %37.40, %53.44, %55.73, %58.78, metanol ekstraktlarının; %19.85, %24.43, %29.01, %33.59, %37.40, α-tokoferolün; %39.69, %49.62, %61.83, %80.92, %84.73 % inhibisyon değerlerine sahip oldukları bulundu. α-tokoferolün ve bitki ekstraktlarının ABTS•⁺ radikali giderme aktivitesinin YS>α-tokoferol>YA>YM sırasında azaldığı ve 125 µg/mL konsantrasyonda sırasıyla %99.24, %84.73, %58.78, %37.40 olduğu belirlendi (Şekil 4.23).



Şekil 4.24. Asma ekstraktlarının ABTS•⁺ radikali giderme etkileri

ABTS^{•+} radikali giderme aktivitesi yönünden asma bitkisinin su, aseton ve metanol ekstraktları incelendiğinde; 25-125 µg/mL konsantrasyon aralığındaki su ekstraktlarının; %72.52, %84.73, %93.13, %95.42, %96.95, aseton ekstraktlarının; %27.48, %45.80, %66.41, %76.34, %85.50, metanol ekstraktlarının; %82.44, %90.84, %93.13, %94.66, %96.18, α-tokoferolün; %39.69, %49.62, %61.83, %80.92, %84.73 % inhibisyon değerlerine sahip oldukları bulundu. α-tokoferolün ve bitki ekstraktlarının ABTS^{•+} radikali giderme aktivitesinin AS>AM>AA>α-tokoferol sırasında azaldığı ve 125 µg/mL konsantrasyonda sırasıyla %96.95, %96.18, %85.50, %84.73 olduğu belirlendi (Şekil 4.24).

ABTS^{•+} radikali giderme aktivitesi sonuçları detaylı incelendiğinde; çalışılan bitki ekstraktlarının bir kısmının standartın aynı konsantrasyonunda elde edilen radikal giderme aktivitesi sonuçlarıyla yakın değerde olduğu görüldü. Şekil 4.23 ve Şekil 4.24'te de görüldüğü gibi, yonca ve asma bitki ekstraktlarının ABTS^{•+} radikali giderme aktiviteleri konsantrasyona bağımlıdır. Asma bitkisinin su, aseton ve metanol ekstraktlarının ABTS^{•+} radikali giderme etkisinin standart olarak kullanılan α-tokoferolden daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Reaksiyon ortamındaki ABTS^{•+} radikalının %50'sinin yok edilmesi için gereken etkili antioksidan konsantrasyonu EC₅₀ değeri olarak tanımlanır ve düşük EC₅₀ değeri yüksek radikal giderme aktivitesinin göstergesidir. Çalışmada kullanılan bitki ekstraktlarının her biri için ayrı ayrı çizilen konsantrasyon-% inhibisyon grafiklerinden EC₅₀ değerleri belirlendi. Elde edilen değerler aşağıdaki tabloda verildi (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. Çalışılan bitki ekstraktlarının ve standartın ABTS^{•+} radikali giderme aktivitesi sonuçlarından elde edilen EC₅₀ değerleri

EC ₅₀ (µg/mL)			
Ekstrakt	Su	Aseton	Metanol
Yonca	10.69±0.01	40.82±0.61	22.35±0.70
Asma	14.49±0.28	45.87±0.47	12.32±0.16
α-tokoferol	28.10±0.47		

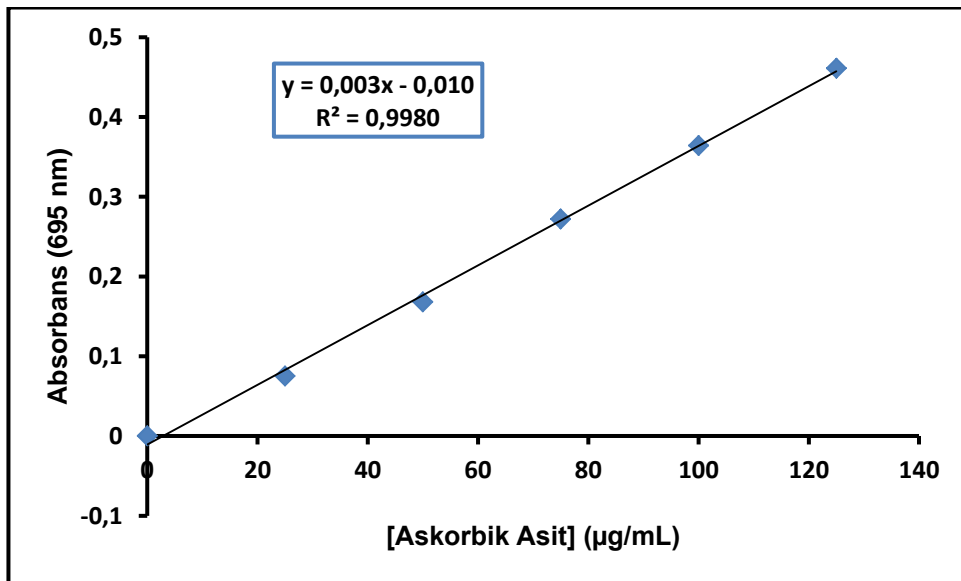
Tablo 4.8'e göre; çalışılan ekstraktlar içinde en düşük EC₅₀ değeri yonca su ve asma metanol ekstraktlarında, en yüksek EC₅₀ değeri yonca aseton ve asma aseton ekstraktlarında tayin edildi.

4.9. Fosfomolibden Metodu ile Toplam Antioksidan Aktivite Tayini

Yonca ve asma bitkilerinin su, aseton ve metanol ekstraktlarının toplam antioksidan aktiviteleri amonyum molibdat, sodyum fosfat ve sülfürik asit içeren belirteç çözeltisi ile tayin edildi. Bu antioksidan kapasite tayin yöntemi, ortamda bulunan Mo (VI)'nın ortama konan indirgeyici ajan (antioksidan bileşikler) tarafından Mo (V)'e indirgenmesi sonucu oluşan yeşil rengin spektrofotometrik olarak (695 nm) ölçümü esasına dayanmaktadır.

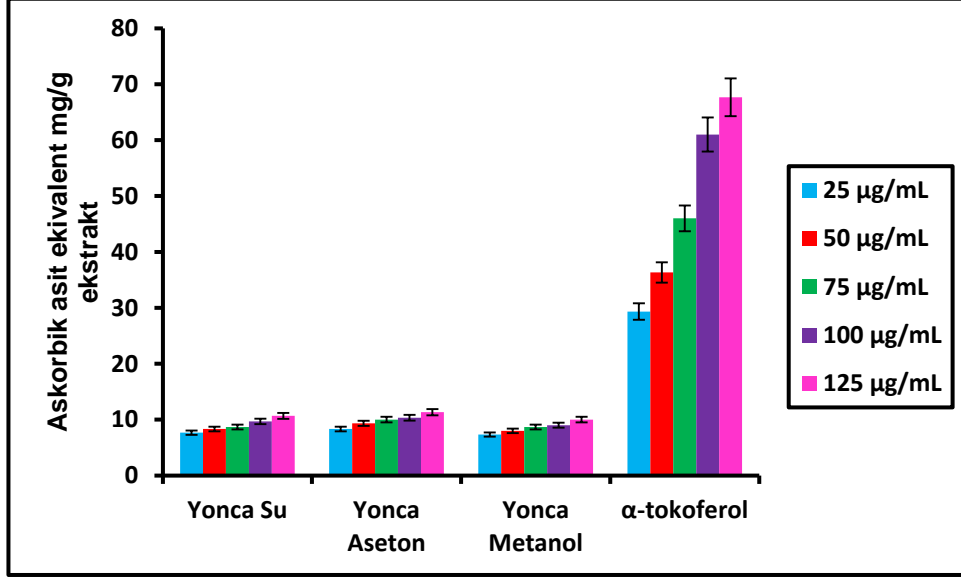
Standart antioksidan olarak askorbik asit ve α -tokoferol kullanıldı. Fosfomolibden spektrofotometrik yöntemi ile yapılan bu çalışma sonrasında örneklerin antioksidan aktiviteleri mg askorbik asit eşdeğeri (mg A.asitE/g ekstrakt) şeklinde ifade edildi (R^2 : 0,9980). Bu amaçla hazırlanan standart askorbik asit grafiği Şekil 4.25'te verilmiştir. Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

$$\text{Absorbans } (\lambda: 695 \text{ nm}) = 0.003 [\text{Askorbik Asit}] - 0.010$$



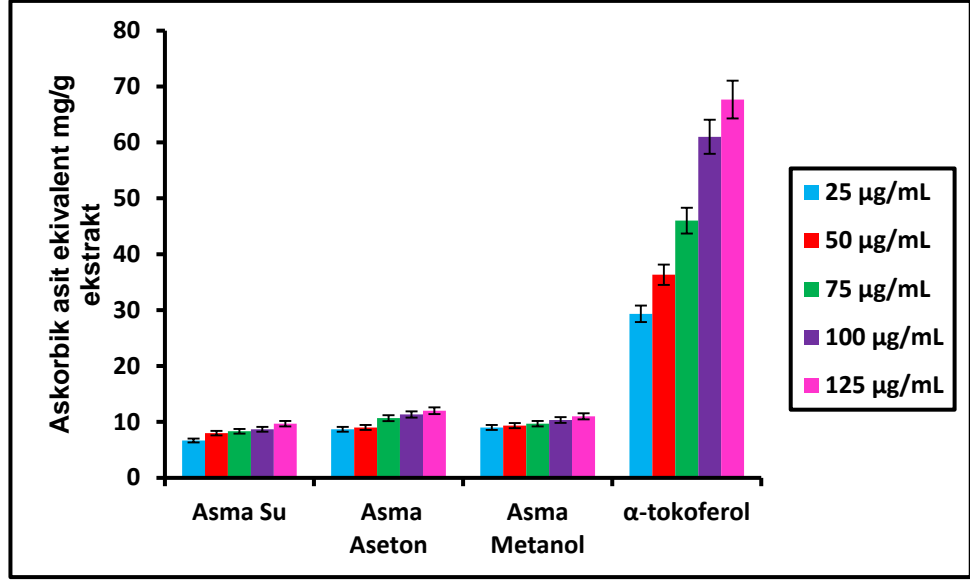
Şekil 4.25. Askorbik asit standart grafiği

Antioksidan kapasite tayini sonucunda araştırma materyali olan yonca ve asma bitkilerinin su, aseton ve metanol ekstraktlarının standart antioksidan ajana (askorbik asit) kıyasla antioksidan kapasiteleri Şekil 4.26 ve Şekil 4.27 'da verilmiştir.



Şekil 4.26. Yonca bitkisinin su, aseton ve metanol ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri

Yonca bitkisinin 25-125 µg/mL konsantrasyon aralığındaki su ekstraktlarının sırasıyla; 7.67 mg/g, 8.33 mg/g, 8.67 mg/g, 9.67 mg/g, 10.67 mg/g, aseton ekstraktlarının; 8.33 mg/g, 9.33 mg/g, 10 mg/g, 10.33 mg/g, 11.33 mg/g, metanol ekstraktlarının; 7.33 mg/g, 8 mg/g, 8.67 mg/g, 9 mg/g, 10 mg/g, α-tokoferolün; 29.33 mg/g, 36.33 mg/g, 46 mg/g, 61 mg/g, 67.67 mg/g askorbik asit eşdeğerliğinde antioksidan aktiviteye sahip oldukları bulundu. Yonca bitkisinin su, aseton ve metanol ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri YA>YS>YM sırasında azaldığı ve 125 µg/mL konsantrasyonda sırasıyla 11.33 mg/g, 10.67 mg/g, 10 mg/g olduğu belirlendi (Şekil 4.26).



Şekil 4.27. Asma bitkisinin su, aseton ve metanol ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri

Asma bitkisinin 25-125 µg/mL konsantrasyon aralığındaki su ekstraktlarının sırasıyla; 6.67 mg/g, 8 mg/g, 8.33 mg/g, 8.67 mg/g, 9.67 mg/g, aseton ekstraktlarının; 8.67 mg/g, 9 mg/g, 10.67 mg/g, 11.33 mg/g, 12 mg/g, metanol ekstraktlarının; 9 mg/g, 9.33 mg/g, 9.67 mg/g, 10.33 mg/g, 11 mg/g, α-tokoferolün; 29.33 mg/g, 36.33 mg/g, 46 mg/g, 61 mg/g, 67.67 mg/g askorbik asit eşdeğerliğinde antioksidan aktiviteye sahip oldukları bulundu. Asma bitkisinin su, aseton ve metanol ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri AA>AM>AS sırasında azaldığı ve 125 µg/mL konsantrasyonda sırasıyla 12 mg/g, 11 mg/g, 9.67 mg/g olduğu belirlendi (Şekil 4.27).

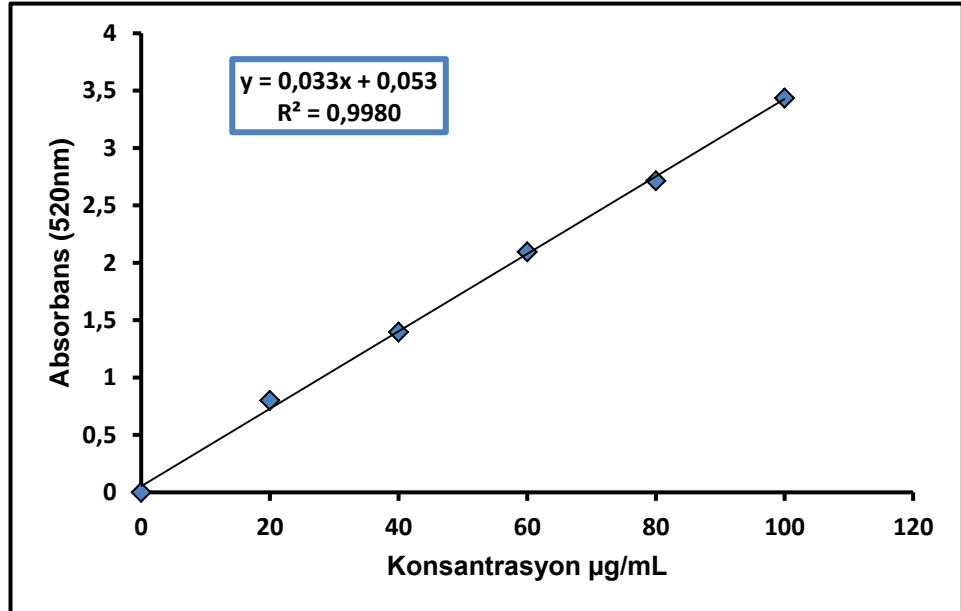
Sonuçlar detaylı incelendiğinde; 25-125 µg/mL konsantrasyon aralığında çalışılan yonca ve asma bitki ekstraktlarının hemen hemen bütün konsantrasyonlarından elde edilen antioksidan aktivite sonuçlarının birbirlerine çok yakın değerlerde oldukları görüldü.

4.10. Prolin Tayini

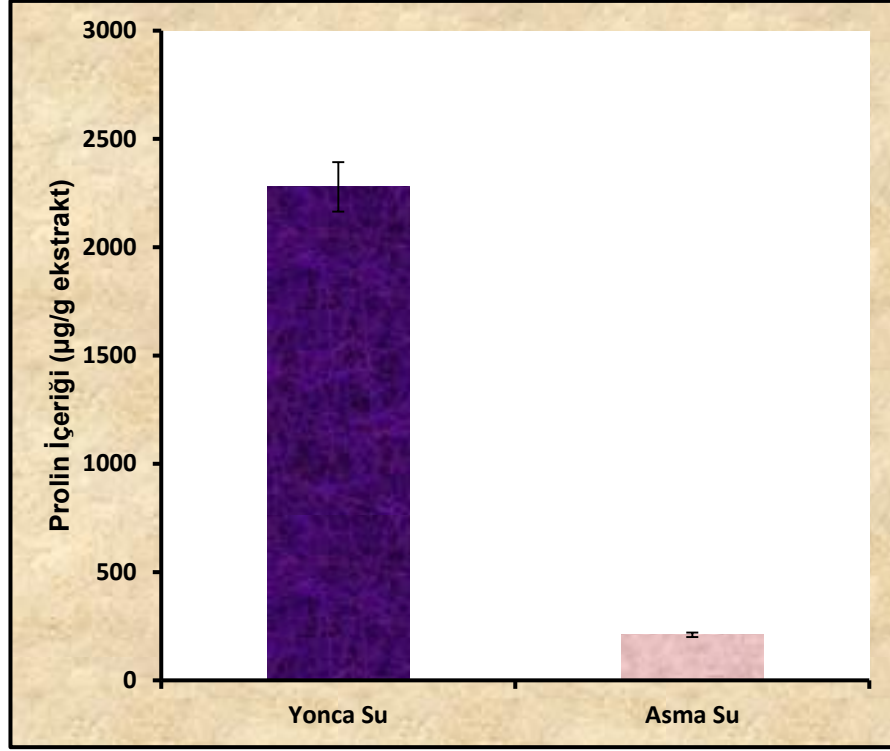
Bazı amino asitler antioksidan özelliklere sahiptir. Prolinde bu antioksidan amino asitlerden biri ve aynı zamanda proteinlerde bulunan 20 amino asitten birisidir. Hafif tatlımsı olan prolin bazı içeceklerde tatlandırıcı olarak kullanılabilir. Enzimatik olmayan hücre içi ROT'ni giderme molekülüdür [89]. SR'leri ve ROT'ni gidererek ve redoks homeostaziyi koruyarak strese karşı koruma sağlayan bir amino asittir [42, 75]. Strese maruz kalan bitkilerde prolin birikimi rapor edilmiştir (Hare ve Cress, 1997). Prolinin birikmesi bitkilerde pentoz fosfat metabolik yolunu indüklediği ve bu yolun indüklenmesinin de fenolik bileşiklerin sentezini arttırdığı bildirilmiştir [76, 77, 90]. Bu nedenle yenilebilir bitkilerin prolin içeriği antioksidan kapasitesinin bir ölçüsü olarak kabul edilir. Şekil 4.29'de örneklerin prolin içerikleri listelenmiştir.

Prolin amino asiti kullanılarak standart grafik hazırlandı. Hazırlanan standart eğriden gidilerek elde edilen formülden örneklerin su ekstraktlarında bulunan prolin içerikleri μg prolin/g ekstrakt şeklinde hesaplandı (R^2 : 0,9980). Bu amaçla hazırlanan standart prolin grafiği Şekil 4.28'de verilmiştir. Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

$$\text{Absorbans } (\lambda: 520 \text{ nm}) = 0.033 [\text{Prolin}] + 0.053$$



Şekil 4.28. Prolin standart grafiği



Şekil 4.29. Yonca ve asma bitkilerinin su ekstraktlarının prolin içerikleri

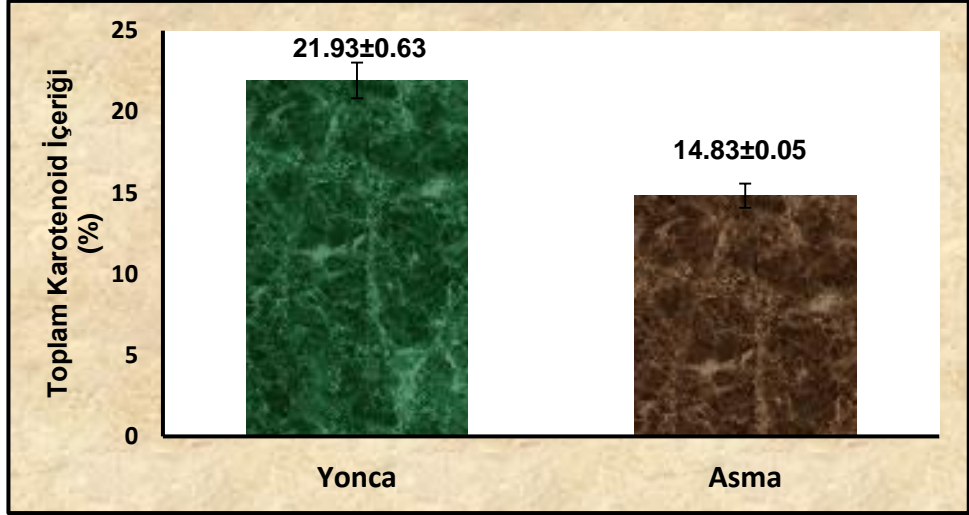
Şekil 4.29’da görüldüğü gibi; yonca su ekstraktının $2278.58 \pm 105.32 \mu\text{g/g}$ ekstrakt ve asma su ekstraktının $210.71 \pm 11.21 \mu\text{g/g}$ ekstrakt prolin içerdiği belirlendi.

Bu çalışmada prolin içeriği artan konsantrasyonla birlikte arttı. Çalışılan yonca ve asma bitkileri karşılaştırıldığında; en yüksek prolin miktarına büyük bir farkla yonca su ekstraktının sahip olduğu tespit edildi.

4.11. Karotenoid Tayini

Karotenoidler, konjuge çift bağların doğrusal bir dizi halinde düzenlenmesiyle oluşan yapıyla güçlü antioksidanlardır. Karotenodilerin singlet oksijeni ($^1\text{O}_2$) yakalama kapasitesinin özellikle konjuge karbon-karbon çift bağ sisteminden kaynaklandığı ve bu nedenle bütün karotenoidlerin antioksidan aktivitelerinin eşit olmadığı belirtilmektedir.

Antioksidan aktiviteye sahip olan karotenoid miktarı, numunelerde ölçümü hedeflenen antioksidan kapasitelerin üzerinde etkili olabileceği dikkate alınarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan yonca ve asma bitkilerinin toplam karotenoid içeriğini belirleyebilmek için kuru örneklerin $405.2 \text{ mg}'ı$ ile çalışıldı.

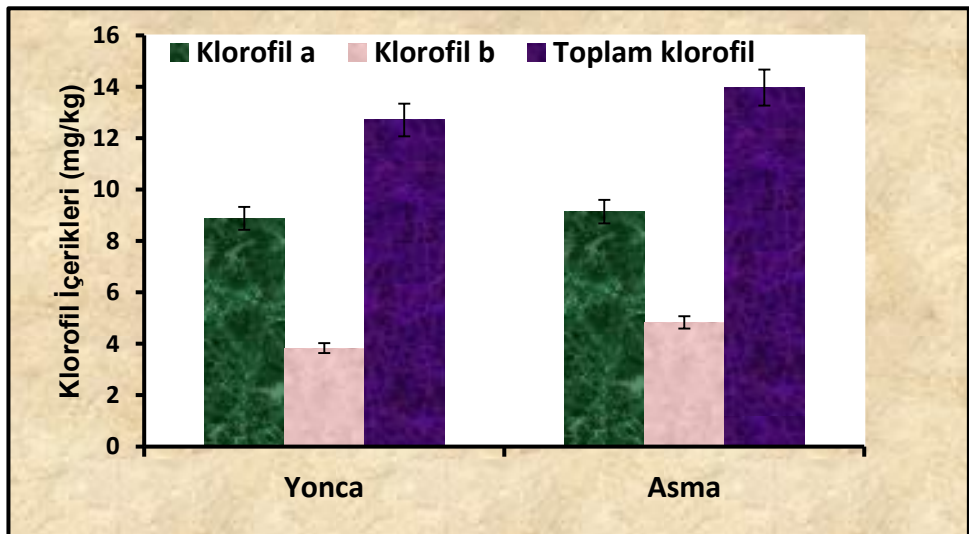


Şekil 4.30. Yonca ve asma bitkilerinin toplam karotenoid içerikleri

Şekil 4.30’da görüldüğü üzere, çalışılan bitkilerin toplam karotenoid içerikleri karşılaştırıldığında; yonca bitkisinin asmaya göre daha fazla karotenoid miktarına sahip olduğu bulundu.

4.12. Klorofil Tayini

Yonca ve asma bitkisinin toplam klorofil içeriği bitkilerin taze ağırlıkları göz önünde bulundurularak mg/kg cinsinden hesaplandı. Taze bitki dokularında bulunan klorofil içerikleri Şekil 4.31’de verilmiştir. Şekil 4.31’de görüldüğü üzere, çalışılan bitkilerin klorofil içerikleri karşılaştırıldığında; her iki bitkinin klorofil miktarlarının birbirlerine yakın değerlerde olduğu tespit edildi.

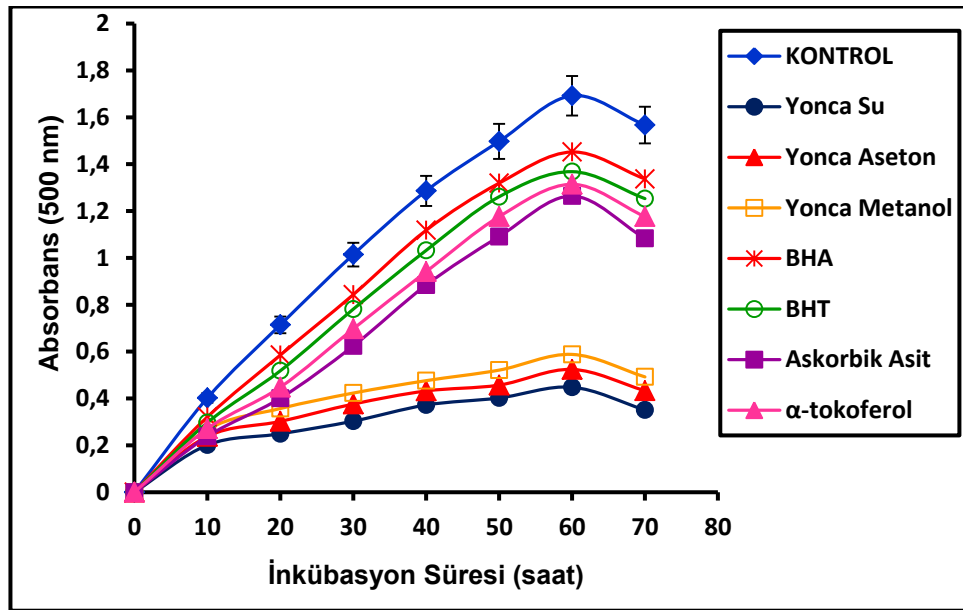


Şekil 4.31. Yonca ve asma bitkilerinin klorofil içerikleri

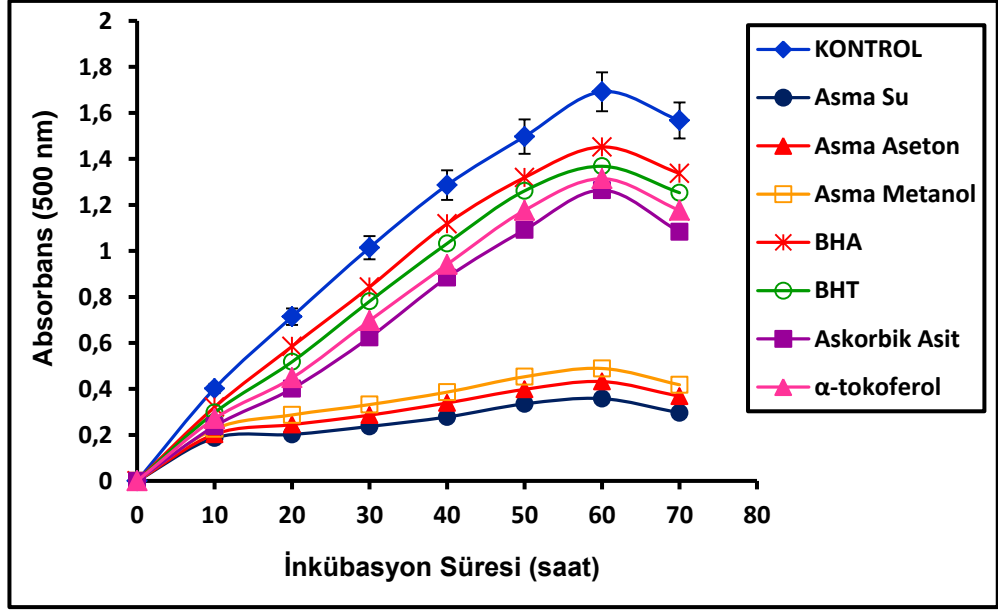
Yonca bitkisinin klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil içerikleri sırasıyla 8.89 ± 0.82 mg/kg, 3.82 ± 0.55 mg/kg, 12.71 ± 1.36 mg/kg ve asma bitkisinin klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil içerikleri sırasıyla 9.14 ± 0.95 mg/kg, 4.83 ± 1.06 mg/kg, 13.97 ± 2.00 mg/kg olduğu tespit edildi.

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

Bitkisel ekstre veya onlardan saflaştırılmış maddelerin toplam antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi için birçok metod mevcuttur. Çalışmada kullandığımız yonca ve asma bitkilerinin yaprak kısımlarından elde edilen su, aseton ve metanol ekstralarının antioksidan aktiviteleri “Ferrik Tiyosiyanat Metoduna” göre belirlendi ve sonuçlar BHA, BHT, α -tokoferol ve askorbik asitin inhibisyon oranları ile karşılaştırıldı. İnkübasyon sırasında emülsiyonda oluşan peroksitlerin miktarı, oksidasyonun ilerleyişi sırasında 10 saatte bir ölçüm alınarak 100 saat boyunca takip edildi. Kontrol absorbansının maksimum olduğu yani lipid peroksidasyonunun en fazla olduğu zamana kadar olan veriler kullanılarak, herbir ekstrakt ve standart maddeler için absorbans-zaman grafikleri çizildi (Şekil 4.32 ve 4.33). Grafikler yardımıyla kontrolün maksimum absorbansı ve her bir örneğin maksimum peroksit oksidasyonu anına karşılık gelen absorbansları belirlendi.

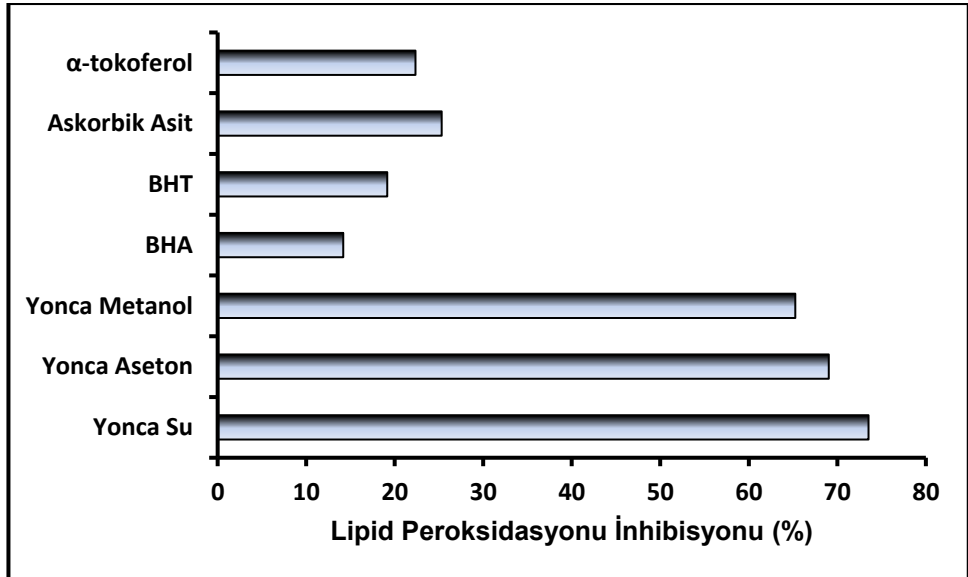


Şekil 4.32. Yonca ekstraktlarının ve standartların linoleik asit peroksidasyonunun zamanla değişimi



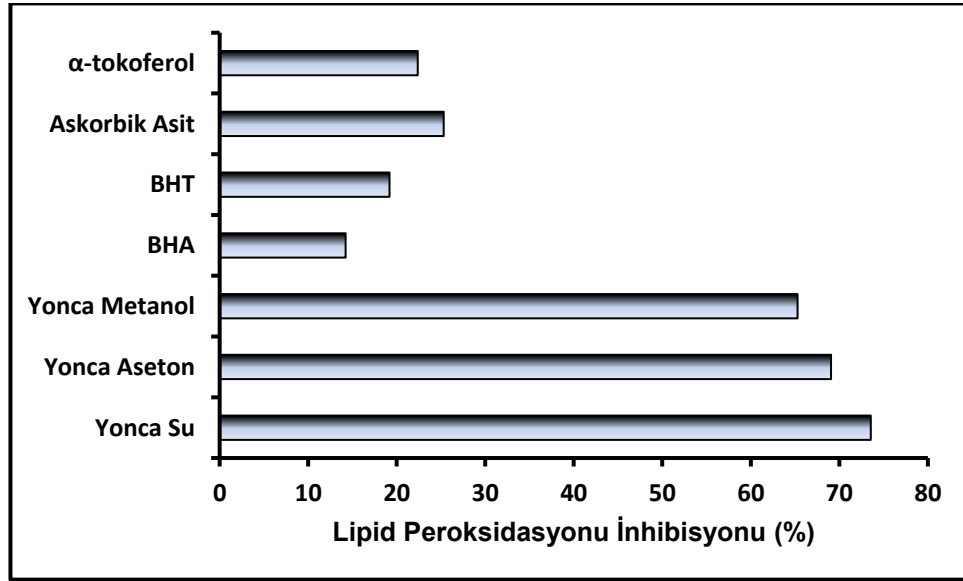
Şekil 4.33. Asma ekstraktlarının ve standartların linoleik asit peroksidasyonunun zamanla değişimi

Yonca, asma ekstrelerinin ve standart antioksidanların linoleik asit emülsiyonunu inhibe etme yüzdeleri, kontrol değerinin maksimuma ulaştığı inkübasyon süresi olan altmışıncı saat baz alınarak hesaplanmıştır (Şekil 4.34 ve Şekil 4.35).



Şekil 4.34. Yonca bitkisinin su, aseton ve metanol ekstraktlarının 75 µg/mL konsantrasyonunda lipid peroksidasyonunu inhibe yüzdelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, askorbik asit ve α-tokoferol ile karşılaştırılması

Şekil 4.34'te görüldüğü gibi karşılaştırmalar yapıldığında; 75 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan yonca su, aseton ve metanol ekstraları lipid peroksidasyonunu sırasıyla %73.55±0.04, %69.06±0.13 ve %65.28±0.21 oranında inhibe ederken aynı konsantrasyonda BHA, BHT, askorbik asit ve α-tokoferol'ün lipid peroksidasyonunu yine sırasıyla %14.22±0.12, %19.18±0.13, %25.30±0.33 ve %22.37±0.04 oranları ile inhibe ettikleri gözlenmiştir.



Şekil 4.35. Asma bitkisinin su, aseton ve metanol ekstralarının 75 µg/mL konsantrasyonunda lipid peroksidasyonunu inhibe yüzdelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, askorbik asit ve α-tokoferol ile karşılaştırılması

Şekil 4.35'te görüldüğü gibi karşılaştırmalar yapıldığında; 75 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan asma su, aseton ve metanol ekstraları lipid peroksidasyonunu sırasıyla %78.87±0.30, %74.47±0.17 ve %71.10±0.25 oranında inhibe ederken aynı konsantrasyonda BHA, BHT, askorbik asit ve α-tokoferol'ün lipid peroksidasyonunu yine sırasıyla %14.22±0.12, %19.18±0.13, %25.30±0.33 ve %22.37±0.04 oranları ile inhibe ettikleri gözlenmiştir.

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi, Türkiye’de de tıbbi açıdan önemli olan bitkiler yüzyıllardan beri hastalıkları tedavi etmek amacıyla kullanılmaktadır [7, 45]. Geçen 40 yıl boyunca bitkilerin antioksidan aktiviteleriyle ilgilenilmeye başlandı. Son yirmi yılda antioksidan aktivite gösteren bitkilerin gıda ve beslenme alanlarındaki kullanımları hakkında oldukça fazla sayıda çalışmalar yapıldı ve bu yoğun çalışmalar halen devam etmektedir. Bunun sebebi ise bitkilerin birer antioksidan olan karotenoid, flavonoid ve fenolik bileşik içeriği bakımından zengin olmaları ve herhangi bir yan etkiye sahip olmamalarıdır. Sıklıkla kullanılan BHA ve BHT gibi sentetik antioksidanların bazı yan etkilerinin bulunmasından sonra araştırmalar tamamen bitkisel esaslı antioksidanlar üzerine yoğunlaşmıştır [35]. Antioksidan aktivite tayin metodları; gıda, farmasötik veya tıbbi amaçlı kullanılan bitkilerin veya onlardan saflaştırılan biyolojik aktif maddelerin biyolojik aktivite kapasitelerinin aydınlatılması bakımından yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Antioksidan kapasite tayini için bugün literatürlerde yirmiden fazla yöntem vardır ve bunlara her gün yenileri eklenmektedir.

Birçok meyve, sebze ve bitkinin doğal olarak yetiştiği yerlerden biri olan ülkemiz, dünyada önemli gen merkezlerinden biridir. Birçok bitki gibi yonca ve asma da doğal olarak yetişmektedir. Bu tezde antioksidan kapasiteleri üzerine fazlaca bir araştırma yapılmayan *Fabaceae* familyasına ait yonca ve *Vitaceae* familyasına ait olan asma yapraklarının antioksidan aktivitelerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Birçok araştırmacı su, metanol, etanol, aseton, petrol eteri, etil asetat, kloroform, diklorometan gibi çeşitli çözücü veya çözücü karışımları ile homojenizer kullanarak, oda koşullarında bekleterek (maserasyon), çözücü ile kaynatarak ve Soxhlet ekstraksiyonu ile ekstrakt elde etmişlerdir [83, 57]. Çalışmamızda ekstraksiyon için polaritesi yüksek, toksisitesi diğer çözücülere oranla düşük olan, ekonomik açıdan uygun ve kolay temin edilebilecek çözücüler tercih edilmiştir.

Hayouni vd. (2007) ile Özcan vd. (2007) farklı yöntemler ve farklı polariteye sahip çözücüler kullanarak yaptıkları araştırmalar sonucunda % ekstrakt miktarları üzerine polar çözücülerin apolar çözücülerden daha etkili olduğunu bildirmişlerdir [62].

Bu bulgularla uyumlu olarak, çalışmamızda kullanılan yonca bitkisinden ekstrakte edilebilen bileşiklerin ekstraksiyon verimi su>metanol>aseton sıralaması şeklindedir (Tablo 4.1). Ancak asma bitkisinden elde edilebilen bileşiklerin ekstraksiyon verimleri, çözücü polarite sıralaması ile uyum içerisinde değildir. Asma bitkisinin özüt verimi metanol>su>aseton sıralaması şeklindedir (Tablo 4.2).

5.1. Toplam Fenolik Bileşik (TPC) Tayini

Bitkilerde antioksidan aktiviteden sorumlu binlerce bileşik vardır. Bu bileşiklerin önemli bir kısmı fenolik karakterdedir. Bu nedenle fenolik bileşik içeriği kimi zaman antioksidan aktivitenin bir ölçüsü gibi düşünülebilir. Ancak bu konuda tespit edilmiş pozitif bir korelasyon yoktur ve bu ilişki bitkiden bitkiye hatta aynı bitkinin çeşitleri arasında farklılık gösterir. Fenolik bileşikler, singlet oksijen, süperoksit anyon ve hidroksil radikalleri gibi serbest oksijen radikalleri gidericisi ve metal iyonları şelatörlüğü gibi özelliklerinden dolayı güçlü antioksidan bileşikler olarak adlandırılır. Toplam fenolik bileşik içeriği büyük oranda genetik faktörler ve çevre koşullarına bağlıdır.

Çalışmamızda toplam fenolik bileşik içerikleri incelendiğinde; Şekil 4.3'te görüldüğü gibi gallik asit eşdeğeri olarak yonca bitkisinin su, aseton ve metanol ekstraktlarının sırasıyla 52±0.00 mg/g, 40±0.71 mg/g ve 16.67±1.53 mg/g fenolik madde ve Şekil 4.4'te görüldüğü gibi gallik asit eşdeğeri olarak asma bitkisinin su, aseton ve metanol ekstraktlarının sırasıyla 60.33±0.58 mg/g, 48.67±1.15 mg/g ve 70.67±1.15 mg/g fenolik madde içerdikleri tespit edildi. Yonca ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları YS>YA>YM sırasında azalma gösterirken, asma ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları AM>AS>AA sırasında azalma gösterdi.

Yonca bitkisi pirogallol eşdeğeri olarak Şekil 4.5'de görüldüğü gibi su, aseton ve metanol ekstraktlarının sırasıyla 49±0.00 mg/g, 37±1.00 mg/g ve 13.67±1.53 mg/g fenolik madde ve asma bitkisi pirogallol eşdeğeri olarak Şekil 4.6'da görüldüğü gibi su, aseton ve metanol ekstraktlarının sırasıyla 57.33±0.58 mg/g, 45.67±1.15 mg/g ve 67.67±1.15 mg/g fenolik madde içerdikleri tespit edildi. Yonca ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları YS>YA>YM sırasında azalma gösterirken, asma ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları AM>AS>AA sırasında azalma gösterdi.

Analizlenen örnekler incelendiğinde yüksek fenolik madde miktarı yüksek antioksidan aktivite ile ilişkilendirilebilir. Antioksidan aktivitenin yüksek olduğu örneklerde toplam fenolik maddenin de daha yüksek olduğu görülmüştür, ancak sonuçlar dikkatle incelendiğinde yüksek fenolik madde miktarına sahip olmanın, tüm antioksidan aktivitesi metodlarında yüksek sonuç vermediği görülmüştür.

Asma yaprağının etanol ekstraktının gallik asit eşdeğeri olarak 98.84 ± 9.26 mg/g fenolik bileşik içerdiği bulunmuştur [66].

Orhan vd., (2006) tarafından ise asma yaprağının gallik asit eşdeğeri olarak su ekstraktının 37.97 ± 0.90 mg/g, n-bütanol ekstraktının 57.17 ± 6.5 mg/g ve etanol ekstraktının 205.79 ± 8.89 mg/g fenolik madde içerdiği tespit edilmiştir [60].

Maydonoz yaprağının su ve metanol ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriği kafeik asit eşdeğeri olarak sırasıyla 89.3 ± 2.6 mg/100g ve 152 ± 9.6 mg/100g, kişniş yaprağının su ve metanol ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriği kafeik asit eşdeğeri olarak sırasıyla 189 ± 8.3 mg/100g ve 110 ± 9.9 mg/100g olduğu saptanmıştır [87].

Arum D. bitkisinin metanol ve aseton ekstraktlarının içerdiği fenol miktarı gallik aside eşdeğer olarak hesaplandığında metanol (0.05 mg GAE/mg) ekstraktının asetondan (0.033 mg GAE/mg) daha fazla miktarda fenol ihtiva ettiği gözlemlendi.

Ningappa vd., (2008) köri yaprağının su, etil alkol, etil alkol:su (1:1), hekzan ve kloroform ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri olarak sırasıyla 54 ± 4.4 , 104 ± 5.2 , 168 ± 5.6 , 18 ± 2.5 ve 21 ± 2.8 mg/g fenolik madde içerdiğini bildirmişlerdir [58].

Velioğlu vd., (1998) 28 bitkisel ürünün (ayçiçeği, keten tohumu, buğday ruşeymi, kara buğday, bazı meyve sebzeler ve tıbbi bitkiler) antioksidan aktivitesini ve toplam fenolik içeriğini araştırmışlardır. Fenolik içeriğin $169-10548$ mg/100g kuru ağırlık aralığında antioksidan aktivitelerinin ise %53.7-99.1 aralığında değiştiğini belirlemişlerdir. Tüm bitkisel materyallerin toplam fenolik içeriği ile antioksidan aktiviteleri arasında sıkı bir ilişkinin olduğunu tespit etmişlerdir [86].

5.2. Toplam Flavonoid İçeriğinin Tayini

Flavonoidler; mantarlarda da görülen bütün yüksek bitkilerde bulunan heterojenik ikincil metabolitlerin en geniş ve en bol olan gruplarından biridir. Önceleri

gereksiz besin maddeleri olarak düşünülürken, daha sonra yapılan araştırmalarla flavonoidlerin antioksidan, anti-alerjik, anti-inflamasyon, anti-viral, anti-proliferatif ve anti-kanserojen etkilere sahip oldukları kanıtlanmıştır. Kimyasal olarak flavonoidlerin güçlü antioksidan özellikleri üç özellikten kaynaklanır; aromatik halka yapılarındaki hidroksil grupları sayesinde hidrojen vererek redoks reaksiyonlarına girebilirler. Bu sayede SR⁺leri yok ederler. Aromatik heterosiklik ve çoklu doymamış bağlardan oluşan yapılarıyla dayanıklı bir kimyasal yapı oluştururlar. Metal şelatlama kapasitesine sahip yapısal grupları vasıtasıyla OH⁻ ve O⁻² gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engelleyebilirler [16]. Yakın tarihlerde yapılan çalışmalarda zengin flavonoid diyetlerinin kalp hastalıklarının azalmasında rol oynadığı yönünde bulgular mevcuttur.

şekil 4.9'da görüldüğü gibi kateşin eşdeğeri olarak yonca bitkisinin su, aseton ve metanol ekstraktlarının sırasıyla 27.87±0.76 mg/g, 44.51±0.12 mg/g ve 26.02±0.22 mg/g flavonoid madde ve şekil 4.10'da görüldüğü gibi kateşin eşdeğeri olarak asma bitkisinin su, aseton ve metanol ekstraktlarının sırasıyla 59.87±0.23 mg/g, 45.20±0.86 mg/g ve 72.90±0.40 mg/g flavonoid madde içerdikleri tespit edildi. Yonca ekstraktlarının toplam flavonoid madde miktarları sırasıyla YA>YS>YM sırasında azalma gösterirken, asma ekstraktlarının toplam flavonoid madde miktarları AM>AS>AA sırasında azalma gösterdi.

Yonca bitkisi gallik asit eşdeğeri olarak şekil 4.11'de görüldüğü gibi su, aseton ve metanol ekstraktlarının sırasıyla 366.33±9.81 mg/g, 582.67±1.53 mg/g ve 342.33±2.89 mg/g flavonoid madde ve asma bitkisi gallik asit eşdeğeri olarak şekil 4.12'de görüldüğü gibi su, aseton ve metanol ekstraktlarının sırasıyla 782.33±3.06 mg/g, 591.67±11.24 mg/g ve 951.67±5.13 mg/g flavonoid madde içerdikleri tespit edildi. Yonca ekstraktlarının toplam flavonoid madde miktarları sırasıyla YA>YS>YM sırasında azalma gösterirken, asma ekstraktlarının toplam flavonoid madde miktarları AM>AS>AA sırasında azalma gösterdi.

Saçan ve Yanardağ (2010) pazı yaprağının su ekstraktının kateşin eşdeğeri olarak 11.88±1.46 µg/g flavonoid madde içerdini bulmuşlardır [74].

Yeşiloğlu ve şit (2012) çalışmalarında reyhan su, etanol ve aseton ekstraktlarının kateşin eşdeğeri olarak sırasıyla 42.5±0.5 mg/g, 24.2±0.5 mg/g ve 36.6±1.5 mg/g flavonoid madde içerdiklerini tespit etmişlerdir [91].

5.3. H₂O₂ Giderme Aktivitesinin Tayini

Düşük konsantrasyonlarda inert olan hidrojen peroksit, uygun koşullar altında Fe⁺² iyonlarıyla kombinasyona girerek oksidasyon gücünü ortaya koymaktadır. Ortamda antioksidan maddenin belirmesiyle bu oksidasyon inhibe edilmektedir. Antioksidan maddelerin H₂O₂ inhibisyon mekanizmaları, birden fazla kimyasal yolla gerçekleşebildiği için, bu mekanizmaları tek bir açıdan açıklamak mümkün değildir. Antioksidan maddeler, H₂O₂ ile doğrudan reaksiyona girebildiği gibi, H₂O₂ veya enzimler ile de reaksiyona girebilmekte ve inhibisyonu gerçekleştirebilmektedirler [43]. Antioksidan maddelerin H₂O₂ yakalamadaki etkinliğinin yüksek ya da düşük olmasında en önemli etken, fenolik bileşiklerin aromatik zincirlerindeki bağlı olan OH grubu sayısı ve bu grupların bileşikte buldukları konumlarıdır. Ayrıca bu sebeplere bağlı olarak antioksidanların yapısında yer alan farklı grup karakterlerinin (karboksil veya asetil gruplar) hidroksil gruplarıyla ilişkileri de inhibisyon gücünde büyük ölçüde etkilidir [82].

Yonca ve asma çözücü ekstraktlarının H₂O₂ giderme aktiviteleri konsantrasyona bağımlı değildir. Yonca bitkisinin metanol ayrıca asma bitkisinin de su ve metanol ekstraktlarının H₂O₂ yakalama aktivitesine sahip olmadığı görüldü. 125 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan standart ve bitki ekstraktları arasından; yonca su ekstraktının %96.04±0.51'lik değerle en yüksek inhibisyon aktivitesi gösterdiği bulundu. H₂O₂ inhibisyon etkisi YS>BHT>α-tokoferol>YA>AA>A.asit sırasında azalma gösterdi. 50 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan standart antioksidan BHA'nın (67.01±0.20) trolox'dan (30.85±0.19) daha yüksek H₂O₂ giderme aktivitesi gösterdiği bulundu.

Eruçar (2006), böğürtlen yaprağının metanol-su (%80) ekstraktının H₂O₂ inhibisyon etkisinin %14.96'lık değerle düşük olduğunu tespit etmiştir [28].

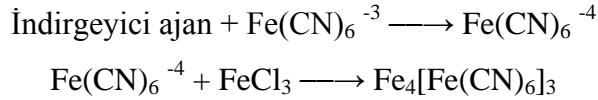
El ve Karakaya (2004), kateşin ve quersetin standartlarının %10.63 ve %22.77 (50 mg/mL madde miktarı için) H₂O₂ yakalama aktivitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir [25].

Yeşiloğlu ve Şit (2012) tarafından 100 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan reyhan su, etanol ve aseton ekstraktlarının H₂O₂ giderme aktivitesi birer standart antioksidan olan BHA, BHT, askorbik asit ve α-tokoferol ile karşılaştırılmış ve ekstraktların sırasıyla %65.07, %45.49 ve %39.92 oranında inhibisyon etkisi

gösterdikleri bulunmuştur. Aynı konsantrasyondaki standartların ise sırasıyla %88.87, %86.76, %88.68 ve %88.29 oranında hidrojen peroksiti giderdiği tespit edilmiştir [91].

5.4. Toplam Ferrik İyonlarını (Fe^{+3}) İndirgeme Kapasitesinin Tayini

Biyoaktif bileşiklerin indirgeme gücünü yansıtan, elektron verme kapasitesinin antioksidan aktivite ile ilgili olduğu bildirilmiştir [4]. Antioksidanlar indirgeyici olabilir ve bir maddenin başka bir maddeyi yükseltgeyerek indirgemesi reaksiyonu olarak tanımlanan redoks reaksiyonlarında, redüktantlarla oksidanların stabilizasyonu şeklinde olabilir. Bir bileşiğin ya da ham ekstraktın indirgeme kapasitesi $Fe[(CN)_6]^{+3}$ 'nin $Fe[(CN)_6]^{+2}$ 'ye indirgenmesiyle ölçülebilir. İndirgenmiş ürüne Fe^{3+} 'ün ilavesiyle 700 nm'de güçlü absorbansa sahip olan Prussian mavisi renginde bir kompleks olan $Fe_4[Fe(CN)_6]$ meydana gelir. Absorbansdaki artış, kompleksin oluşumundan kaynaklanan artışı ve dolayısıyla artan indirgeme kapasitesini göstermektedir.



Bu analizde test çözeltilisinin sarı rengi, antioksidan örneklerin indirgeme kapasitesine bağlı olarak farklı yeşil-mavi tonlarına dönüşür. Bir bileşiğin indirgeme kapasitesi, potansiyel antioksidan aktivitesinin önemli bir göstergesidir [12].

Yonca su ekstraktının aseton ve metanol ekstraktlarından, asma metanol ekstraktının da su ve aseton ekstraktlarından daha etkili indirgeme kapasitesi gösterdikleri bulunmuştur. Ekstraktların Fe^{3+} 'ü indirgeyebildiği gözlemlendi ancak birer standart antioksidan olan BHA, BHT, askorbik asit ve α -tokoferole kıyasla daha düşük indirgeme gücüne sahip oldukları bulundu (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16).

Literatüre göre, Fernandes vd., (2012) tarafından 4 çeşit kırmızı (Tinto Cao, Bastardo) ve beyaz (Codega, Viosinho) asma yaprağı su ekstraktlarının standart antioksidan olan askorbik asit ve quersetine nazaran zayıf indirgeme gücü gösterdikleri tespit edilmiştir [29].

Wong ve Kitts (2006) çalışmalarında maydonoz yaprağının metanol ve su ekstraktlarının indirgeme kapasitelerinin birbirine çok yakın değerlerde olduklarını bildirmişlerdir. Kişniş yaprağının ise, su ekstraktının metanol ekstraktından daha zayıf indirgeme gücü gösterdiğini ve bütün maydonoz ve kişniş ekstraktlarının indirgeme

kapasitelerinin standart askorbik asitin indirgeme gücünden daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir [87].

Saçan ve Yanardağ (2010) indirgeme kapasitesi yönünden pazı yaprağının su ekstraktının (0.069±0.003) α-tokoferol (0.294±0.001), askorbik asit (0.432±0.003) ve BHA (0.538±0.001) standartlarına göre daha düşük aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. 100 µg/mL pazı su ekstraktı ve standartların indirgeme gücünün BHA>A.asit>α-tokoferol>pazı su ekstraktı sırasında azaldığını belirlemişlerdir [74].

5.5. Demir (II) İyonlarını Şelatlama Aktivitesinin Tayini

Örneklerin metal şelatlama aktivitesi sonuçları Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'de gösterilmiştir. Metal iyonları arasından, ferröz iyonları (Fe²⁺) bilinen en önemli pro-oksidan iyonlardır. Ferröz (Fe²⁺) iyonu gibi iyonik türler, organizmada ROT üretimini kolaylaştırdığı için, demir şelatlama kapasitesi oldukça önemlidir. Metal iyonları şelatlama aktivitesi metallerin katalizlediği oksidasyon reaksiyonlarını engellemek veya geciktirmek için sıklıkla kullanılan önemli bir antioksidan metottur. Bu analizde FeCl₂'nin ferrozin ile koyu mor renkli bir kompleks oluşturmasına dayanılarak spektrofotometrik olarak ölçüm yapılmıştır. Antioksidan maddeler tarafından şelatlanan demir iyonları ferrozin tarafından bağlanamayacağı için oluşacak olan mor renk şiddeti daha düşük olacak ve absorbans daha düşük okunacaktır. Düşük absorbans değeri yüksek şelatlama aktivitesini göstermektedir.

Yonca ve asma ekstraktlarının (su, aseton ve metanol) Fe²⁺ iyonlarını şelatlama aktivitelerinin artan konsantrasyonla birlikte arttığı gözlemlendi. Her iki bitkininde metanol ekstraktları su ve aseton ekstraktlarından daha yüksek şelatlama aktivitesi gösterirken, bu sistemde ekstraktlardan hiçbirinin çok iyi bir şelatlayıcı olan EDTA çözeltisinden daha iyi bir şelatör olmadığı bulundu.

Çalışmamızda 25 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan; yonca su ekstraktının %10.74±0.56-%12.26±0.52, aseton ekstraktının %4.98±0.78-%6.78±0.14 ve metanol ekstraktının %15.22±0.79-29.78±0.29 şelatlama aktivitesi, asma su ekstraktının %9.89±0.30-%13.74±0.66, aseton ekstraktının %4.98±0.40-%10.24±0.83 ve metanol ekstraktının %8.44±0.79-14.06±0.56 şelatlama aktivitesi gösterdiği bulundu.

Karşılaştırma yapmak amacı ile Ningappa vd.,'nin (2008) köri yaprağının metal şelatlama aktivitesini belirleme ile ilgili yapmış olduğu çalışma incelendiğinde; 100

$\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda etil alkol:su ekstraktının %92 oranında EDTA ($60 \mu\text{g/mL}=\%95$) ile kıyaslanabilecek ölçüde şelatlama aktivitesi gösterdiği bulunmuştur [58].

Metal şelatlama aktivitesini etkileyen en önemli özellik, fenolik bileşiklerin yapısında bulunan fonksiyonel gruplara ve bu fonksiyonel grupların pozisyonuna ve bulunma miktarına bağlıdır. Yapısında, -OH, -SH, -COOH, $-\text{PO}_3\text{H}_2$, C=O, $-\text{NR}_2$, -S ve -O- fonksiyonel gruplarından en az iki tane bulunduran ve bunların uygun yapı ve fonksiyonel konfügrasyonundaki fenolik bileşiklerin, şelatlama özelliklerinin daha iyi olduğu görülmüştür [6, 34]. Bu nedenle örneklerin şelatlama aktivitesindeki farklılık, fenolik madde miktarlarının farklı olmasının yanı sıra, farklı yapı ve pozisyonlardaki fenolik madde gruplarına sahip olmaları ile açıklanabilmektedir.

5.6. DPPH• Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini

DPPH• radikali biyolojik bir radikal olmamasına rağmen, antioksidanların SR giderme aktivitelerinin tayini için kabul görmüş bir indikatördür. Çalışmamızda; bitki ekstraktlarının SR giderici etkileri stabil bir radikal olan DPPH• üzerinden test edilmiştir. DPPH çözeltisi mordur ve antioksidan bir bileşikle etkileştiğinde yapısı değişerek sarı renkli yeni bir bileşik haline gelir. Bu renk değişikliğinin derecesi, antioksidanın konsantrasyonu ile orantılıdır. Çalışmadaki bitki ekstraktlarının radikal giderme kapasitelerine ait grafikler Şekil 4.19 ve Şekil 4.20’de görülmektedir.

Tez çalışmamızda yonca için radikal giderme aktiviteleri su ekstraktı>aseton ekstraktı>metanol ekstraktı sıralaması şeklindedir. Asma bitkisinin DPPH• radikali giderme aktivitesi incelendiğinde metanol ekstraktında daha yüksek aktivite gözlemlendi ve aktivitenin metanol ekstraktı>su ekstraktı>aseton ekstraktı sırasında azaldığı tespit edildi.

Tablo 4.5’e göre; çalışılan ekstraktlar içinde en düşük EC₅₀ değeri yoncanın metanol ve aseton ekstraktlarında, en yüksek EC₅₀ değeri ise asma metanol ve yonca su ekstraktlarında tayin edildi. Çalışmamızda EC₅₀ değerleri 11.14 ± 0.09 – $53.61\pm 1.31 \mu\text{g/mL}$ aralığında belirlenmiştir.

Pari ve Suresh (2008) yaptıkları çalışmada asma yaprağının etil alkol:su (%70) ekstraktının $116.25\pm 2.74 \text{ mg/mL}$, askorbik asitin ise $46.17\pm 1.74 \text{ mg/mL}$ oranında EC₅₀

değerine sahip olduklarını bildirmişler ve böylece asma ekstraktının standarttan daha düşük DPPH• radikali giderme aktivitesi gösterdiğini tespit etmişlerdir [66].

Silva vd., (2012) tarafından yonca (*Medicago sativa* L.) filizlerinin su ekstraktının DPPH• radikali giderme aktivitesi incelenmiş ve örneğin 1.977 mg/mL EC₅₀ değerine sahip olduğu bildirilmiştir [79].

Benzer bazı bitkiler ile ilgili çalışmalar ise şöyledir; Yuan ve arkadaşları (2012) tarafından enginar yaprağının su, petrol eteri, etil asetat ve n-bütanol ekstraktlarının radikal giderme aktiviteleri kendi aralarında ve standart BHT ile karşılaştırmış (etil asetat>n-bütanol>BHT>su>petrol eteri ekstraktı), EC₅₀ değerlerinin ise sırasıyla 11.01±1.43 µg/mL, 36.21±1.41 µg/mL, 73.06±1.57 µg/mL, 86.11±1.17 µg/mL ve 304.74±22.33 µg/mL olduğu tespit edilmiştir [96].

YouGuo vd., (2009) semiz otu ile yaptıkları araştırmada, semiz otu su ekstraktının (EC₅₀=0.35 mg/mL) BHT'den (EC₅₀=0.26 mg/mL) daha düşük radikal giderme aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir. Saçan ve Yanardağ (2010) pazı yapraklarıyla yapmış oldukları çalışmada ise; örneğin su ekstraktının (%85.03±0.77) DPPH• radikali giderme aktivitesinin BHA (%81.61±5.96) ile benzer BHT aktivitesinden ise (%47.55±4.04) daha yüksek bulmuşlardır [74, 95].

Shukla ve arkadaşlarının (2009) yapmış oldukları bir başka çalışmada çeşitli konsantrasyonlardaki (20-40-50-100-200 µg/mL) *Stevia rebaudiana* Bert. (şeker otu) etanol ekstraktlarının radikal giderme etkisi askorbik asit ile karşılaştırılmıştır. 200 µg/mL konsantrasyonda *Stevia rebaudiana* Bert. etanol ekstraktının %68.76 (EC₅₀=93.46 µg/mL), aynı konsantrasyondaki askorbik asitin ise %82.58 (EC₅₀=26.75 µg/mL) oranında inhibisyon değerine sahip oldukları bulunmuştur [78].

5.7. Süperoksit Anyon Radikalini Giderme Aktivitesinin Tayini

Süperoksit anyon radikalleri lipid peroksidasyonunu direk başlatan oksijen merkezli radikallerdir. Lipid, protein ve DNA gibi biyomoleküllerde oksidatif hasara sebep olan hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve singlet oksijen gibi diğer reaktif oksijen türlerinin oluşumunda da önemli rol oynamaktadır [68].

Deneysel çalışmalarda kullanılan bu metotta süperoksit anyon radikalleri riboflavin/metiyonin/ışık sisteminde çözünen oksijenden elde edildi. Elde edilen süperoksit anyon radikalleri NBT'yi NBT²⁺'e yükseltger. Azalan absorbans süperoksit

radikallerinin giderildiğinin göstergesidir. Radikal giderme ile ilgili bulgular gösteriyor ki çalışılan bitkilerin aseton ekstraktlarının su ve metanol ekstraktlarına göre daha yüksek derecede süperoksit radikali giderme aktivitesi gösterdiği bulundu. Ayrıca çalışılan tüm ekstraktların BHA ve BHT ile kıyaslanabilecek ölçüde, standart askorbik asitten ise daha düşük radikal giderme aktivitesine sahip oldukları tespit edildi.

Karşılaştırma yapmak amacı ile literatürde mevcut diğer çalışmalar incelendiğinde Shukla vd., (2009) tarafından çeşitli konsantrasyonlardaki (20-40-50-100-200 µg/mL) *Stevia rebaudiana* Bert. (şeker otu) etanol ekstraktlarının güçlü süperoksit radikali giderme aktivitesi (sırasıyla %26.19, %34.75, %39.40, %54.44 ve %70.84) gösterdikleri bildirilmiştir. Askorbik asitle karşılaştırıldığı zaman ekstraktların süperoksit radikali giderme aktivitelerinin düşük olduğu ve 200 µg/mL konsantrasyonda etanol ekstraktı ve askorbik asitin sırasıyla %70.84 ve %85.42 oranında % inhibisyon değerlerine sahip oldukları bulunmuştur [78].

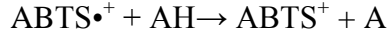
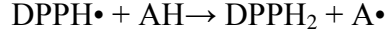
YouGuo vd., (2009) bu metod ile yaptıkları çalışmada ise, 0.1-0.6 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan semiz otu su ekstraktlarını aynı konsantrasyonlardaki standart antioksidan BHT ile kıyaslamışlardır. Bütün konsantrasyonlarda semiz otu su ekstraktlarının ($EC_{50}=0.48$ mg/mL) BHT'den ($EC_{50}=0.21$ mg/mL) daha düşük süperoksit radikali giderme aktivitesi gösterdikleri bildirilmiştir [95].

Ningappa vd.,'nin (2008) yapmış oldukları bir başka çalışmada, köri yaprağının farklı ekstraktlarının; su ekstraktının %71 (300 µg), etil alkol ekstraktının %75 (250 µg), etil alkol:su (1:1) ekstraktının %93 (200 µg), hekzan ekstraktının %61 (300 µg) ve kloroform ekstraktının %46 (300 µg) oranında süperoksit radikali giderme aktivitesine sahip oldukları tespit edilmiştir [58].

5.8. ABTS^{•+} Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini

DPPH[•] ve ABTS^{•+} radikallerinin kullanımına dayanan metotlar, yiyecek, içecek ve bitkisel ekstrelerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi için kullanılan en popüler spektrofotometrik metotlardır. Menekşe renkli DPPH[•] ve yeşil-mavi renkli ABTS^{•+} kromojenlerini kullanmak kolaydır. Ayrıca DPPH[•] ve ABTS^{•+} giderme metodları hızlı basit seçici, yüksek duyarlılık, aynı zamanda çok sayıda numunenin analizine uygun olması ve tekrarlanabilir prosedürler olmalarından dolayı antioksidan ekstre veya bileşiklerin aktivitesini belirlemek için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [8, 63]. Bir

antioksidan madde, bu radikal çözeltilerinden birine eklendiğinde; DPPH• ve ABTS•⁺ oluşumunu tersine çeviren antioksidanların varlığından dolayı bir renksizleşme oluşur.



Çalışmamızda yonca ve asma yapraklarının çözücü (su, aseton ve metanol) ile olan ekstraktlarının ABTS•⁺ radikali giderme aktivitelerinin konsantrasyona bağlı olarak arttığı gözlemlendi. 125 µg/mL konsantrasyonda yonca ve asma su ekstraktlarının aynı konsantrasyondaki aseton ve metanol ekstraktlarından ve standart α-tokoferolden daha güçlü radikal katyonu giderme aktivitesi gösterdikleri bulundu. Tablo 4.8'e göre; çalışılan ekstraktların EC₅₀ değerleri 10.69±0.01-45.87±0.47 µg/mL aralığında, referans α-tokoferolün ise 28.10±0.47 µg/mL olarak tayin edildi.

Pari ve Suresh (2008) yaptıkları çalışmada asma yaprağının etil alkol:su (%70) ekstraktının EC₅₀ değerini 89.73±5.56 mg/mL, standart askorbik asitin ise 29.72±2.53 mg/mL olarak bulmuşlar ve böylece asma ekstraktının standarttan daha düşük ABTS•⁺ radikali giderme aktivitesi gösterdiğini tespit etmişlerdir [66].

Literatürde mevcut diğer çalışmalar incelendiğinde ise, Yuan ve arkadaşları (2012) tarafından enginar yaprağının su, petrol eteri, etil asetat ve n-bütanol ekstraktlarının ABTS•⁺ radikali giderme aktiviteleri kendi aralarında ve standart BHT ile karşılaştırılmış (etil asetat>BHT>n-butanol>su>petrol eteri ekstraktı), EC₅₀ değerlerinin ise sırasıyla 2.54±0.09 µg/mL, 4.48±0.15 µg/mL, 6.58±0.18 µg/mL, 16.47±0.26 µg/mL ve 50.33±2.44 µg/mL olduğu tespit edilmiştir [96].

5.9. Fosfomolibden Metodu ile Toplam Antioksidan Aktivite Tayini

Yonca ve asma ekstraktlarının toplam antioksidan aktivitelerinin konsantrasyona bağlı olarak arttığı gözlemlendi. Yonca ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri YA>YS>YM sırasında azalma gösterirken, asma ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri AA>AM>AS sırasında azalma gösterdi. Askorbik asit eşdeğerliğinde 29.33-67.67 mg/g aralığında antioksidan aktiviteye sahip olan standart antioksidan α-tokoferole kıyasla aktiviteleri oldukça düşük olan bitki ekstraktlarının antioksidan kapasitelerinin birbirine çok yakın değerlerde olduğu tespit edildi.

Karşılaştırma yapmak amacı ile Prasad vd.,'nin (2009) 5 *Cinnamomum* (tarçın ağacı) türü (*C. burmanni*, *C. cassia*, *C. pauciflorum*, *C. tamala* ve *C. zeylanica*) ile yapmış oldukları çalışmada, etanol:su (1:1) çözücüsü ile hazırlanan yaprak ekstraktlarının toplam antioksidan kapasiteleri incelenmiştir. 100 µg/mL konsantrasyonda *C. zeylanica*'nın antioksidan aktivitesi (1.41±0.05) aynı konsantrasyondaki BHT'den (1.3±0.03) daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca 75 ve 100 µg/mL konsantrasyonda *C. zeylanica*'nın, aynı konsantrasyonlardaki BHT ve diğer *Cinnamomum* türlerinden daha fazla antioksidan aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir [69].

5.10. Prolin Tayini

Yenilebilen bitkilerin prolin içerikleri onların antioksidan kapasitelerinin bir ölçüsü olarak kabul edilmektedir [76]. Prolin düzeyi oksidatif stresle artmakta ve fenolik bileşik içeriği de paralel olarak yükselmektedir. Prolin tatlımsı tadı ile gıda katkı maddesi olarak da kullanılmaya başlanmıştır. İncelenen örneklerin prolin düzeyleri µg/g ekstrakt mertebesinde bulunmuştur. Buna karşın bazı yeşil yapraklı bitkilerde mg/g mertebesinde prolin tespit edilmiştir [20]. Yine de yonca ve asma bitkilerinin prolin analizi ilk kez yapıldığından sonuçların daha sonraki çalışmalara yön vermesi ve ışık tutması beklenmektedir.

Şekil 4.29'dan görüldüğü üzere örneklerin her ikisinde prolin içermektedir. Çalışmamızda yonca su ekstraktının prolin düzeyi (2278.58±105.32 µg/g ekstrakt) oldukça yüksek, asma su ekstraktının prolin düzeyi ise daha düşük (210.71±11.21 µg/g ekstrakt) bulunmuştur.

Bulunan sonuçları literatürde mevcut bazı çalışmalar ile karşılaştırdığımızda; Saçan ve Yanardağ (2010) pazı yaprağı su ekstraktının prolin içeriğini 427.74±24.41 µg/g ekstrakt olarak bulmuşlardır [74].

5.11. Karotenoid Tayini

Karotenoidler doğal pigmentlerin en önemli grubudur ve meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunmaktadır. Bağışıklık sistemini geliştirmelerinin yanında kanser, kalp rahatsızlığı ve katarakt gibi birçok kronik hastalığa karşı koruyucu etkiye sahiptir. Ayrıca gözdeki dokuları da koruduğu belirtilmektedir. Karotenoidler, aktif radikalleri

elektron transfer ederek, hidrojen vererek ya da radikale bağlanarak inhibe edebilmektedir. Reaktif oksijen türlerini ve SR'leri yakalama özelliği bulunan antioksidanlar arasında önemli bir yer tutmaktadır. Nitekim, karotenoidlerin tekli oksijeni yakaladığı ve hücreyi oksidatif zarara karşı koruduğu bildirilmektedir.

Tez çalışmamızda kullandığımız bitkilerin karotenoid içerikleri, kuru ağırlığın mg'ı başına % toplam karotenoid olarak hesaplandı. Yonca bitkisinin asmadan daha yüksek miktarda karotenoid içerdiği ve toplam karotenoid miktarlarının sırasıyla %21.93±0.63 ve %14.83±0.05 olduğu tespit edildi (Şekil 4.30).

Alasalvar vd.,'nin (2005) yapmış oldukları çalışmada mor ve turuncu havuçta bulunan toplam karotenoid miktarı karşılaştırılmış ve mor havuçta (19.5±0.5 mg/100g), turuncu havuca (8.6±0.2 mg/100g) nazaran 2.3 kat daha fazla karotenoid bulunduğu bildirilmiştir [2].

5.12. Klorofil Tayini

Tez çalışmamızda, pigment tayini olarak klorofil içeriği de araştırıldı. Klorofil yeşil sebzelerin, meyvelerin ve yaprakların karakteristik özelliğini oluşturmaktadır. Antioksidan gıda, anti-inflamatuar ve yaraları iyileştiren özelliklere sahiptir. Dokuların oluşması ve tamirine yardımcı olduğu görülmüştür. Her gün soluduğumuz ve içimize aldığımız hava kirliliğini nötralize etmeye yardımcı olur. A, C ve E gibi diğer vitaminlerle, klorofilin sağlıklı hücrelere zarar veren SR'leri nötralize ettiği tespit edilmiştir. SR'ler için kullanılacak antioksidan besinler arasında yer alır. Anti-mütajen ve anti-kanserojen özellikleri vardır ve böylece vücudumuzu toksinlere karşı korumaya ve ilaç yan etkilerini azaltmaya yardımcı olur. *Oregon State University Linus Pauling Institute*'deki araştırmacılar, klorofilin kanseri önleme ve tedavi potansiyeline sahip olduğunu ifade etmişlerdir.

Taze yonca ve asma yapraklarında bulunan klorofil miktarı Arnon'un (1949) metoduna göre belirlendi [5]. Şekil 4.31'de görüldüğü gibi çalışılan bitkilerin klorofil içerikleri karşılaştırıldığında; her iki bitkinin klorofil miktarları arasında büyük bir fark olmadığı gözlemlendi. Asma yaprağının klorofil a (9.14±0.95 mg/kg), klorofil b (4.83±1.06 mg/kg) ve toplam klorofil içeriği (13.97±2.00 mg/kg) çok az bir farkla yoncadan (klorofil a=8.89±0.82 mg/kg, klorofil b=3.82±0.55 mg/kg, klorofil a+b=12.71±1.36 mg/kg) yüksek bulundu.

Literatürde mevcut diğer çalışmalar incelendiğinde, Yıldız vd.,'nin (2011) yapmış oldukları çalışmada Çankırı ve Kayseri bölgesinden temin edilmiş *Pseudevernia furfuracea* bitkisinin klorofil a miktarı sırasıyla 1.845 µg/mg kuru ağırlık ve 2.249 µg/mg kuru ağırlık, klorofil b miktarı sırasıyla 0.462 µg/mg kuru ağırlık ve 0.514 µg/mg kuru ağırlık, klorofil a+b miktarı ise 2.307 µg/mg kuru ağırlık ve 2.763 µg/mg kuru ağırlık olduğu tespit edilmiştir [92].

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

Ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan kapasite biyoaktif bileşenleri için en çok kullanılan parameterden biridir. Çalışılan metod, lipid peroksidasyonu boyunca meydana gelen peroksitin miktarını ölçer. Bu biyoanalitik analizde, hava oksijeni tarafından oksitlenen ve emülsiyonda linoleik asidin peroksidasyonu sonucu oluşan hidroperoksitler dolaylı olarak ölçülür. Metodun esası, linoleik asit emülsiyonunun oksidasyonu sonucu oluşan hidroperoksidin spektrofotometrik olarak 500 nm'de ölçülmesine dayanır. Yüksek absorbans, peroksidasyon sonucu oluşan peroksit miktarının fazlalığını gösterir. Oluşan hidroperoksit ise Fe^{2+} 'yi Fe^{3+} 'e yükseltir. Daha sonra Fe^{3+} , ilave edilen amonyum tiyosiyanat ile kompleks oluşturularak 500 nm'de maksimum absorbans verir.

Lipid peroksidasyonunu inhibisyon yüzdesi antioksidan aktivitenin bir ölçüsü olarak kabul edilir. Çalışılan örneklerden yonca ve asma bitkilerinin su ekstraktının lipid peroksidasyonunu en yüksek değerde inhibe ettiği bulundu ve her iki bitki içinde toplam antioksidan aktivitenin su ekstraktı>aseton ekstraktı>metanol ekstraktı sırasında azaldığı tespit edildi. Şekil 4.34 ve Şekil 4.35'e bakıldığında analizlenen örneklerin standartlardan daha yüksek inhibisyon gücüne sahip olduğu görülmektedir.

Chen ve Yen (2007) yaptığı çalışmada; guava yapraklarının su ekstraktının 100 µg/mL konsantrasyonda etkili antioksidan aktiviteye (%94.4) sahip olduğu bildirilmiştir [18].

Eruçar'ın (2006) yaptığı analizde ise, böğürtlen yaprağı metanol-su (%80) ekstraktlarının linoleik asit peroksidasyonunu %86.64 oranında inhibe ettiği bulunmuştur [28].

Tüm antioksidan aktivitesi analizi sonuçları incelendiğinde analiz örneklerinin her bir yöntem için yüksek antioksidan aktivitesi sıralamasında da farklılıklar olabilir. Bundan dolayı tek bir yöntemle antioksidan aktivitesi hakkında kesin bir karar vermek doğru bir yaklaşım değildir. Her bir antioksidanın farklı radikallere karşı farklı reaksiyon mekanizmasına sahip olabileceği bilinen bir gerçektir. Antioksidan aktivitesi belirlemede reaksiyon mekanizması oldukça önemli olduğundan ve her bir örneğin içerdiği antioksidan ve oksidan arasındaki reaksiyon tam olarak bilinemediğinden dolayı, farklı yöntemler ile antioksidan aktivitesi ölçmenin daha kesin bir yargıya varmada önemli olduğu görülmektedir. Ayrıca antioksidan aktivitesi belirlenirken, farklı yöntemler kullanarak canlı sistemlerdeki biyokimyasal olayları da simüle edebilecek 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.

Literatür taraması sonucu seçilen bitkilere dair fazla veriye ulaşılmadığından, elde edilen sonuçlar bu alana daha fazla veri ile katkı sağlayacaktır.

Son yıllarda sentetik antioksidanların ya da yan ürünlerinin kanserojen olduğu veya negatif sağlık etkilerine neden olduğu pek çok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir. Bunun olağan sonucu olarak da doğal kaynaklı antioksidanlara olan eğilim gittikçe artmaktadır. Ülkemizin bitki florası yönünden önemli bir potansiyele sahip olması ve özellikle de endemik türlerin çokluğu bu talebe paralellik arz etmektedir.

Tablo 5.1. Bitki ekstraktları ve standartların çalışılan antioksidan aktivite sonuçlarından elde edilen EC₅₀ (µg/mL) değerleri

Bitki Ekstraktları ve Standartları	Antioksidan Metodlar				
	Fe ⁺³ İyonlarını İndirgeme Kapasitesi	Fe ⁺² İyonlarını Şelatlama Aktivitesi	Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi	Fosfomolibden Metodu ile Toplam Antioksidan Aktivite	FTC Metodu ile Toplam Antioksidan Aktivite
Yonca Su	117.55±15.88	12.26±0.52	36.13±0.74	15.13±0.62	73.55±0.04
Yonca Aseton	158.20±9.08	6.78±0.14	21.35±0.31	14.65±0.57	69.06±0.13
Yonca Metanol	220.79±18.50	29.78±0.29	28.82±0.25	14.72±0.63	65.28±0.21
Asma Su	116.88±19.40	13.74±0.66	39.24±3.26	16.30±0.82	78.87±0.30
Asma Aseton	172.89±47.88	10.24±0.83	32.16±0.62	14.73±0.66	74.47±0.17
Asma Metanol	133.50±77.10	14.06±0.56	20.41±0.62	12.84±0.33	71.10±0.25
EDTA	–	97.28±0.64	–	–	–
Askorbik Asit	27.18±0.62	3.23±1.04	29.06±0.71	–	25.30±0.33
BHA	25.91±0.71	6.41±0.40	20.91±0.27	–	14.22±0.12
BHT	26.70±1.25	6.64±0.14	22.99±0.16	–	19.18±0.13
α-tokoferol	27.48±1.48	–	–	34.23±0.75	22.37±0.04

6. KAYNAKLAR

- [1] Akkuş, İ., *SR'ler ve Fizyopatolojik Etkileri*, Mimoza Yayınları, Konya, (1995).
- [2] Alasalvar, C., Farsi, M.A., Quantick, P.C., Shahidi, F., Wiktorowicz, R., *Effect of chill storage and modified atmosphere packaging (MAP) on antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, phenolics and sensory quality of ready-to-eat shredded orange and purple carrots*, Food Chemistry, 89, 69–76, (2005).
- [3] Altınışık, M., *Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar*, Adü Tıp Fakültesi Biyokimya AD., Aydın, (2000).
- [4] Arabshahi-Delouee, S., Urooj, A., *Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (Morus indica L.) leaves*, Food Chemistry, 102, 1233-1240, (2006).
- [5] Arnon, D.I., *Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoloxidase in Beta vulgaris*, Plant Physiology, 24, 1-15, (1949).
- [6] Arora, A., Nair, M.G. and Strasburg, G.M., *Structure activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system*, Free Radical Biology and Medicine, 24, 1355-1363, (1988).
- [7] Ateş, D. A., ve Erdoğan, Ö. T., *Antimicrobial activities of various medicinal and commercial plant extracts*, Türk. J. Biol., 27, 157-162, (2003).
- [8] Awika, J.M., Rooney, L.W., Wu, X., Prior, R.L., Cisneros-Zevallos, L., *Screening methods to measure antioxidant activity of Sorghum (Sorghum bicolor) and Sorghum product*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 6657-6662, (2003).
- [9] Baytop, T., *Bitkiler İle Tedavi (Geçmişte ve Bugün)*, Nobel Tıp kitapçevleri, İstanbul, pp. 357-358, (1999).
- [10] Bates, S.L., *Rapid determination of free proline for water stress studies*, Plant Soil, 39, 205-207, (1973).
- [11] Becker, E.M., Nissen, L.S., Skibsted, L.H., *Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects*, European Food Research and Technology, 10.107/s00217-004-1012-4, (2004).
- [12] Benzie, I.F.F., Strain, J.J., *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) assay a measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay*, Analytical Biochemistry, 239, 70-76, (1996).

- [13] Bercu, V., Negut, C.D., Dului, O.G., *EPR studies of the free radical kinetics in γ -rays, irradiated Pleurotus ostreatus oyster mushrooms*, Food Res Int., 44, 139–145, (2011).
- [14] Blois, M.S., *Antioxidant determinations by the use of stable free radical*, Nature, 1199-1200. (1958).
- [15] Bozdemir, Y., *Keten tohumu (Linum Usitatissimum)ekstraktında katalaz ve süperoksit düsmutaz enzim aktiviteleri*, Y. Lisans Tez, Kimya Anabilim Dalı, Adana, (2007).
- [16] Cam, M., Hışıl, Y., *Gıdalardaki flavonoidler ve önemleri*, 3. Gıda Mühendisliği Kongresi, Ankara, 2-4 Ekim, s. 67-82, (2003).
- [17] Cheesman, K.H., Slater, T.F., *An introduction to free radical biochemistry*, British Medical Bulltin, 49 (3), 481-493, (1993).
- [18] Chen, H.Y., Yen, G.C., *Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guava (Psidium guajava L.) leaves*, Food Chemistry, 101, 686-694, (2007).
- [19] Choe, E., Min, D.B., *Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods*, J Food Sci, 70, 142-158, (2005).
- [20] Cook, J.A., Vanderjagt, D.J., Pastuszyn, A., Mankaila, G., Glew, R.S., Milbon, M. and Glew, R.H., *Nutrient and chemical composition of 13 wild plant foods of niger*”, Journal of Food Composition and Analysis, 13, 83-92, (2000).
- [21] Dasguptan, DE B., *Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A comparative study*, Food Chemistry, 101, 471-474, (2007).
- [22] Dean, R.R., Cheeseman, K.H., *Restriction of free radical attack an monoamine oxidases in mitochondrial membrane by vitamin E*, Biochem Biophys Res Commun, 148, 1277-1282, (1987).
- [23] Deng, J., Cheng, W., Yang, G., *A novel antioxidant activity index (AAV) for natural products using the DPPH assay*, Food Chemistry, 125, 1430-1435, (2011).
- [24] Diplock, A., *Healty lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients*, ILSI Europe concise monograph series, 59 p., Belgium, (1998).
- [25] El, S.N. and Karakaya, S., *Radical scavenging and iron-chelating activities of some greens used as traditional dishes in Mediterranean diet*, International Journal of Food Sciences and Nutrition, 55, 67-74, (2004).

- [26] Emecen, Ö., *Astımlı hastalarda serum total oksidan/antioksidan status ve ECP düzeylerinin değerlendirilmesi*, Uzmanlık tezi, İstanbul, (2009).
- [27] Erbaş, M., Şekerci, H., *SR'lerin önemi ve gıda işleme sırasında oluşumu*, Gıda, 36(6), 349-356, (2011).
- [28] Eruçar, S., *Bazı Bitkisel Çayların Fenolik Madde Profili ve Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi*, Y.Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, (2006).
- [29] Fernandes, F., Ramalhosa, E., Pires, P., Verdial, J., Valentao, P., Andrade, P., *Vitis vinifera leaves towards bioactivity*, Industrial Crops and Products, 43, 434-440, (2012).
- [30] Freman, B.A., Crapo, J.D., *Biology of disease, free radicals and tissue injury*, Laboratory Investigation, 47(5), 412, (1982).
- [31] Fridovich, I., *Superoxide Radical and Superoxide Dismutase*, Biochem. Soc. Trans., 1, 48, (1973).
- [32] Garrido, G., Gonzalez, D., Romay, C., Nunez-Selles, AJ., Delgado, R., *Scavenger effect of a mango (Mangifera indica L.) food supplement's active ingredient on free radicals produced by human polymorphonuclear cells and hypoxanthine-xanthine oxidase chemiluminescence systems*, Food Chem., 107, 1008-1014, (2008).
- [33] Guerrero-Romero, F., Rodrı'guez-Mora'na, M., *Complementary Therapies for Diabetes: The Case for Chromium, Magnesium, and Antioxidants*, Archives of Medical Research, 36, 250-257, (2005).
- [34] Gülçin, İ., *The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (Piper nigrum) seeds*, International Journal of Food Sciences and Nutrition, 56(7), 491-499, (2005).
- [35] Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., Boyer, L., *Antioxidant activity of lignans from fringe tree (Chionanthus virginicus L.)*, European Food Research and Technology, 223, 759-767, (2006).
- [36] Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Alici, H.A., Elmastaş, M. and Büyükokuroglu, M.E., *In vitro antioxidant properties of morphine*, Pharmacol Res., 49, 59-66, (2004).
- [37] Gülçin, İ., Alici, H.A. and Cesur, M., *Determination of in vitro antioxidant and radical scavenging activities of propofol*, Chem. Pharm. Bull., 53(3), 281-285, (2005a).

- [38] Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C., *The chemistry of oxygen radicals and other oxygen-derived species*, In: Free Radicals in Biology and Medicine, New York: Oxford University Press, p. 20-64, (1985).
- [39] Halliwell, B., *The wanderings of a free radical*, Free Radical Bio Med, 46, 531-542, (2009).
- [40] Halliwell, B., Gutteridge, J.M., *Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts*, Arch Biochem Biophys, 246, 501-514, (1986).
- [41] Hare, P.D. and Cress, W.A., *Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants*, Plant Growth Regulation, 21, 79-102, (1997).
- [42] Hoque, M.A., Banu, M.N.A., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., Murata, Y., *Proline and glycinebetaine enhance antioxidant defense and methyglyoxal detoxification systems and reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells*, J. Plant Physiol, 165, 813-824, (2008).
- [43] Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., *The chemistry behind antioxidant capacity assays, Reviews*, Journal of Agricultural Food Chemistry, 53, 1841-1856, (2005).
- [44] Hurst, R., Bao, Y., Jemth, P., Mannervi, B., Williamson, G., *Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase Activity of Rat Class Theta Glutathione Transferase T2-2*, Biochem. Soc.Trans., 25, S-559, (1997).
- [45] İlçim, A., Dığrak, M., Bağcı, E., *Bazı bitki ekstraktlarının antimikrobiyal etkilerinin araştırılması*, Türk. J. Biol., 22, 119-125, (1998).
- [46] Inglet, G. E., Chen, D., Berhow, M., Lee, S., *Antioxidant activity of commercial buck wheat flours and their free and bound phenolic compositions*, Food Chemistry, 125, 923-929, (2011).
- [47] Jornot, L., Petersen, H., Junot, A.F., *Hydrogen peroxideinduced DNA damage is independent of nuclear calcium but dependent on redox-active ions*, Biochem J., 335, 85-94, (1998).
- [48] Kılınç, K., Kılınç, A., *Oksijen toksisitesinin aracı molekulleri olarak oksijen radikalleri*, Hacettepe Tıp Dergisi, 33(2), 110-118, (2002).
- [49] Koike, T., Takayama T, S. Ogawa S, *Satu I Elevation of the serum uric acid level preceding the clinical manifestation of preeclampsia in twin pregnancies*, Gynecol Obstet Invest, 44(2), 97-101, (1997).

- [50] Köksal, E., *Karnabahar (Brassica oleracea L.) peroksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, antioksidan ve antiradikal aktivitesinin belirlenmesi*, Doktora Tezi, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, (2007).
- [51] Kumar, S., *Free radicals and antioxidants: Human and food system*, Adv Appl Sci Res., 2, 129-135, (2011).
- [52] Lardos, A., Kreuter, M.H., *Red vine leaf*, In: Kreuter, M.H. (Ed.), *Phytopharm. and Phytochem. Products*, Ask Intercity Pharmaceuticals and Extracts, (2000).
- [53] Larson, R.A., *The antioxidants of higher plants*, Phytochemistry, 27(4), 969-978, (1988).
- [54] Mercan, U., *Toksikolojide serbest radikallerin önemi*, YYÜ Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 15, 91-96, (2004).
- [55] Mitsuda, H., Yasumoto, K., Iwami, K., *Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid*, Eiyoto Shokuryo, 19, 210-214, (1966).
- [56] Nakiboğlu, M., Urek R.O., Kayalı, HA., Tarhan, L., *Antioxidant capacities of endemic Sideritis sipylea and Origanum sipyleum from Turkey*, Food Chemistry, 104, 630-635, (2007).
- [57] Ningappa, M.B., Dinesha, R., Srinivas, L., *Antioxidant and free radical scavenging activities of polyphenol-enriched curry leaf (Murraya koenigii L.) extracts*, Food Chemistry, 106, 720-728, (2008).
- [58] Nishimiki, M., Rao, N.A., Yagi, K., *The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 46(2), 849-854, (1972).
- [59] Orhan, N., Aslan, M., Orhan, D.D., Ergun, F., Yeşilada, E., *In-vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of grapevine leaves (Vitis vinifera) in diabetic rats*, Journal of Ethnopharmacology, 108, 280-286, (2006).
- [60] Oyaizu, M., *Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine*, Japan Journal of Nutrition, 44, 307-315, (1986).
- [61] Özcan, M.M., Baydar, H., Sağdıç, O., Özkan, G., *Türkiye’de ticari açıdan önemli Lamiaceae familyasına ait baharat veya çeşni olarak kullanılan bitkilerin fenolik bileşenleri ile antioksidan ve antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi*, TÜBİTAK Projesi, No:TOG TAG-3319, Konya, (2007).

- [62] Özçelik, B., Lee, J.H., Min, D.B., *Effects of light, oxygen and pH on the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method to evaluate antioxidants*, Journal of Food Science, 68, 487–490, (2003).
- [63] Özdemir, M., *Van yüzüncü yıl üniversitesi kampüsü doğal florasında bulunan baklagil yem bitkilerinin bazı özelliklerinin belirlenmesi üzerine bir araştırma*, Y.Lisans Tezi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Van, (2007).
- [64] Pan, Y., Zhang, X., Wang, H., Liang, Y., Zhu, J., Li, H., Zhang, Z., Wu, Q., *Antioxidant potential of ethanolic extract of Polygonum cuspidatum and application in peanut oil*, Food Chemistry, 105(4), 1518-1524, (2007).
- [65] Pari, L., Suresh, A., *Effect of grape (Vitis vinifera L.) leaf extract on alcohol induced oxidative stress in rats*, Food and Chemical Toxicology, 46, 1627-1634, (2008).
- [66] Percival, M., *Antioxidants*, Clinical Nutrition Insights, 10, 1-4, (1998).
- [67] Pietta, P.G., *Flavonoids as antioxidants*, Journal of Natural Products, 63, 1035–1042, (2000).
- [68] Prasad, K.N., Yang, B., Dong, X., Jiang, G., Zhang, H., Xie, H., Jiang, Y., *Flavonoid contents and antioxidant activities from Cinnamomum species*, Innovative Food Science and Emerging Technologies, 10, 627-632, (2009).
- [69] Prieto, P., Ineda, M., & Aguilar, M., *Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E*, Analytical Biochemistry, 269, 337-341, (1999).
- [70] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., *Antioxidants activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*, Free Radical Biology and Medicine, 26, 1231-1237, (1999).
- [71] Revan, S., *Farklı dayanıklılık antrenmanlarının oksidatif stres oluşumu ve antioksidan düzeyleri üzerine etkisi*, Beden Eğitimi ve Spor Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, (2007).
- [72] 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).

- [73] Saçan, Ö., Yanardağ, R., *Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities activities of chard (Beta vulgaris L. var. cicla)*, Food and Chemical Toxicology, 48, 1275-1280, (2010).
- [74] Sharma, S.S., Dietz, K.J., *The significance of amino acids and amino acids derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stres*, J. Exp. Bot., 57, 711-726, (2006).
- [75] Shetty, K., *Biotechnology to harness the benefits of dietary phenolics; focus on Lamiacea*, The Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 6, 162-171, (1997).
- [76] Shetty, K., *Role of proline-linked pentose phosphate pathway in biosynthesis of plant phenolics for functional food and environmental applications*, Process Biochemistry, 39, 789–803, (2004).
- [77] Shukla, S., Mehta, A., Bajpai, V.K., Shukla, S., *“In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of Stevia rebaudiana Bert.”* Food and Chemical Toxicology, 47, 2338-2343 (2009).
- [78] Silva, L.R., Pereira, M.J., Azevedo, J., Gonçalves, R.F., Valentão, P., Pinho, P.G., Andrade, P.B., *Glycine max (L.) Merr., Vigna radiata L. and Medicago sativa L. sprouts: A natural source of bioactive compounds*, Food Research International, 50, 167–175, (2012).
- [79] Slinkard, K. and Singleton, V.L., *Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods*, Am. J. Enol. Vitic., 28, 49-55, (1977).
- [80] Spagna, G., Tomano, A., Cimino, F., Barbagallo, R.N., Ventura, D., Bonina, F., Saija, A., *Chemical analysis and photoprotective effect of an extract of wine from Jacques grapes*, Journal of the Science of Food and Agriculture, 82, 1867-1874, (2002).
- [81] Sroka, Z., Cisowski, W., *Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids*, Food and Chemical Toxicology, 41, 753-758, (2003).
- [82] Su, L., Yin, J.J., Charles, D., Zhou, K., Moore, J., Yu, L.L., *Total phenolic contents, chelating capacities, and radical-scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon, and oregano leaf*, Food Chemistry, 100, 990-997, (2007).
- [83] Thirunavukkarasu, V., Anitha Nandhini, A.T., Anuradha, C.V., *Lipoic acid improves glucose utilisation and prevents protein glycation and AGE formation*, Pharmazie, 60(10), 772-5, (2005).

- [84] Tietz, N.W., *Clinical Guide to Laboratory Tests*, W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, (1995).
- [85] Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D., *Antioxidant Activity And Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, And Grain Products*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 4113- 4117, (1998).
- [86] Wong, P.Y.Y., Kitts, D.D., *Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts*, Food Chemistry, 97, 505-515, (2006).
- [87] Wood, J.E., Senthilmohan, S.T., Peksin, A.V., *Antioxidant activity of procyanidin-containing plant extract at different pHs*, Food Chemistry, 77, 115-161, (2002).
- [88] Xu, J., Yin, H.X., Li, X., *Protective effects of proline against cadmium toxicity in micropropagated hyperaccumulator, Solanum nigrum L.*, Plant Cell Rep., 28, 325-333, (2009).
- [89] Yang, R. and Shetty, K., *Stimulation of rosmarinic acid in shoot cultures of oregano (*origanum vulgare*) clonal line in response to proline, proline analogue, and proline precursors*, Journal of Agricultural Food Chemistry, 46(7), 2888-2893, (1998).
- [90] Yeşiloğlu, Y., Şit, L., *Antioxidant properties of various solvent extracts from purple basil*, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 95, 100-106, (2012).
- [91] Yıldız, A., Aksoy, A., Akbulut, G., Demirezen, D., Altuner, E.M., Duman, F., *Correlation Between Chlorophyll Degradation and the Amount of Heavy Metals Found in Pseudevernia furfuracea in Kayseri (Turkey)*, Ekoloji 20, 78, 82-88, (2011).
- [92] Yokuş, B., Çakır, D.Ü., *İn vivo oksidatif DNA hasarı biyomarkeri; 8-hidroxy 2'-deoxyguanosine*, T Clin J Med Sci., 22, 535-543, (2002).
- [93] Yoo, M.A., Chung, H.K., Kang, M.H., *Evaluation of physicochemical properties in different cultivar grape seed waste*, Food Science and Biotechnology, 13(1), 26-29, (2004).
- [94] YouGuo, C., ZongJi, S., XiaoPing, C., *Evaluation of free radicals scavenging and immunity-modulatory activities of Purslane polysaccharides*, International Journal of Biological Macromolecules, 45, 448–452, (2009).
- [95] Yuan, X., Gao, M., Xiao, H., Tan, C., Du, Y., *Free radical scavenging activities and bioactive substances of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus L.*) leaves*,

Food Chemistry, 133, 10-14, (2012).

[96] Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., *The determination of flavonoid contents on mulberry and their scavenging effects on superoxide radical*, Food Chemistry, 64, 555–559, (1999).

[97] Zhao, H., Dong, J., Lu, J., Chen, J., Li, Y., Shan, L., Lin, Y., Fan, W., Gu, G., *Effect of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in Barely (*Hordeum vulgare L.*)*, Agric. Food Chem., 54, 7277-7286, (2006).

8. ÖZGEÇMİŞ



1987→Bulgaristan’da doğdum.

2001→Marmaracık İlköğretim Okulundan mezun oldum.

2005→ Ticaret Borsası Anadolu Lisesinden mezun oldum.

2006→ Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünü kazandım.

2008→ Lisans öğrenimi sırasında 45 iş günü zorunlu stajımı Sanovel İlaç Sanayi ve Tic. A.Ş.’de yaptım.

2010→ Lisans öğrenimimi tamamladım.

2011→ Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nün Yüksek Lisans sınavını kazanarak Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans programına başladım.

2013→ Kırkgöz İlköğretim Okulunda ücretli öğretmenlik yaptım.

2013→Deva Holding A.Ş.’de Kalite Kontrol Laboratuvarında ürün uzman yardımcısı olarak çalışmaktayım.