

**BAZI BAHARATLARIN FARKLI EKSTRAKTLARININ  
ANTIOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Hatice AYDIN**

**Danışman  
Doç. Dr. Yeşim YEŞİLOĞLU**

**EDİRNE-2011**

**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI BAHARATLARIN FARKLI  
EKSTRAKTLARININ ANTIOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN  
BELİRLENMESİ**

**Hatice AYDIN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**Danışman**

**Doç. Dr. Yeşim YEŞİLOĞLU**

**EDİRNE-2011**

## ÖZET

Bu çalışmada, zencefil (*Zingiber officinale*) ve zerdeçal (*Curcuma longa*) baharatlarının antioksidan aktiviteleri çeşitli metodlarla incelenmiştir. Bu amaçla kuru baharatlar öğütüldükten sonra etanol ve metanol çözücüleri kullanılarak ekstraksiyonları yapıldı. Her bir ekstraktın Folin-Ciocalteu ayırıcı ile toplam fenolik madde içeriği, DPPH serbest radikali giderme aktivitesi, ferrik tiyosiyanat (FTC) metodu ile toplam antioksidan aktivitesi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> giderme aktivitesi, metal iyonlarını şelatlama kapasitesi, süperoksit radikali giderme aktivitesi, toplam flavonoid içeriği tayini, indirgeme kapasitesi ve ABTS radikali giderme aktivitesi tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar  $\alpha$ -tokoferol, askorbik asit, trolox, BHT ve BHA standart maddeleriyle kıyaslanarak değerlendirilmiştir.

Etanol ve metanol çözücüleriyle gerçekleştirilen ekstraksiyonlar sonucunda; her iki baharatın da ekstrakte edilebilen madde miktarları 41.88-52.03 mg/g arasında kurutulmuş ekstrakt bulundu. En yüksek ekstraksiyon verimleri etanol ekstraktlarında gözlemlendi.

Toplam fenolik madde tayini sonucunda, ekstraktların toplam fenolik madde miktarlarının gallik asit eşdeğeri olarak 400.2 $\pm$ 10.1-551.1 $\pm$ 12.5 mg/g aralığında, pirokateşol eşdeğeri olarak 364.3 $\pm$ 4.6-502.6 $\pm$ 11.3 mg/g aralığında değiştiği belirlendi. En yüksek miktarlar zerdeçal ekstraktlarında tayin edildi.

Serbest radikal giderme aktivitesinden elde edilen verilere göre; zencefilin etanol ekstraktı ile zerdeçalın etanol ekstraktlarının standart maddelerle karşılaştırılabilir düzeyde DPPH giderme aktivitesi gösterdiği belirlendi.

Baharat ekstraktlarının toplam antioksidan aktivitesi; linoleik asit emülsiyonunda değerlendirildi. Elde edilen sonuçlara göre zencefil-etanol, zencefil-metanol, zerdeçal-etanol, zerdeçal-metanol 150  $\mu$ g/mL konsantrasyonunda olan ekstraktlar etkili ve yüksek oranlarda antioksidan aktivite gösterdiler.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> giderme aktivitesi denemesinde; ekstraktların 50-250  $\mu$ g/mL konsantrasyonlarında aktiviteleri tayin edildi. En yüksek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> giderme aktivitesi zencefil-etanol ekstraktında belirlendi.

Metal şelatlama aktivitesi tayininde;  $Fe^{2+}$  çözeltisi kullanıldı, sonuçlar EDTA çözeltisi ile kıyaslandı. Zencefil ekstraktları, zerdeçal ekstraktlarına göre daha yüksek metal şelatlama aktivitesi gösterdi.

Süperoksit radikali giderme aktivitesinde; PMS/NADH/O<sub>2</sub> sisteminde O<sub>2</sub><sup>•-</sup> radikali oluşturuldu ve ekstraktların bu radikali giderebilme kapasiteleri incelendi. Çalışılan ekstraktların hepsinde aktivite gözlemlendi.

Toplam flavonoid içeriğinin tayini; toplam fenolik madde tayini gibi belirlendi. 50-250 µg/mL konsantrasyonu arasında bulunan değerler gallik asit ve pirokateşol eşdeğeri olarak hesaplandı. Ekstraktların toplam flavonoid içeriklerinin gallik asit eşdeğeri olarak; 318.9±4.7-360.9±5.8 mg/g aralığında, pirokateşol eşdeğeri olarak; 268.2±3.1-303.2±4.1 mg/g aralığında değiştiği belirlendi. En yüksek miktarlar zerdeçal ekstraktlarında tayin edildi.

İndirgeme kapasitesi tayininde; her bir baharat ekstraktının aktivitesi standartlarla kıyaslandığında standartlardan daha düşük aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi. İndirgeme kapasitesi yetenekleri zerdeçal>zencefil şeklinde sıralama gösterdi.

ABTS radikali giderme aktivitesi tayininde; zerdeçal, zencefilden daha yüksek oranda radikal giderme etkisi gösterdi.

**Anahtar kelimeler:** *Zingiber officinale*, *Curcuma longa*, flavonoid madde, ROT, fenolik madde.

## ABSTRACT

This study, the antioxidant activities of ginger (*Zingiber officinale*) and turmeric (*Curcuma longa*) spices were investigated by using different methods. For this purpose, after the dry spices were ground to fine powder, their extractions were done by ethanol and methanol as solvent. The antioxidant activities of all extracts were assayed with the various methods including total phenolic compound contents by Folin-Ciocalteu reagent (FCR), DPPH free radical scavenging activity, total antioxidant activity by using ferric thiocyanate (FTC) method, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> free radical scavenging activity, metal chelating capacity, superoxide anion scavenging activity, total flavonoid compound contents, reducing power and ABTS radical scavenging activity assay. The obtained results were compared by using  $\alpha$ -tocopherol, ascorbic acid, trolox, BHT and BHA as standard.

The extractable compound of all studied spices; were found in the range of 41.88-52.03 mg/g dried extract at the end of the extractions carried out by ethanol and methanol as solvent. The best extraction yield was observed in ethanol extracts.

In the total phenolic compound assay; total phenolic compound amounts of extracts were determined to be 400.2 $\pm$ 10.1-551.1 $\pm$ 12.5 mg/g as gallic acid equivalent; 364.3 $\pm$ 4.6-502.6 $\pm$ 11.3 mg/g as pyrocatechol equivalent. The highest amounts were found in the turmeric extracts.

According to obtained results from the assay of free radical scavenging activity; the ethanol extract of turmeric and ginger showed DPPH scavenging activity, which is comparable with standard compounds.

Total antioxidant activities of spice extracts; were assayed by using linoleic acid emulsion. According to obtained results; all of extracts exhibited effective and high antioxidant activity except of ethanol and methanol of ginger and turmeric at 150  $\mu$ g/mL concentration.

In the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging activity assay; the scavenging activities of extracts determined at concentrations of 50-250  $\mu$ g/mL. The high H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging effects were observed the ethanol extract of ginger.

Metal chelating effect of samples; were carried out by using  $\text{Fe}^{2+}$  solution, and the results were compared with EDTA. Ginger extracts showed the higher chelating activity  $\text{Fe}^{2+}$  ions than the turmeric extracts.

For measurement of superoxide anion scavenging activity;  $\text{O}_2^{\bullet-}$  radical was generated by PMS/NADH/ $\text{O}_2$  system, and the abilities of all extracts to scavenge  $\text{O}_2^{\bullet-}$  activity were determined. It was observed the activity only in the ethanol and methanol extracts.

Determination of total flavonoid contents; were determined as total phenolic determination. 50-250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentrations of extracts were determined as gallic acid equivalent and pyrocatechol equivalent. In the total flavonoid compound assay, total flavonoid compound amounts of extracts were determined to be  $318.9 \pm 4.7$ - $360.9 \pm 5.8$  mg/g as gallic acid equivalent;  $268.2 \pm 3.1$ - $303.2 \pm 4.1$  mg/g as pyrocatechol equivalent. The highest amounts were found in the turmeric extracts.

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

ABTS radical scavenging activity assay; according to obtained results, turmeric extracts showed the higher radical cation than the ginger extracts.

**Key words:** *Zingiber officinale*, *Curcuma longa*, flavonoid compound, ROS, phenolic compound.

## İÇİNDEKİLER

Sayfa No

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>v</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>KISALTMALAR</b> .....	<b>xi</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. Oksidatif Stres</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2. Serbest Radikaller</b> .....	<b>3</b>
2.2.1. Oksijen ve Reaktif Oksijen Türleri (ROT).....	5
2.2.1.1. Süperoksit radikali ( $O_2^{\bullet}$ ).....	7
2.2.1.2. Hidrojen peroksit( $H_2O_2$ ).....	8
2.2.1.3. Hidroksil radikali ( $^{\bullet}OH$ ).....	9
2.2.1.4. Singlet oksijen ( $^1O_2$ ).....	10
2.2.1.5. Nitrik oksit ( $NO^{\bullet}$ ).....	11
2.2.1.6. Hipoklorik asit (HOCl) .....	11
2.2.2. Hücredeki Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynakları.....	11
2.2.2.1. Biyolojik kaynakları.....	11
2.2.2.2. İntrasellüler kaynakları.....	13
2.2.3. Serbest Radikallerin Etkileri.....	13
2.2.3.1. Serbest radikallerin lipidlere etkileri.....	14
2.2.3.2. Serbest radikallerin proteinlere etkileri.....	15
2.2.3.3. Serbest radikallerin nükleikasitlere ve DNA'ya etkileri.....	16
2.2.3.4. Serbest radikallerin karbonhidratlara etkileri.....	16
<b>2.3. Antioksidanlar</b> .....	<b>16</b>

2.3.1. Antioksidanların sınıflandırılması.....	17
2.3.1.1. Enzimler.....	18
2.3.1.2. Yağda ve suda çözünen radikal tutucular.....	19
2.3.1.3. Metal iyonlarını bağlayan proteinler.....	23
2.3.1.4. Eksojen antioksidanlar.....	23
<b>2.4. Gıdalar ve Antioksidanlar.....</b>	<b>24</b>
2.4.1. Gıdalarda doğal olarak bulunan antioksidan maddeler.....	25
2.4.2. Gıdalara ilave edilen sentetik antioksidanlar.....	26
<b>2.5. Antioksidan Aktivite Tayin Metodları.....</b>	<b>27</b>
2.5.1. HAT-temelli metodlar.....	28
2.5.2. ET-temelli metodlar.....	29
2.5.3. Lipid oksidasyon markerlerini ölçen metodlar.....	30
2.5.4. Diğer ROT giderici kapasiteleri ölçen metodlar.....	31
<b>2.6. Çalışmada Kullanılan Baharatlar ve Özellikleri.....</b>	<b>32</b>
2.6.1. Zencefil ( <i>Zingiber officinale</i> ).....	33
2.6.2. Zerdeçal ( <i>Curcuma longa</i> ).....	34
<b>3. MATERYAL VE METOD.....</b>	<b>36</b>
<b>3.1. Materyal.....</b>	<b>36</b>
3.1.1. Baharat Örnekleri.....	36
3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Ekipmanlar.....	36
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Çözeltiler.....	36
<b>3.2. Metod .....</b>	<b>39</b>
3.2.1. Ekstraktların Hazırlanışı.....	39
3.2.2. Toplam Fenolik Madde (TPC) Tayini.....	39



3.2.3. DPPH Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini.....	40
3.2.4. FTC Metodu ile Toplam Antioksidan Aktivite Tayini.....	40
3.2.5. Demir (II) İyonlarını Şelatlama Aktivitesinin Tayini.....	41
3.2.6. Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini.....	41
3.2.7. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Giderme Aktivitesinin Tayini.....	42
3.2.8. İndirgeme Kapasitesi Tayini.....	42
3.2.9. Toplam Flavonoid Madde Tayini.....	43
3.2.10. ABTS Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini.....	43
3.2.11. Değerlendirme.....	43
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>	<b>44</b>
4.1. FCR ile Toplam Fenolik Bileşik Tayini.....	44
4.2. DPPH Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini.....	47
4.3. FTC Metodu ile Toplam Antioksidan Aktivite Tayini.....	52
4.4. Demir (II) İyonlarını Şelatlama Aktivitesinin Tayini.....	55
4.5. Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini.....	57
4.6. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Giderme Aktivitesinin Tayini.....	59
4.7. İndirgeme Kapasitesi Tayini.....	60
4.8. Toplam Flavonoid Madde Tayini.....	62
4.9. ABTS Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini.....	65
<b>5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....</b>	<b>70</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>79</b>
<b>7. TEŞEKKÜR.....</b>	<b>87</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>88</b>

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

	<b>Sayfa No</b>
Şekil 2.1. Moleküler oksijenin oluşumu	4
Şekil 2.2. Oksijenin suya indirgenmesi ve diğer oksijen türlerinin oluşumu	6
Şekil 2.3. Fagositik solunumsal patlamada oluşan reaktif oksijen türleri	12
Şekil 2.4. Serbest radikallerin hücresel hedefleri	14
Şekil 2.5. Lipid peroksidasyonunun temel reaksiyonları	15
Şekil 2.6. Oksidatif strese karşı enzimatik savunma mekanizmaları	19
Şekil 2.7. Gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılan bazı sentetik antioksidanların formülleri	27
Şekil 2.8. Zencefil ve zerdaçalın bileşenleri	32
Şekil 2.9. Zencefil yumrusu ve baharatı	33
Şekil 2.10. Zerdeçal yumrusu ve baharatı	34
Şekil 4.1. Gallik asit standart grafiği	45
Şekil 4.2. Pirokateşol standart grafiği	45
Şekil 4.3. Zencefil ve zerdeçalın gallik asit eşdeğeri olan fenolik madde içerikleri	46
Şekil 4.4. Zencefil ve zerdeçalın pirokateşol eşdeğeri olan fenolik madde içerikleri	47
Şekil 4.5. Zencefil-etanol ekstraktının DPPH radikal giderme aktiviteleri	48
Şekil 4.6. Zencefil-metanol ekstraktının DPPH radikal giderme aktiviteleri	49
Şekil 4.7. Zerdeçal-etanol ekstraktının DPPH radikal giderme aktiviteleri	50
Şekil 4.8. Zerdeçal-metanol ekstraktının DPPH radikal giderme aktiviteleri	51
Şekil 4.9. Zencefil ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri	53
Şekil 4.10. Zerdeçal ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri	54
Şekil 4.11. Zencefil ekstraktlarının metal şelatlama etkileri	56
Şekil 4.12. Zerdeçal ekstraktlarının metal şelatlama etkileri	56
Şekil 4.13. Zencefil ekstraktlarının süperoksit radikali giderme aktiviteleri	57
Şekil 4.14. Zerdeçal ekstraktlarının süperoksit radikali giderme aktiviteleri	58
Şekil 4.15. Zencefil ekstraktlarının H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> radikali giderme aktiviteleri	59
Şekil 4.16. Zerdeçal ekstraktlarının H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> radikali giderme aktiviteleri	60
Şekil 4.17. Zencefil ekstraktlarının Fe <sup>3+</sup> ü Fe <sup>2+</sup> ye indirgeme kapasiteleri	61
Şekil 4.18. Zerdeçal ekstraktlarının Fe <sup>3+</sup> ü Fe <sup>2+</sup> ye indirgeme kapasiteleri	61

Şekil 4.19.	Gallik asit standart grafiği	63
Şekil 4.20.	Pirokateşol standart grafiği	63
Şekil 4.21.	Zencefil ve zerdeçalın gallik asit eşdeğeri olan flavonoid madde içerikleri	64
Şekil 4.22.	Zencefil ve zerdeçalın pirokateşol eşdeğeri olan flavonoid madde içerikleri	65
Şekil 4.23.	Zencefil-etanol ekstraktının ABTS radikali giderme etkileri	66
Şekil 4.24.	Zencefil-metanol ekstraktının ABTS radikali giderme etkileri	67
Şekil 4.25.	Zerdeçal-etanol ekstraktının ABTS radikali giderme etkileri	68
Şekil 4.26.	Zerdeçal-metanol ekstraktının ABTS radikali giderme etkileri	69

**TABLolar DİZİNİ**

	<b>Sayfa No</b>
Tablo 2.1. Bazı serbest radikal türleri	7
Tablo 4.1. Baharatlardan ekstrakte edilen bileşiklerin verimleri	44
Tablo 4.2. Çalışılan baharat ekstraktlarının ve standartların DPPH radikali giderme aktivitesi sonuçlarından elde edilen EC <sub>50</sub> değerleri	52

**KISALTMALAR**

ABTS	2,2'-Azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat)
A.asit	Askorbik asit
BHA	Bütillendirilmiş hidroksianisol
BHT	Bütillendirilmiş hidroksitoluen
DPPH	1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil
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
GST	Glutasyon-S-transferaz
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
MDA	Malondialdehit
NADH	Nikotinamidadenindinükleotid
NBT	Nitroblue tetrazolyum
ORAC	Oksijen radikalini absorblama kapasitesi
PG	Propil gallat
PMS	Fenazin metasülfat
ROT	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
TBQH	t-bütil hidroksikinon
TEAC	Trolox ekivalenti antioksidan kapasite
TPC	Toplam fenolik madde
TRAP	Toplam radikal tutma parametresi
Z.fil-E	Zencefil etanol ekstraktı
Z.fil-M	Zencefil metanol ekstraktı
Z.çal-E	Zerdeçal etanol ekstraktı
Z.çal-M	Zerdeçal metanol ekstraktı

## 1. GİRİŞ

Oksijen molekülü, canlılar için hayati önemi olan bir moleküldür. Yaşamımızı sürdürmek için havanın moleküler oksijenini ( $O_2$ ) 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 aminoasitlerin karbon iskeleti) türeyen NADH ve  $FADH_2$ 'den elektronları ve hidrojenleri alarak suya indirgenir. Bu yolda oksijen molekülünün kuvvetli oksitleyici gücü, ATP' nin yüksek enerjili fosfat bağı haline dönüştürülür.

Biyolojik sistemlerde serbest radikal reaksiyonları önemli bir yer tutar. Serbest radikaller; son yörüngelerinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan, kimyasal olarak çok aktif ve zararlı moleküllerdir. Serbest radikaller; radikal olmayan bir atom veya molekülden bir elektron çıkmasıyla veya radikal olmayan bir atom veya moleküle bir elektron ilavesiyle oluşurlar. Bu bileşikler organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında oluşabildiği gibi, dış etkenlerin etkisiyle de oluşmaktadır. Çok kısa yaşam süreli, ancak yapılarındaki dengesizlik nedeniyle çok reaktif olan serbest radikaller, tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliği göstermektedir ve yararlı biyomoleküllerin fonksiyonlarını yitirmesine neden olmaktadır (Inglett vd., 2011).

Serbest radikaller reaktif yapıları nedeniyle hücrelerde ve dokularda pek çok zarara yol açarlar. Oksijenli yaşamla birlikte oksijen kaynaklı radikaller oluşumu artmış ve oksidatif hasarı engelleyici antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir. Sağlıklı kişilerde serbest radikaller ile antioksidan savunma sistemi arasında bir denge vardır. Radikal üretiminin aşırı artması ve antioksidanların azalması oksidatif strese neden olur. Son yıllardaki araştırmalara göre; serbest radikaller inflamasyon, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, kanser, diyabet, gut, böbrek hastalıkları, solunum sistemi hastalıkları ve sindirim sistemi hastalıklarında rol alır. Serbest radikallerin doğrudan ölçümü için ESR, Kemilüminesans ve Enzimsel yöntemler kullanılmakta, bu yöntemler deneysel modellerde ve kontrollü sistemlerde

iyi sonuç vermektedir. Serbest radikallerin doğrudan ölçümünün zorluğu, araştırmacıları lipid, protein ve nükleik asitlerde oksidatif stresin neden olduğu hasar sonrası ortaya çıkan ürünlerin ölçümüne yöneltmiştir. Antioksidan savunma sisteminin ölçümü için de çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (Deng vd., 2011).

Serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için hücreler, bunları nötralize eden antioksidanlar üretmektedir. Serbest radikallerin oluşum hızı ve bunların antioksidanlar tarafından nötralize edilme hızı arasında bir denge bulunması beklenir. Böylece hücre serbest radikallerin olumsuz etkilerinden korunur. Eğer bu denge serbest radikaller lehine bozulursa, yani yapımdan daha yavaş nötralize edilirse, hücrede serbest radikaller artar.

Antioksidanlar serbest radikallerin etkilerini yokedici sistemlerdir. Vücutta ROT'ların oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek üzere enzimatik veya enzimatik olmayan birçok endojen antioksidan savunma mekanizması bulunmaktadır. Bunun yanında bazı ilaçlar, vitaminler ve sentetik gıda antioksidanları da eksojen antioksidanlar olarak değerlendirilebilir. Serbest radikal oluşumunu geciktiren veya tamamen durduran koruyucu antioksidanlar veya lipid peroksidasyonunun ilerlemesini engelleyen zincir kırıcı antioksidanlar (askorbik asit,  $\alpha$ -tokoferol, flavonoidler) olarak etki gösterirler. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarla reaktif oksijen türlerine karşı bitkisel kaynakların yararlı olduğu; meyve ve sebzelerin koruyucu etkilerinin içerdikleri askorbik asit (C vitamini),  $\alpha$ -tokoferol (E vitamini), karotenoidler, glutatyon, flavonoidler ve fenolik asitler gibi doğal bileşiklerden dolayı olduğu bildirilmiştir (Halvorsen vd., 2002). Vücudun endojen savunma sisteminin düzenli ve dengeli bir diyetle alınacak antioksidan bileşikler ile desteklenmesi gerekmektedir. Bu yüzden diyetle antioksidan alımında artma veya antioksidanlarla zenginleştirilmiş gıdalar giderek önem kazanmaktadır.

Çalışmamızda zencefil ve zerdeçal baharatlarının etanol ve metanol ekstraktları alınarak çeşitli metodlarla antioksidan aktiviteleri, toplam fenolik maddeleri,  $H_2O_2$  giderme aktiviteleri, indirgeme kapasiteleri, metal iyonlarını şelatlama aktiviteleri, süperoksit radikali giderme aktiviteleri, antiradikal aktiviteleri, ABTS radikali giderme aktiviteleri ve toplam flavonoid maddeleri tayin edilmiştir. Sonuçlar  $\alpha$ -tokoferol, askorbik asit, trolox, BHA, BHT gibi çeşitli standart maddeler ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir.

## 2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

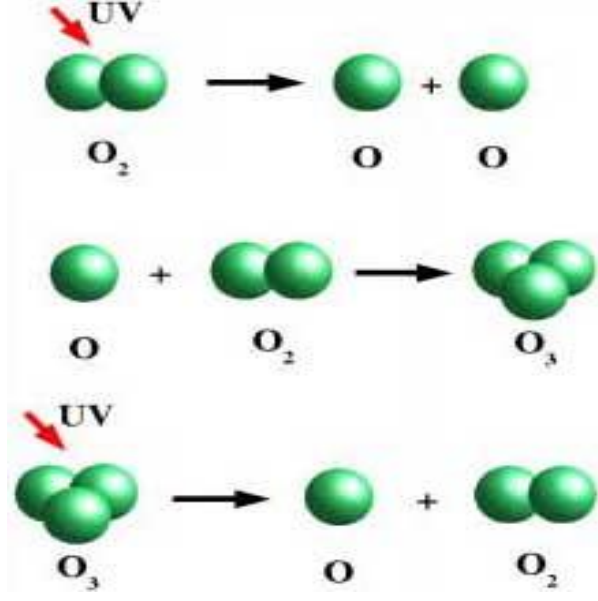
### 2.1. Oksidatif Stres

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde, bu olaya oksidatif denge denir. Oksidatif denge sağlandığı süreçte organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Hücrede normal metabolik yollardaki enzimatik reaksiyonlarda, ara ürünler olarak devamlı şekilde serbest radikaller oluşur. Bu serbest radikal ara ürünleri, enzimlerin aktif yerinden sızmakta, moleküler oksijenle kazara etkileşerek serbest oksijen radikalleri oluşturmaktadırlar. Hücrede oluşan ROT, “antioksidanlar” olarak bilinen mekanizmalarla ortadan kaldırılırlar. Bazen hücresel savunma mekanizması vasıtasıyla ortadan kaldırılardan daha fazla ROT oluşabilir. Organizmada hücresel savunma mekanizması vasıtasıyla ortadan kaldırılardan daha fazla ROT’ ların meydana gelmesi **oksidatif stres** olarak tanımlanır. ‘Oksidatif stres’ : serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki dengesizliği göstermekte olup, doku hasarına yol açmaktadır (Altan vd., 2006).

### 2.2 Serbest Radikaller

Kuantum kimyasına göre, iki elektron bir bağ yapısına girebilir. Ayrıca iki elektronun zıt yönde olması gerekir. Yani yukarıya doğru dönen bir elektronun eşi aşağıya doğru dönen bir elektrondur. Bir bağ koptuğunda elektronlar ya birlikte kalır ya da ayrılırlar. Kimyasal bileşikler iki veya daha çok elementin aralarında kimyasal bağ oluşturması ile meydana gelir (Şekil 2.1). Bu bağlar negatif yüklü elektronlarla sarılmıştır ve bu elektronların düzeni bileşiğe kararlılık sağlar. Kararlı bileşiklerin elektronları çiftleşmiş halde bulunur. Eğer elektron çiftleşmemiş ise molekül daha reaktif ve kararsız duruma geçer. Bir ya da daha fazla sayıda çiftleşmemiş elektrona sahip element veya bileşiklere ‘serbest radikaller’ denir. Bu eşleşmemiş elektronlar yüksek enerjilidir ve eşleşmiş elektronları ayırıp işlerine engel olurlar. Bu işlem serbest radikalleri hem tehlikeli hem kullanışlı yapar. Elektron transferi enerji üretimi ve pek çok metabolik işlevde temel oluşturur. Ama zincir reaksiyonu kontrolsüz bir davranış gösterirse hücrede hasarlara neden olur (Altan vd., 2006).

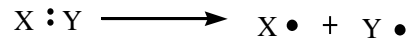




Şekil 2.1. Moleküler oksijenin oluşumu

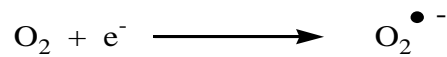
Bazı fiziksel etkenler ve kimyasal olaylardan dolayı hücrenel koşullarda ve çevrede devamlı bir radikal yapımı vardır. Serbest radikaller üç yolla oluşur (Akkuş, 1995, Onat vd., 2002):

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



**b) Normal bir molekülün elektron kaybetmesi:** Radikal özelliği bulunmayan bir molekülde elektron kaybı sırasında dış orbitalinde eşlenmemiş elektron kalıyorsa radikal formu oluşur.

**c) Normal bir moleküle tek bir elektron transferi:** Radikal özelliği bulunmayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde eşleşmemiş elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna sebep olabilir.



Serbest radikallerin oluşumu organizmada oksijen kullanımı sırasında ortaya çıkar. Eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküller hücrelerin zarar gördüğü reaksiyonlar dizisini başlatır. Vücutta serbest radikallerin oluşumu katabolik reaksiyonların yanı sıra yağlı diyetler, sağlıksız beslenme, sigara, radyasyon ve çevre kirliliği gibi nedenlerle başlamakla birlikte artmaktadır. Serbest radikaller bağışıklık sistemini zayıflatarak çeşitli hastalıklara ve erken yaşlanmaya neden olurlar.

### 2.2.1. Reaktif Oksijen Türleri

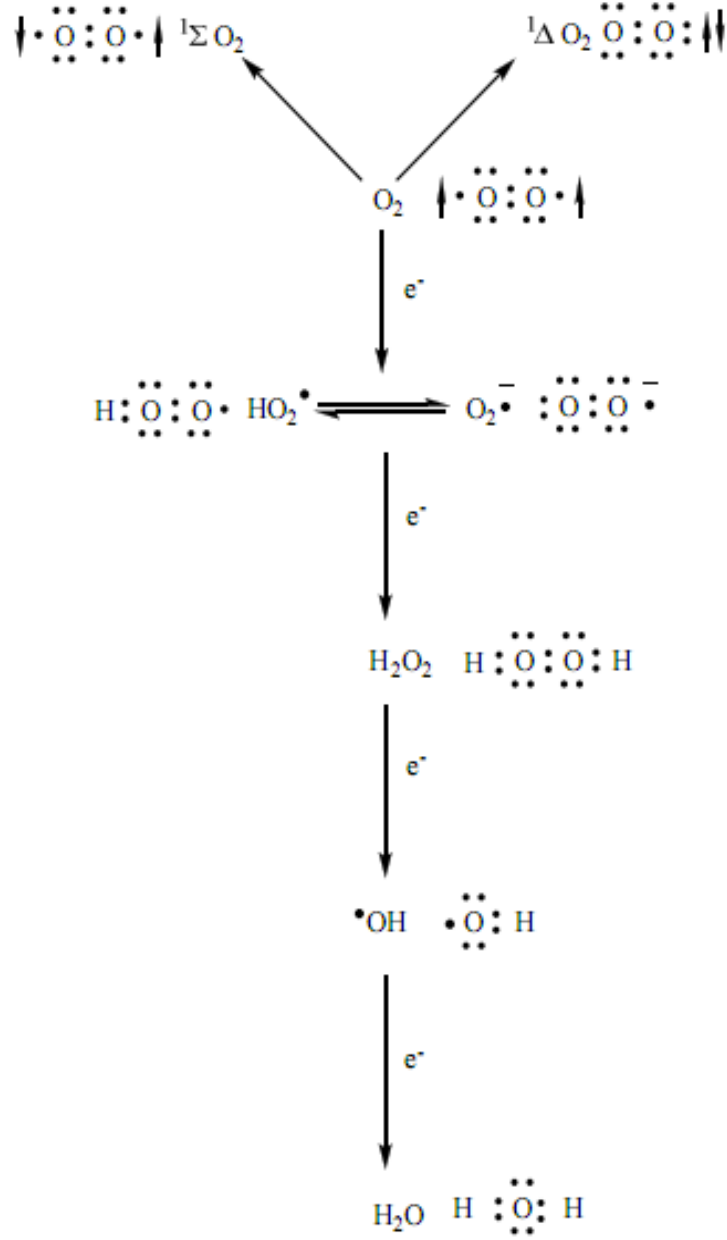
Moleküler oksijen ( $O_2$ ), iki kovalent bağ yapmasına rağmen, paralel spin durumlu iki ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektrona sahiptir (Lee,1991). Serbest radikal tanımına göre oksijen bir 'diradikal' dir. Diradikal oksijen, spin kısıtlanmasından dolayı radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girerken, diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer (Akkuş, 1995).



**Moleküler oksijen**

Ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektron içeren atom, atom grubu veya moleküller **serbest radikal** olarak tanımlanırlar. Ancak  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  ve  $Mo^{5+}$  gibi geçiş metalleri de ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler, fakat serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar. Serbest radikaller pozitif yüklü (katyon), negatif yüklü (anyon) veya elektriksel olarak nötral olabilirler.

Organizmada geçiş metallerini ( $Fe^{2+}$  ve  $Cu^+$  gibi metaller) içeren enzimler vasıtasıyla moleküler oksijene tek elektronların transferi suretiyle oksidasyon reaksiyonları meydana gelir. Moleküler oksijen, biradikal doğasının bir sonucu olarak yüksek derecede ROT oluşturma eğilimindedir (Şekil 2.2).



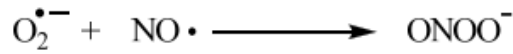
**Şekil 2.2.** Oksijenin suya indirgenmesi ve diğer oksijen türlerinin oluşumu

ROT, çeşitli serbest radikallerin olduğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler. Hücrede karbon merkezli organik radikaller, peroksit radikalleri, alkoksi radikalleri, tiyil radikalleri, sülfenil radikalleri serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar (Akkuş, 1995) (Tablo 2.1).

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

Adı	Formülü	Tanımı
Hidrojen atomu	H•	En basit serbest radikal
Süperoksit	O <sub>2</sub> •	Oksijen merkezli radikal, seçimli reaktif
Hidroksil	•OH	En fazla reaktif oksijen radikali. İnsan vücudundaki tüm moleküllere saldırır.
Triklorometil	CCl <sub>3</sub> •	C merkezli radikal, CCl <sub>4</sub> metabolizması sonucu üretilir ve genellikle O <sub>2</sub> ile hızla reaksiyona girer.
Tiyil	RS•	Kükürt üzerinde eşleşmemiş elektron bulunduran türlerin genel adı
Peroksil, Alkoksil	RO <sub>2</sub> •, RO•	Organik peroksitlerin yıkımı sırasında oluşan oksijen merkezli radikaller.
Nitrik oksit	NO•	L-arginin amino asidinden in vivo koşullarda üretilir.
Azotdioksit	NO <sub>2</sub> •	NO•'nun O <sub>2</sub> ile reaksiyonunda oluşur. Kirli hava, sigara dumanında vb. bulunur.
Hidrojen peroksit	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Reaktivitesi en düşük, moleküler hasar yeteneği düşük.
Singlet oksijen	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oksijenin güçlü oksidatif formu

Reaktivite, radikale ve ortamda bulunan moleküle bağlıdır. İki serbest radikal karşılaştığında eşleşmemiş elektronları kovalent bağ yaparak birleşir. Ancak bunun sonucunda oluşan türler de reaktif olabilir. Buna örnek NO ve O<sub>2</sub>'in çok hızlı reaksiyonu ile bir nonradikal ürün olan peroksinitritin oluşumu verilebilir:



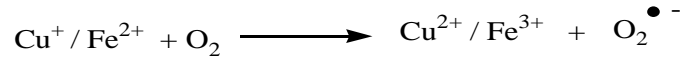
Bununla birlikte bir serbest radikal, radikal olmayan bir madde ile reaksiyona girerek yeni bir radikal oluşturabilir. Biyolojik moleküllerin büyük bir kısmı radikal olmadığı için, *in vivo* şartlarda reaktif bir radikalın oluşumu, zincir reaksiyonunun başlamasına yol açabilir (Nehir El vd., 1999).

### 2.2.1.1. Süperoksit Radikali (O<sub>2</sub>•)

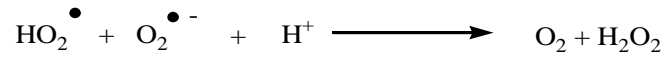
Süperoksit radikalleri hücrede enerji metabolizmasında oksidasyon sırasında ya da oksidazlar gibi bazı enzimlerin aktivitesi sonucu oluşurlar. Süperoksit radikalleri

süperoksit dismutaz adı verilen bir enzimle inaktive edilirler. Süperoksit radikali iki mekanizmayla çalışır. Bu fagositlerin bakterisit etkilerinin temel mekanizmasıdır. Aynı zamanda yangın reaksiyonlarında normal dokulara bile zarar verebilecek araçlardır (Halliwell ve Gutteridge, 1990, Halliwell, 1994).

Süperoksit radikali, hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu süperoksit radikali meydana getirebilir.

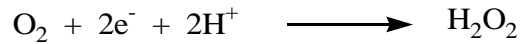


Bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit radikali hem oksitleyici hem indirgeyici özelliğe sahiptir. Bu radikal epinefrinin oksidasyonunda oksidan olarak davranarak bir elektron alır ve hidrojen perokside indirgenir (Akkuş, 1995).

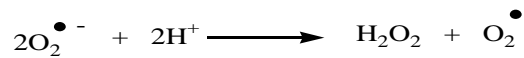


### 2.2.1.2. Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), süperoksidin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksidin iki proton ile birleşmesi sonucu meydana gelir

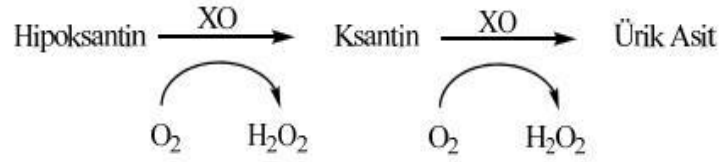


Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi, süperoksidin dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü, süperoksidin dismutasyonu reaksiyonunda iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar.



Bu reaksiyon, radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir, ya spontan gerçekleşir ya da **süperoksit dismutaz (SOD)** enzimi tarafından katalizlenir.

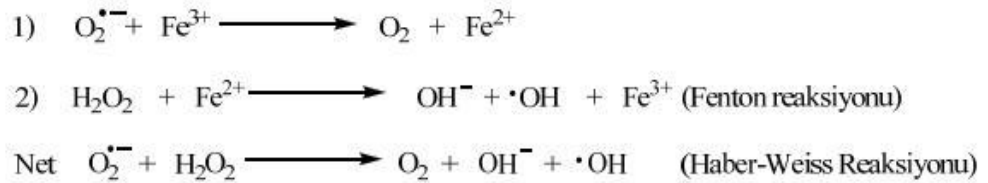
Ayrıca, aminoasit oksidaz ve ksantin oksidaz (XO) gibi bazı oksidaz enzimlerinin faaliyeti sonucunda *in vivo* olarak  $H_2O_2$  üretilir (Murray vd., 1996).



Hidrojen peroksit, bir serbest radikal olmadığı halde ROT kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü  $Fe^{2+}$  veya diğer geçiş metallerinin varlığında **Fenton reaksiyonu** sonucu, süperoksit radikalinin varlığında **Haber-Weiss reaksiyonu** sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturur (Halliwell vd., 2000).

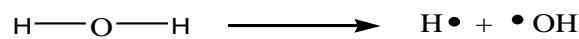
Haber-Weiss reaksiyonu, süperoksitin direkt olarak  $H_2O_2$  ile reaksiyonudur, katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerler. Demirle katalizlenen ikinci şekli ise çok hızlıdır.

Sonra Fenton reaksiyonu ile  $H_2O_2$ 'den hidroksil radikali ve hidroksil üretilir. Reaksiyon mekanizması aşağıdaki şekildedir:



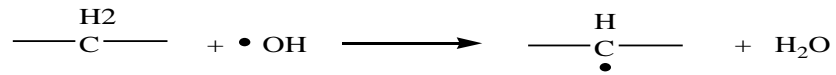
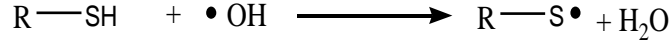
### 2.2.1.3. Hidroksil Radikali ( $HO^\bullet$ )

Hidroksil radikali, geçiş metalleri varlığında  $H_2O_2$ 'nin indirgenmesiyle (Fenton reaksiyonu) oluşur. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda oluşur.



Hidroksil radikali son derece reaktif bir oksidan radikaldir, yarılanma ömrü çok kısadır ve ROT'un en güçlüsüdür (Akkuş, 1995, Halliwell ve Gutteridge, 1990).

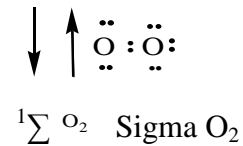
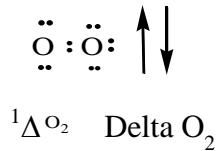
Oluştığı yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyil radikalleri, karbon merkezli organik radikaller, organik peroksitler gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara neden olur.



Her tür biyolojik moleküllerle reaksiyona girer, özellikle elektronca zengin bileşikler tercih ederler, nükleik asitler (pürin ve pirimidin bazları) ve proteinler (aromatik aminoasitler) ile çeşitli radikalik tepkimelerde verirler.

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

Bir radikal oksijen, radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer. Bir radikal oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitalle yer değiştirmesiyle **singlet oksijen** oluşur. Singlet oksijen, eşleşmemiş elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür, delta ve sigma olmak üzere iki şekli vardır. Delta şekli daha düşük enerjili (92 kJ) olduğundan sigma şekline (155 kJ) göre daha uzun yarı ömürlüdür (Cotton ve Wilkinson., 1988).



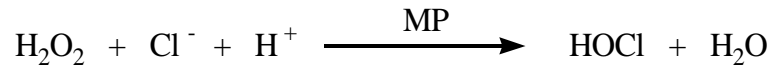
### 2.2.1.5. Nitrik Oksit (NO<sup>•</sup>)

Nitrik oksit, hücrel patofizyolojide önemli bir rol oynayan çözünebilir, serbest radikal gazıdır. Vazodilatör mesajı endotelyumdan düz kasa taşıyan bir enerji aktarıcısı olarak, sentral, periferel sinirsel aktarımda ve bağışıklıkta aktif rol alır (Halliwell, 1994, Murray, 1996).

Nitrik oksit, hem fizyolojik hem patofizyolojik süreçlerde önemli bir role sahip serbest radikaldir. NO<sup>•</sup> sentezi bazı hücrelerde bir reseptöre bir stimülatörün bağlanmasına veya nöronlarda bir sinir uyarısına yanıt olarak meydana gelir. Nitrik oksit (NO<sup>•</sup>) muskarinik veya histamin reseptörleri gibi çeşitli reseptörlerin aktivasyonu sonucu L-arjinin ve oksijenden, **nitrik oksit sentaz (NOS, EC 1.14.13.39)** etkisiyle sentezlenir. Nitrik oksitin süperoksit dismutaz (SOD) enzimiyle yarışmaya girmesi ve süperoksit radikaliyle etkileşmesi sonucu peroksinitrit oluşur. Böylece nitrik oksitin fizyolojik etkisi inhibe edilir, oksidatif etkisi ortaya çıkar (Halliwell, 1994, Murray, 1996).

### 2.2.1.6. Hipoklorik Asit (HClO)

Doku makrofajları gibi fagositik hücreler, nötrofil, eozinofil gibi granülositler mikroorganizmaları öldürmek için klorlanmış oksidanlar üretebilir (Murray vd., 1990). HClO miyeloperoksidaz enzimi tarafından H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve Cl<sup>-</sup> iyonunun birleşmesi sonucu oluşur. Dokularda hasar oluşturan güçlü bir antioksidandır.



## 2.2.2. Hücredeki Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynakları

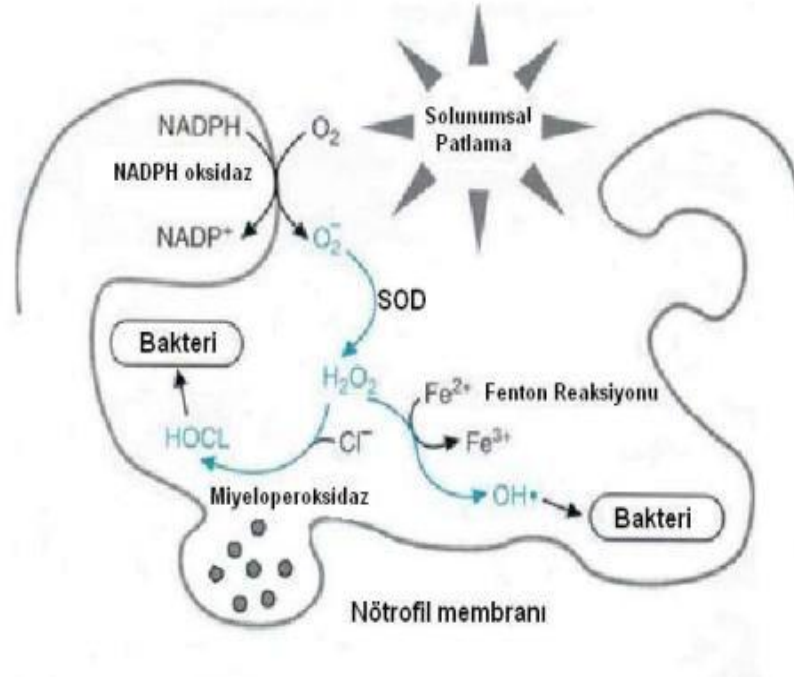
Serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türleri organizmada özel metabolik olaylar sırasında da üretilirler, eksojen de alınabilirler.

### 2.2.2.1. Biyolojik kaynakları

a) Solunumsal Patlama: Aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller, eozinofiller ve fagositik lökositler çeşitli biyolojik hedeflerin parçalanmasını sağlayan ve enfeksiyona karşı vücudun hücrel cevabını başlatan hücrelerdir. Fagositik solunumsal patlama



sırasında çeşitli serbest oksijen radikalleri ( $H_2O_2$ , süperoksit ve hidroksil radikali) oluşur. Fagosite edilmiş mikroorganizma ve bakteriler bu ürünlerin etkisiyle öldürülür. Ancak bu oksidan ürünler hücrelerin antioksidan savunma güçlerini aştığında normal konakçı hücrelerine zarar verirler ve çeşitli hastalıkların patogenezinde rol oynarlar (Şekil 2.3).



**Şekil 2.3.** Fagositik solunumsal patlamada oluşan reaktif oksijen türleri

b) Radyasyon ve çevresel ajanlar: Hava kirliliği, pestisidler, sigara dumanı, çözücüler, anestetikler, aromatik hidrokarbonlar serbest radikal oluşumuna neden olmaktadır.

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

d) Stres: Sinirsel uyarılar kateşolaminlerin sentezinde artış yaparlar (Murray vd., 1996). Kateşolaminlerin oksidasyonunda bir serbest radikal oluşum sebebidir.

### 2.2.2.2. İntrasellüler kaynakları

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

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

c) Küçük moleküllerin otooksidasyonu: Tiyoller, katekolamin, tetrahidrofolat gibi bazı bileşiklerin otooksidasyonu süperoksit radikali kaynağıdır.

d) Birçok enzimin (ksantin oksidaz, aldehit oksidaz, flavoprotein dehidrogenaz, aminoasit oksidaz) katalitik döngüsü sırasında  $H_2O_2$  ortaya çıkar (Murray vd., 1996).

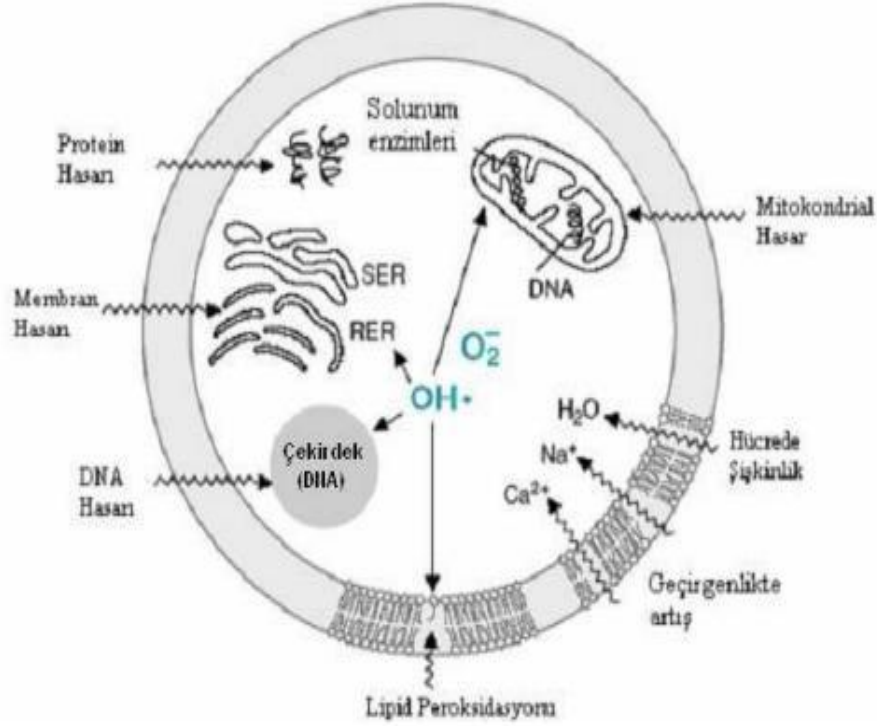
e) Özellikle demir ve bakır gibi geçiş metalleri, fizyolojik şartlarda yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarında yer alırlar. Bu özelliklerinden dolayı serbest radikal reaksiyonlarını hızlandıran katalizörler olarak iş görürler. Demir ve bakır özellikle tiyollerden tiyil sentezini,  $H_2O_2$ , süperoksit ve hidroksil radikali sentezini katalizler.

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

g) Araşidonik asit metabolizması da reaktif oksijen metabolitlerinin önemli bir kaynağıdır. Araşidonik asit, membran yapısında bulunan, önemli fizyolojik fonksiyonları olan eikazonoidler ailesinin sentezinde başlangıç maddesi olan 20 karbonlu çoklu doymamış bir yağ asididir. Fagositik hücrelerin uyarılması sonucu plazma membranındaki araşidonik asit serbestleşir ve enzimatik oksidasyonla çeşitli serbest radikal ana ürünleri meydana gelir (Akkuş., 1995).

### 2.2.3. Serbest Radikallerin Etkileri

ROT oluşumu enflamasyon, radyasyon, yaşlanma, normalden yüksek oksijen basıncı, ozon ( $O_3$ ) ve azot dioksit, kimyasal maddeler gibi bazı uyarıların etkisiyle artar. Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler (Onat vd., 2002) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Serbest radikallerin hücresel hedefleri

Serbest oksijen radikallerinin tüm bu etkilerinin sonucunda hücre hasarı olur. Hücrede ROT' ların ve serbest radikallerin artışı hücre hasarının önemli bir nedenidir.

### 2.2.3.1. Serbest radikallerin lipidlere etkileri

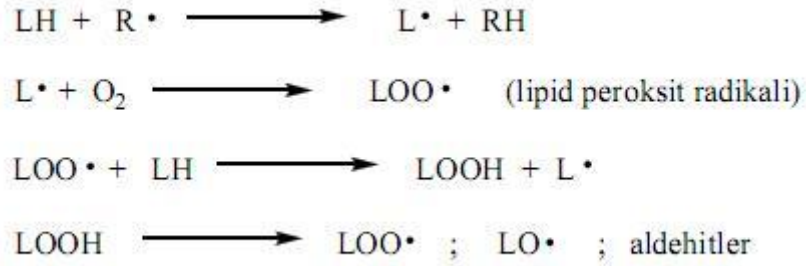
Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar.

Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri ( $L\cdot$ ) ve lipid peroksit radikallerinin ( $LOO\cdot$ ) oluşması, ROT'ların neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Serbest radikallerin sebep olduğu lipid

peroksidasyonuna "**nonenzimatik lipid peroksidasyonu**" denir (Halliwell ve Gutteridge, 1990).

Lipid radikali, dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipid radikallerinin moleküler oksijenle ( $O_2$ ) etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikalleri oluşur. Lipid peroksit radikalleri, membran yapısındaki diğer doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipidperoksitlerine (LOOH) dönüştürler ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder (Şekil 2.5).

Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu; lipid peroksidasyon seviyesinin indikatörü olarak kabul edilen malondialdehit (MDA) oluşur. Lipid peroksidasyonu, membran yapısına direk ve oluşturduğu reaktif aldehitlerle diğer hücre bileşenlerine indirek olarak zarar veren geri dönüşümsüz bir olaydır (Onat vd., 2002).



**Şekil 2.5.** Lipid peroksidasyonunun temel reaksiyonları

### 2.2.3.2. Serbest radikallerin proteinlere etkileri

Proteinler serbest radikallere karşı doymamış yağ asitlerinden daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme derecesi aminoasit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin ve sistein gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler (Van Der Vliet vd., 1994). Bu etki sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur.

Serbest radikallerin etkileri sonunda, yapılarında fazla sayıda disülfid bağı bulunan immünoglobülin G (IgG) ve albümin gibi proteinlerin tersiyer yapıları bozulur, normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Hemoglobin gibi HEM proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle

oksihemoglobinin süperoksit radikali veya hidrojen peroksitle ( $H_2O_2$ ) reaksiyonu methemoglobin oluşumuna neden olur (Murray vd., 1996).

### **2.2.3.3. Serbest radikallerin nükleikasitlere ve DNA'ya etkileri**

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına ve hatta hücre ölümüne yol açabilir (Halliwell, 1994).

### **2.2.3.4. Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisi**

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerinde polisakkarit depolimerizasyonu ve özellikle monosakkarit otooksidasyonu gibi etkileri vardır. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu meydana gelen süperoksitler ve okzalaldehyitler diyabet ve sigara içimi ile ilgili patolojik olaylarda rol oynar (Hawkins ve Davies, 1998, McNeil vd., 1985).

Okzaldehyitler ayrıca DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece kanser ve yaşlanma olaylarında da rol oynarlar. Diyabet komplikasyonlarının gelişimi, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, romatoit artrit, behçet hastalığı ve kanser gibi birçok hastalıkta ve yaşlılıkta serbest radikal üretiminin arttığı, antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir. Ancak bu hallerde serbest radikal artışının sebep mi yoksa sonuç mu olduğu tam olarak bilinmemektedir.

## **2.3. Antioksidanlar**

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada koruyucu mekanizmalar vardır. Bu mekanizmalardan bir kısmı serbest radikal oluşumunu, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önler. ROT'ların düzeylerini ve bunların meydana getirdiği hasarı sınırlandırmak için vücutta birçok savunma mekanizması gelişmiştir.

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddeler antioksidanlar olarak bilinirler (Ames ve ark., 1993; Frei, 1994; Akkuş, 1995; Bast ve ark., 1997; Yanbeyi, 1999; Dikici, 1999). Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Antioksidanlar, hem direkt hem de dolaylı olarak ilaçların, karsinogenlerin ve toksik radikal reaksiyonların istenmeyen etkilerine karşı hücreleri koruyan maddelerdir. Kontrol mekanizmasının temel amacı serbest radikallerin aşırı yapılmasını önlemek, aynı zamanda da sağlam olan komşu hücreleri korumaktır. Antioksidanlar endojen ve eksojen kaynaklı antioksidanlar, serbest radikalin meydana gelişini engelleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler, enzim olanlar ve enzim olmayanlar şeklinde sınıflandırılmaktadır.

Antioksidanlar başlıca dört yolla oksidanları etkisiz hale getirirler;

- 1) Süpürme etkisi: Oksidanları daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirirler. Antioksidan enzimler ve mikromoleküller bu yolla etki eder.
- 2) Onarma etkisi: Oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onarırlar.
- 3) Söndürme etkisi: Oksidanlara bir hidrojen aktararak inaktive etmesine denir. Vitaminler, flavanoidler, timetazidin ve mannitol bu şekilde etki eder.
- 4) Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi: Hemoglobin, seruloplazmin, ağır mineraller kendilerine bağlar ve inaktive eder.

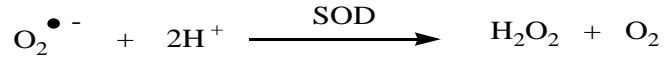
### **2.3.1. Antioksidanların sınıflandırılması**

Antioksidanlar, doğal antioksidanlar ve ilaçlar olmak üzere iki grupta toplanabilir. Doğal antioksidanlar arasında enzimler (süperoksit dismutaz, katalaz, sitokrom-C-oksidad), makromoleküller (seruloplazmin, transferin, miyoglobin) ve mikromoleküller (beta-karoten, A-vitamini, C-vitamini, E-vitamini, tokoferoller, glutation, N-asetil sistein, metiyonin, ubikinon) sayılabilir. Antioksidanların sınıflandırılması çeşitlilik göstermektedir. Doğal (endojen kaynaklı) ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olarak sınıflandırılabilirdiği (Akkuş., 1995) gibi enzim ve enzim olmayan antioksidanlar (Seven ve Candan., 1996) şeklinde sınıflandırmalar da mevcuttur. Vücudumuzdaki antioksidan savunma sisteminde yer alan başlıca

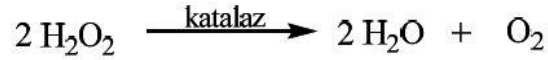
elemanlar ise; enzimler, metal iyonlarını bağlayan proteinler ve suda ile yağda çözünen radikal tutuculardır (Percival., 1998, Halliwell., 1994).

### 2.3.1.1. Enzimler

**Süperoksit Dismutaz (SOD):** Süperoksit serbest radikalinin hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir. Serbest radikallere karşı organizmadaki ilk savunma SOD enzimiyle gerçekleşir.



**Katalaz (CAT):** Hidrojen peroksidi ( $H_2O_2$ ) suya ve oksijene parçalar. Esas olarak peroksizomlarda, daha az olarak sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur (Murray vd., 1996, Onat vd., 2002).

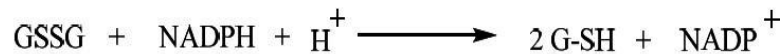


**Glutasyon Peroksidaz (GSH-P<sub>x</sub>):** Hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Lipid peroksidasyonunun başlamasını ve gelişmesini engelleyici özellikte olan enzimdir.

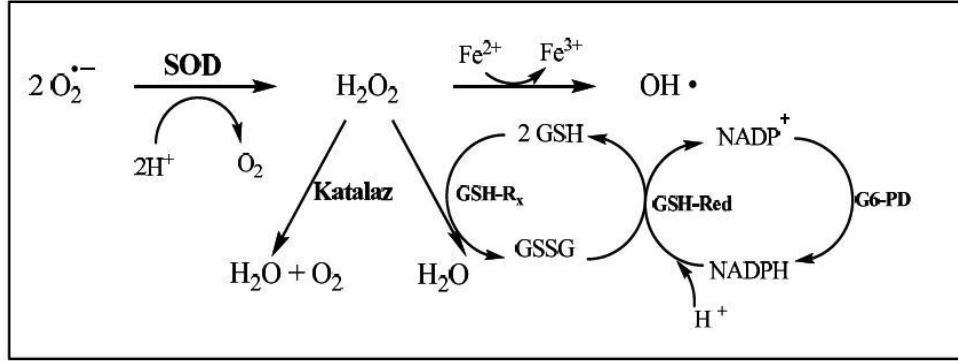


Reaksiyonlar sonucunda oksitlenmiş glutasyon GSSG oluşur. Antioksidan savunmanın etkinliğini sürdürebilmesi için oksitlenmiş glutasyonun tekrar indirgenmiş şekle (GSH) dönüşmesi gerekir. GSSG konsantrasyonundaki artış oksidatif stresin bir göstergesidir (Seven ve Candan, 1996).

**Glutasyon Redüktaz (GSH-Red):** GSH-P<sub>x</sub> vasıtasıyla hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutasyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatyon (GSH) dönüşümünü katalize eder (Halliwell, 1994).



**Glutasyon-S-Transferaz:** Başta araşidonikasit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı, selenyum-bağımsız GSH-Px aktivitesi göstererek bir antioksidan savunma mekanizması oluştururlar (Şekil 2.6).



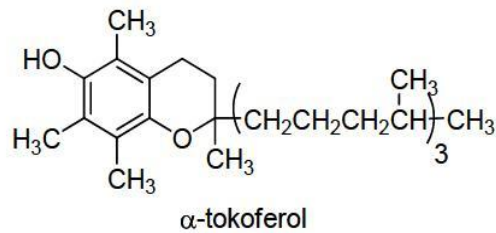
Şekil 2.6. Oksidatif strese karşı enzimatik savunma mekanizmaları

**Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz:** Solunum zincirinin son enzimidir ve süperoksiti detoksifiye eder.

**Fosfolipid Hidroperoksit Glutasyon Peroksidaz (PLGSH-Px):** Monomerik yapıdadır. Esas olarak membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkollere indirger.

### 2.3.1.2. Yağda ve suda çözünen radikal tutucular

**$\alpha$ -tokoferol ( E Vitamini ):** Doğada yaygın olarak bulunan E vitamininin ana bileşenidir. Antioksidan aktivitesi yapısındaki fenolik hidroksil grubuna sahip aromatik halkadan kaynaklanır (Akkuş, 1995).

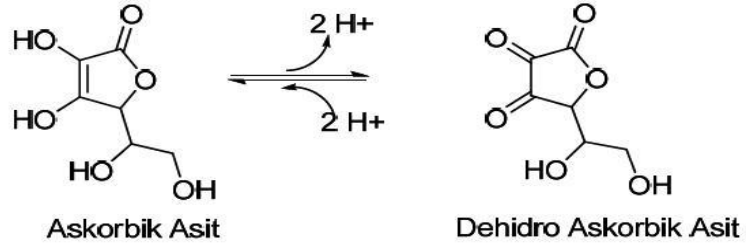


Hücre membran fosfolipidlerinde bulunan doymamış yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur. Okside olduktan sonra,



parçalanmadan önce askorbik asit ve glutatyon tarafından yeniden indirgenebilmektedir.

**Askorbik Asit ( C-Vitamini ):** Askorbik asit bir monosakkarit türevi olup yapıcı glikoza ve diğer altı karbonlu monosakkaritlere benzer. Çok hafif özel bir kokusu vardır. Ekşi tatta ve asit reaksiyondadır. Optikçe aktiftir. Polarize ışığı sağa çevirir. Güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı güçlü bir antioksidandır.

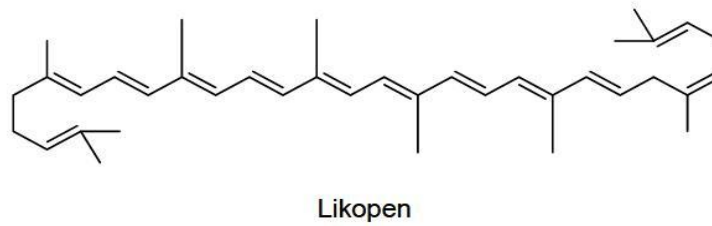


Süperoksit radikali ve hidroksil radikali ile reaksiyona girerek onları ortamdan temizler. Antioksidan etkisinin yanında oksidan etki de gösterir.

**Karotenoidler:** Bitkilerde bulunan doğal renk pigmentidir. Fotooksidatif proseslere karşı bitkileri korur. En bilineni A vitamini öncüsü olan  $\beta$ -karotendir.

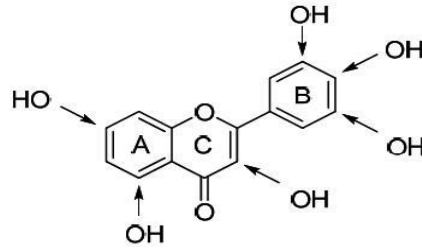


Singlet oksijeni bastırır. Süperoksit radikalini temizler. Peroksit radikalleriyle direkt olarak etkileşerek antioksidan görev görür.



Karotenoidler arasında en etkin  $\beta$ -karotenin açık zincirli analogu olan likopendir (Stahl ve Sies, 1999). LDL'yi oksidatif hasara karşı koruyarak ateroskleroz ve diğer koroner hastalıkların gelişmesini de engeller.

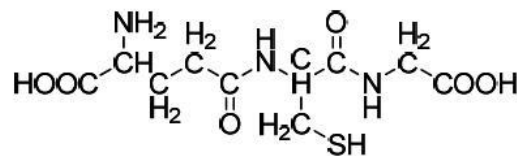
**Flavonoidler:** Bitkilerin sekonder metabolitleri olan polifenolik bileşiklerdir. Halka yapılarına göre flavonoller, flavonlar, flavanonlar, antosiyaninler, kateşinler ve izoflavonoidler olarak sınıflandırılır (Bilaloğlu ve Harmandar). Flavonoidler ve diğer bitki fenoliklerinin  $O_2^{\bullet-}$ , lipid alkoksil ( $RO^{\bullet}$ ), lipid peroksil ( $ROO^{\bullet}$ ) ve  $NO^{\bullet}$  radikallerini temizleme, Fe ve Cu şelatlama,  $\alpha$ -tokoferol rejenerasyonu gibi fonksiyonlara katıldığı da bildirilmiştir (Miller ve Ruiz-Larrea, 2002, Ross ve Kasum, 2002, Rice ve Evans, 1999).



temel flavonoid yapısı

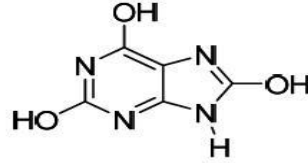
Flavonoid ve fenolik antioksidanlar anomerik hidroksil grubundan lipid radikallerine bir hidrojen atomu vererek lipid oksidasyonunu engellerler. Bileşiğin yapısı ile antioksidan kapasitesi ilişkilidir, fenolik bileşiklerde  $-OH$  grubu sayısı, flavonoidlerde B halkasının 5-OH, 4-OH ve 3-OH grupları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

**Glutasyon (G-SH):** Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur. L-sistein, L-glutamik asit ve glisinden sentezlenen üç etkili anti-aging aminoasit ve güçlü bir antioksidandır.



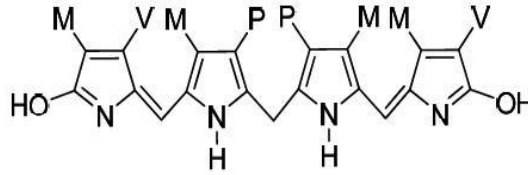
Glutasyon (G-SH)

**Ürik Asit:** Purin metabolizmasının son ürünü olan ürat plazmada bulunan ve suda çözünen bir maddedir. Normal plazma konsantrasyonlarında bulunan ürat süperoksit, hidroksil, peroksil radikalleri ve singlet oksijeni içerir. Lipid radikalleri üzerinde etkisizdir (Akkuş, 1995).



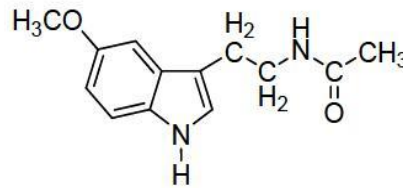
Ürik Asit

**Bilirubin:** HEM metabolizmasının memelilerdeki son ürünlerinden biri olan bilirubin plazmada üç temel antioksidandan birisidir (Stryer, 1995, Seven ve Candan, 1996). Düşük konsantrasyonlarda lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir (Yeşilkaya vd., 1998).



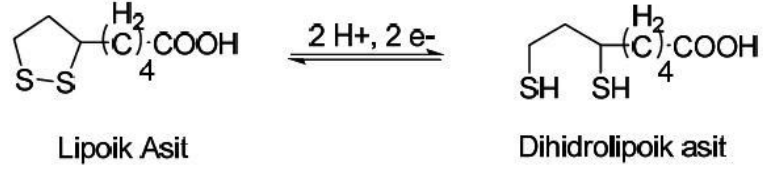
Bilirubin

**Melatonin (MLT):** Melatonin yaz-kış, uzun-kısa gün, aydınlık-karanlık döngüsünün düzenlenmesi gibi birçok biyolojik fonksiyonda rol oynayan bir hormondur (Reiter, 1998). En zararlı serbest radikal olan hidroksil serbest radikalini ortadan kaldıran çok güçlü bir antioksidandır. Günümüze kadar bilinen antioksidanların en güçlüsü olarak kabul edilmektedir (Yazıcı ve Köse, 2004).



Melatonin

**Lipoik Asit:** Kükürt içeren endojen bir antioksidandır. Hidroksil radikali ve hidrojen peroksidi nötralize eder. Prooksidan metalleri şelatlayarak da antioksidan etki gösterebilir (Percival, 1998, Packer vd., 1995, Scott vd., 1994).



**Sistein:** Vücudun ürettiği aminoasitlerden sisteinin bir formu olan N-asetil sistein (NAS) önemli bir antioksidan olan glutatyonun üretilmesine yardım eder. Ayrıca NAS 'in kendisi de çok güçlü bir antioksidandır. Süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır.

### 2.3.1.3. Metal iyonlarını bağlayan proteinler

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

**Ferritin:** Dokudaki demiri bağlar.

**Transferrin ve Laktoferrin:** Dolaşımdaki serbest demiri bağlarlar.

**Albumin:** LOOH ve HClO toplayıcısıdır.

**Seruloplazmin:** Ferro demiri ( $Fe^{2+}$ ) ferri demire ( $Fe^{3+}$ ) yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu ve böylece hidroksil radikali oluşumunu inhibe eder.

### 2.3.2. Eksojen antioksidanlar

Eksojen antioksidanları vitaminler, ilaçlar ve gıda oksidanları olarak sınıflandırabiliriz.  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karoten, askorbik asit ve folik asit vitamin olan eksojen antioksidanlardır.

İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar; Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, folik asit), NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal

anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid antiinflammatuvar ilaçlar), rekombinant SOD, endojen antioksidan aktiviteyi arttıranlar (ebselen, asetil sistein), nonenzimatik radikal toplayıcılar (mannitol, albumin), sitokinler, demir şelatörleri, demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferrokamin, seruloplazmin) (Onat vd., 2002).

**Demir Şelatörleri:** Hücre içine girerek serbest demiri bağlamak suretiyle onu etkisizleştirirler, böylece Fenton reaksiyonunu ve sonuçta hidroksil radikali oluşumunu inhibe ederler.

**Desferroksamin:** Serbest  $Fe^{3+}$ 'i bağlar.

**Oksipurinol:** Allopürinolün metabolitidir, doğrudan hidroksil radikali ve hipokloriti azaltıcı yönde etki eder.

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

**Ebselen:** Selenyumlu bir bileşiktir. Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) 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.

## 2.4. Gıdalar ve Antioksidanlar

Son yıllarda çoğunluğu bitkisel kaynaklı olan yüzlerce madde gıdalarda antioksidan olarak kullanılabilirlik açısından test edilmektedir. Bitkiler (yağlı tohumlar, tahıllar, sebzeler, meyveler, baharatlar), hayvansal ürünler (peptidler, aminoasitler ve karotenoidler), enzimler (glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz) ve bazı mikroorganizmalar en önemli doğal antioksidan kaynakları arasında yer almaktadır. Bunların antioksidan aktivitelerinin askorbik asit,  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karotenoidler, glutatyon, flavonoidler, kumarinler, fenolik asitler, selenyum ve izotiyosiyanatlar gibi antioksidan özellikli bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu bileşikler detoksifikasyon enzimlerini indüklemek, nitrozamin oluşumunu inhibe etmek, karsinojenleri bağlamak gibi çeşitli mekanizmalarla antioksidan aktive gösterirler (Pokorny., 1991, Steinmetz ve Potter., 1996, Vecchia vd., 2001).

### 2.4.1. Gıdalarda doğal olarak bulunan antioksidan maddeler

**C Vitamini:** C vitamini, önemli bir besin ögesi olması yanında, antioksidan özellikleri nedeniyle de önem taşımaktadır. Antioksidan özellikleri çok yönlü olup, lipid oksidasyonunu farklı mekanizmalarla önlemektedir. Bu mekanizmalar serbest radikal ve oksijen yok edici olarak indirgen etkileriyle bazı okside olabilir bileşiklerini korumak, daha az reaktif olan semidehidroaskorbat, dehidroaskorbik asit radikaline dönüşmek suretiyle oksijen ve karbon merkezli radikalleri indirgemek ve bazı antioksidanları rejenera etmek olmak üzere üç grupta toplanabilir.

**Fenolik Bileşikler:** Fenolik bileşikler bitkiler aleminde yaygın ikincil metabolitlerin büyük bir grubunu oluşturup, hidroksil gruplarının sayısı ve pozisyonuna göre değişik gruplara ayrılırlar. Polifenollerin en yaygın grubu C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> flavon iskelet üzerine kurulmuş olan flavonoidlerdir.

Flavonoidlerin lipid oksidasyonu üzerindeki etkileri, peroksi radikalleriyle reaksiyona girmeleri sonucunda elektron transferi yolu ile hidroksil ve süperoksit radikallerini yakalamalarıyla ilişkilidir.

**Karotenoidler:** Karotenoidler, birçok meyve ve sebze de bulunan sarı, turuncu ve kırmızı renk veren pigmentlerdir. Çoklu doymamış yapıları bu pigmentlere kolay okside olabilen ve stabil olmayan bir yapı kazandırmaktadır. Konjuge çift bağlarından dolayı hem serbest radikal toplayıcı hem de singlet oksijen bastırıcılar olarak fonksiyon gösterirler.

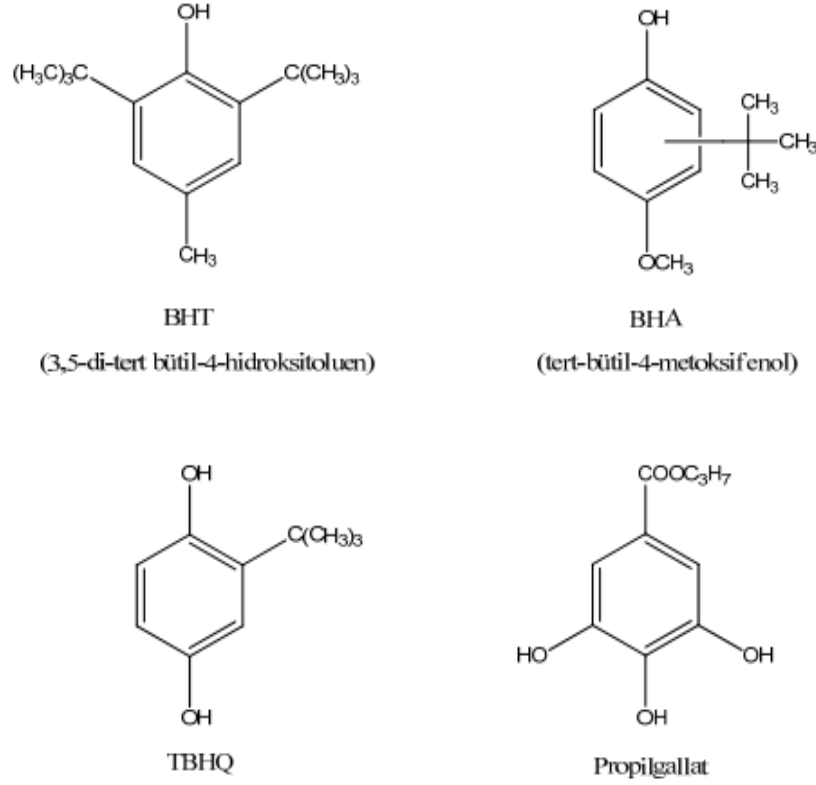
**Tokoferoller:** Tokoferoller, fenolik hidroksil gruplarından hidrojen veya elektron vererek başlangıçtaki serbest yağ asidi radikali oluşumunu engelleyerek lipid oksidasyonunu inhibe ederler.

Doğal antioksidanların gıdalarda kullanımı ile ilgili literatürde çeşitli iddialar bulunmaktadır. Bu iddialara göre baharatlar, şifalı otlar, kahve çekirdekleri, yulaf, çay, fasulye, kızılıcık, sebzeler (özellikle soğan ve biber), zeytin yaprağı, soya fasulyesi bitkisel ürünlerde etkin antioksidandır. Ticari açıdan en fazla ümit verici olanların biberiye ve yulaf ekstraktları olduğu belirtilmiştir.

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

#### **2.4.2. Gıdalara ilave edilen sentetik antioksidanlar**

Gıdaların korunması ve depolanması sırasında meydana gelen büyük problemlerden biri lipid oksidasyonu olup; yağlarda acılaşmaya (ransidleşme), yağ içeren diğer gıdalarda ise renk, tat, aroma, yapı kıvamında bozulmalara ve besinsel kalitenin azalmasına neden olmaktadır. Gıda endüstrisinde lipid oksidasyonunu gidermek, toksik oksidasyon ürünlerinin oluşmasını engellemek, besinsel kaliteyi sürdürmek ve gıdanın raf ömrünü uzatmak amacıyla antioksidan kullanmak gereklidir (Finley ve Given, 1986). Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'ne göre de antioksidanlar *“yağların acılaşması ve renk değişikliği gibi oksidasyonun neden olduğu bozunmaları önleyerek, gıdaların raf ömürlerinin uzatılmasını sağlayan maddeler olarak”* tanımlanmaktadır (Şekil 2.7).



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

Sentetik antioksidanların insan sağlığı açısından potansiyel toksik olabileceğinin öne sürülmesi, özellikle günümüzde tüketici tercihlerini doğal tarımsal ürünlere yöneltmiş ve işlenmiş gıdalarda da sağlık, kalite ve güvenlik arayışlarını ön plana çıkarmıştır. Araştırmacılar ve gıda bilimcileri sentetik antioksidanların yerine geçebilecek “doğal antioksidanlar” araştırma gayreti içine girmişlerdir. Bu amaçla yeryüzünde geniş dağılım gösteren bitkisel kaynaklara yönelinmekte ve bu kaynaklardan elde edilecek doğal antioksidanların gıdaların işlenmesi sırasında sentetik antioksidanlar yerine gıdalara ilave edilmesi hedeflenmektedir (Muare vd., 2001, Jayaprakasha vd., 2003, Nandita ve Rajini, 2004,).

## 2.5. Antioksidan Aktivite 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 (Frankel ve Meyer, 2000).

Bu metodlar kimyasal reaksiyonlarına göre başlıca iki gruba ayrılırlar:

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

### **2.5.1. 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 (Ou vd., 2002, Huang vd., 2005).

### **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  $\beta$ -fikoeritrin ve peroksil radikal başlatıcısı olarak AAPH ile çalışılmıştır. Ama kullanılan probun fotostabil olmaması ve polifenolik maddelerle etkileşimi nedeniyle  $\beta$ -PE yerine fluoressein kullanılmıştır. Floressein protein olmayan sentetik bir probtur (Becker vd., 2004).

Bu metodta AAPH, fluoressein fluoresansında azalmaya neden olur. Reaksiyon ilerledikçe fluoressein tüketilir. Antioksidan varlığında AAPH radikalleri giderilir ve fluoresans azalması inhibe edilir (Tomer vd., 2007).

### **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 (Frankel ve Meyer, 2000).

### **Crocın Ağartma Metodu**

Crocın, doğal karotenoid türevidir. Metod serbest radikal başlatıcı AAPH tarafından, crocının ağarmasını önlemede antioksidanların inhibisyon kapasitesini ölçer. Crocın safrandan elde edilen doğal pigment karışımı olduğu için çok fazla çeşitliliğe sahiptir. Karotenoidler gibi diğer gıda pigmentleri aynı dalga boyunda ışık absorblar. Bu da crocının endüstriyel uygulamasını sınırlar (Huang vd., 2005).

### **2.5.2. 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 (Huang vd., 2005).

### **TEAC (Trolox Ekvivalenti Antioksidan Kapasite) Metodu**

İlk kez 1993 yılında bulunan metod daha sonraki yıllarda geliştirilmiştir. Bu metodta metmiyoglobin/ $H_2O_2$  sisteminin oluşturduğu ferrilmiyoglobin radikali ABTS

ile etkileşerek bu maddenin katyonik radikalini üretir. Oluşan radikalın antioksidan tarafından giderilmesi 734 nm'de absorbansın azalmasıyla takip edilir (Frankel ve Meyer, 2000). Antioksidan kapasite suda çözünen E vitamini analogu olan trolox konsantrasyonu (mM) olarak tayin edilir. TEAC, 1 mM troloxunkiyile aynı aktiviteyi göstermek için gerekli olan antioksidan konsantrasyonunu ifade eder. En büyük dezavantajı sentetik ABTS radikalinin biyolojik sistemlerde bulunmamasıdır (Becker vd., 2004, Huang vd., 2005).

### **FRAP ( Fe<sup>3+</sup> İyonu İndirgeme Gücü ) Metodu**

Bu metodta düşük pH'da ferrik tripiridiltriazin kompleksi (Fe<sup>3+</sup>-TPTZ) antioksidanların etkisiyle ferröz kompleksine (Fe<sup>2+</sup>-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 (Benzie ve Strain, 1996, Huang vd., 2005).

### **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 EC<sub>50</sub> (mg/mL) olarak isimlendirilir (Frankel ve Meyer, 2000). EC<sub>50</sub> değeri antioksidan aktiviteyi ölçmek için daha yaygın olarak kullanılan bir parametredir.

### **2.5.3. Lipid oksidasyon markerlerini ölçen metodlar**

Lipid model sistemlerinde reaktantların kaybı, serbest radikal 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 yükseltmesi ve ortama eklenen tiyosiyanat ile oluşturulan kompleksin spektrofotometrik olarak tayinine dayanır (Pon vd., 2007).

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 (Becker vd., 2004).

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

#### 2.5.4. Diğer ROT giderici kapasiteleri ölçen metodlar

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

##### $O_2^{\cdot-}$ Radikali Giderme Kapasitesi Tayini

NADH/PMS/ $O_2$  sistemi ve riboflavin/metiyonin sisteminde flavinin fotokimyasal indirgenmesi ile non-enzimatik olarak (Dasgupta ve De, 2007) veya hipoksantin/ksantin oksidaz sistemi ile enzimatik olarak (Wood vd., 2003) süperoksit radikali üretilir. Radikal giderme aktivitesi substrat olarak kullanılan NBT'nin indirgenmesiyle tayin edilir.

##### $OH^{\cdot}$ 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 (Becker vd., 2004).

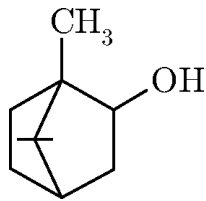
### Peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) Giderici Kapasitenin Tayini

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 (Becker vd., 2004).

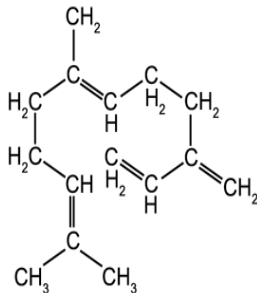
### 2.6. Çalışmada Kullanılan Baharatlar ve Özellikleri

Bu tezde kaynak ve literatür taramaları sonucunda genellikle zencefil rizomlarının; gingerol, farnesen, linalool, neral, geraniol, shogaol, paradol, zingiberol, bisabolen, fellandron, borneol, sineol; zerdeçal rizomlarının ise kurkumin içeriği yönünden zengin oldukları tespit edilmiştir (Şekil 2.8). Zencefilin  $B_3$  ve  $B_6$  vitamini inositol, demir, fosfor, kalsiyum, potasyum, sodyum, magnezyum; zerdeçalın ise, çinko, eterli yağlar, demir, resin, potasyum, mangan, fosfor ve lif içerdiği, rizomlarının ise zingibain adı verilen bir proteolitik enzim bulundurduğu belirlenmiştir.

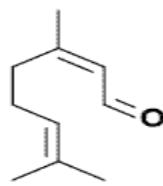
**borneol**



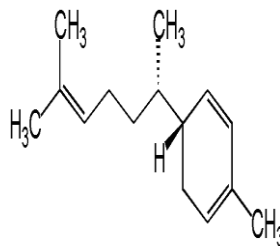
**farnesen**



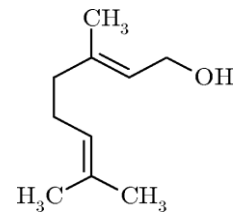
**neral**



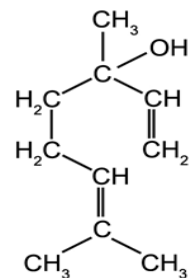
**zingiberol**

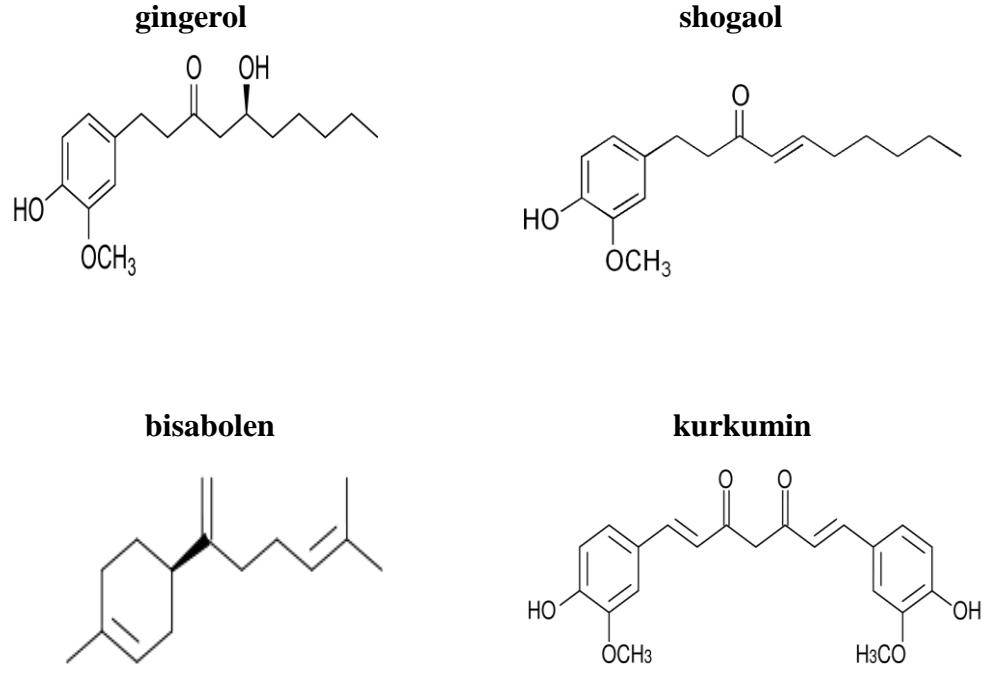


**geraniol**



**linalool**





**Şekil 2.8.** Zencefil ve zerdeçalın bileşenleri

### 2.6.1. Zencefil (*Zingiber officinale*)

Zencefil; tropikal alanlarda yaşayan ve yetişen yumru köklü sarımtırak bir bitkidir. Düğümler şeklinde yetişen kökleri genelde toprağın 15-25 cm altındadır. Zencefil Asya, Çin, Hindistan ve Arabistan'da çok tüketilen baharat çeşididir (Şekil 2.9).



**Şekil 2.9.** Zencefil Yumrusu ve Baharatı

### Yararları

- ❖ İştah açıcıdır.
- ❖ Antiseptik özelliği, kanın temiz kalmasını sağlar.
- ❖ Mide ağrılarında ve hazımsızlıkta iyi bir seçimdir.
- ❖ Bağırsaklarda biriken gazların kolaylıkla atılmasını sağlar.
- ❖ Vücutta sıcaklık ve terleme meydana getirir.
- ❖ Zencefil iyi bir antioksidandır.
- ❖ Kalp ritminin düzene girmesini sağlar.
- ❖ Baş ağrılarını giderici özelliği vardır.
- ❖ Uykuyu rahatlatır.
- ❖ Kandaki kolesterolu düşürür.

### 2.6.2. Zerdeçal ( *Curcuma longa* )

Köri tozunun temel öğelerinden olan zerdeçal batıda daha çok baharat olarak kullanılmasına rağmen Asya'da uzun zamandan beri doğal ilaç olarak kullanılmaktadır. Zerdeçal, polifenolik bir bitkidir. Acımsı tadı vardır. Aktif maddesi kurkumindir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Zerdeçal Yumrusu ve Baharatı

**Yararları**

- ❖ İltihap giderici özelliği vardır.
- ❖ Karaciğeri güçlendirir ve karaciğerden toksinlerin atılmasını sağlar.
- ❖ Solunum yolu enfeksiyonlarının tedavisinde yararlanılır.
- ❖ Cilt, kolon, ve göğüs kanseri için faydalı olabileceği görülmüştür.
- ❖ Kolesterolü azaltıcı etkisi vardır.
- ❖ Damar sertliğini önler.
- ❖ Hazmı kolaylaştırır.
- ❖ Haricen deri rahatsızlıklarında yararlıdır.

Bu tez kapsamında günlük beslenmede tüketilen zencefil ve zerdeçal baharatlarının *in vitro* koşullarda antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. Bu amaçla baharat ekstraktlarının radikal veya oksidan giderici kapasitelerinin ölçümü FCR ile toplam fenolik madde tayini, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> giderme aktivitesi, ABTS radikali giderme aktivitesi, indirgeme kapasitesi, DPPH radikali ve süperoksit radikali giderme aktivitesi deneyleri ile; baharat ekstraktlarının geçiş metallerini şelatlayarak koruyucu antioksidan etkileri Fe<sup>2+</sup> iyonlarını şelatlama potansiyeli deneyi ile ve lipid peroksidasyonunu önleme etkileri linoleik asit emülsiyonunda peroksit oluşumunu engelleme derecelerinin tayini ile değerlendirilmiştir.



### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Baharat Örnekleri

Deneylerde kullanılan baharatlar; zencefil ve zerdeçal aktardan temin edildi. 5-6 saat kurutuldu. Analizlerde kullanılmak üzere renkli kavanozlarda muhafaza edildi.

##### 3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Ekipmanlar

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

Çalışmada çalkalamalı su banyosu (Clifton 100-400 rpm; termostatlı), vortex (Fisons), evaporatör (Buchi R-200), spektrofotometre (Shimadzu UV-1601), inkübatör (EnoLab MB-80), pH-metre (WTW Ph 330i), analitik terazi (Gec Avery), soğutmalı santrifüj (Hettich 38 R), ısıtıcı ve manyetik karıştırıcı (Chiltern HS31), dağıtıcı ve mikropipetler (Eppendorf) kullanılan başlıca ekipmanlardır.

##### 3.1.3. Kullanılan Kimyasal Çözeltiler

###### 0.1 M Fosfat Tamponu (pH=7.4)

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  (13.609 g/L) ve  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (35.8 g/L) çözeltilerinin pH=7.4 olacak şekilde karıştırılması ile hazırlanır.

###### 40mM $\text{H}_2\text{O}_2$ Çözeltisi

0.409 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  otomatik pipetle çekilerek balon jodede fosfat tamponu ile 100 mL'ye tamamlanır.

###### 0.2M Fosfat Tamponu (pH=6.6)

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  (27.218 g/L) ve  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (71.6 g/L) çözeltilerinin pH=6.6 olacak şekilde karıştırılması ile hazırlanır.

###### %1'lik $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ Çözeltisi

1 gr  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  tartılır ve destile su ile 100 mL'ye tamamlanır.

**%10'luk TCA Çözeltisi**

10 gr trikloroasetikasit tartılarak destile suda çözülür ve balon jodede 100 mL'e tamamlanır.

**%0.1'lik FeCl<sub>3</sub> Çözeltisi**

0.1 gr FeCl<sub>3</sub> tartılarak destile suda çözülür ve balon jodede 100 mL'ye tamamlanır.

**2mM FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O Çözeltisi**

0.0398 g FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O tartılarak destile suda çözülür ve balon jodede 100 mL'e tamamlanır.

**5 mM Ferrozin Çözeltisi**

0.0616 g ferrozin tartılarak destile suda çözülür ve balon jodede 25 mL'ye tamamlanır.

**156 µM NBT Çözeltisi**

0.0255 g NBT tartılarak fosfat tamponunda (0.1M, pH= 7.4) çözülür ve balon jodede 200 mL'ye tamamlanır.

**468 µM NADH Çözeltisi**

0.0694 g NADH tartılarak fosfat tamponunda (0.1M, pH= 7.4) çözülür ve balon jodede 200 mL'ye tamamlanır.

**60 µM PMS Çözeltisi**

0.0018 g PMS tartılarak fosfat tamponunda (0.1M, pH= 7.4) çözülür ve balon jodede 100 mL'ye tamamlanır.

**1mM DPPH Çözeltisi**

0.0986 g DPPH tartılarak etanolde çözülür ve balon jodede 250 mL'ye tamamlanır.

**0.1 mM DPPH Çözeltisi**

1mM DPPH çözeltisinden 10 mL alınarak etanolle balon jodede 100 mL'ye tamamlanır.

**Linoleik Asit Emülsiyonu**

175 mg Tween 20 ve 155 µL linoleik asidin, fosfat tamponuyla 50 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlanır.

**%30'luk NH<sub>4</sub>SCN Çözeltisi**

30 g NH<sub>4</sub>SCN tartılarak destile suda çözülür ve balon jodede 100 mL'ye tamamlanır.

**20mM FeCl<sub>2</sub> Çözeltisi**

0.2535 g FeCl<sub>2</sub> tartılarak %3.5'luk HCl ile balon jodede 100 mL'ye tamamlanır.

**%3.5'luk HCl Çözeltisi**

9.46 g der. HCl çözeltisinden pipetle alınarak içinde bir miktar destile su bulunan 100 mL'lik balon jojeye aktarılır ve destile su ile tamamlanır.

**0.04 M Fosfat Tamponu (pH=7)**

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5.44 g/L) ve Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O (7.12 g/L) çözeltileri pH=7 olacak şekilde karıştırılır.

**% 75'lik Etanol Çözeltisi**

390.6 mL etil alkol alınarak destile su ile balon jodede 500 mL'ye tamamlanır.

**%5'lik Sodyum Nitrit Çözeltisi**

5 g sodyum nitrit alınır 100 mL'ye destile su ile tamamlanır.

**%10'luk Alüminyum Nitrat Çözeltisi**

10 g alüminyum nitrat alınır 100 mL'ye destile su ile tamamlanır.

**% 4.3'lük NaOH Çözeltisi**

4.3 g sodyum hidroksit alınır 100 ml'ye destile su ile tamamlanır.

### **Folin-Ciocalteu Reaktifi**

Ticari olarak satın alındığı şekilde kullanıldı.

### **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.

## **3.2. Metod**

### **3.2.1. Ekstraktların Hazırlanışı**

25'er gr baharat örneği 500 mL çözücü (etanol ve metanol) ile oda sıcaklığında çalkalandı. Su banyosunda 300 rpm'de 3 saat inkübe edildi (Tawaha, 2007). Süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntülerin çözücüleri evaporatörde 40°C'de uçuruldu. Ekstrelerin susuz kalıntıları, 0.05 g'lık porsiyonlara ayrılarak eppendorflara konuldu. Kullanılincaya kadar dondurucuda saklandı.

### **3.2.2. Toplam Fenolik Madde (TPC) Tayini**

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

Baharatların, 1000 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan etanol ve metanol ekstraktlarından 1 mL alındı. Destile su ile hacimler 46 mL'ye tamamlandı. 1 mL folin belirteci eklendi. 3 dk sonra %2 'lik  $Na_2CO_3$  çözeltisinden 3mL katılarak oda şartlarında 2 saat çalkalandı. Su banyosunda 250 rpm 'de tutuldu. Örnek yerine destile su içeren şahit denemeye karşı, 760 nm'de absorbans ölçüldü (3 ölçüm alındı).

Standartlar (gallik asit, pirokateşol) için de aynı deneme yapıldı. Okunan absorbans ile konsantrasyon arasında çizilen grafiklerin denklemlerinden, örneklerin toplam fenolik madde miktarları mg olarak hesaplandı.

### 3.2.3. DPPH Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini

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

1 mL DPPH çözeltisi üzerine farklı konsantrasyonlardaki baharat ve standart çözeltilerinden 3 mL eklendi. Vorteksle karıştırıldıktan sonra oda şartlarında karanlıkta 30 dk bekletildi. 517 nm'de absorbandsları okundu.

Aşağıdaki denkleme göre, % inhibisyon değerleri hesaplandı. Burada,

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

$A_{\text{kontrol}}$  = Kontrolün absorbandsı,

$A_{\text{örnek}}$  = Örneğin absorbandsı

göstermektedir.

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

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

Değişik konsantrasyonlardaki baharat ekstraktları ve standart çözeltilerin 1 mL'sine 1.5 mL fosfat tamponu 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  $\text{NH}_4\text{SCN}$  çözeltisi ilave edildi. 3 dk sonra reaksiyon karışımlarına 0.1 mL  $\text{FeCl}_2$  (20mM) çözeltisi eklendi. 5 dk sonra oluşan rengin absorbandsı 500 nm'de okundu.

Aşağıdaki denkleme göre, % inhibisyon değerleri hesaplandı. Burada,

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

$A_{\text{kontrol}}$  = Kontrolün absorbandsı,

$A_{\text{örnek}}$  = Örneğin absorbandsı

göstermektedir.

### 3.2.5. Demir (II) İyonlarını Şelatlama Aktivitesinin Tayini

Farklı konsantrasyonlardaki (50-250µg/mL) baharat ekstraktlarının Fe<sup>2+</sup> iyonlarını şelatlama aktivitesi Dinis ve arkadaşlarının metoduna göre çalışıldı (Dinis vd., 1994). Metod Fe<sup>2+</sup> iyonlarını bağlamak üzere, güçlü bir demir şelatlayıcı olan ferrozin reaktifi ile ortamda bulunan metal bağlayıcı bileşiklerin yarışmasına dayanır. Şelatlama gücü yüksekse kırmızı renkli Fe<sup>2+</sup>/ferrozin kompleksinin oluşumu engellenir.

50-250 µg/mL konsantrasyonlarında baharat ekstraktları ve standartlar hazırlandı. Stok 250 mL'lik çözeltisi hazırlanıp diğerleri bundan seyreltilerek elde edildi. 0.4 mL örneğe 0.05 mL FeCl<sub>2</sub> (2mM) çözeltisi eklendi. Reaksiyon 0.2 mL ferrozin (5mM) çözeltisi ilavesiyle başlatıldı.

Toplam hacim etil alkolle ve metil alkolle 4 mL'ye ayarlandı. Sonra karışım vorteksle hızlıca karıştırılıp 10 dk oda sıcaklığında bekletildi. Bu süre sonunda absorbanslar 562 nm 'de okundu.

Aşağıdaki denkleme göre, % inhibisyon değerleri hesaplandı. Burada,

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

$A_{\text{kontrol}}$  = Kontrolün absorbansı,

$A_{\text{örnek}}$  = Örneğin absorbansı

göstermektedir.

### 3.2.6. Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini

Süperoksit anyonu giderme aktivitesi Nishikimi ve arkadaşlarının metoduna göre tayin edildi (Nishikimi vd., 1972). Deney koşullarında NADH/PMS/O<sub>2</sub> 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 çözeltisi (0.1 M, pH=7.4 fosfat tamponunda 156 µM) ve 1 mL NADH çözeltisi (0.1 M pH=7.4 fosfat tamponunda 468 µM) ve 1 mL örnek ekstraktı karıştırıldı. Karışıma 100 µL PMS çözeltisi (0.1 M, 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.

Aşağıdaki denkleme göre, % inhibisyon değerleri hesaplandı. Burada,

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

$A_{\text{kontrol}}$  = Kontrolün absorbansı,  $A_{\text{örnek}}$  = Örneğin absorbansı  
göstermektedir.

### 3.2.7. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Giderme Aktivitesinin Tayini

Baharat ekstraktlarının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> giderme yeteneği Ruch ve arkadaşlarının (Ruch vd., 1989) metoduna göre çalışıldı. Bu metodta, reaksiyon ortamına eklenen belirli miktardaki hidrojen peroksit çözeltisinin örnek ekstraktı tarafından yıkılması 230 nm'deki absorbans değişimiyle izlenir.

3.4 mL fosfat tamponu (100 mM, pH=7.4) ve 0.6 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisine (100 mM, pH=7.4 fosfat tamponunda 40 mM) 1 mL örnek ekstraktı ilave edildi. Absorbans 10 dk sonra 230 nm'de okundu.

Aşağıdaki denkleme göre, % inhibisyon değerleri hesaplandı. Burada,

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

$A_{\text{kontrol}}$  = Kontrolün absorbansı,  $A_{\text{örnek}}$  = Örneğin absorbansı  
göstermektedir.

### 3.2.8. İndirgeme Kapasitesi Tayini

Baharat ekstraktlarının indirgeme kapasitesi Oyaizu metoduna göre tayin edildi (Oyaizu, 1986). Ortamdaki indirgen madde Fe<sup>3+</sup> iyonlarını Fe<sup>2+</sup> iyonlarına indirger ve FeCl<sub>3</sub> 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 K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> çözeltisi eklendi. Karışım 50°C'de 20 dk inkübe edildikten sonra 2.5 mL TCA (%10) ilave edildi ve 2000 rpm'de 10 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası çözeltinin üst tabakasından 2.5 mL alınarak 2.5 mL destile su ve 0.5 mL FeCl<sub>3</sub> (%0.1'lik) çözeltisi ile karıştırıldı. 700 nm'de absorbans ölçüldü.

### 3.2.9. Toplam Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi

Baharat ekstraktlarındaki toplam flavonoid içeriği Zhishen ve arkadaşlarının metoduna göre belirlendi (Zhishen vd., 1999).

Örneklerin 1000 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan etanol ve metanol ekstraktlarından 10 mL alındı. Üzerine 1 mL sodyum nitrit çözeltisi (% 5'lik) ilave edilerek 6 dk bekletildi ve flavonoid-alüminyum kompleksi oluşturmak için 1 mL alüminyum nitrat çözeltisi (%10'luk) eklendi. 6 dk sonra 10 mL NaOH çözeltisi (% 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 şahide karşı absorbansı ölçüldü.

Standartlar (gallik asit, pirokateşol) için de aynı deneme yapıldı. Okunan absorbans ile konsantrasyon arasında çizilen grafiklerin denklemlerinden, örneklerin flavonoid madde miktarları mg olarak hesaplandı.

### 3.2.10. ABTS Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini

Baharat ekstraktlarının ABTS radikali giderme aktivitesi Re ve arkadaşlarının metoduna göre belirlendi (Re vd., 1999).

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  $0.7 \pm 0.025$  olacak şekilde seyreltilti.

1 mL ABTS çözeltisi, 3mL standart çözeltilerine (50-250 µg/mL, etanol-metanol) eklendi. 30 dk sonra 734 nm'de absorbans okundu.

Aşağıdaki denkleme göre, % inhibisyon değerleri hesaplandı. Burada,

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

$A_{\text{kontrol}}$  = Kontrolün absorbansı,

$A_{\text{örnek}}$  = Örneğin absorbansı

göstermektedir.

### 3.2.11. Değerlendirme

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



#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Zencefil ve zerdeçalın etanol ve metanol çözücülerini ile ekstraksiyonları yapıldı. Elde edilen ekstraktların antioksidan aktiviteleri çeşitli metodlarla incelendi. Ekstraksiyon işlemleri sonucunda, ekstrakte edilebilen bileşiklerin miktarı 41.88-52.03 mg/g baharat materyali aralığında değişmektedir. Baharatlardan ekstrakte edilebilen bileşiklerin ekstraksiyon verimleri Tablo 4.1’de görülmektedir. Tabloda görüldüğü gibi etanol ekstraktlarında daha yüksek verim elde edildi (Tablo 4.1).

**Tablo 4.1.** Baharatlardan ekstrakte edilen bileşiklerin verimleri

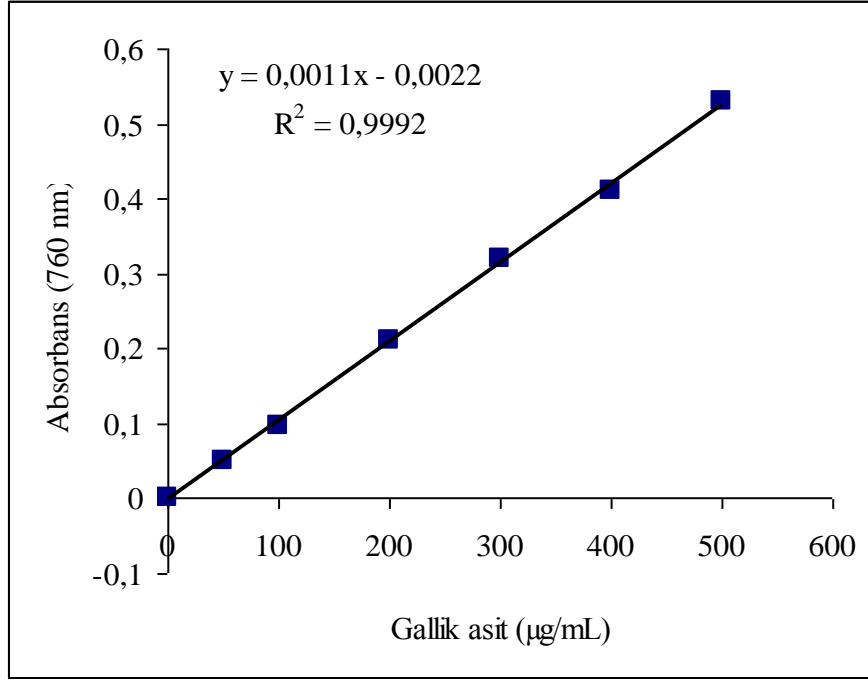
Ekstrakt	Baharat gramındaki mg ekstrakt verimi	
	Zencefil	Zerdeçal
Etanol ekstraktı	44.12	52.03
Metanol ekstraktı	41.88	50.38

##### 4.1. FCR ile Toplam Fenolik Bileşik Tayini

Zencefil ve zerdeçalın, etanol ve metanol ekstraktlarındaki toplam çözünebilen fenolik maddeler Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile tayin edildi. Gallik asit ve pirokateşol 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 pirokateşol (mg PKE/g ekstrakt) eşdeğeri şeklinde hesaplandı.

Gallik asit standart grafiğinden elde edilen formülden etanol ve metanol ekstraktlarında bulunan toplam fenolik bileşik miktarları gallik asit ekvivalent (GAE) olarak hesaplandı ( $R^2$ : 0.9992). Bu amaçla hazırlanan standart gallik asit grafiği Şekil 4.1’de verilmiştir. Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

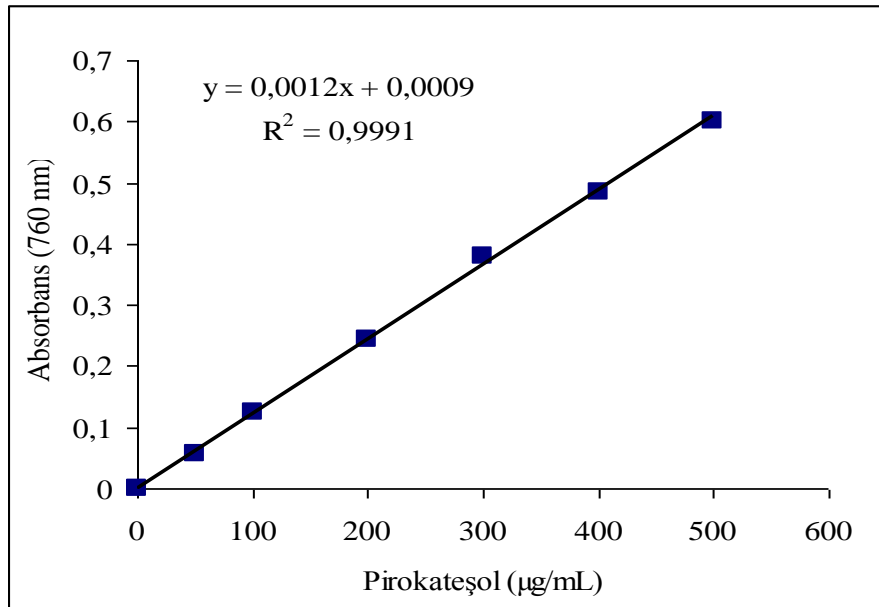
$$\text{Absorbans } (\lambda:760 \text{ nm}) = 0.0011[\text{Gallik asit}]-0.0022$$



Şekil 4.1. Gallik asit standart grafiği

Pirokateşol standart grafiğinden elde edilen formülden etanol ve metanol ekstraktlarında bulunan toplam fenolik bileşik miktarları pirokateşol ekivalent (PKE) olarak hesaplandı ( $R^2$ : 0.9991). Bu amaçla hazırlanan standart pirokateşol grafiği Şekil 4.2’de verilmiştir. Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

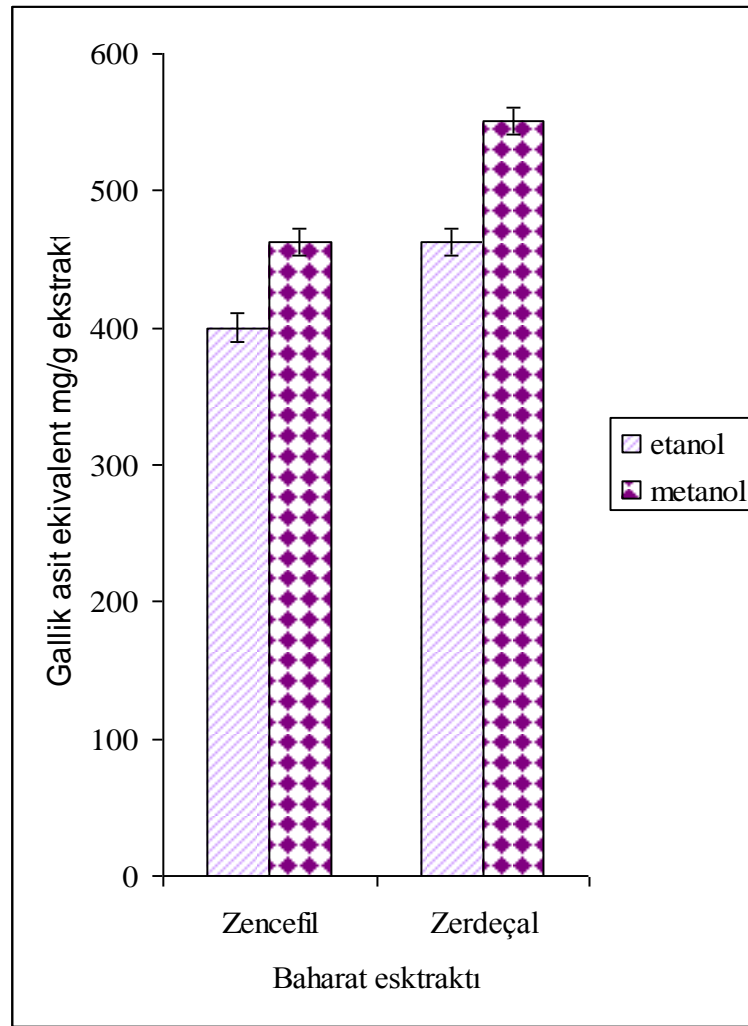
$$\text{Absorbans } (\lambda:760 \text{ nm}) = 0.0012[\text{Pirokateşol}] + 0.0009$$



Şekil 4.2. Pirokateşol standart grafiği

Zencefil ve zerdeçalın etanol ve metanol ekstraktlarının gallik asit ve pirokateşol eşdeğeri olan fenolik madde miktarlarına ait değerler Şekil 4.3 ve Şekil 4.4 te verilmiştir. Bu grafiklerde görüldüğü gibi, çalışılan baharatlarda ekstrakte edilebilen toplam fenolik bileşik içerikleri karşılaştırıldığında; gallik asit ve pirokateşol için zerdeçal-metanol ekstraktının diğerlerinden daha yüksek fenolik madde içerdiği belirlenmiştir.

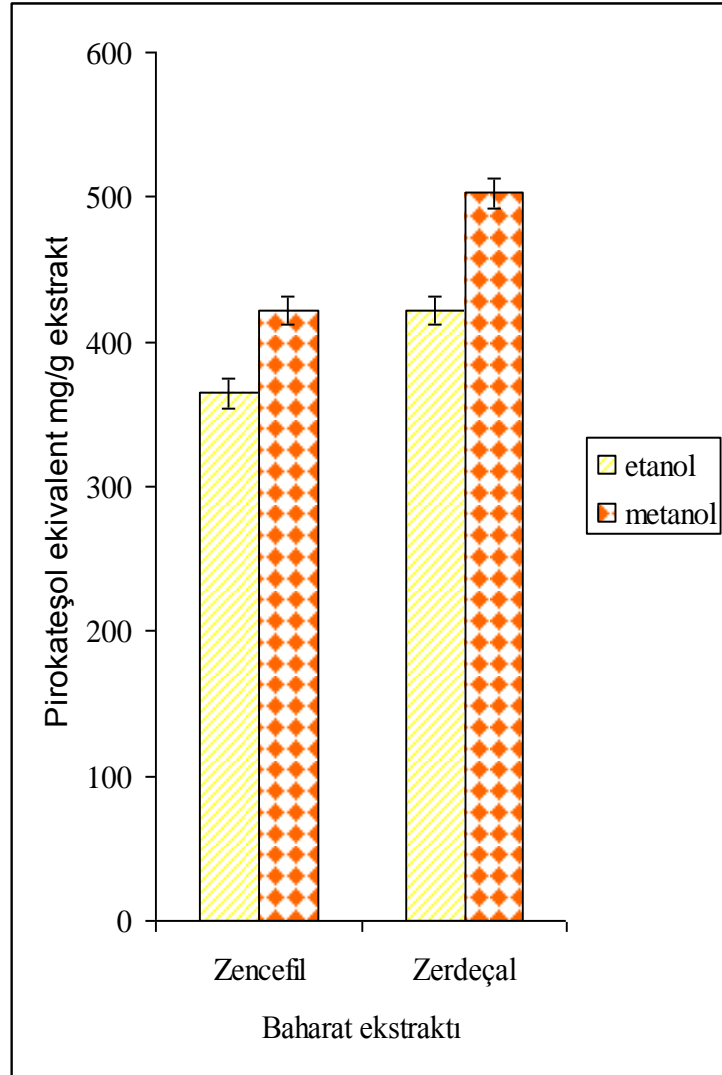
Standart grafik denklemlerinden hesaplanan sonuçların gallik asit ekivalenti olarak  $400.2 \pm 10.1$ - $551.1 \pm 12.5$  mg/g ve pirokateşol ekivalenti olarak  $364.3 \pm 4.6$ - $502.6 \pm 11.3$  mg/g arasında değiştiği belirlendi.



**Şekil 4.3.** Zencefil ve zerdeçalın gallik asit eşdeğeri olan fenolik madde içerikleri

Şekil 4.3'te; zencefilin gallik asit eşdeğeri olarak, etanol ekstraktının  $400.2$  mg/g, metanol ekstraktının  $462.9$  mg/g ve zerdeçalın gallik asit eşdeğeri olarak, etanol

ekstraktının 462.9 mg/g, metanol ekstraktının 551.1 mg/g fenolik madde içerdiği belirlendi.



**Şekil 4.4.** Zencefil ve zerdeçalın pirokateşol eşdeğeri olan fenolik madde içerikleri

Şekil 4.4'te; zencefilin pirokateşol eşdeğeri olarak, etanol ekstraktının 364.3 mg/g, metanol ekstraktının 421.8 mg/g ve zerdeçalın pirokateşol eşdeğeri olarak, etanol ekstraktının 421.8 mg/g, metanol ekstraktının 502.6 mg/g fenolik madde içerdiği belirlendi.

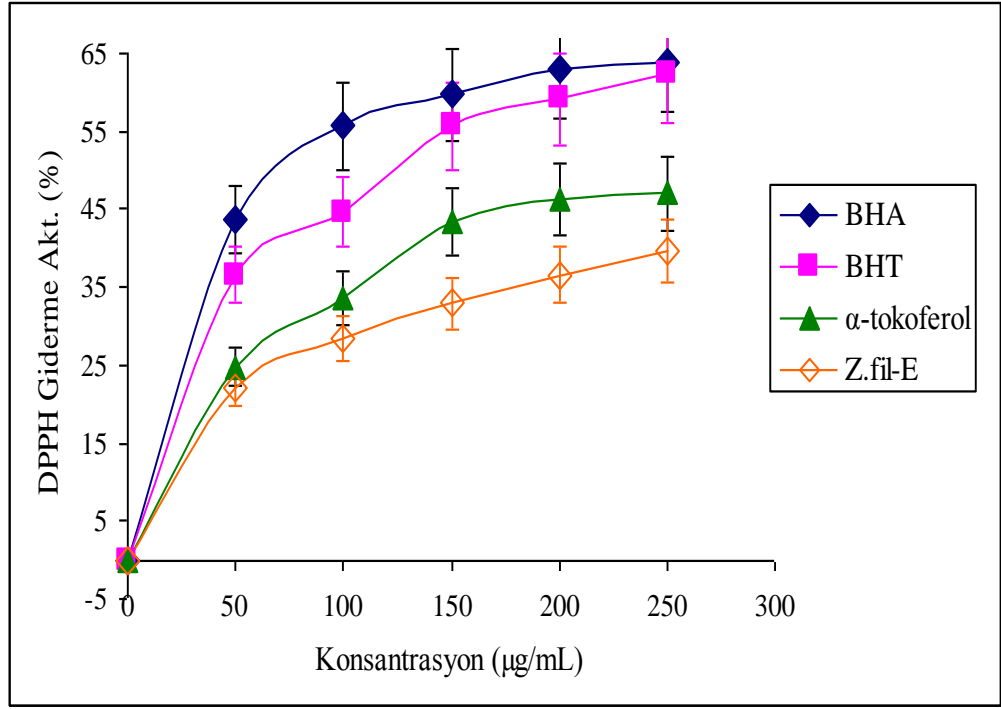
#### 4.2. DPPH Radikali Giderme Aktivitesi

DPPH radikali doğal antioksidanların serbest radikal yakalama aktivitesini değerlendirmek için kullanılır. Çalışmada kullanılan baharatlara ait ekstraktların

serbest radikal giderici etkileri DPPH radikali üzerinden tayin edildi. Standart madde olarak BHA, BHT ve  $\alpha$ -tokoferol çözeltileri kullanıldı.

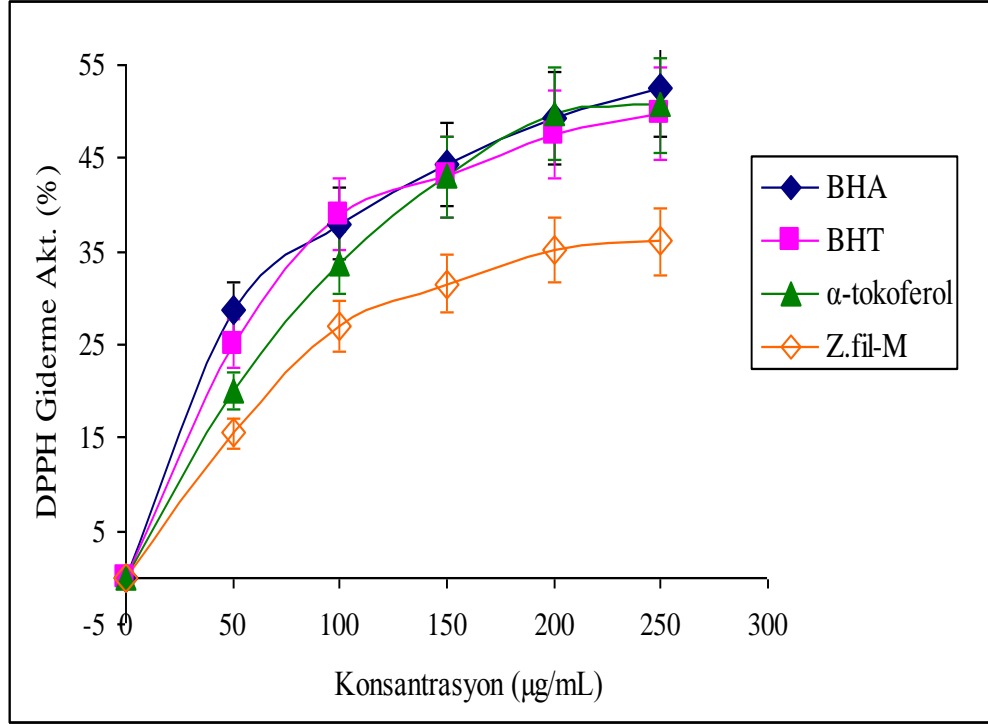
Ekstraktların DPPH serbest radikali giderme aktivitelere ait konsantrasyon-% inhibisyon grafikleri çizildi (Şekil 4.5-4.6-4.7-4.8).

Zencefil ve zerdeçalın her iki ekstraktında konsantrasyonunun artmasıyla inhibisyon oranının arttığı gözlemlendi. Standartlarla karşılaştırıldığında, standartların daha yüksek inhibisyona sebep oldukları gözlemlendi.



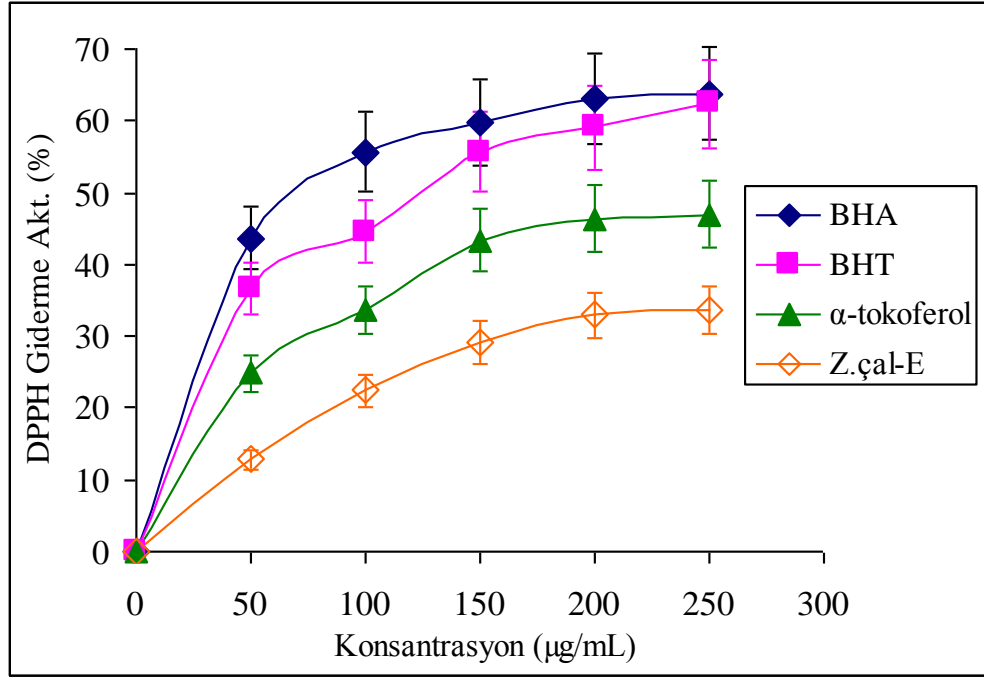
Şekil 4.5. Zencefil-etanol ekstraktının DPPH radikal giderme aktivitelere

Etanol ekstraktları incelendiğinde; 50-250  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyon aralığında zencefilin; %22.1, %28.5, %32.9, %36.6, %39.6, BHA'nın; %43.6, %55.7, %59.7, %63.1, %63.8, BHT'nin; %36.6, %44.6, %55.7, %59.1, %62.4,  $\alpha$ -tokoferolün; %24.8, %33.6, %43.3, %46.3, %47 serbest radikal giderme aktivitesi açısından % inhibisyon değerlerine sahip oldukları görüldü. Standartların ve zencefil-etanol ekstraktlarının DPPH giderme aktivitesinin BHA>BHT> $\alpha$ -tokoferol>zencefil sırasında azaldığı ve 150  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonda sırasıyla %59.7, %55.7, %43.3, %32.9 olduğu belirlendi (Şekil 4.5).



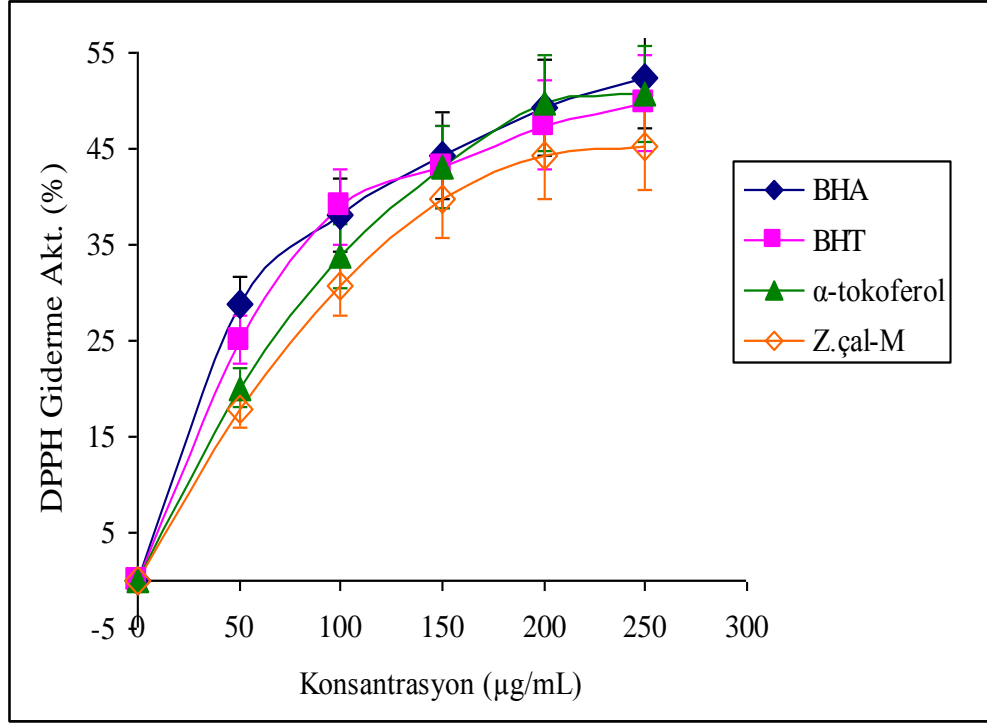
Şekil 4.6. Zencefil-metanol ekstraktının DPPH radikal giderme aktiviteleri

Metanol ekstraktları incelendiğinde; 50-250 µg/mL konsantrasyon aralığında zencefilin; %15.5, %27, %31.5, %35.2, %36.1, BHA'nın; %28.8, %38, %44.3, %49.3, %52.5, BHT'nin; %25.1, %39, %43, %47.5, %49.8, α-tokoferolün; %20.1, %33.8, %43, %49.8, %50.7 serbest radikal giderme aktivitesi açısından % inhibisyon değerlerine sahip olduğu görüldü. Standartların ve zencefil-metanol ekstraktlarının serbest radikal giderme aktivitesinin BHA>BHT>α-tokoferol>zencefil sırasında azaldığı ve 150 µg/mL konsantrasyonda sırasıyla % 44.3, %43, %43, %31.5 olduğu belirlendi (Şekil 4.6).



**Şekil 4.7.** Zerdeçal-etanol ekstraktının DPPH radikal giderme aktiviteleri

Zerdeçal için aynı deney yapıldığında etanol ekstraktlarının; 50-250 µg/mL konsantrasyon aralığında zerdeçalın; %12.8, %22.5, %29.2, %32.9, %33.6, BHA'nın; %43.6, %55.7, %59.7, %63.1, %63.8, BHT'nin; %36.6, %44.6, %55.7, %59.1, %62.4, α-tokoferolün; %24.8, %33.6, %43.3, %46.3, %47 serbest radikal giderme aktivitesi açısından % inhibisyon değerlerine sahip oldukları görüldü. Standartların ve zerdeçal-etanol ekstraktlarının DPPH giderme aktivitesinin BHA>BHT>α-tokoferol>zerdeçal sırasında azaldığı ve 150 µg/mL konsantrasyonda sırasıyla %59.7, %55.7, %43.3, %29.2 olduğu belirlendi (Şekil 4.7).



**Şekil 4.8.** Zerdeçal-metanol ekstraktının DPPH radikal giderme aktiviteleri

Metanol ekstraktları incelendiğinde; 50-250 µg/mL konsantrasyon aralığında zerdeçalın; %17.8, %30.6, %39.7, %44.3, %45.2, BHA'nın; %28.8, %38, %44.3, %49.3, %52.5, BHT'nin; %25.1, %39, %43, %47.5, %49.8, α-tokoferolün; %20.1, %33.8, %43, %49.8, %50.7 serbest radikal giderme açısından % inhibisyon değerlerine sahip olduğu görüldü. Standartların ve zerdeçal-metanol ekstraktlarının serbest radikal giderme aktivitesinin BHA>BHT>α-tokoferol>zerdeçal sırasında azaldığı ve 150 µg/mL konsantrasyonda sırasıyla %44.3, %43, %43, %39.7 olduğu belirlendi (Şekil 4.8).

Şekil 4.5-Şekil 4.6-Şekil 4.7 ve Şekil 4.8 incelendiğinde; DPPH serbest radikali giderme aktivitesi yönünden zencefilin ve zerdeçalın etanol-metanol ekstraktları, standartlarla karşılaştırılabilir başarılı aktiviteler gösterdi.

DPPH serbest radikali giderme aktivitesi sonuçları detaylı incelendiğinde; çalışılan baharat ekstraktlarının bir kısmının standartların aynı konsantrasyonunda elde edilen radikal giderme aktivitesi sonuçlarıyla çok yakın değerde olduğu görüldü.

Reaksiyon ortamındaki DPPH radikalinin %50'sinin yok edilmesi için gereken etkili antioksidan konsantrasyonu EC<sub>50</sub> değeri olarak tanımlanır ve düşük EC<sub>50</sub> değeri



yüksek radikal giderme aktivitesinin göstergesidir. Çalışmada kullanılan baharat ekstraktlarının her biri için ayrı ayrı çizilen konsantrasyon-% inhibisyon grafiklerinden  $EC_{50}$  değerleri belirlendi. Elde edilen değerler aşağıdaki tabloda verildi (Tablo 4.2).

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

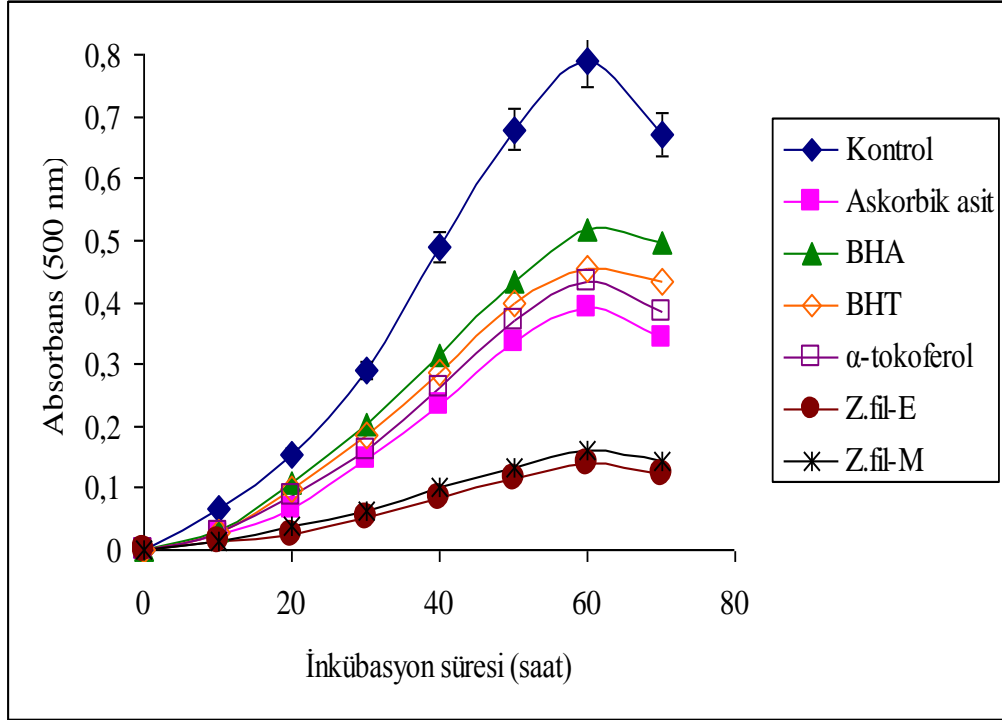
	$EC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	Etanol Ekstraktı	Metanol Ekstraktı
Zencefil	3.96±1.41	3.61±1.12
Zerdeçal	3.36±0.92	4.52±1.23
BHA	0.49±0.13	0.52±0.11
BHT	0.51±0.09	0.5±0.08
$\alpha$ -tokoferol	0.46±0.05	0.48±0.06

Tablo 4.2'ye göre; çalışılan ekstraktlar içinde en düşük  $EC_{50}$  değeri  $\alpha$ -tokoferolün etanol ve metanol ekstraktlarında tayin edildi. Dolayısıyla  $\alpha$ -tokoferolün yüksek bir radikal giderme aktivitesine sahip olduğunu söyleyebiliriz.

### 4.3. FTC Metodu ile Toplam Antioksidan Aktivite Tayini

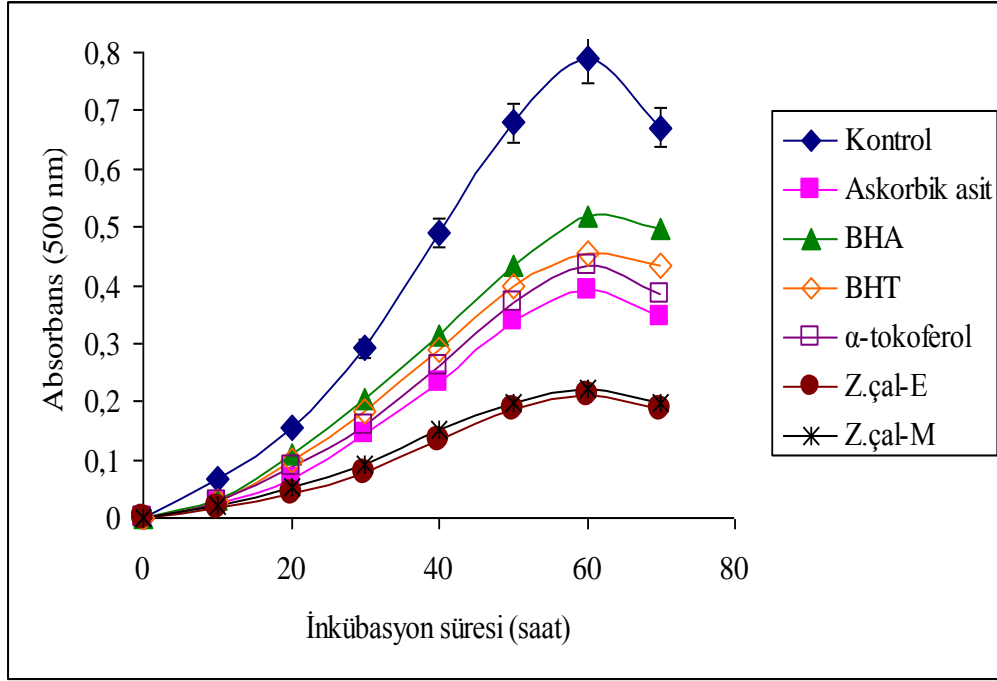
Baharat ekstraktlarının linoleik asit peroksidasyonu üzerindeki inhibisyon etkileri, 50-250  $\mu\text{g/mL}$  aralığındaki konsantrasyonlarda ferrik tiyosiyanat (FTC) metodu ile ölçüldü ve sonuçlar BHA, BHT,  $\alpha$ -tokoferol ve askorbik asitin inhibisyon oranları ile karşılaştırıldı. İnkübasyon sırasında emülsiyonda oluşan peroksitlerin miktarı, oksidasyonun ilerleyişi sırasında on saatte bir ölçüm alınarak 80 saat boyunca takip edildi. Kontrolün absorbansının maksimum olduğu yani lipid peroksidasyonunun en fazla olduğu zamana kadar olan veriler kullanılarak, her bir ekstraktın farklı

konsantrasyonları için ve standart maddeler için absorbands-zaman grafikleri çizildi (Şekil 4.9 ve 4.10). Grafikler yardımıyla kontrolün maksimum absorbandı ve her bir örneğin maksimum peroksit oksidasyonu anına karşılık gelen absorbandları belirlendi.



**Şekil 4.9.** Zencefil ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri

Çalışmada kullandığımız zencefil baharatından elde edilen etanol ve metanol ekstraktlarının antioksidan aktivitesi ferrik tiyosiyanat metoduna göre belirlendi. Zencefilin etanol ve metanol ekstraktlarının toplam antioksidan aktivite tayini için 150  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonu kullanıldı. Şekil 4.9’da görüldüğü gibi zencefilin etanol ve metanol ekstraktlarının antioksidan aktivitesi, artan konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artmıştır. Standart olarak kullanılan askorbik asit, BHA, BHT ve  $\alpha$ -tokoferolün zencefil ekstraktlarından daha fazla antioksidan aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.10. Zerdeçal ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri

Çalışmada kullandığımız zerdeçaldan elde edilen etanol ve metanol ekstraktlarının antioksidan aktivitesi ferrik tiyosiyanat metoduna göre belirlendi. Zerdeçalın etanol ve metanol ekstraktlarının toplam antioksidan aktivite tayini için 150 µg/mL konsantrasyonu kullanıldı. Şekil 4.10’da görüldüğü gibi zerdeçalın etanol ve metanol ekstraktlarının antioksidan aktivitesi, artan konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artmıştır.

Zencefil ve zerdeçal ekstraktlarının 150 µg/mL konsantrasyonunda, lipid peroksidasyonu inhibe etme oranları sırasıyla; %91.7, %80.6, %63.5, %38.7, %14.9, %1.2 ve %16’dir. α-tokoferolün lipid peroksidasyonu inhibe etme oranları sırasıyla; %96.6, %89.1, %80.1, %67.3, %53.5, %45.6 ve %51.9’dur. Askorbik asitin lipid peroksidasyonu inhibe etme oranları sırasıyla; %97, %91.5, %81.8, %70.7, %57.6, %51 ve %56.9’dur. BHA’nın lipid peroksidasyonu inhibe etme oranları sırasıyla; %96.2, %86.2, %74.6, %60.8, %45.6, %35.2 ve %37.8’dir. BHT’nin lipid peroksidasyonu inhibe etme oranları sırasıyla; %96.5, %87.7, %76.8, %63.9, %50, %42.9 ve %45.7’dir. Zerdeçalın metanol ekstraktlarının lipid peroksidasyonu inhibe etme oranları sırasıyla; %97, %93, %88, %81, %75, %72 ve %75’tir. Zerdeçalın etanol ekstraktlarının lipid peroksidasyonu inhibe etme oranları sırasıyla; %98, %95, %90, %83, %76, %74 ve %77’dir. Zencefilin metanol ekstraktlarının lipid

peroksidasyonu inhibe etme oranları sırasıyla; %98, %95, %92 , %88, %83, %80 ve %82'dir. Zencefilin etanol ekstraktlarının lipid peroksidasyonu inhibe etme oranları sırasıyla; %98, %97, %93, %89, %86, %83 ve %85'dir.

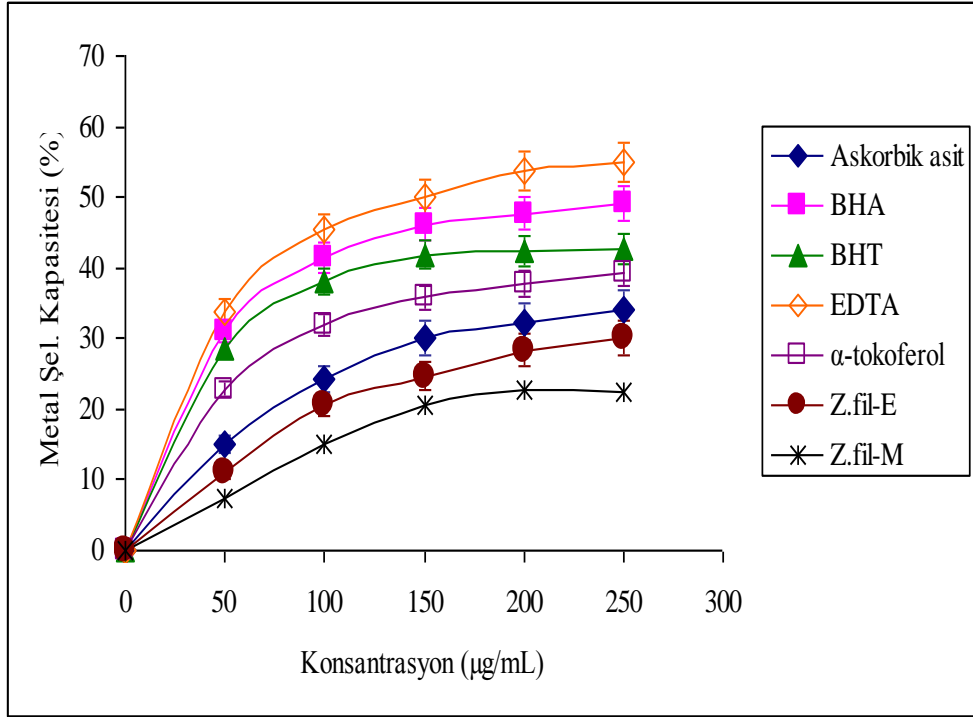
Linoleik asit emülsiyonu ile yapılan lipid peroksidasyonu denemesinde BHA ve BHT kullanılan tüm konsantrasyonlarda peroksit oluşumunu tamamen inhibe ederek tipik bir antioksidan profili sergilediler. En yüksek aktivite BHA ve BHT de gözlemlendi.  $\alpha$ -tokoferol ve askorbik asidin de zencefil ve zerdeçaldan göre daha yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlendi (Şekil 4.10).

Zencefil ekstraktının 150  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonu, zerdeçalın konsantrasyonundan daha güçlü antioksidan aktivite göstererek, linoleik asit otooksidasyonunun başlamasını önemli ölçüde geciktirdikleri söylenebilir.

#### **4.4. Demir (II) İyonlarını Şelatlama Aktivitesinin Tayini**

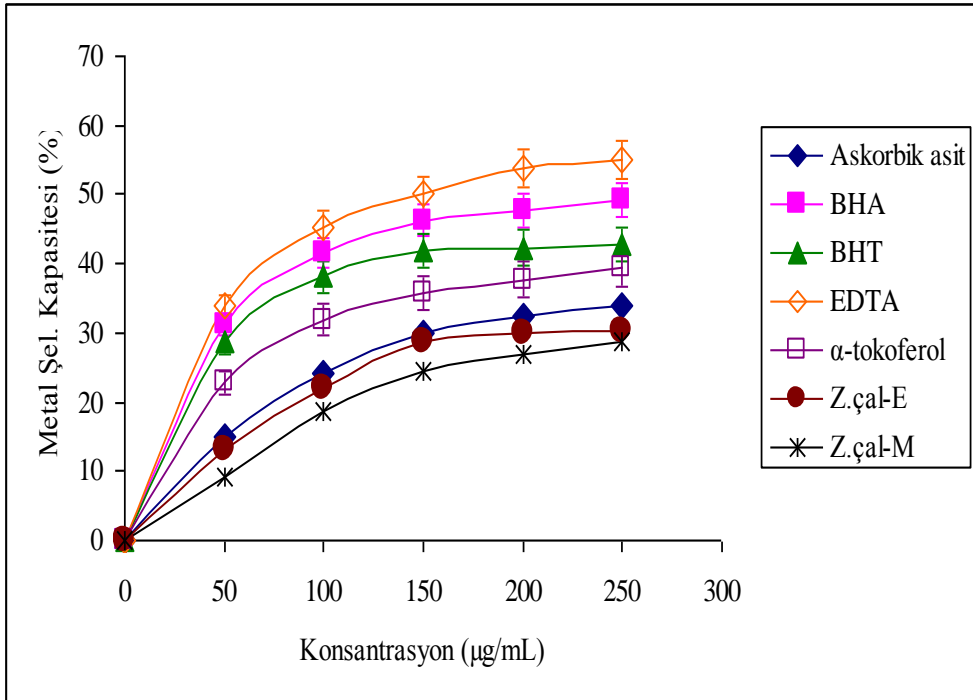
Metal iyonu şelatlama aktivitesi; baharat ekstraktlarının çözeltideki  $\text{Fe}^{2+}$  iyonlarını bağlayabilmek için ferrozin ile yarışmasına göre değerlendirildi. Metal şelatlama aktivitesinde azalan absorbans ferrozin bağlanmadan önce metal iyonlarının şelatlandığını gösterir. Kıyaslama maddesi olarak iyi bir metal şelatlayıcı olan EDTA çözeltisi seçildi. Standart olarak BHA, BHT, askorbik asit ve  $\alpha$ -tokoferol kullanıldı. Çalışmada kullanılan baharatların her bir ekstraktının metal şelatlama potansiyelini gösteren konsantrasyon-% inhibisyon grafikleri oluşturuldu (Şekil 4.11-Şekil 4.12).

Grafiklerden görüldüğü gibi; çalışmada kullanılan ekstraktların konsantrasyon arttıkça artan şelatlama aktivitesi gösterdiği belirlendi. Zencefil ve zerdeçal ekstraktlarının  $\text{Fe}^{+2}$  iyonlarını şelatlama aktivitelerinin, standartlardan daha düşük olduğu görülmektedir.



Şekil 4.11. Zencefil ekstraktlarının metal şelatlama etkileri

Daha düşük absorbans daha yüksek metal şelatlama aktivitesi gösterir. Şekil 4.11'de görüldüğü gibi zencefilin 150 µg/ml konsantrasyondaki etanol ve metanol ekstraktlarının  $Fe^{+2}$  şelatlama aktivitesi sırasıyla %24.7 ve %20.6 olarak tespit edildi.



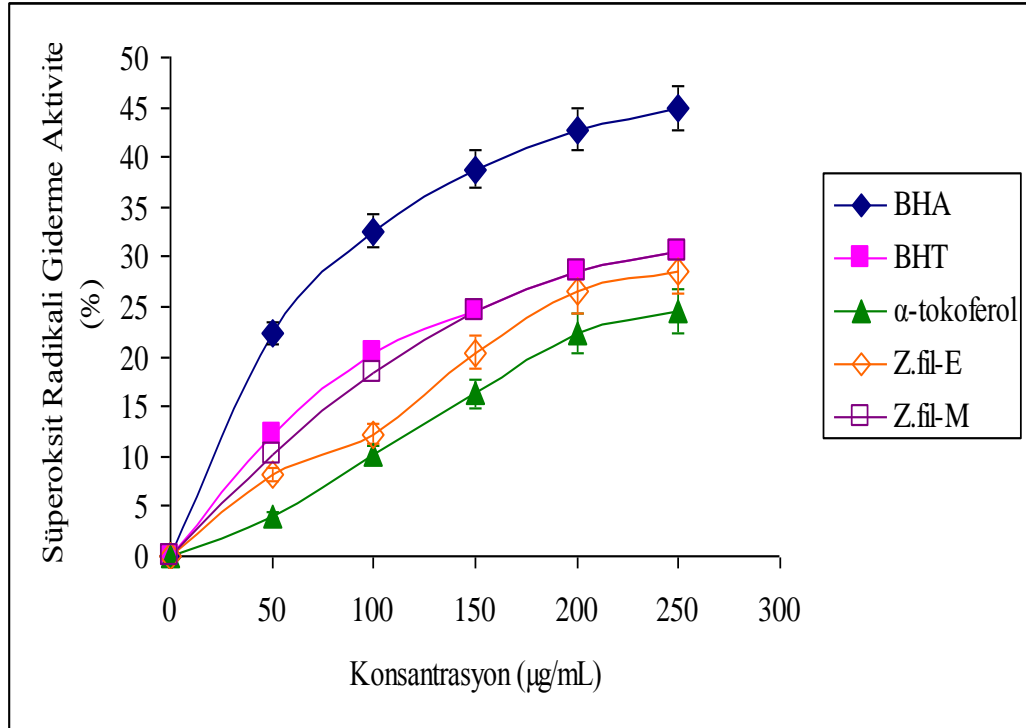
Şekil 4.12. Zerdeçal ekstraktlarının metal şelatlama etkileri

Şekil 4.12’de görüldüğü gibi zerdeçalın 150 µg/ml konsantrasyondaki etanol ve metanol ekstraktlarının Fe<sup>+2</sup> şelatlama aktivitesi sırasıyla %24.3 ve %20.6 olarak tespit edildi.

Şekil 4.11 ve 4.12’ den görüldüğü gibi; çalışmada kullanılan tüm ekstraktların konsantrasyon arttıkça artan şelatlama aktivitesi gösterdiği belirlendi. BHA, BHT, α-tokoferol ve askorbik asidin yüksek metal şelatlama aktivitelere rağmen ekstraktların hiçbirinin Fe<sup>2+</sup> iyonlarını şelatlama kapasitesinin EDTA’dan daha iyi olmadığı da belirtilmelidir.

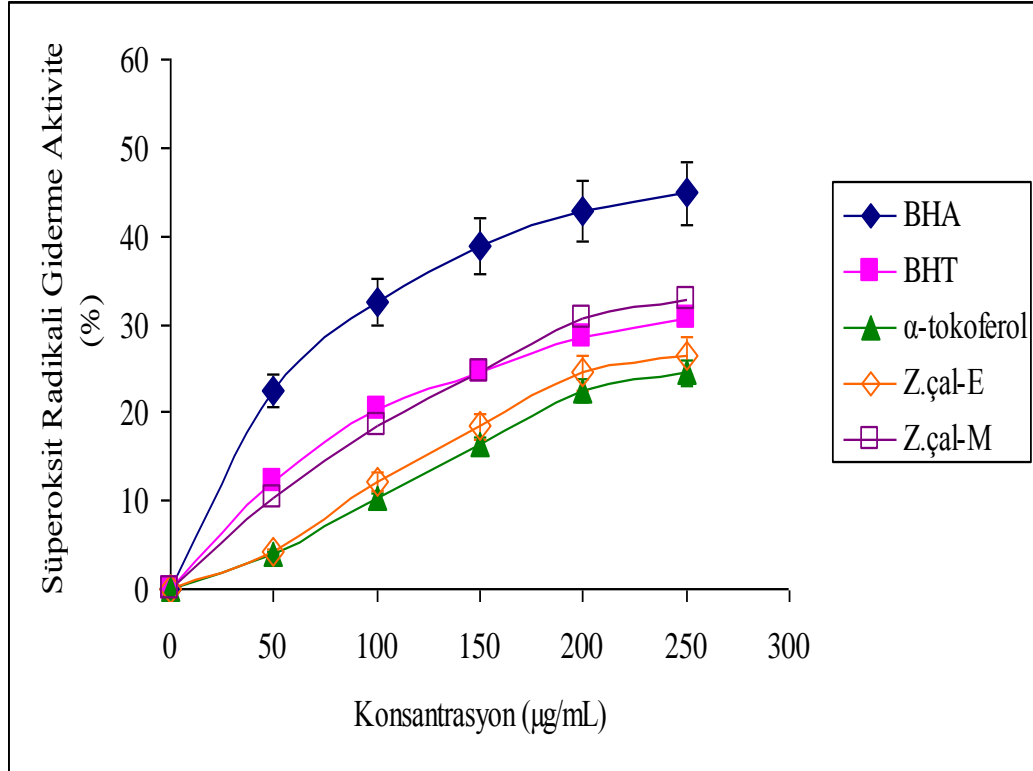
#### 4.5. Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini

Çalışmada kullanılan baharat ekstraktlarının süperoksit radikali giderme aktivitesi *in vitro* koşullarda PMS/NADH/O<sub>2</sub> sisteminde süperoksit radikali oluşturularak çalışıldı ve ekstraktların bu radikali etkisizleştirebilme kapasiteleri belirlendi. Zencefil ve zerdeçalın her iki ekstraktının da süperoksit radikali giderme aktivitesi gösterdiği belirlendi. Baharatların her iki ekstraktı ve standart olarak seçilen BHA, BHT ve α-tokoferol’ün değişen konsantrasyonlarına karşılık süperoksit radikalini giderme aktiviteleri (% inhibisyon) grafiğe geçirildi (Şekil 4.13-Şekil 4.14).



Şekil 4.13. Zencefil ekstraktlarının süperoksit radikali giderme aktiviteleri

Süperoksit anyonu diğer oksijen radikalleri ile karşılaştırıldığında daha uzun yaşam ömrüne sahiptir. Zencefilin 150 µg/ml konsantrasyonda etanol ve metanol ekstraktlarının sırasıyla %20.4 ve %24.5 oranlarında süperoksit radikali oluşumu üzerine inhibisyon etkisi gösterdikleri bulundu (Şekil 4.13). Zencefil ekstraktlarını, standart olarak kullanılan BHA, BHT ve  $\alpha$ -tokoferolle karşılaştırdığımızda BHA>BHT >Z.fil-M>Z.fil-E> $\alpha$ -tokoferol şeklinde azalan aktivite gözlenmiştir.

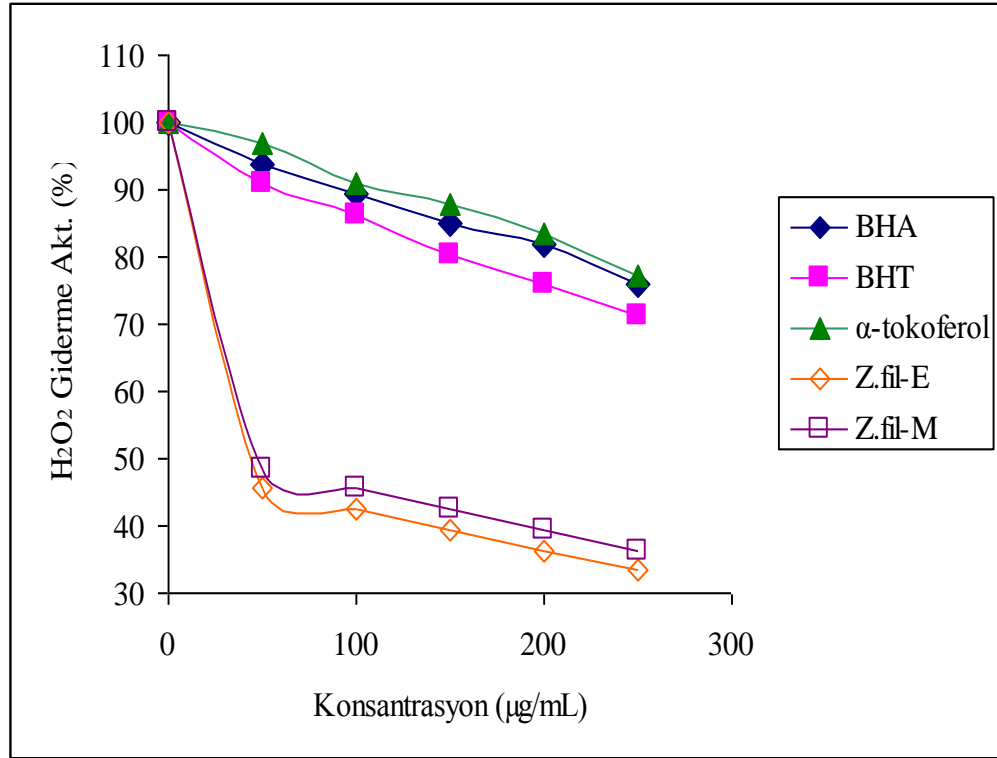


Şekil 4.14. Zerdeçal ekstraktlarının süperoksit radikali giderme aktiviteleri

Zerdeçalın 150 µg/ml konsantrasyonunun etanol ve metanol ekstraktlarının sırasıyla %18.4 ve %24.5 oranlarında süperoksit radikali oluşumu üzerine inhibisyon etkisi gösterdikleri bulundu (Şekil 4.14). Zerdeçal ekstraktlarını, standartlarla karşılaştırdığımızda süperoksit radikali giderme aktivitesi yönünden BHA>Z.çal-M>BHT>Z.çal-E> $\alpha$ -tokoferol şeklinde azalan aktivite gözlenmiştir. Grafiklerde de görüldüğü gibi örneklerin konsantrasyon artışı ile radikal giderme aktivitesi artışı orantılıdır.

#### 4.6. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Giderme Aktivitesinin Tayini

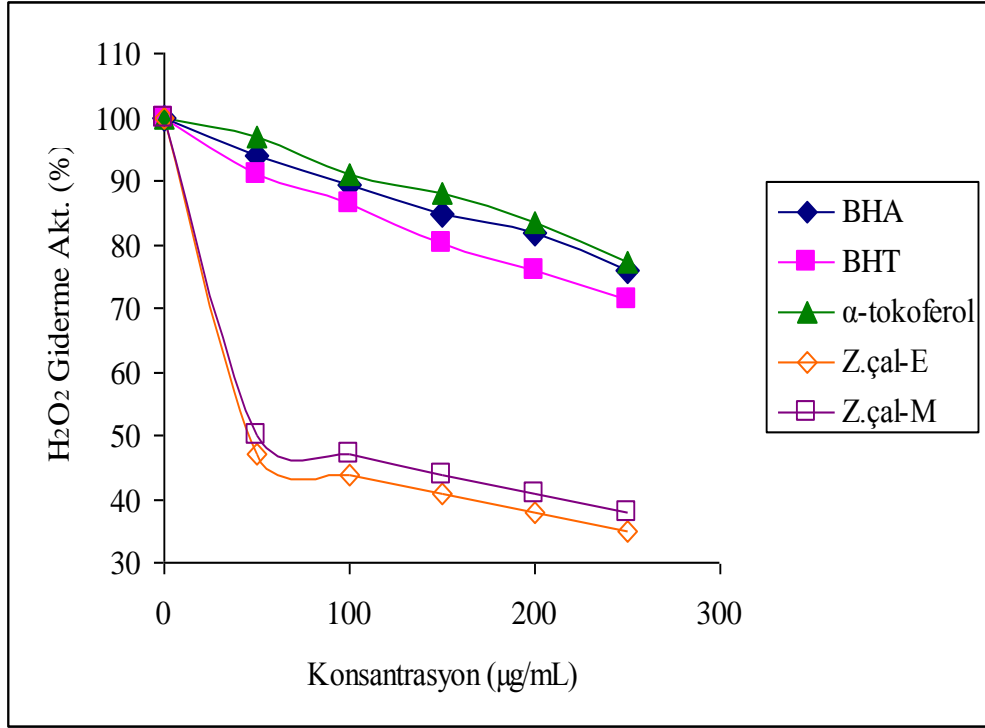
Baharat ekstraktlarının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> giderme aktivitesi Ruch ve arkadaşlarının (1989) metoduna göre tayin edildi. Zencefil ve zerdeçalın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> giderme aktiviteleri standartlardan daha düşük bulundu. Her iki baharat için de etanol ekstraktının daha iyi giderme etkisine sahip olduğu tespit edildi (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16).



Şekil 4.15. Zencefil ekstraktlarının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> radikali giderme aktiviteleri

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> süperoksit dismutaz gibi çoğu oksitleyici enzimler tarafından *in vivo* olarak oluşturulabilir. Hücre zarından geçebilir ve bazı bileşikleri yavaş bir şekilde oksitleyebilir. Zencefilin etanol ve metanol ekstraktlarının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> giderme yetenekleri Şekil 4.15'te verilmektedir. Zencefilin, 150 µg/ml konsantrasyonda etanol ve metanol ekstraktlarının sırasıyla %39.4 ve %42.4 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> giderme aktivitesi gösterdiği belirlendi (Şekil 4.15).



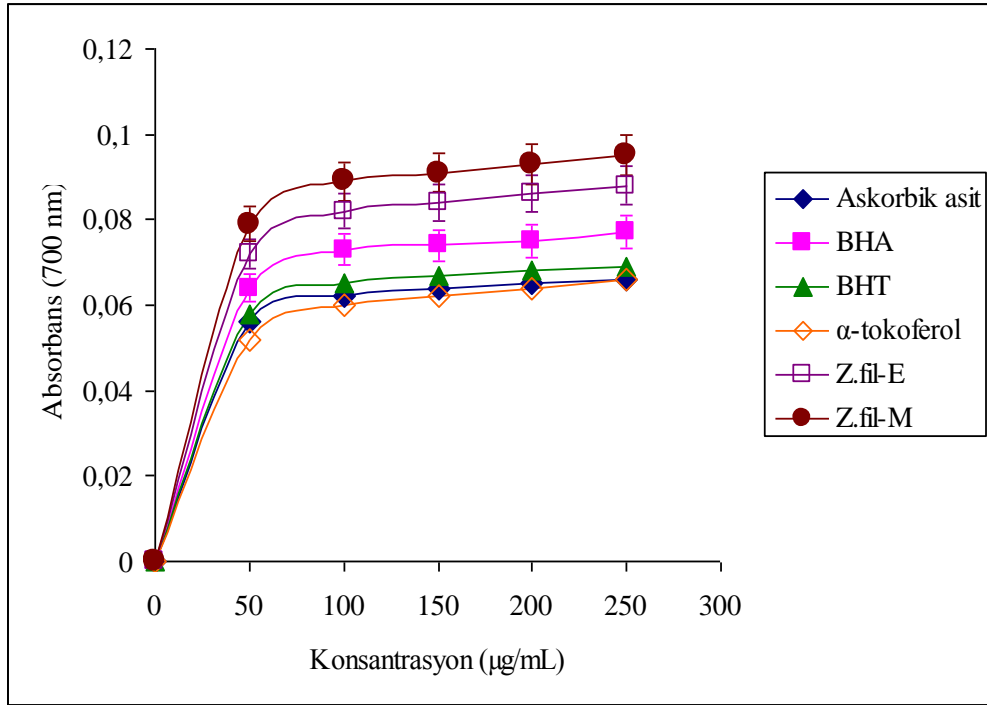


**Şekil 4.16.** Zerdeçal ekstraktlarının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> radikali giderme aktiviteleri

Zerdeçalın etanol ve metanol ekstraktlarının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> giderme yetenekleri Şekil 4.16'da verilmektedir. Zerdeçal baharatının 150 µg/ml konsantrasyonda etanol ve metanol ekstraktlarının sırasıyla %40.9 ve %43.9 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> giderme aktivitesi gösterdiği belirlendi.

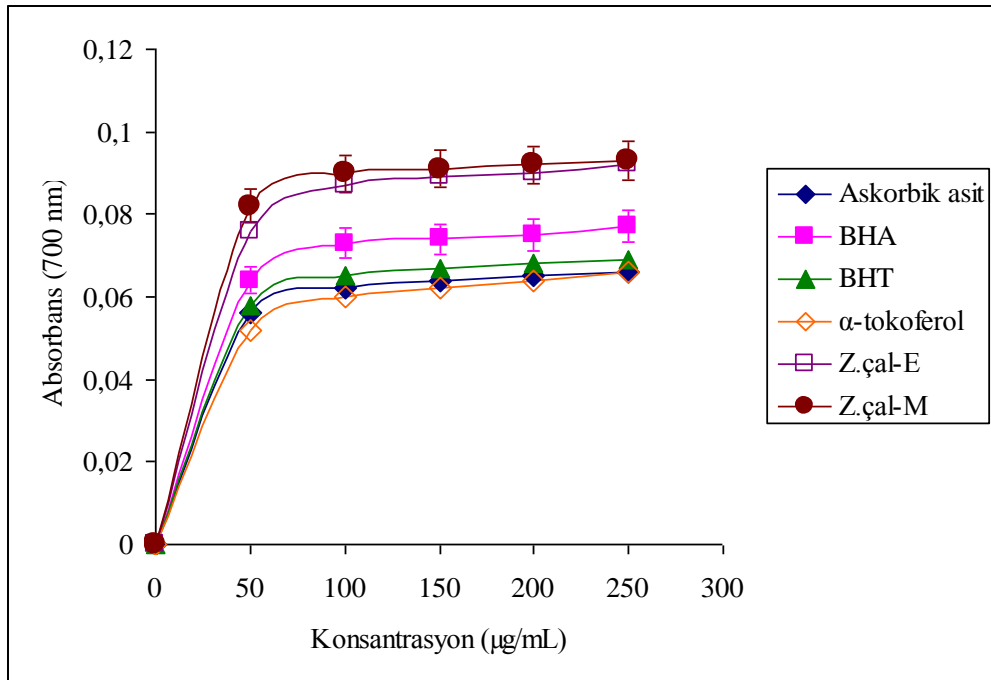
#### 4.7. İndirgeme Kapasitesi Tayini

Fe<sup>3+</sup> iyonlarının indirgenmesi, bir bileşiğin antioksidan aktivite gösterebilmesi için önemli bir mekanizma olan elektron verebilme yeteneğinin göstergesidir ve diğer antioksidan özellikler ile de yakından ilişkilidir. Baharat ekstraktının ortamdaki Fe<sup>+3</sup>'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 baharat ekstraktı için konsantrasyon-absorbans grafikleri çizildi (Şekil 4.17 ve 4.18).



Şekil 4.17. Zencefil ekstraktlarının  $Fe^{3+}$ 'ü  $Fe^{2+}$ 'ye indirgeme kapasiteleri

Zencefilin, etanol ve metanol ekstraktları ile BHA, BHT,  $\alpha$ -tokoferol ve askorbik asitin indirgeme gücü, örnek konsantrasyonlarının artması ile arttı. Zencefil-M ekstraktının, indirgeme gücünün etanol ekstraktından daha güçlü olduğu belirlendi (Şekil 4.17).



Şekil 4.18. Zerdeçal ekstraktlarının  $Fe^{3+}$ 'ü  $Fe^{2+}$ 'ye indirgeme kapasiteleri

Zerdeçalın, etanol ve metanol ekstraktları ile BHA, BHT,  $\alpha$ -tokoferol ve askorbik asitinin indirgeme gücü örneklerin konsantrasyonlarının artması ile arttı. Z.çal-M ekstraktının, indirgeme gücünün etanol ekstraktından daha güçlü olduğu belirlendi (Şekil 4.18).

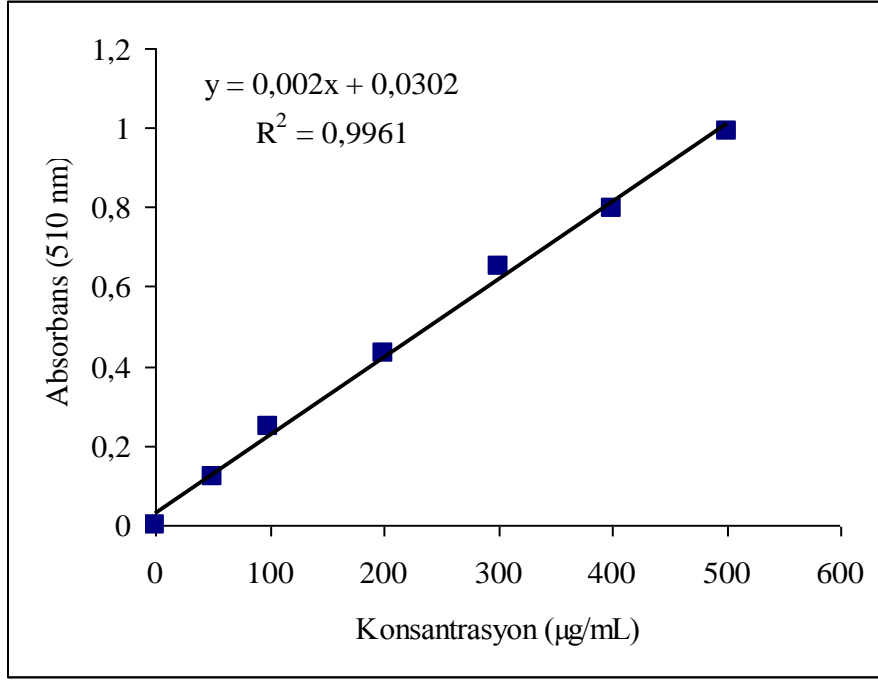
Grafiklerden görüldüğü üzere, çalışılan baharat ekstraktlarının  $Fe^{+3}$ 'ü indirgeme yetenekleri yönünden standartlarla karşılaştırıldığında yüksek aktiviteye sahip oldukları gözlemlendi. Çalışılan baharatların indirgeme gücü yeteneklerine bakıldığında çalışılan konsantrasyon aralığında zerdeçalın zencefilden daha kuvvetli olduğu görüldü. İndirgeme kapasitesi tayininde yüksek absorbans değerinin yüksek indirgeme kapasitesinin göstergesi olduğu kabul edilmektedir.

#### 4.8 Toplam Flavonoid Tayini

Baharat ekstraktlarındaki toplam flavonoid içeriği Zhishen ve arkadaşlarının (1999) metoduna göre belirlendi. Zencefil ve zerdeçalın etanol ve metanol ekstraktlarındaki toplam çözünebilir flavonoid içeriğini belirlemek için pirokateşol ve gallik asit kullanılarak standart grafikler hazırlandı (Şekil 4.19 ve Şekil 4.20). Bu standart grafikler kullanılarak flavonoid bileşik miktarları mg gallik asit (mg GAE/g ekstrakt) ve mg pirokateşol (mg PKE/ g ekstrakt) eşdeğeri şeklinde hesaplandı.

Gallik asit standart grafiğinden elde edilen formülden etanol ve metanol ekstraktlarında bulunan toplam flavonoid bileşik miktarları gallik asit ekvivalent (GAE) olarak hesaplandı ( $R^2$ : 0.9961). Bu amaçla hazırlanan standart gallik asit grafiği Şekil 4.19'da verilmiştir. Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

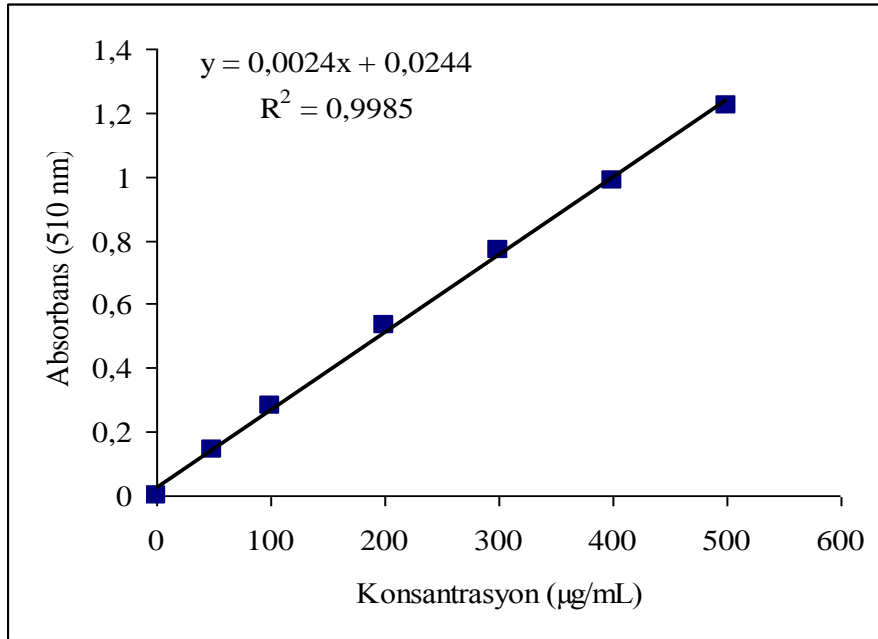
$$\text{Absorbans } (\lambda: 510 \text{ nm}) = 0.002[\text{Gallik asit}] + 0.0302$$



Şekil 4.19. Gallik asit standart grafiği

Pirokateşol standart grafiğinden elde edilen formülden etanol ve metanol ekstraktlarında bulunan toplam flavonoid bileşik miktarları pirokateşol ekivalent (PKE) olarak hesaplandı ( $R^2$ : 0,9985). Bu amaçla hazırlanan standart pirokateşol grafiği Şekil 4.20’de verilmiştir. Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

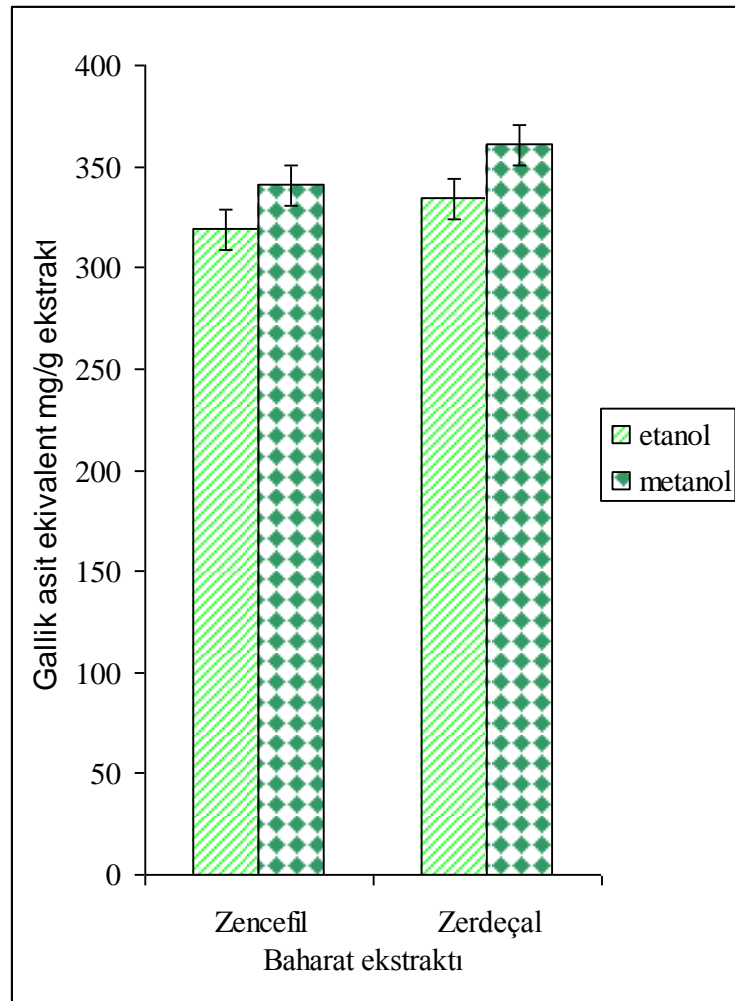
$$\text{Absorbans } (\lambda:510 \text{ nm}) = 0.0024[\text{Pirokateşol}] + 0.0244$$



Şekil 4.20. Pirokateşol standart grafiği

Zencefil ve zerdeçalın etanol ve metanol ekstraktlarının gallik asit ve pirokateşol eşdeğeri olarak flavonoid bileşik miktarlarına ait değerler Şekil 4.19, Şekil 4.20’de verilmiştir. Bu grafiklerde görüldüğü gibi, çalışılan baharatlarda ekstrakte edilebilen flavonoid bileşik içerikleri karşılaştırıldığında; gallik asit ve pirokateşol açısından zerdeçal-metanol ekstraktında en fazla flavonoid bileşik bulunduğu belirlenmiştir (Şekil 4.21 ve Şekil 4.22).

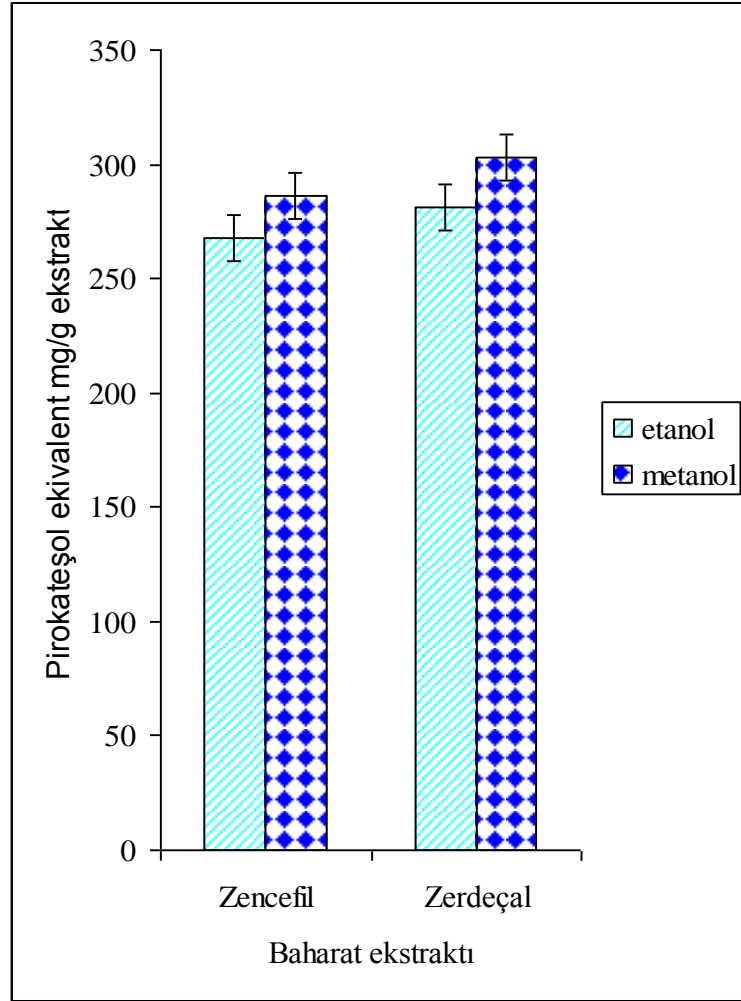
Standart grafik denklemlerinden hesaplanan sonuçların gallik asit ekivalenti olarak  $318.9 \pm 3.7$ - $360.9 \pm 4.9$  mg/g ve pirokateşol ekivalenti olarak  $268.2 \pm 3.1$ - $303.2 \pm 3.9$  mg/g arasında değiştiği belirlendi.



**Şekil 4.21.** Zencefil ve zerdeçalın gallik asit eşdeğeri olan flavonoid madde içerikleri

Şekil 4.21’de; zencefilin gallik asit eşdeğeri olarak, etanol ekstraktının  $318.9$  mg/g, metanol ekstraktının  $340.9$  mg/g ve zerdeçalın gallik asit eşdeğeri olarak, etanol

ekstraktının 334.4 mg/g, metanol ekstraktının 360.9 mg/g flavonoid madde içerdiği belirlendi.



**Şekil 4.22.** Zencefil ve zerdeçalın pirokateşol eşdeğeri olan flavonoid madde içerikleri

Şekil 4.22’de; zencefilin pirokateşol eşdeğeri olarak, etanol ekstraktının 268.2 mg/g, metanol ekstraktının 286.5 mg/g ve zerdeçalın pirokateşol eşdeğeri olarak, etanol ekstraktının 281.1 mg/g, metanol ekstraktının 303.2 mg/g flavonoid bileşik içerdiği belirlendi.

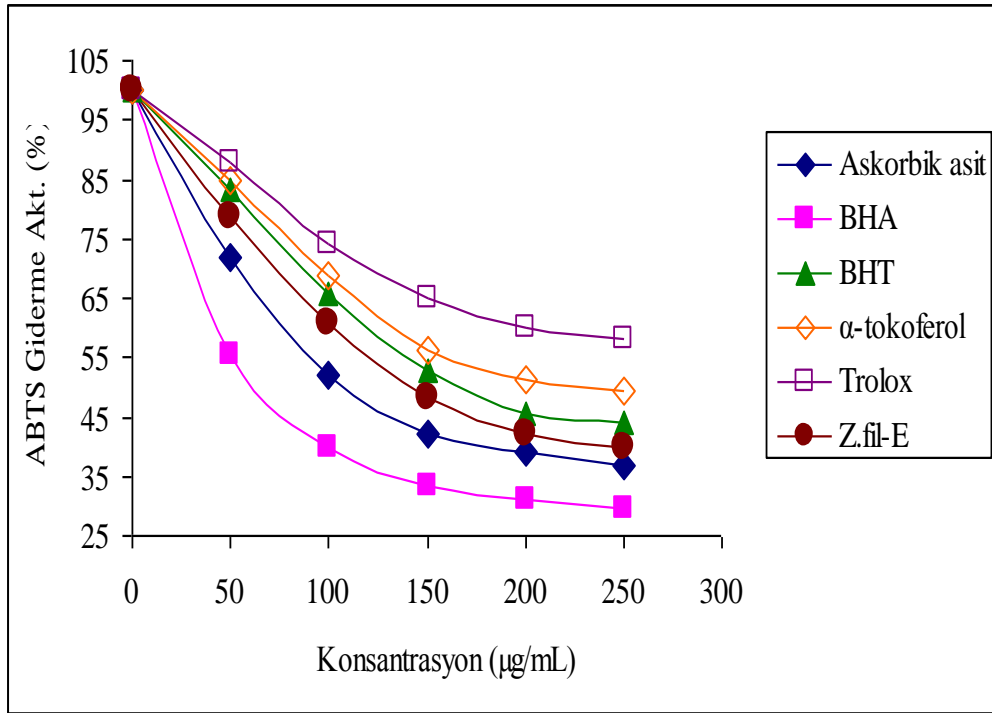
#### 4.9. ABTS radikali giderme aktivitesi tayini

Zencefil ve zerdeçal baharatlarının ABTS radikali giderme etkileri, Re ve arkadaşlarının metoduna göre tayin edildi. Baharatların etanol ve metanol ekstraktlarının ABTS radikali giderme aktiviteleri, 50-250 µg/mL aralığındaki

konsantrasyonlarda ölçüldü. Sonuçlar BHA, BHT,  $\alpha$ -tokoferol, askorbik asit ve troloxun inhibisyon oranları ile karşılaştırıldı.

6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2- karboksilik asit bileşiği olan trolox,  $\alpha$ -tokoferolün suda çözünebilen bir analogudur. Bu bileşiğin yapılan bazı kinetik çalışmalarda antioksidanlara benzediği bulunmuş ve rapor edilmiştir. Bu bileşik için fenoksi radikal ürünüyle, çeşitli biyolojik indirgeyici ajanlarla olan reaksiyonu incelendiğinde, biyolojik koruyuculuğuyla ilgili olarak  $\alpha$ -tokoferol ile aynı amaca yönelik hareket edebildiği belirtilmiştir.

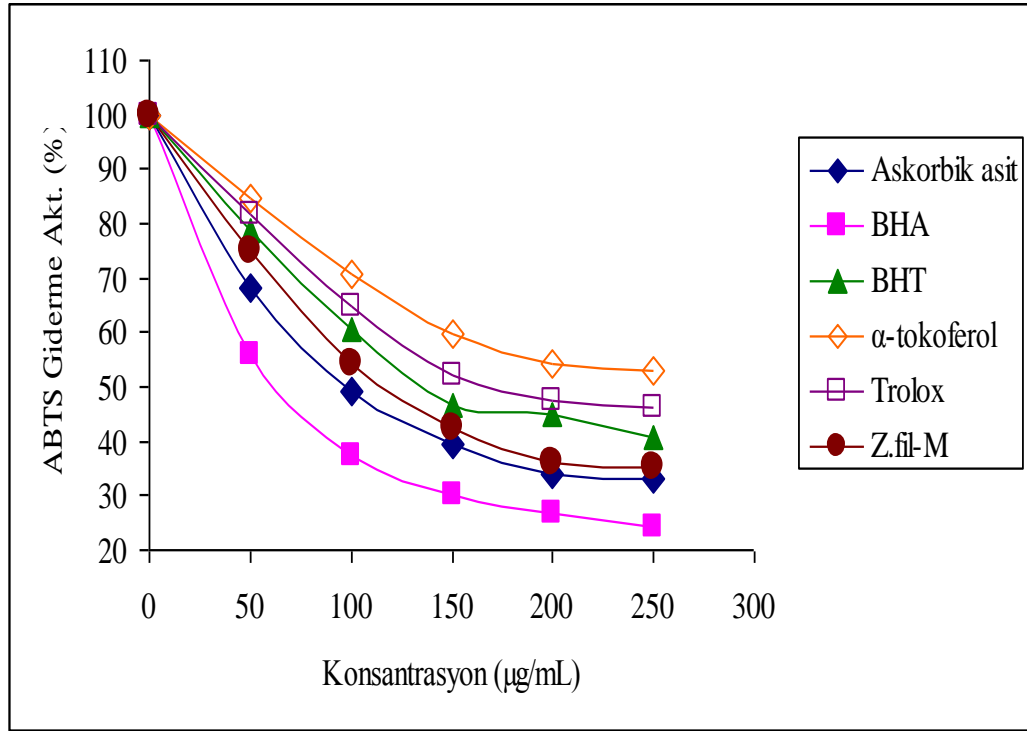
İnkübasyon esnasında çözelti on iki saat karanlık odada bekletildi. Grafikler yardımıyla kontrolün maksimum absorbansı ve her bir örneğin maksimum peroksit oksidasyonu anına karşılık gelen absorbansları belirlendi. Verilen formül yardımıyla lipid peroksidasyonunu inhibe etme oranları tayin edildi.



**Şekil 4.23.** Zencefil-etanol ekstraktının ABTS radikali giderme etkileri

ABTS radikali giderme aktivitesi yönünden etanol ekstraktlarını karşılaştırdığımızda; 50-250  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyon aralığında zencefilin; %78.6, %60.7, %48.1, %42.3, %39.9, BHA'nın; %55.3, %39.9, %33.5, %31.2, %29.6, BHT'nin; %83.2, %65.8, %52.7, %45.7, %43.9,  $\alpha$ -tokoferolün; %85, %69, %56.2,

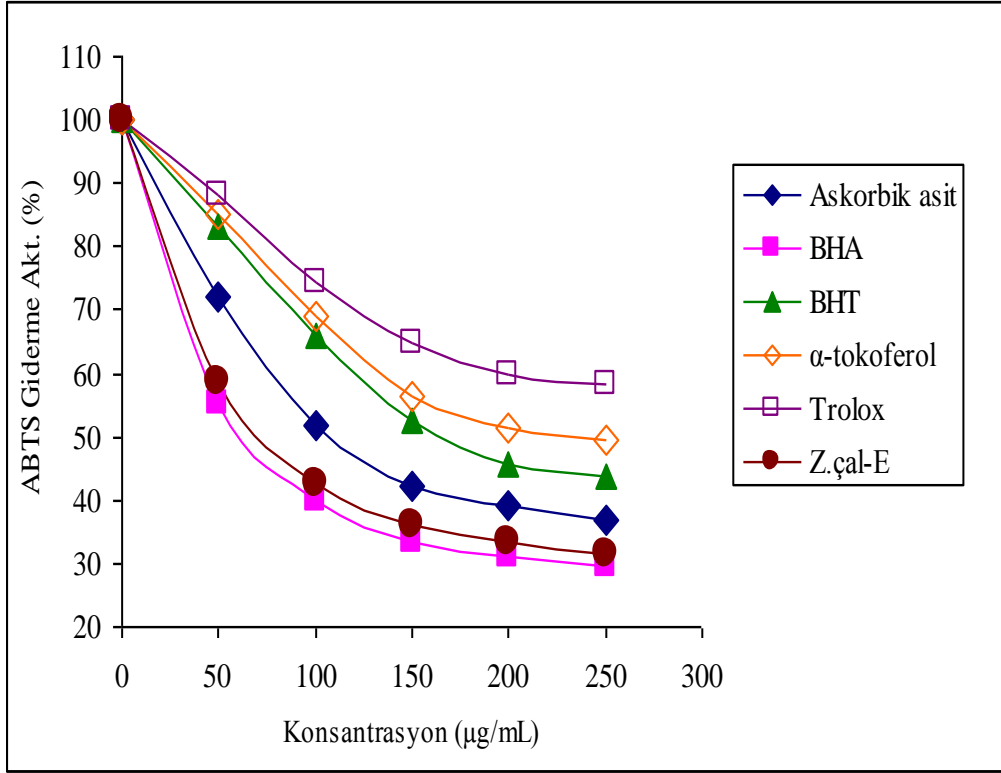
%51.3, %49.5, troloxun; %88, %74.3, %64.9, %59.9, %58.3, askorbik asidin; %71.9, %51.9, %42.3, %39.1, %36.7 % inhibisyon değerlerine sahip oldukları görüldü. Standartların ve zencefilin etanol ekstraktlarının ABTS radikali giderme aktivitesinin trolox> $\alpha$ -tokoferol>BHT>zencefil>askorbik asit>BHA sırasında azaldığı ve 150  $\mu$ g/mL konsantrasyonda sırasıyla %64.9, %56.2, %52.7, %48.1, %42.3, %33.5 olduğu belirlendi (Şekil 4.23).



Şekil 4.24. Zencefil-metanol ekstraktının ABTS radikali giderme etkileri

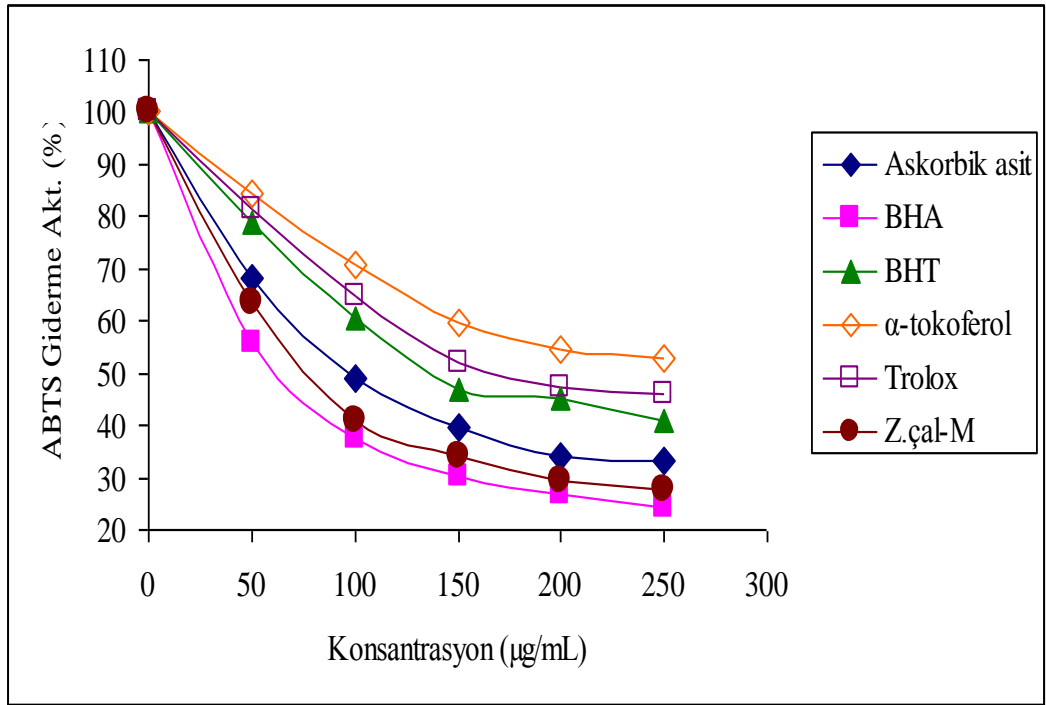
ABTS radikali giderme aktivitesi açısından metanol ekstraktlarını kıyasladığımızda; 50-250  $\mu$ g/mL konsantrasyon aralığında zencefilin; %75.1, %54.1, %42.4, %36, %35.4, BHA'nın; %55.9, %37.4, %30.1, %26.9, %24.4, BHT'nin; %78.9, %60.4, %46.8, %45, %40.8,  $\alpha$ -tokoferolün; %84.5, %70.9, %59.7, %54.4, %52.9, troloxun; %81.6, %64.6, %52, %47.3, %46, askorbik asitin ise; %68, %49, %39.5, %34, %33.3 % inhibisyon değerlerine sahip oldukları görüldü. Standartların ve zencefilin metanol ekstraktlarının ABTS radikali giderme aktivitesinin  $\alpha$ -tokoferol>trolox> BHT>zencefil>askorbik asit>BHA sırasında azaldığı ve 150  $\mu$ g/mL konsantrasyonda sırasıyla %59.7, %52, %46.8, %42.4, %39.5, %30.1 olduğu belirlendi (Şekil 4.24).





Şekil 4.25. Zerdeçal-etanol ekstraktının ABTS radikali giderme etkileri

Zerdeçalın etanol ile yapılan ABTS radikali giderme aktivitesi denemesinde; 50-250 µg/mL konsantrasyon aralığında zerdeçalın; %58.8, %42.7, %35.9, %33.5, %31.6, BHA'nın; %55.3, %39.9, %33.5, %31.2, %29.6, BHT'nin; %83.2, %65.8, %52.7, %45.7, %43.9, α-tokoferolün; %85, %69, %56.2, %51.3, %49.5, troloxun; %88, %74.3, %64.9, % 59.9, %58.3, askorbik asitin; %71.9, %51.9, %42.3, %39.1, %36.7 % inhibisyon değerlerine sahip oldukları görüldü. Standartların ve zerdeçalın etanol ekstraktının ABTS radikali giderme aktivitesinin trolox>α-tokoferol>BHT>askorbik asit>zerdeçal>BHA sırasında azaldığı ve 150 µg/mL konsantrasyonda bu değerlerin sırasıyla %64.9, %56.2, %52.7, %42.3, %35.9, %33.5 olduğu belirlendi (Şekil 4.25).



**Şekil 4.26.** Zerdeçal-metanol ekstraktının ABTS radikali giderme etkileri

ABTS radikali giderme aktivitesinin belirlenmesi amacıyla metanol ekstraktlarıyla gerçekleştirilen deneyde; 50-250 µg/mL konsantrasyon aralığında zerdeçalın; %63.3, %40.8, %34, %29.3, %27.6, BHA'nın; %55.9, %37.4, %30.1, %26.9, %24.4, BHT'nin; %78.9, %60.4, %46.8, %45, %40.8, α-tokoferolün; %84.5, %70.9, %59.7, %54.4, %52.9, troloxun; %81.6, %64.6, %52, %47.3, %46, askorbik asitin; %68, %49, %39.5, %34, %33.3 % inhibisyon değerlerine sahip oldukları görüldü. Standartların ve zerdeçalın metanol ekstraktının ABTS radikali giderme aktivitesinin α-tokoferol>trolox>BHT>askorbik asit>zerdeçal>BHA sırasında azaldığı ve 150 µg/mL konsantrasyonda sırasıyla %59.7, %52, %46.8, %39.5, %34, %30.1 olduğu belirlendi (Şekil 4.26).

## 5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

İnsanların doğal metabolizmasında enerji kaynağı olan karbonun oksijen ile yanması sonucunda bazı etmenlerin etkisi ile; superoksit ( $O_2^-$ ), hidroksil ( $HO^-$ ), nitrikoksit ( $NO^-$ ) ile hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi aktif oksijen formları olan serbest radikal olarak adlandırılan bir takım bileşikler ortaya çıkmaktadır. Serbest radikaller; vücuttaki hücrelerin membranına, hücre yapısında bulunan lipidlere, proteinlere, nükleik asitlere ve DNA'ya zarar vererek, kanser, koroner hastalıklar, diyabet, katarakt, karaciğer tahribatı gibi pekçok hastalığa neden olmaktadır. Antioksidan maddeler; serbest radikallerin neden olduğu reaksiyonu durdurarak, singlet oksijenini bağlayarak, metallerin katalizlediği oksidasyon reaksiyonlarında metali bağlayarak ve oksidasyonun teşvik etmiş olduğu zararlanmaları hücresel bakımdan engelleyerek dejeneratif hastalıkların oluşumunu engellerler (Velioglu, 2000).

Zencefil ve zerdeçalın incelenen literatürlerde antioksidan aktivite yönünden değerlendirilmesinin yetersiz sayıda olduğu bulunmuştur. Yapılan çalışmada zencefil ve zerdeçalın, etanol ve metanol ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı, toplam antioksidan aktivitesi, DPPH serbest radikal giderme aktivitesi, metal iyonlarını şelatlama kapasitesi, indirgeme kapasitesi, süperoksit radikali giderme aktivitesi, toplam flavonoid bileşik tayini,  $H_2O_2$  giderme aktivitesi ve ABTS radikali giderme aktivitesi tayini metodlarıyla antioksidan kapasiteleri ayrıntılı olarak incelenmiştir. Zencefil ve zerdeçaldan elde edilen veriler birbirleriyle kıyaslanarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

Araştırmacılar su, metanol, etanol, aseton, petrol eteri, etil asetat, kloroform, diklorometan gibi çeşitli çözücü veya çözücü karışımları ile homojenizer kullanarak, oda koşullarında bekleterek (maserasyon), çözücü ile kaynatarak ve Soxhlet ekstraksiyonu ile ekstrakt elde etmişlerdir (Nakiboğlu vd., 2007, Su vd., 2007, Silva vd., 2007, Tawaha vd., 2007). Çalışmamızda ekstraksiyon için polaritesi yüksek, toksisitesi düşük olan, ekonomik açıdan uygun ve kolay temin edilebilecek çözücüler tercih edilmiştir.

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

Bu bulgularla uyumlu olarak, çalışmamızda kullanılan baharatlarda ekstrakte edilebilen bileşiklerin ekstraksiyon verimleri genel olarak etanol>metanol sıralaması şeklindedir.

**Fenolik bileşikler**, hidroksil gruplarının serbest radikalleri giderme kabiliyetinden dolayı en önemli bitki bileşenleridir (Hatano, Edmatsu, Mori, Fujita ve Yasuhara, 1980). Fenolik bileşenler antioksidan aktiviteye doğrudan katkıda bulunabilir (Duh vd., 1999). Son yıllarda gıdalardaki fenolik bileşiklerin antioksidan etkilerinin incelenmesi giderek önem kazanmaktadır (El vd., 1999). Geniş bir aile olan fenolik bileşiklerin spesifik bir grubunun ayrı ayrı analizleri mümkün olsa da gıdalardaki toplam fenolik bileşiklerin tayini her zaman gereksinim duyulan bir analizdir.

Fenolik bileşikler doğal antioksidanlar olarak bilinirler. Belirli bir konsantrasyonda konjuge dienlerin oluşum hızını belirgin bir şekilde azaltırlar. Lipidlerin oksidatif bozulmasını geciktirdiklerinden dolayı da besin endüstrisi açısından oldukça ilgi çekicidirler. Besinlerin, besin değerini ve kalitesini geliştirmektedirler.

Çalışmamızda gallik asit eşdeğeri olarak zencefilin metanol ekstraktının (462.9 mg/g), etanol ekstraktından (400.2 mg/g); zerdeçalın da metanol ekstraktının (551.1 mg/g), etanol ekstraktından (462.9 mg/g) daha fazla fenolik madde içerdiği belirlendi.

Fenolik bileşikler, antioksidatif etkiyi doğrudan meydana getirebilirler. Meyve ve sebze açısından zengin bir beslenme sonucu insanlarda yaklaşık günde 1 gramlarının kanser ve mutajenez üzerine inhibitör etkiye sebep olduğu bilinmektedir.

Çalışmamızda pirokateşol eşdeğeri olarak zencefilin metanol ekstraktının (421.8 mg/g), etanol ekstraktından (364.3 mg/g); zerdeçalın da metanol ekstraktının (502.6 mg/g), etanol ekstraktından (421.8 mg/g) daha çok fenolik madde bulundurduğu tespit edildi.

Standart grafik denklemlerinden hesaplanan sonuçların gallik asit ekivalenti olarak 400.2-551.1 mg/g ve pirokateşol ekivalenti olarak 364.3-502.6 mg/g arasında değiştiği belirlendi.

Zencefilin etanol ekstraktının, toplam fenolik madde miktarı 871 mg/g gallik asit eşdeğeri olarak saptanmıştır (Stoliova vd., 2006).

Anason (*Pimpinella anisum L.*) ekstraktlarının toplam fenolik madde konsantrasyonu 30-77.5 µg gallik asit eşdeğeri olarak saptanmış etanol ekstraktının su ekstraktından daha yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Gülçin vd., 2003).

Toplam fenolik madde miktarı açısından Chen ve arkadaşlarının (2007) dört çeşit bitki yapraklarının su ekstraktlarıyla yaptığı antioksidan aktivite çalışması, Wong ve arkadaşlarının (2006) ise 30 çeşit medikal bitki ile çalışması bulunmaktadır.

Tez kapsamında, zencefil ve zerdeçala dair literatür taraması sonucunda; zencefil yapraklarının antioksidan aktivitesinin araştırıldığı ve zencefilin kanser ile kalp-damar hastalıklarından koruyucu özelliklerinin belirlendiği; zerdeçalın ise içerdiği inflamatör bileşiklerden dolayı Alzheimer, göğüs ve kolon kanserleri üzerinde olumlu etkiye sebep olduğu belirlenmiştir.

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

**DPPH radikalinin**, lipofilik bir radikal olduğu düşünülür. Lipofilik radikallerde lipid otooksidasyonu tarafından bir zincir reaksiyon başlatılır. DPPH, oda sıcaklığında kararlı bir serbest radikaldir, kararlı bir diamanyetik molekül olabilmek için bir elektron veya hidrojen radikali alır. Antioksidanlar tarafından DPPH'nin giderilmesi 517 nm'de absorbanstaki azalmayla tespit edilmektedir.

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.

Tez çalışmamızda; zencefil ve zerdeçalın etanol ekstraktlarının metanol ekstraktlarından daha yüksek serbest radikal giderme aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.2'ye göre; çalışılan ekstraktlar içinde en düşük EC<sub>50</sub> değeri zerdeçal-etanol ekstraktında, en yüksek EC<sub>50</sub> değeri zerdeçal-metanol ekstraktında tayin edildi. Çalışmamızda EC<sub>50</sub> değerleri 0.48±0,06–4.52±1,23 mg/mL aralığında belirlenmiştir.

Bazı çalışmalarda genel olarak ekstraktlarının radikal giderme aktivitelerinin yüksek değerlerde olduğu belirlenmiştir. Miliauskas ve arkadaşları (2004) bazı aromatik bitki ekstraktlarıyla yaptıkları çalışmada aseton, metanol ve etil asetat ekstraktları arasında DPPH radikali gidermede en etkili ekstraktın metanol ekstraktı olduğunu bildirerek, antiradikalik aktiviteyi TFC (Toplam fenolik madde) içeriği ile ilişkilendirmişlerdir.

Benzer şekilde Shon ve arkadaşları da (2003) zencefilin, sıcak su ve metanol ekstraktlarının bütanol, etil asetat ve kloroform ekstraktlarının DPPH radikali gidermede etkili olduklarını bildirmişlerdir.

Literatür taramasında antioksidan aktivite ile ilgili olarak zencefil ve zerdeçala ait veriler elde edilememiştir. Ancak Stoilova ve arkadaşlarının (2006) zencefil yumruları ile yaptığı bir çalışmada; 20 µg/mL konsantrasyonda etanol ekstraktında % 90.1 DPPH radikali giderme aktivitesi bildirilmiştir.

Middleton ve arkadaşları (2004) zencefil yumrularıyla yaptığı çalışmada, rizomların hekzan, diklorometan ve metanol ekstraktlarına kalitatif veya kantitatif olarak uygulanan DPPH radikali giderme aktivitesi tayinlerinde, ekstraktların aktivite göstermediğini bildirmişlerdir.

Hinneburg ve arkadaşları (2006) ise maydanoz, defne, zencefil, rezene, fesleğen ve kimyon gibi benzer aromatik bitkilerin DPPH radikali giderme aktivitesi çalışmalarında 0,49±0,011-12,0±0,10 mg/mL aralığında EC<sub>50</sub> değerleri bildirmektedir. Kullandıkları referans maddelerin EC<sub>50</sub> değerleri incelendiğinde BHA ve askorbik asitin 0,09±0,01 mg/mL, BHT'nin 0,21±0,01 mg/mL ve gallik asitin 0,03±0,01 mg/mL olarak tayin edilmiştir.

Zencefil ve zerdeçal ekstraktlarının **linoleik asit peroksidasyonu** üzerindeki inhibisyon etkisi çeşitli konsantrasyonlarda FTC (Ferrik Tiyosiyanat) metoduna göre belirlendi ve sonuçlar BHT, BHA, α-tokoferol ve askorbik asit standartlarıyla karşılaştırıldı.

Ferrik tiyosiyanat metodu, oksidasyonun ilk safhası boyunca üretilen ve oksidasyon ürünü olan peroksitin miktarını ölçen bir methodur. Yüksek absorbans, oluşan peroksitlerin yüksek konsantrasyonunun göstergesidir.

İnkübasyon boyunca emülsiyon sistemde oluşan peroksitler, 500 nm absorbansta spektrofotometrik olarak belirlendi.

Zencefil ve zerdeçalın her iki ekstraktının tüm konsantrasyonlarda etkili antioksidan aktiviteye sahip oldukları görüldü. Ekstraktların konsantrasyon artışına bağlı olarak (50-250 µg/mL) lipid peroksidasyonunun inhibisyonunda artışa sebep oldukları ve linoleik asit otooksidasyonunun başlama periyodunu uzattıkları görüldü.

Linoleik asit emülsiyon sisteminde gerçekleştirilen benzer çalışmalarda; zencefilin etanol ekstraktının 20 µg/mL konsantrasyonu için yüksek inhibisyon oranları (% 71,6) bulunmuştur (Krastanov, 2006).

Denev ve arkadaşlarının (2006) yaptığı çalışmada; zencefil etanol ekstraktlarının çalışılan konsantrasyon aralığında (20-100 µg/mL) etkili antioksidan aktiviteye sahip oldukları bildirilmiştir.

Toplam antioksidan aktivitesi ve toplam fenolik bileşik içeriği arasında bağlantı vardır. Çünkü bazı araştırmacılar toplam fenolik madde içeriğinin yüksek olduğunda antioksidan aktivitesinin de yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında da aynı bağlantı gözlenmiştir.

En son çalışmalar, bazı flavonoid ve polifenollerin meyve, sebze ve baharatların toplam antioksidan aktivitelerine önemli derecede katkı sağladığını göstermektedir (Luo vd., 2002).

Geçiş metalleri arasından  $Fe^{2+}$ , lipid oksidasyonunda prooksidan olarak bilinir. Fenton reaksiyonu ( $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \bullet OH$ ) vasıtasıyla ROT'ları oluşturur ve lipid oksidasyonunu hızlandırır (Halliwell ve Gutteridge, 1990). Baharat ekstraktları geçiş metal iyonlarını bağlayarak ortamdaki konsantrasyonlarını azaltır ve  $Fe^{2+}$  katalizli lipid peroksidasyonunu geciktirirler.

Baharat ekstraktlarının ve standartların  **$Fe^{2+}$  iyonlarını şelatlama aktivitesi** 50-250 µg/mL konsantrasyon aralığında Dinis ve arkadaşlarının metoduna göre değerlendirildi.

Zencefil ve zerdeçalın çözücü (etanol ve metanol) ile olan ekstraktlarının  $Fe^{2+}$  şelatlama aktivitesinin konsantrasyona bağlı olarak arttığı gözlemlendi. Baharatların metanol ekstraktları etanol ekstraktlarından daha düşük şelatlama aktivitesi gösterirken, bu sistemde ekstraktların iyi bir şelatlayıcı olan EDTA çözeltisinden daha iyi bir şelatör olmadığı bulundu.

Çalışmamızda 50-250 µg/mL konsantrasyon aralığında; zencefilin etanol ekstraktının %11.1-%30.2, metanol ekstraktının ise %7.5-%22.3 şelatlama aktivitesi

gösterdiği belirlendi. Zerdeçalın etanol ekstraktının %13.2-%30.2 aralığında, metanol ekstraktının ise %9.2-%28.6 şelatlama etkisi gösterdiği bulundu.

Kalyan ve arkadaşları (2009) zencefil ile yaptığı çalışmada standart şelatör olarak EDTA çözeltisini kullanmış ve metal şelatlama etkisinin %50 bulmuştur. Zerdeçalda bu oran %72 civarında iken zencefilde %32 bulunmuştur.

Süperoksit anyonları lipidlerin, proteinlerin ve DNAnın oksidatif hasarına neden olan hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve singlet oksijen gibi diğer reaktif oksijen türlerinin oluşumunda önemli rol oynarlar ( Pietta, 2000 ).

Radikal giderme kapsamında yapılan çalışmalarda **süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitesi** de araştırıldı. Süperoksit anyon radikalleri lipid peroksidasyonunu doğrudan başlatan oksijen merkezli radikallerdir. Bu radikaller biyolojik makro moleküller ile etkileşip doku hasarlarına sebep olan reaktif radikallerden biridir (Halliwell and Gutteridge, 1984). Süperoksit anyonu diğer oksijen radikalleri ile karşılaştırıldığında daha uzun yaşam ömrüne sahiptir.

Çalışmamızda kullandığımız baharatların metanol ekstraktlarında yüksek düzeyde süperoksit radikali giderme aktivitesi tayin edilmiş, etanol ekstraktları bu denemede düşük oranda aktivite göstermiştir. Sonuçlar ekstrakt miktarının artmasıyla radikal giderme aktivitesinin arttığını göstermesine rağmen, düşük konsantrasyonlarda ekstraktların hiçbirinin süperoksit radikalini giderme kapasitesinin BHA kadar iyi olmadığı görülmüştür. 200 µg/mL için zencefil ve zerdeçalın etanol ekstraktlarının süperoksit radikali giderme kapasitesi açısından BHA ile kıyaslanabilir oranda olduğu söylenebilir.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> giderme aktivitesinde;** Canlı organizmalarda hidrojen peroksit, süperoksit dismutaz gibi birçok enzim tarafından oluşturulabilir. Hidrojen peroksit hücre membranında bir uçtan diğer uca diffüze olarak birçok bileşiği oksitleyebilir. Hidrojen peroksit çok reaktif değildir, fakat hücrede serbest radikallerin artmasına sebep olduğundan dolayı zamanla hücre için toksik olabilir. Hücre kültüründe hidrojen peroksit ilavesiyle geçiş metal iyonları varlığında oksidatif DNA hasarlarına sebep olan hidroksil iyonlarının oluşmasına sebep olur. Bundan dolayı farmasötik ve gıda sistemlerini oksidatif hasardan korumak için bu sistemlerden hidrojen peroksit uzaklaştırmak oldukça önemlidir. Çeşitli makalelerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in reaktivitesinin düşük olduğu ve lipid peroksidasyonunu başlatabilecek aktivitede olmadığı bildirilmiştir



(Yen ve Duh, 1994). Ancak Fenton reaksiyonu ile reaktif hidroksil radikalini oluşturma potansiyeli vardır. Bu yüzden gıdalar veya hücrelerdeki antioksidan savunma için  $H_2O_2$ 'in uzaklaştırılması önem taşımaktadır.

Zencefil ve zerdeçalın çözücü ekstraktlarının kullanılan standartlardan daha az oranlarda inhibisyon değerleri gösterdiği belirlenmiştir. Zencefil ve zerdeçalın metanol ekstraktlarının da etanol ekstraktlarından daha fazla inhibisyon aktivitesi gösterdiği sonucuna varılmıştır. Standartlar arasında  $\alpha$ -tokoferolün, BHA, BHT'den daha yüksek oranda inhibisyon etkisi gösterdiği bulunmuştur.

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

Zencefil ve zerdeçalın metanol ekstraktlarının etanol ekstraktlarından ve standartlardan daha etkili indirgeme kapasitesi gösterdiği bulundu.

Çalışmamızda kullandığımız baharat ekstraktlarının iyi derecede  $Fe^{+3}$  indirgeyici kapasiteleri ve dolayısıyla elektron verebilme yetenekleri olduğu gözlemlendi. Bu özelliklerinden dolayı ekstraktların reaktif serbest radikal türlerini, daha stabil radikal olmayan türlere dönüştürerek serbest radikal zincirini sonlandırmak üzere rol oynayabilecekleri söylenebilir.

Saçan ve arkadaşları (2008) çalışmalarında rokanın su ekstraktının standartlara nazaran zayıf indirgeme gücü gösterdiğini belirlemişlerdir.

Alam ve arkadaşları (2007) roka tohumunun etanol ekstraktının gallik asit ve askorbik aside karşı gösterdiği indirgeyici gücünün önemli derecede doza bağımlı olduğunu bildirmektedirler.

Dorman ve arkadaşları (2003) *Lamiaceae* ailesinden mercanköşk, biberiye, adaçayı, kekik bitkileri ile yaptıkları çalışmalarında benzer indirgeme kapasiteleri bildirmişlerdir.

Bazı çalışmalarda da  $Fe^{+3}$  indirgeyici kapasite ile lipid peroksidasyonunun inhibisyonu arasında güçlü bir ilişki olduğu belirtilmiştir (Juntachote ve Berghofer, 2005; Hinneburg vd., 2006).

**Flavonoidler;** flavondan türetilen, suda çözünebilen, %70 etanol ile ekstrakte edilebilen ve baz ile muamele edildiğinde renkleri değişen sekonder metabolitlerin önemli bir sınıfıdır. Çiçek ve meyvelere renklerini verirler, serbest radikalleri etkisiz kılarlar, zararlı mikroorganizmaların fonksiyonlarını engellerler, virüslere karşı koruma sağlarlar, bağışıklık sistemini ve damar sağlığını korurlar, C vitamininin emilimini arttırmaları, kanserli hücreleri azaltırlar, ishal ve ülser gibi hastalıklara karşı ilaç etkisi gösterirler, enzimlerin aktivitelerini düzenlerler ve alerjik reaksiyonları önlerler.

Gallik asit eşdeğeri olarak zencefilin metanol ekstraktının (340.9 mg/g) etanol ekstraktından (318.9 mg/g); zerdeçalın da metanol ekstraktının (360.9 mg/g) etanol ekstraktından (334.4 mg/g) daha fazla flavonoid madde içerdiği bulunmuştur.

Pirokateşölü standart olarak kullandığımızda zencefilin metanol ekstraktının (286.5 mg/g) etanol ekstraktından (268.2 mg/g); zerdeçalın metanol ekstraktının da (303.2 mg/g) etanol ekstraktından (281.1 mg/g) daha çok flavonoid bileşik içerdiği belirlenmiştir.

**ABTS radikali giderme aktivitesi,** antioksidan aktiviteyi değerlendirmek için en çok kullanılan yöntemlerden biridir. ABTS radikal olmayan formunda, renksiz olan oldukça kararlı bir serbest radikaldir. ABTS giderme aktivitesinin spektrofotometrik analizleri Re ve arkadaşlarının (1999) yöntemine göre belirlenmiştir.

Çalışmamızda zencefilin etanol ekstraktının aynı konsantrasyonda metanol ekstraktından; zerdeçalın da etanol ekstraktının aynı konsantrasyondaki metanol ekstraktından daha etkili radikal katyonu giderme aktivitesi gösterdiği bulunmuştur.

ABTS giderme aktivitesi açısından saçak ağacı yaprağının etanol ekstraktının metanol ekstraktından daha etkili olduğu bildirilmiştir (Gülçin vd., 2006).

Tez kapsamında çeşitli metodlarla baharat ekstraktlarının serbest radikalleri giderme ve toplam antioksidan aktiviteleri çalışılmıştır. Literatür taraması sonucu seçilen baharatlara dair hiç antioksidan aktivitesi çalışmasına rastlanmadığından elde edilen sonuçlar bu alana daha fazla veri ile katkı sağlayacaktır.

Bu çalışma kapsamında çalışılan baharatlara ait bulgular göz önünde bulundurulacak olursa baharatların etanol ekstraktlarında antioksidan aktiviteleri daha yüksek bulunduğundan, günlük tüketimde bu baharatlara daha çok yer verilmesi önerilir. Ayrıca günümüzde, geleceğe yönelik sentetik antioksidanların yerini alabilecek doğal antioksidan arayışları hızla sürmektedir. Bu tip çalışmalarla yüksek

antioksidan aktiviteye sahip ekstraktlar belirlenerek, bunların gıda sistemlerindeki antioksidan etkilerinin incelenmesi ile çalışmaların endüstriyel uygulamaya yönelik devamlılığının sağlanması düşünülmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

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

**ALTAN, N.,** Dingel, A.S., Koca,C., (2006). Diabetes mellitus and oxidative stres. *Turkish Journal of Biochemistry-Turk J Biochem*, 31(2); 51-56.

**AMES, B. N.,** Shigenaga, M. K., Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 1; 90(17): 7915-22.

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

**BAST, A.,** Haenen, G. R. M. M., Cees, J. A. D. (1997). Oxidants and antioxidants: State of the art. *The American Journal of Medicine*, 91, (Suppl 3C), 30, 3C-2S\_3C-13S.

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

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

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

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

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

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

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

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

**DENG, J.,** Cheng, W., Yang, G. (2011). A novel antioxidant activity index (AAV) for natural products using the DPPH assay. *Food Chemistry*, 125, 1430-1435.

**DİKİCİ, İ.** (1999). Akut viral hepatitlerle interferon tedavisi görmüş kronik viral hepatitlerde oksidatif stresin araştırılması. Selçuk Üni. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Konya, 73s.

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

**DUH, P. D.,** Tu, Y. Y. (1999). Antioxidant activity of water extract of Harnng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Lebnesmittel-Wissenschaft und Technologie*. 32, 269-277.

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

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

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

**FREI, B.** (1994). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of Action., *The American Journal of Medicine*, 97(Suppl 3A), 26, 3A-5S-3A-12S.

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

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

**GÜLÇİN İ., ELIAS R., GEPDİREMEN A., BOYER L., KÖKSAL E., (2006):** “A comparative study on the antioxidants activity of fringe tree (*Chionanthus virginicus L.*) extracts.”

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

**HALLIWELL B., CLEMENT MV., LONG LH., (2000):** “Hydrogen peroxida in the human body.” *FEBS Letter*, 486, 10-13.

**HALLIWELL B., GUTTERIDGE JMC., (1990)** “Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview.” *In: Methods in Enzymology*, 186, 1-85.

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

**HATANO, T., Edamatsu, R., Mori, A., Fujita, Y., Yasuhara, E. (1989).** Effect of interaction of tannins with co-existing substances. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and on DPPH radical. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 37, 2016-2021.

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

**HO CT., WANG M., WEI GJ., HUANG TC., HUANG MT., (2000):** “Chemistry and antioxidative factors in rasemary and sage.” *BioFactors*, 13, 161-166.  
<http://tr.wikipedia.org> (Mart 2008)

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

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

**INGLET, G. E., Chen, D., Berhow, M., Lee, S. (2011).** Antioxidant activity of commercial buck wheat flours and their free and bound phenolic compositions. *Food Chemistry*, 125, 923-929.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**PIETTA, P.G.**, (2000). "Flavonoids as antioxidants." *Journal of Natural Products* 63, 1035-1042.

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

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

**RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M.**, (1999). "Antioxidants activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay." *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**STOILOVA I.**, **KRASTANOV A.**, **STOYANOVA.**, **DENEV P.**, **GARGOVA S.**, (2006): "Antioxidant activity of a ginger extract (*Zingiber officinale*)."

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

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

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

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

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

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

**VELİOĞLU, S.** (2006). The effect of extraction conditions on total polyphenol, antioxidant and antimicrobial activities of black and mate tea. *Ankara Universty Scientific Researches Projects*, 2005-0745-004-HPD

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

**WINTERBOURN CC., GUTTERIDGE JMC., HALLIWELL B.,** (1985): “Doxorubicin-dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O<sub>2</sub>.” *Journal of Free Radicals in Biology and Medicine*, 1(1), 43-49.

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

**YANBEYİ, S.** (1999). Aspirin ve antioksidant buthylated hydroxyanisole’ün tavşanlarda eritrosit total katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine etkileri. Ondokuz Mayıs Üni. Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Samsun, 88s.

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

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

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

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

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, mesleki gelişimimde ve tez çalışmamda bilgi ve deneysel birikimleri ile yol gösteren, yüksek lisans eğitimim süresince teorik ve pratik çalışmaları ve tez tamamlamada büyük ilgi ve desteğini gördüğüm, bilgi ve görüşlerinde, çalışmalarımın yönlendirilmesinde ve devam etmesinde her türlü desteğini benden esirgemeyen değerli danışman hocam Doç. Dr. Yeşim YEŞİLOĞLU'na teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Araştırmamın başlangıcından bitimine kadar her aşamada yakın ilgisini gördüğüm, çalışmalarım boyunca katkılarını ve yardımlarını esirgemeyen ve desteklerini gördüğüm tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

ANOVA grafik çizimlerinde bana yardımcı olan Ercüment ÖZKEÇECİ'ye çok teşekkür ederim.

Beni her zaman içtenlikle destekleyen aileme sonsuz teşekkürler...

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından desteklenen "Bazı Baharatların Farklı Ekstraktlarının Antioksidan Özelliklerinin İncelenmesi" başlıklı TÜBAP 2010-03- no'lu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

## ÖZGEÇMİŞ

1985 Tekirdağ doğumluyum. İlköğretim ve lise öğrenimimi sırasıyla Atatürk İlköğretim Okulu, Hisar İlköğretim Okulu ve Hayrabolu Anadolu Lisesi'nde tamamladım.

2004-2008 yılları arasında Trakya Üniversitesi Fen–Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde devam ettim. 2008 yılında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimime başladım. Lisans öğrenimi sırasında zorunlu stajımı C.P. STANDART GIDA SANAYİ VE TİCARET ANONİM ŞİRKETİ'nde tamamladım.