



**T.C**  
**SELÇUK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**KİMYA ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANTALYA'DA YETİŞEN *Ziziphus zizyphus*'un ANTIOKSİDAN AKTİVİTESİ VE  
BİYOKİMAYSAL BİLEŞİMİNİN İNCELENMESİ**

**Danışman**  
**PROF. DR. SALİH YILDIZ**

**Hazırlayan**  
**FATİH UÇKAYA**

**Eylül, 2011**

## TEZ KABUL VE ONAYI

Fatih UÇKAYA tarafından hazırlanan “Antalya’da yetişen *Ziziphus zizyphus*’un antioksidan aktivitesi ve biyokimyasal bileşiminin incelenmesi” adlı tez çalışması 12/10/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS olarak kabul edilmiştir.

### Jüri Üyeleri

#### Başkan

Prof. Dr. Mehmet SEZGİN

#### Danışman

Prof. Dr. Salih YILDIZ

#### Üye

Prof. Dr. Tevfik ATALAY

### İmza



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Bayram SADE  
FBE Müdürü

Bu tez çalışması BAP tarafından 11201060 nolu proje ile desteklenmiştir.

## TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

## DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Fatih UÇKAYA

12.10.2011



## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

# ANTALYA'DA YETİŞEN *Ziziphus zizyphus*'UN ANTIOKSİDAN AKTİVİTESİ VE BİYOKİMAYSAL BİLEŞİMİNİN İNCELENMESİ

**Fatih UÇKAYA**

**Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Fizikokimya Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Salih YILDIZ**

**2011, 62 Sayfa**

**Jüri**

**Prof. Dr. Salih YILDIZ  
Prof. Dr. Mehmet SEZGİN  
Prof. Dr. Tevfik ATALAY**

Bu çalışmada Antalya'da yetişen *Ziziphus zizyphus* adlı bitkinin metanol ekstraktının biyokimyasal bileşimini, antioksidan aktivitesini ve toplam fenolik ve flavonoid madde miktarlarını tayin ettik. Antioksidan kapasite tayini için, demir ve bakır indirgeme gücü (FRAP ve KUPRAK), DPPH radikalini süpürme aktivitesi ve  $\beta$ -karoten-linoleik asid metodunu gerçekleştirdik. Ekstraktın toplam fenolik ve flavonoid madde miktarlarını sırasıyla gallik asit ve kuersetine eşdeğer olarak bulduk. 2 mg/mL metanolik ekstrakt 0,58 mg/mL gallik asite eşdeğer fenolik madde ve 0,24 mg/mL kuersetine eşdeğer flavonoid madde ihtiva ederek yüksek antioksidan aktivite gösterdi. Bununla birlikte bu çalışmada *Ziziphus zizyphus*'un fenolik maddelerinin tayinini sıvı kromatografisi ile gerçekleştirdik. Sonuçlar gösterdi ki Antalya'de yetişen *Ziziphus zizyphus* standartlar ve yapılmış bazı çalışmalarla karşılaştırıldığında doğal bir antioksidan madde kaynağıdır.

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidan aktivite, FRAP, KUPRAK, yağ asidi, *Ziziphus zizyphus*.

## **ABSTRACT**

### **MS THESIS**

#### **ANALYSIS OF BIOCHEMICAL COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *Ziziphus zizyphus***

**Fatih UÇKAYA**

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK  
UNIVERSITY  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN DEPARTMENT OF CHEMISTRY**

**Advisor: Prof. Dr. Salih YILDIZ**

**2011, 62 Pages**

**Jury**

**Prof. Dr. Salih YILDIZ  
Prof. Dr. Mehmet SEZGIN  
Prof. Dr. Tevfik ATALAY**

In this study, we investigated biochemical compounds, the antioxidant capacity and total phenolic and flavonoid contents of methanolic extract of *Ziziphus zizyphus* from Antalya. The antioxidant capacity of the methanolic extract from *Ziziphus zizyphus* fruits was measured by various assays including ferric reducing antioxidant power assay, cupric reducing antioxidant capacity assay, DPPH radical scavenging and  $\beta$ -caroten-linoleic acid assay. Total phenolic and flavonoid content of the extract were measured as gallic acid and quercetin equivalent by Folin–Ciocalteu reagent and aluminium chelating method, respectively. The methanolic extract showed higher antioxidant activity related to high phenolic content with 0,58 mg/mL GAE and flavonoid content with 0,24 mg/mL QE dry weight. Phenolics of the methanolic extract of *Ziziphus zizyphus* were analysed by high performance liquid chromatography. Data suggested that *Ziziphus zizyphus* grown in Antalya may be importance source as natural antioxidant when it was compared with standarts and old articles about the same methods.

**Keywords:** Antioxidant activity, CUPRAC, fatty acid, FRAP, *Ziziphus zizyphus*.

## ÖNSÖZ

“Antalya’da yetişen *Ziziphus zizyphus*’un antioksidan aktivitesi ve biyokimyasal bileşiminin incelenmesi” adlı bu çalışma Prof. Dr. Salih YILDIZ danışmanlığında hazırlanmış olup, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Fen Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı’na yüksek lisans tezi olarak sunulmuştur.

Yüksek lisans eğitimim boyunca tüm olanak ve bilgilerini sağlayan, tezin gelişimini titizlikle inceleyen ve yöneten sayın hocam Prof. Dr. Salih YILDIZ’a, araştırmanın yürütülmesinde bilimsel alt yapı imkânlarını sağlayan ve deneyimleriyle çalışmanın verimli olmasına katkıda bulunan Arş. Gör. Dr. Esra MALTAŞ’a teşekkürlerimi sunarım.

Hiçbir zaman maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve tüm yaşantım boyunca her zaman yanımda olan sevgili aileme de sonsuz teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Fatih UÇKAYA  
Konya, 2011

# İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>vii</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	<b>x</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Serbest Radikaller .....	2
1.1.1. Serbest radikal oluşumu ve reaktif oksijen türleri.....	3
1.1.1.1. Süperoksit radikali.....	3
1.1.1.2. Hidrojen peroksit.....	5
1.1.1.3. Hidroksil radikali.....	6
1.1.1.4. Singlet oksijen .....	6
1.1.1.5. Nitrik oksit.....	7
1.1.2. Serbest radikal kaynakları .....	7
1.1.3. Serbest radikallerin etkileri .....	8
1.1.3.1. Membran lipitlerine etkileri.....	8
1.1.3.2. Proteinlere etkileri .....	9
1.1.3.3. Nükleik asitler ve DNA'ya etkileri .....	9
1.2. Antioksidanlar .....	9
1.2.1. Endojen antioksidanlar .....	11
1.2.1.1. Enzim olan endojen antioksidanlar .....	11
1.2.1.2. Enzim olmayan endojen antioksidanlar .....	12
1.2.2. Eksojen antioksidanlar .....	12
1.2.2.1. Vitamin eksojen antioksidanlar .....	12
1.2.2.2. İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar .....	13
1.2.2.3. Gıdalardaki eksojen antioksidanlar .....	13
1.3. Antioksidan Reaksiyon Mekanizması .....	13
1.4. Oksidatif Stres .....	15
1.4.1. Oksidatif stres araştırmaları .....	15
1.5. Antioksidan Tayin Yöntemleri .....	16

1.5.1. Oksijen radikal absorbands kapasitesi (ORAC) tayini.....	17
1.5.2. Toplam radikal yakalayıcı parametre (TRAP) tayini.....	19
1.5.3. Krosin beyazlatma yöntemi.....	20
1.5.4. Toplam oksiradikal söndürme kapasite (TOSC) tayini.....	20
1.5.5. Toplam fenolik madde tayini .....	21
1.5.6. Troloksa eşdeğer antioksidan kapasite (TEAC) tayini.....	22
1.5.7. Demir indirgeme gücü (FRAP) .....	23
1.5.8. Bakır indirgeme gücü (KUPRAK).....	23
1.5.9. DPPH tayini.....	24
<b>2. <i>Ziziphus zizyphus</i> (HÜNNAP) .....</b>	<b>26</b>
2.1. <i>Ziziphus zizyphus</i> İle İlgili Botanik Bilgi .....	26
2.2. <i>Ziziphus zizyphus</i> 'un Yetiştığı Yerler .....	26
2.3. <i>Ziziphus zizyphus</i> 'un Faydaları .....	26
<b>3. MATERYAL ve METOT .....</b>	<b>27</b>
3.1. Materyal .....	27
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	27
3.1.2. Cihazlar .....	27
3.2. Metot .....	27
3.2.1. Bitki ekstraktlarının hazırlanması .....	27
3.2.2. Toplam fenolik ve flavonoid madde tayini .....	27
3.2.3. DPPH tayini.....	28
3.2.4. $\beta$ -karoten lineolik asit emülsiyon yöntemi .....	28
3.2.5. Demir İndirgeme Gücü (FRAP).....	29
3.2.6. Bakır indirgeme gücü (KUPRAK).....	29
3.2.7. HPLC analizi .....	30
<b>4. DENEYSEL SONUÇLAR.....</b>	<b>31</b>
4.1. Toplam Fenolik ve Flavonoid Madde Tayini Sonuçları .....	31
4.2. DPPH Tayini Sonuçları.....	33
4.3. $\beta$ - Karoten Lineolik Asit Emülsiyon Yöntemi Sonuçları.....	35
4.4. Bakır İndirgeme Gücü (KUPRAK) Sonuçları.....	36
4.5. Demir İndirgeme Gücü (FRAP) Sonuçları.....	37
4.6. HPLC Analizi Sonuçları.....	38



<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>41</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>45</b>
<b>7. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>52</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

A•:	Aktif antioksidan molekülü
AH:	Antioksidan molekülü
AO:	İnaktif antioksidan molekülü
Cu(II)-Nc:	Bakır(II)-neokuproin kelatı
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Hidrojen peroksit
HOCl:	Hipoklorik asit
LOOH:	Lipid peroksitleri
LOO•:	Lipid peroksit radikalleri
L•:	Lipid radikali
NO•:	Nitrik oksit
OH•:	Hidroksil radikali
O <sub>2</sub> • <sup>-</sup> :	Süperoksit
Tween 20:	Polioksietilensorbitan monolaurat

### Kısaltmalar

BHA:	Bütillenmiş hidroksianisol
BHT:	Bütillenmiş hidroksitoluen
CAT:	Katalaz enzimi
DNA:	Deoksiribo nükleik asit
DPPH :	1,1-Difenil 2-pikril hidrazil
DPPH• :	1,1-Difenil 2-pikril hidrazil radikali
DPPH-H :	İndirgenmiş 1,1-difenil 2-pikril hidrazil
GAE:	Galik asit ekivalent
GPx:	Glutatyon peroksidaz
MDA:	Malondialdehit
QE :	Kuersetin ekivalent
ROT:	Reaktif oksijen türleri
SOD:	Süperoksit dismutaz enzimi
TCA:	Triklorasetik asit
TEAC:	Troloks eşdeğer antioksidan aktivitesi
Trolox:	6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilik asit

## 1. GİRİŞ

Serbest radikal, dış yörüngesinde tek sayıda elektron bulunduran bir atom veya moleküldür. Hem organik hem de inorganik moleküller halinde bulunurlar.

Serbest radikaller son yıllarda en çok üzerinde durulan konulardan biridir. Serbest radikallerin hücresel kaynakları, görev aldıkları reaksiyonlar ve serbest radikallerin zararlarını önleyici antioksidan mekanizmaların çözülmesi, pek çok hastalık için son derece önemlidir.

Serbest radikaller etkilediği atomun, buna bağlı olarak da o atomun bulunduğu maddenin işlevini yerine getirememesine neden olur. Etkilenen maddenin biyolojik önemine ve onun tamir edilip edilememesine bağlı olarak geçici veya kalıcı etkiler gözlenir.

Genelde oksijen, hidrojen ve hidroksil tipinde olan serbest radikaller, elektron ihtiyaçlarını elektron verme özelliği yüksek olan antioksidanlardan sağlarlar. Antioksidanlar, serbest radikalleri nötralize ederek vücudun serbest radikallerden etkilenmemesini veya kendini yenilemesini sağlayan maddelerdir. Eğer serbest radikaller nötralize edilmezlerse vücutta ciddi hasarlara sebep olabilirler. Günümüzde serbest radikallerin tüm sistemlerle ilgili birçok hastalığa neden olduğu düşünülmektedir.

Antioksidanlara verilen önem, sağlığa olumlu katkıları nedeniyle her geçen gün artmaktadır. Son dönemin en popüler destek maddelerinden olan antioksidanlar, yaşam süresini uzatan, kanser, kalp hastalıkları gibi hastalıklara yakalanma riskini azaltan ve yaşlanmayı geciktiren etkileri sayesinde herkes tarafından bilinir ve kullanılır hale gelmiştir.

Yaşamımız için vazgeçilmez olan oksijen bazı durumlarda vücudumuza zarar verebilir. Oksijenin bu olası zararının nedeni, vücudumuzda oksijen kullanılarak gerçekleşen metabolik tepkimelerin sonucunda kimyasal tepkimeye girmeye yatkın yani reaktif oksijen türlerinin oluşmasıdır. Serbest radikaller olarak bilinen bu moleküller, lipit, protein, DNA ve benzeri hücre bileşenlerine zarar verebilirler. Ardından erken yaşlanma, kanser, kalp ve damar hastalıkları gibi sorunlarla karşılaşılabilir.

Aerobik yani oksijenli solunum yapan organizmalarda gelişmiş olan antioksidan savunma sistemleri, yapılarında eşleşmemiş bir elektron bulunduran serbest radikallerin oluşumunu kontrol eder ve bu moleküllerin zararlı etkilerine engel olur. Böylece hücre hasar görmez ve hastalıklardan korunmuş olur. Ancak bazen mevcut antioksidan savunma sisteminin serbest radikallerin etkisini tamamen önleyemediği durumlar da olabilir. İşte o zaman serbest radikallerin artışı nedeniyle oksidatif stres adı verilen durum ortaya çıkar.

Beynin oksidatif strese karşı savunmasız olması nedeniyle meydana gelen beyin hasarlarını tedavi etmek için antioksidanlar yaygın olarak kullanılmaktadır.

Tedavilerde kullanılacak antioksidan bileşimlerinin sinir hücrelerindeki oksidatif stresi engelleyerek hücre ölümünün ve nörolojik hasarın önüne geçtikleri bilinmektedir. Antioksidanların Alzheimer, Parkinson, motor nöron hastalığı olarak bilinen ALS (Amiyotrofik Lateral Skleroz) ve gürültüye bağlı işitme kaybının tedavisi için kullanılmasına yönelik araştırmalar devam etmektedir.

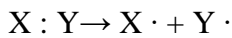
Hücrelerde üretimi gerçekleştirilemeyen antioksidanlar ancak besinlerle ya da bazı hazır antioksidan destekleriyle alınabilir. Yapılan bir çalışmada günlük beş porsiyon meyve ve sebze tüketen kişilerde felç olma riskinin % 25 azaldığı tespit edilmiştir. Diğer çalışmalarda antioksidan bakımından zengin besinler tüketmenin birçok hücre ve dokuların çeşitli yapısal değişimlere uğraması sonucu oluşacak hastalıklara yakalanma riskini düşürdüğü görülmüştür.

### 1.1. Serbest Radikaller

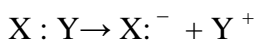
Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküllerdir. Bu tip maddeler, ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftir. Yarı ömürleri çok kısadır. Serbest radikaller normal metabolik olaylar sırasında oluşabilecekleri gibi çok çeşitli dış etkenlere bağlı olarak da oluşabilirler (Barber ve ark., 1994; Halliwell, 1994).

Serbest radikaller üç yolla meydana gelirler (Cheeseman ve ark., 1993):

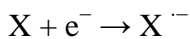
1- Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı sonucu oluşurlar (Bölünme sonrası her bir parçada ortak elektronlardan biri kalır).



2- Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ile oluşurlar. Heterolitik bölünmede kovalent bağ oluşturulan her iki elektron, atomlardan birisinde kalır.



3- Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi.

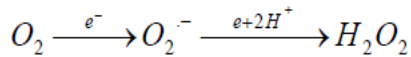


Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelirler. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötr olabilirler. Organik veya inorganik moleküller şeklinde olabilirler.

İki serbest radikalın birbiri ile reaksiyona girmesi sonucu radikal olmayan bir bileşik ortaya çıkar ve her iki serbest radikal ortadan kalkar. Bir serbest radikal, radikal olmayan bir yapıyla reaksiyona girince başka bir serbest radikal oluşturur. Bu özellik serbest radikallerin zincir reaksiyonları oluşturabilmelerini sağlar (Mccord, 1985).

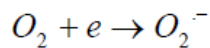
### 1.1.1. Serbest radikal oluşumu ve reaktif oksijen türleri

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler, oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metalleri iyonları ve hidroksil radikalidir. Oksijen atomu toplam sekiz elektron içerir. Bu elektronlardan dış yörüngede bulunan iki tanesi eşleşmemiştir. Moleküler oksijen ( $O_2$ ), iki tane eşleşmemiş elektronu bulunduğu için kendisi de bir radikaldir. Her iki atom denge halinde olduğundan bu oksijen molekülünün reaktif bir özelliği yoktur. Bu özelliğinden dolayı oksijen, diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer. Radikal olmayan maddelerle ise daha yavaş reaksiyona girer. Oksijen en son suya indirgenir. Mitokondriyal elektron transport zinciri tarafından gerçekleştirilen bu süreçte, %1-2 oranında moleküler oksijen kaçığı meydana gelir. Bu oksijenin redüksiyonu ile süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi reaktif ürünler açığa çıkar. Bu radikaller oksijenin toksik etkisinin gerçek nedenini oluştururlar (Bast ve ark., 1991; Cheeseman ve ark., 1993).



#### 1.1.1.1. Süperoksit radikali

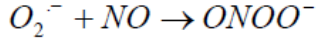
Tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu, serbest süperoksit radikal anyonu ( $O_2^-$ ) meydana gelir (Brunori ve ark., 1984).



Diğer radikallere oranla reaktivitesi çok azdır. Oluşumuna neden olduğu radikallerle birlikte organizmada genel bir oksitleyici gibi davranmaktadır. Süperoksit, bir serbest radikal

olmakla birlikte kendisi direkt olarak fazla zarar vermez. Hidrojen peroksidin kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olması bakımından önemlidir (Mccord, 1993).

Süperoksidin, fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit ile birleşmesi sonucu reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitrit meydana gelir.

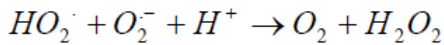


Böylece NO'nın normal etkisi inhibe edilir. Ayrıca, peroksinitritlerin doğrudan proteinlere zararlı etkileri vardır ve azot dioksit (NO<sub>2</sub>), hidroksil radikali (OH<sup>·</sup>) ve nitronyum iyonu gibi daha başka toksik ürünlere dönüşürler.

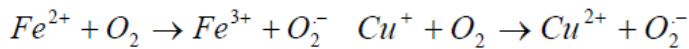
Süperoksit, düşük pH değerlerinde daha reaktif olup oksidan perhidroksil radikali (HO<sub>2</sub><sup>·</sup>) oluşturmak üzere protonlanır. Fizyolojik pH'daki protonlanmış formu % 1'den azdır. Süperoksit anyonu hem oksitleyici hem de redükleyici özelliğe sahiptir. Redüktan olarak görev yaptığında, örneğin ferrisitokrom C'nin ya da nitroblue tetrazolium'un redüksiyonunda bir elektron kaybeder ve oksijene okside olur. Sitokrom C'yi indirgemesi SOD tarafından inhibe edilir. Bundan faydalanılarak SOD aktivitesi ve fagositler tarafından üretilen O<sub>2</sub><sup>-</sup> tayini yapılır (Weiss, 1986).

Oksidan olarak görev yaptığında, örneğin epinefrinin oksidasyonunda bir elektron alır ve hidrojen perokside indirgenir.

Süperoksit ile perhidroksil radikali birbirleriyle reaksiyona girince biri okside olur diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonunda oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelir.



İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu da süperoksit meydana getirebilir.

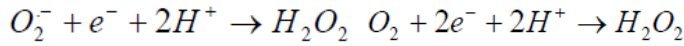


Bu reaksiyonlar geri dönüşümlüdürler. Bu yüzden, geçiş metalleri iyonlarının oksijenle reaksiyonları geri dönüşümlü redoks reaksiyonları olarak düşünülebilir.

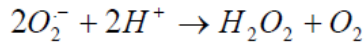
Süperoksit radikali, sülfidril gruplarının disülfidlere yükseltgenmesine ve ferrik demirin ferröz formuna indirgenerek ferritinden demirin direkt olarak ayrılmasına neden olur. Ferritin, demirin güvenli depolama formudur. Demir, süperoksit radikali ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den OH üretimini teşvik eder (Bilinski ve ark., 1989; Akkuş, 1995).

### 1.1.1.2. Hidrojen peroksit

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü iki hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksiti ( $H_2O_2$ ) meydana getirir.  $H_2O_2$  membranlardan kolayca geçebilen uzun ömürlü bir oksijendir (Markesbery, 1997).

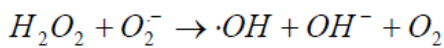


Hidrojen peroksit genellikle biyolojik sistemlerde süperoksidin dismutasyonu ile meydana gelir. İki süperoksit molekülü iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar. Reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden bu bir dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir.

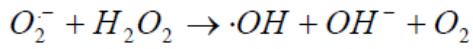
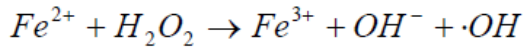
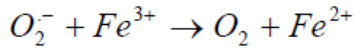


Bu dismutasyon ya spontandır ya da SOD enzimi tarafından katalizlenir. Spontan dismutasyon pH 4,8'de en hızlıdır. Bu pH'ta protonlanmış ve protonlanmamış radikal konsantrasyonları eşittir. Fakat hem protonlanmış radikalın arttığı daha asit pH'ta hem de süperoksit iyonunun fazla olduğu alkali pH'ta bu hız belirgin şekilde düşüktür. Süperoksidin SOD tarafından dismutasyonu ise daha geniş bir pH aralığında katalizlenir. Spontan dismutasyonun nispeten yavaş olduğu nötral ya da alkali pH'ta enzimatik dismutasyon daha belirgindir (Klebanoff, 1980; Cheeseman ve ark., 1993; Akkuş, 1995).

Hidrojen peroksit, bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü süperoksit ile reaksiyona girerek, en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir.



Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu adı verilir. Katalizör varlığında veya katalizörsüz oluşabilir. Fakat katalizörsüz reaksiyon çok yavaş ilerler. Demirle katalizlenen ikinci şekil ise çok hızlıdır ve fenton reaksiyonu adını alır. Bu reaksiyonda önce ferri demir ( $Fe^{3+}$ ) süperoksit tarafından ferro demire ( $Fe^{2+}$ ) indirgenir. Sonra bu ferro demir kullanılarak fenton reaksiyonu ile hidrojen peroksitten  $\cdot OH$  ve  $OH^-$  üretilir.



Mitokondride bol miktarda  $H_2O_2$  bulunur. Metal iyonları da çok olduğu için çok fazla hidroksil radikali üretimi söz konusudur. Bu metal katyonları, DNA veya hücre zarına bağlanırsa hidroksil radikali oluşumuna sebep olabilir (Reiter, 1998).

### 1.1.1.3. Hidroksil radikali

Oksijen radikalleri içinde en reaktif ve en toksik etkili olanı hidroksil radikalidir ( $\cdot OH$ ). Hidroksil radikali ( $\cdot OH$ ), hidrojen peroksidin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesiyle meydana gelir. Suyun yüksek enerjili iyonize radyasyona maruz kalması sonucunda da hidroksil radikali oluşur. Yarılanma ömrü çok kısadır. Oluştığı yerde büyük hasara sebep olur. Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları hidroksil oluşumundaki en önemli reaksiyonlardır (Mccord ve ark., 1978).

Hidroksil radikali oluşunca hemen üretildiği yerin birkaç  $\text{\AA}$  uzaklığında herhangi bir moleküle reaksiyona girer. Reaktifliği yüksek olduğu için  $37^\circ\text{C}$ 'da beklenen yarılanma ömrü  $1 \times 10^{-9}$  saniyedir (Karbownik ve ark., 2000).

Nükleer ve mitokondriyal DNA, membran lipitleri ve karbonhidratları gibi, hücrenin makro molekülleri üzerine yıkıcı etki yapmamaktadır (Halliwell ve ark., 1993; Halliwell, 1994).

### 1.1.1.4. Singlet oksijen

Singlet oksijen ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür (Akkuş, 1995). Serbest radikal olmamasına rağmen çok reaktif olması ve üretimi sırasında bazı radikalik tepkimeler oluşması nedeniyle aynı aileden sayılmaktadır (Halliwell ve ark., 1989). Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da neden olur.

Oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitalle yer değiştirmesiyle oluşur. Enerji absorpsiyonu ile uyarılan oksijenin paylaşılmamış dış elektronları spinlerini değiştirerek ayrı ayrı ya da aynı orbitali işgal edebilir. Bu iki forma singlet oksijen adı verilmektedir. Singlet oksijen, uyarılmış elektronların daha düşük enerji seviyelerine inmesiyle ışık yayar (Cheeseman ve ark., 1993).



### 1.1.1.5. Nitrik oksit

Nitrik oksit (NO<sup>•</sup>), tek sayıda elektron içeren renksiz gaz şeklinde bulunan inorganik bir serbest radikaldir. Bakteriler, sigara dumanı ve egzoz gazları reaktif azot oksitleri üretir. NO kararlı bir serbest radikaldir ve fizyolojik şartlar altında birçok fonksiyonda rol oynar (Simonian ve ark., 1996). Hücre içi konsantrasyonu fazla arttığında nöron ölümü ile sonuçlanan toksik olayları başlatır. Nitrik oksit, biyolojik sistemlerde O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup> ve geçiş metalleriyle reaksiyona girer. Metal ve tiyol içeren proteinlerle yürüyen reaksiyonlar, enzim aktivitelerinde zayıflamaya neden olur. Nitrik oksitin elektron tranport zincirindeki demir içeren komplekslere saldırması, bozulmuş enerji metabolizmasıyla sonuçlanır. Nitrik oksit oluşumunun artması sinir hücreleri tahribatına yol açar (Reiter, 1998).

### 1.1.2. Serbest radikal kaynakları

Biyolojik sistemlerde serbest radikal oluşumu normal metabolik olayların seyri esnasında ve organizmanın çeşitli dış etkilere maruz kalmasıyla meydana gelir. Serbest radikaller, iyonize radyasyon, stres yapıcı durumlar, enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlar sonucunda vücuttaki biyolojik fonksiyonların yan ürünü olarak oluşurlar (Basaga, 1990).

#### a- Biyolojik kaynaklar

- i. Aktive olmuş fagositler
- ii. Antineoplastik ajanlar: nitrofurantoin, bleomisin, doxorubicine
- iii. Radyasyon
- iv. Alışkanlık yapan maddeler: alkol ve uyuşturucu maddeler
- v. Çevresel ajanlar (hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler; hiperoksi, pestisitler, sigara dumanı, solventler, anestezikler, aromatik hidrokarbonlar)
- vi. Stres: Streste katekolamin düzeyi artar. Katekolaminlerin oksidasyonu ise serbest radikal kaynağıdır.

#### b- İntrasellüler kaynaklar

- i. Küçük moleküllerin otooksidasyonu
- ii. Enzimler ve proteinler : ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, hemoglobin
- iii. Mitokondrial elektron transportu
- iv. Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri
- v. Peroksizomlar : oksidazlar, flavoproteinler

vi. Plazma membranı : lipoksijenaz, prostoglandin sentetaz, fagositlerde NADPH oksidaz, lipit peroksidasyonu

vii. Oksidatif stres yapıcı durumlar : iskemi, travma, intoksikasyon

Hücrelerde serbest radikal üretimi, bazı yabancı toksik maddeler tarafından da büyük oranda arttırılabilir. Bu maddeler ya doğrudan serbest radikal üretirler veya antioksidan aktiviteyi düşürürler. Bu tip maddeler dört grupta toplanabilirler;

i. Toksinin kendisi bir serbest radikaldir. Kirli havanın koyu rengini veren azot dioksit gazı örnek olarak verilebilir. Bu radikal iyi bir lipit peroksidasyon başlatıcısıdır.

ii. Toksin bir serbest radikale metabolize olur. Mesela, toksik bir madde olan karbontetraklorür karaciğerde sitokrom P-450 tarafından triklorometil serbest radikale dönüşür. Bu radikalın oksijenle reaksiyonu sonucu meydana gelen peroksil radikali de kuvvetli bir lipit peroksidasyonu başlatıcısıdır. Böylece, reaktif serbest radikal üretimi, karaciğerde antioksidan savunmaları aşar. Bu da hücre membranlarının oksidatif yıkımı ve ciddi doku hasarı ile sonuçlanır.

iii. Toksinin metabolizması sonucu serbest oksijen radikali meydana gelir. Bunun tipik bir örneği paraquat'tır. Özellikle karaciğerde biriken paraquat, bir serbest radikale indirgenikten sonra tekrar yükseltgenerek rejenere edilirken beraberinde oksijen indirgenir. Böylece bol miktarda süperoksit üretilmiş olur.

iv. Toksin antioksidan aktiviteyi düşürür. Mesela parasetamolün karaciğerde sitokrom P-450 tarafından metabolizması glutatyonla reaksiyona giren ve miktarını azaltan bir ürün meydana getirir.

### **1.1.3. Serbest radikallerin etkileri**

#### **1.1.3.1. Membran lipitlerine etkileri**

Serbest radikaller biyomoleküllerin çoğunu etkiler, ancak lipitler en hassas olanlarıdır (Igarı ve ark., 1982). Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranlarda oluştuğları zaman organizmada çeşitli bozukluklara yol açarlar. Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Poliansatüre yağ asitleri (PUFA)'nın oksidatif yıkımı, lipit peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerlerler. Lipit peroksidasyonu, lipit hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesiyle son bulur. Bu ürünlerden başlıcaları olan hidroksinonenal (HNE) ve MDA, proteinlere ve DNA'ya bağlanarak kalıcı değişiklikler

oluşturur. Lipit peroksidlerinin hücre yaşamı için en önemli etkileri, membran yapısında ve hücre bölünmesinde meydana getirdikleri değişimlerdir (Erden, 1992; Akkuş, 1995).

### **1.1.3.2. Proteinlere etkileri**

Proteinlerin serbest radikal hasarından etkilenme derecesi amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Protein oksidasyonu, özellikle histidin, tirozin, fenilalanin gibi amino asitlerde karbonil gruplarının oluşumu şeklindedir. Proteinlerde fragmantasyon ve çapraz bağlanmalar meydana gelir. Protein fonksiyonlarında (kataliz, transport, reseptör gibi) bozulmalar ve immün sistemi uyarabilecek antijenik değişiklikler oluşabilir (Simonian ve ark., 1996).

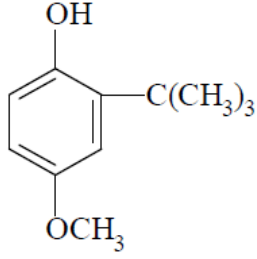
Serbest radikal hasarı proteinler üzerinde birikmişse veya proteinlerin belirli bölgesi üzerinde yoğunlaşmışsa hücrenin canlılığı bakımından zararlı etki yapar (Erden, 1992; Cheeseman ve ark., 1993).

### **1.1.3.3. Nükleik asitler ve DNA'ya etkileri**

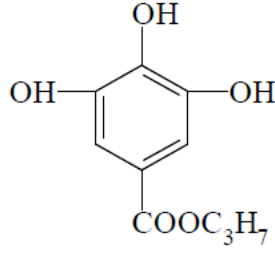
DNA yapısında oksidatif hasara sebep olan pek çok faktör vardır. İyonize radyasyon, artmış oksijen konsantrasyonu, ksantin oksidaz ve çeşitli kimyasallar aşırı radikal oluşumuna neden olarak direkt hasara yol açarlar. Bazı serbest radikaller de DNA tamir enzimlerini etkileyerek hasara yol açarlar. İyonize radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede değişime ve ölüme yol açarlar. DNA yapısındaki pürin ve pirimidin bazlarında parçalanma ve yıkım sonuçta DNA'nın denatürasyonuna neden olur. Oksidatif hasar dal kırıkları, baz çifti değişimleri, yeniden düzenlenme gibi yapısal değişimlere neden olmaktadır. DNA, serbest radikallerden kolay zarar görebilir önemli bir hedeftir. (Winrow ve ark., 1993; Halliwell, 1994).

## **1.2. Antioksidanlar**

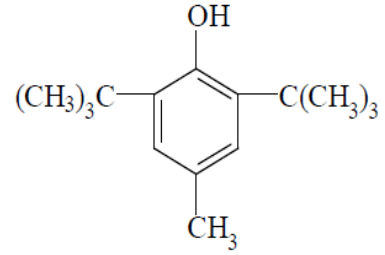
Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler.



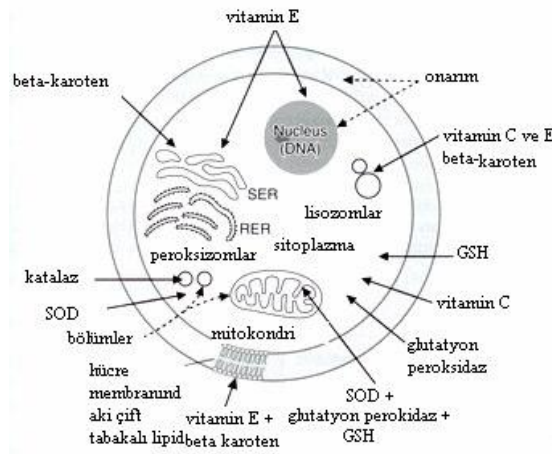
Bütül hidroksianisol (BHA)



Bütül hidroksitoluen (BHT)



Propil gallat



Şekil 1.1. Antioksidanların hücredeki etkileri

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler:

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

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

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

4) Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması *onarıcı etkidir*.

Antioksidanlar, sadece gıda katkı maddesi veya besin destek ünitesi olarak vücuda alınmazlar, serbest radikallerin oluşumunu ve yaptıkları hasarı önlemek için de vücutta birçok savunma mekanizması mevcuttur. Antioksidanlar onların zararlı etkilerini inaktif eden maddelerdir (Akkuş, 1995).

Günümüzde antioksidanların gıda sanayinde kullanımı oldukça yaygın olup hemen hemen tükettiğimiz her ürüne antioksidan maddeler katılmaktadır. Bunlar gıdaları bozulmaya karşı korumakta olup onların daha uzun süreli saklanması sağlar, bunlardan bazıları bütillenmiş hidroksi toluen (BHT) ve bütillenmiş hidroksi anisol (BHA) bileşikleridir ancak bunların toksik etkilerinden şüphelenilmektedir. Bu nedenle son yıllarda yeni, daha güvenli ve ucuz antioksidan maddelerin bulunması için doğal ürünler üzerinde yaygın çalışmalar yapılmaktadır (Dawn ve ark., 1996; Akkuş, 1995; Tietz, 1995; Burtis ve ark., 1999).

Antioksidanlar vücutta çok kısa ömürlü fakat saldırgan olan serbest radikaller diye adlandırılan moleküllerle savaşırlar. Eğer serbest radikaller nötralize edilmezlerse vücutta ciddi hasarlara neden olabilirler.

Sürekli gelişmekte olan teknoloji, oluşan çevre kirliliği, sigara, UV vb. pek çok diğer etken sürekli olarak çeşitli toksik maddelerle karşı karşıya kalmamıza neden olmaktadır. Bu etkiler kendini serbest radikal oluşumuyla gösterir. Tüm bu nedenlerden dolayı dış etkilerle oluşan hastalıklar artmakta, genetik hastalıkların da çevresel etkilerle daha çok belirginleşmesine neden olmaktadır. Bu hastalıklara çözüm getirmek öncelikle bu hastalıkların oluşumunu engellemekle gerçekleşebilir. Bunun için de ilaçlardan öte alınan besinler önem kazanmaktadır. Serbest radikallerin etkilerini önleyen ve gıdalarda bol miktarda bulunması gereken C vitamini ve E vitamini kanser ve kalp hastalıkları gibi toplumda erken ölümlerin başlıca nedenleri olan hastalıkların oluşumunu önlemektedir. Besinlerin dışında dışarıdan yapılacak takviyelerin de yararlı olduğu yapılan doz tespit çalışmalarıyla anlaşılmıştır. Ancak vücudun hassas dengesi alınacak aşırı dozlarla bozulabilmekte, bunun sınırının konabilmesi gerekmektedir (Dawn ve ark., 1996; Akkuş, 1995; Tietz, 1995; Burtis ve ark., 1999).

Antioksidanlar, endojen veya eksojen olabilirler (Dawn ve ark., 1996; Akkuş, 1995; Tietz, 1995; Burtis ve ark., 1999).

### **1.2.1. Endojen antioksidanlar**

Endojen antioksidanlar, enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar.

#### **1.2.1.1. Enzim olan endojen antioksidanlar**

Enzim olan antioksidanlar aşağıda verilmiştir:

- 1) Süperoksit dismutaz (SOD)
- 2) Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)

- 3) Glutatyon S-Transferazlar (GST)
- 4) Katalaz (CAT)
- 5) Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi
- 6) Hidroperoksidaz

#### **1.2.1.2. Enzim olmayan endojen antioksidanlar**

Enzim olmayan antioksidanlar aşağıda verilmiştir:

- 1) Melatonin
- 2) Seruloplazmin
- 3) Transferrin
- 4) Miyogloblin
- 5) Hemoglobin
- 6) Ferritin
- 7) Bilirubin
- 8) Glutatyon
- 9) Sistein
- 10) Metiyonin
- 11) Ürat
- 12) Laktoferrin
- 13) Albümin

#### **1.2.2. Eksojen antioksidanlar**

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

##### **1.2.2.1. Vitamin eksojen antioksidanlar**

Vitamin olan eksojen antioksidanlar aşağıda verilmiştir:

- 1)  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E)
- 2)  $\beta$ -karoten
- 3) Askorbik asit (vitamin C)
- 4) Folik asit (folat)

### 1.2.2.2. İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar

İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar aşağıda verilmiştir:

- 1) Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten)
- 2) NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, diphenylene iodonium)
- 3) Rekombinant süperoksit dismutaz
- 4) Trolox-C (vitamin E analogu)
- 5) Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)
- 6) Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)
- 7) Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin)
- 8) Nötrofil adezyon inhibitörleri
- 9) Sitokinler (TNF ve IL-1)
- 10) Barbitüratlar

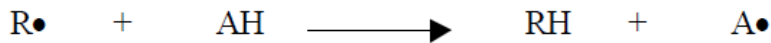
### 1.2.2.3. Gıdalardaki eksojen antioksidanlar

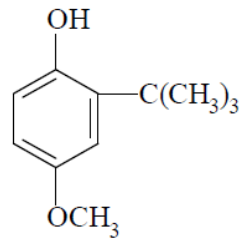
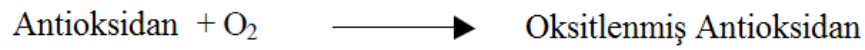
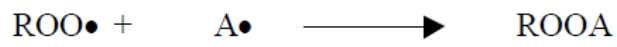
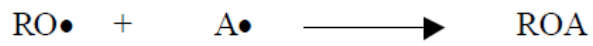
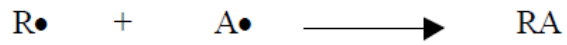
Gıdalardaki eksojen antioksidanlar aşağıda verilmiştir:

- 1) Butylated hydroxytoluene (BHT)
- 2) Butylated hydroxyanisole (BHA)
- 3) Sodium benzoate
- 4) Ethoxyquin
- 5) Propylgalate
- 6) Fe-superoxyde dismutase

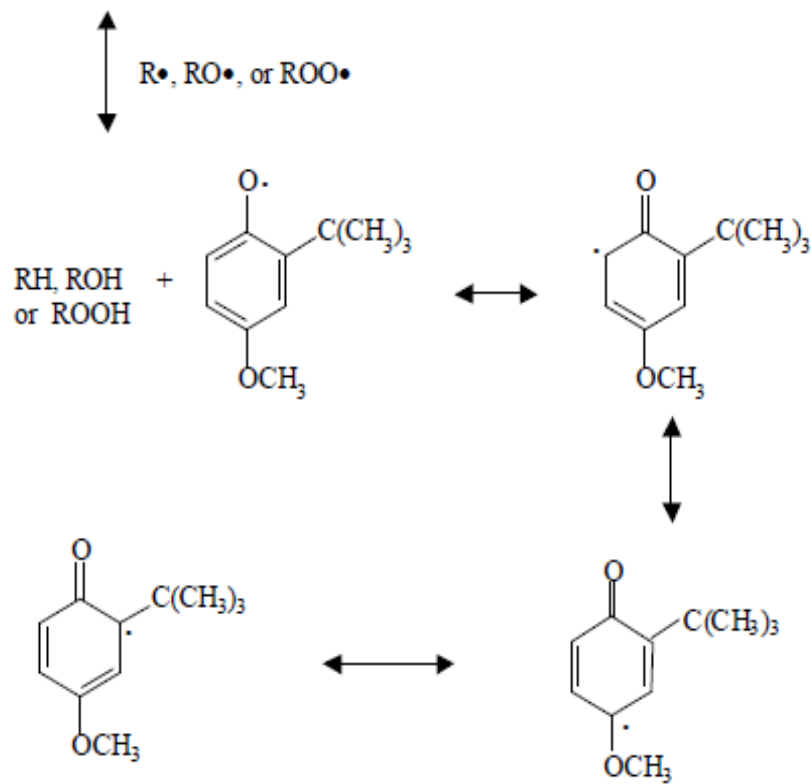
### 1.3. Antioksidan Reaksiyon Mekanizması

Antioksidanların radikallerle reaksiyonları:





Bütül Hidroksianisol (BHA)



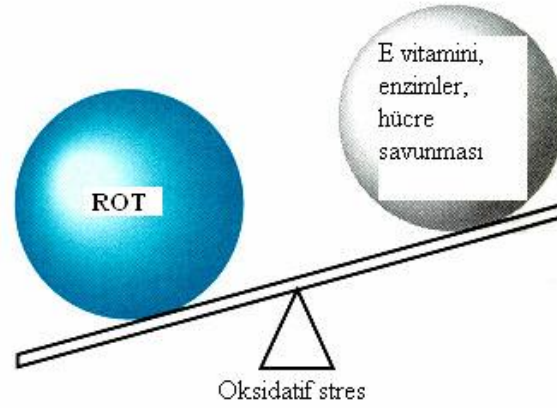
BHA sabit rezonans formu



## 1.4. Oksidatif Stres

Hücrede normal metabolik yollardaki enzimatik reaksiyonlarda enzimlerin aktif yerinde ara ürünler olarak devamlı şekilde serbest radikaller oluştuğunu biliyoruz. Bazen bu serbest radikal ara ürünler enzimlerin aktif yerinden sızmakta, moleküler oksijenle kazara etkileşerek serbest oksijen radikalleri oluşturmaktadırlar.

Hücrede oluşan reaktif oksijen türleri (ROT), "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinen mekanizmalarla ortadan kaldırılırlar. Ancak bazen hücresel savunma mekanizması vasıtasıyla ortadan kaldırılardan daha fazla reaktif oksijen türleri (ROT) oluşabilir. Organizmada Hücresel savunma mekanizması vasıtasıyla ortadan kaldırılardan daha fazla reaktif oksijen türlerinin (ROT) meydana gelmesi oksidatif stres olarak tanımlanır.



Şekil 1.2. Oksidatif stres

Oksidatif stresin, serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarıyla birçok kronik hastalığın komplikasyonlarına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Aterogenez, amfizem/bronşit, Parkinson hastalığı, Duchenne tipi musküler distrofi, gebelik preeklampsisi, serviks kanseri, alkolik karaciğer hastalığı, hemodiyaliz hastaları, diabetes mellitus, akut renal yetmezlik, Down sendromu, yaşlanma, retrolental fibroplazi, serebrovasküler bozukluklar, iskemi/reperfüzyon injürisi gibi durumların patogenezinde oksidatif stresin rolünden söz edilmektedir (Dawn ve ark., 1996; Akkuş, 1995; Tietz, 1995; Burtis ve ark., 1999).

### 1.4.1. Oksidatif stres araştırmaları

Oksidatif stresin hastalıkların patogenezinde rolü anlaşıldıkça bu alandaki çalışmalar da yoğunlaşmıştır. Oksidatif stres çalışmalarında serbest radikallerin artışı veya antioksidan

savunma sistemlerinin yetersizliği araştırılmaktadır. Bunun için plazma, serum, eritrosit, doku örnekleri gibi çeşitli materyallerde analiz yapmaya uygun yöntemler geliştirilmiştir.

Serbest radikaller son derece reaktif ve kısa ömürlüdürler. Bu yüzden direkt olarak ölçümleri zordur. Serbest radikalleri direkt olarak ölçen tek analitik teknik spin rezonans spektrometrisidir. Spin rezonans spektrometrisi ileri teknik donanım gerektirir, ayrıca çok duyarlı olmaması ve mikromolar düzeyde sabit konsantrasyonlarda serbest radikaller gerektirmesi nedeniyle kullanımı yaygın değildir (Dawn ve ark., 1996; Akkuş, 1995; Tietz, 1995; Burtis ve ark., 1999).

Serbest radikal üretimi artısının belirlenmesi için bunların lipidlerle, proteinlerle ve DNA ile reaksiyonları sonucu oluşan çeşitli ürünlerin ölçümü gibi indirekt yöntemler kullanılır. Bu yöntemler arasında lipid peroksidasyonunun son ürünlerinin ölçümü en çok kullanılan yöntemdir.

Hidroksil serbest radikali (OH•) reaksiyon ürünlerinin ölçümü ile tayin edilebilir. Hidroksil serbest radikali (OH•) salisilik asitle reaksiyona girerek 2,3-dihidroksibenzoat(2,3-DHB) ve fenilalanin ile reaksiyona girerek o- ve m-tirozinleri oluşturur. Organizma sıvılarında 2,3-dihidroksibenzoat (2,3-DHB) veya o- ve m-tirozinlerin tespiti hidroksil serbest radikalinin (OH•) artısını gösterir. Ancak bu teknik uygulanması zor ve sonuçları bakımından pek güvenilir değildir (Dawn ve ark., 1996; Akkuş, 1995; Tietz, 1995; Burtis ve ark., 1999).

### **1.5. Antioksidan Tayin Yöntemleri**

Reaktif oksijen türleri (ROS) aerobik organizmaların elektron taşıma zinciri ve aktif fagositoz gibi metabolik yollarında devamlı olarak oluşmaktadır (Lichtenthaler ve ark., 2003). Bu süreçlerde oluşan başlıca ROS'lar süperoksit anyon ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroksil radikal ( $HO^•$ ), peroksil radikal ( $ROO^•$ ), alkoksil radikal ( $RO^•$ ), hidroklorikasit ( $OHCl^•$ ) ve peroksinitrit ( $ONOO^•$ )'tir (Schoneich, 1999; Aruoma, 1998). ROS'lar DNA, protein ve lipit gibi makromolekülleri etkileyerek oksidatif hasara neden olurlar. Normal olarak ROS'lar spesifik enzim sistemleri (süperoksit dismutaz ve katalaz), suda ve lipitte çözünebilir bazı protein yapısında olmayan bileşikler (ürik asit ve tokoferol) tarafından engellenmektedir (Lichtenthaler ve ark., 2003). Bu ROS'ların antagonistleri vücudun ROS temizleyici antioksidanlarıdır. Antioksidanlar tarafından sunulan koruma sınırlıdır. Eğer ROS oluşumu biyolojik sistemlerin antioksidan kapasitesini aşarsa oksidatif stres oluşur. Bu nedenle gıdalarla antioksidanların vücuda alınımı kanser, kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli hastalıkları önlemede ve yaşlanma sürecini geciktirmede önemli rol oynamaktadır

(Lichtenthaler ve ark., 2003; Price ve ark., 2006). Epidemiyolojik çalışmalar gıdaların besleyici değerleri yanında insan sağlığı için faydalı etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Son yıllarda, bu alandaki araştırmalar gıdalardaki antioksidanları belirlemeye yoğunlaşmıştır. Özellikle meyveler vitamin C, vitamin E,  $\beta$ -karoten gibi yüksek miktarda antioksidan içerdikleri için özel bir ilgi çekmektedir (Ames ve ark., 1993). Bu nedenle gıda ve biyolojik sistemlerde doğal olarak bulunan birçok molekülün antioksidan kapasitesinin çalışılması önem kazanmıştır (MacDonald ve ark., 2006; Price ve ark., 2006).

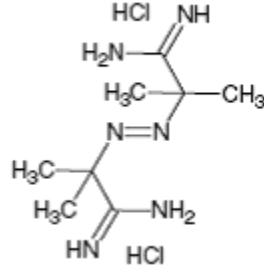
Antioksidan kapasiteyi ölçmek için bu güne kadar çok sayıda yöntem geliştirilmiştir (Prior ve ark., 1999; Decker ve ark., 2005). Toplam antioksidan kapasitenin ölçülmesini sağlayan yöntemler, hidrojen atomu transfer (HAT) reaksiyonlarına dayanan yöntemler ve elektron transferine (ET) dayanan yöntemler olmak üzere ikiye ayrılabilir. HAT temelli yöntemlerin birçoğu azobileşiklerin bozulması ile oluşan peroksil radikalleri için antioksidan ve substratın rekabetine dayanan yarışmacı reaksiyonları kullanmaktadır. Bu yöntemler oksijen radikal absorban kapasite (ORAC), toplam radikal yakalayıcı antioksidan parametre (TRAP) ve krosin beyazlatma yöntemlerini içermektedir. ET temelli yöntemler antioksidanın oksidantı indirgeme yeteneğini renk değişimi ile ölçer. Renk değişiminin derecesi örneklerin antioksidan konsantrasyonu ile alakalıdır. ET temelli yöntemler toplam Folin-Ciocalteu ayırıcı ile toplam Fenolik yöntemi (FCR), Troloks eşiti antioksidan kapasite (TEAC), demir iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP), oksidant olarak bakır (II) kullanan toplam antioksidan potansiyel yöntemi (CUPRAC) ve DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yöntemini içermektedir (Somogyi ve ark., 2007).

### **1.5.1. Oksijen radikal absorban kapasitesi (ORAC) tayini**

Oksijen radikal absorban kapasitesi (ORAC) yöntemi kimyasal biyomarkırlar kullanarak maddelerin toplam antioksidan güçlerini ölçen *in vitro* veya *in vivo* bir yöntemdir (Ellefson ve ark., 2006). Fitokimyasalların, bitkisel maddelerin, diğer biyolojik örneklerin ve gıdaların antioksidan kapasitesinin ölçülmesinde çok fazla kullanılan bir yöntemdir (MacDonald ve ark., 2006; Gillespie ve ark., 2007; Tomer ve ark., 2007).

Bu yöntem başlangıçta (Cao ve ark., 1998) tarafından geliştirilmiştir. Plazma ve doku homojenatlarında bulunan çeşitli doğal antioksidanların etkinliğini ölçen bu yöntem peroksil radikalinin neden olduğu oksidasyonun antioksidan tarafından inhibisyonunu temel almaktadır. Bu da flüoresans yoğunluğundaki azalma ile belirlenebilir. Bu nedenle bu yöntem sadece tek bir antioksidanın ölçülmesi için yeterli değildir. 2,2-azobis-(2-amidinopropan)

dihidroklorid (AAPH) gibi azo-bileşiklerin sıcaklıkla bozulması (Şekil 1.3) sonucu peroksil radikalleri oluşmaktadır (Somogyi ve ark., 2007).



Şekil 1.3. 2,2-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorid (AAPH)'in moleküler yapısı

Antioksidan potansiyeli ölçmek için başka yöntemler geliştirilmesine rağmen ORAC yöntemi biyoloji ile daha çok ilgilidir. Çünkü yöntemde bir peroksil radikal üretici kullanılır. Peroksil radikal sadece en yaygın reaktif oksijen türlerinden biri değildir. Aynı zamanda su ve lipitte çözünebilir maddeler ile reaksiyon verir (Ellefson ve ark., 2006).

Orjinal yöntemde prob olarak *Porphyridiumcruentum*'dan izole edilen flüoresan bir protein olan B-fikoeritrin (B-PE) kullanılmaktadır. B-PE'nin flüoresan bozulması onun peroksil radikalleri ile reaksiyonunun göstergesidir. B-PE, yüksek flüoresans verimi, ROS'a hassasiyeti ve suda çözünürlüğü nedeniyle tercih edilmektedir (MacDonald ve ark., 2006). Ancak çok fazla çeşitliliğe sahiptir, oda koşullarında ışık ile rengi değişmektedir. Aynı zamanda spesifik olmayan proteinik bağlardan dolayı polifenoller ile ilişkiye girmektedir ve böylece radikal üretici eklenmeden bile flüoresans kayıpları olmaktadır. Bu nedenle sonuçlar tekrarlanabilir değildir (MacDonald ve ark., 2006; Huang ve ark., 2005; Pérez ve ark., 2006). Bu dezavantajlarından dolayı prob olarak B-PE yerine florescein (FL) (3,6'-dihidroksi-spiro [isobenzofuran-1 [3H], 9'[9H]-xanthen]-3-one) kullanılmaktadır (Ou ve ark., 2001). FL sentetik protein yapıda olmayan bir probtur ve BPE'nin sınırlamalarını gidermektedir. FL kesin, sağlam ve doğru sonuçlar vermektedir. Fakat FL probu pahalı ve pH duyarlıdır. Bu nedenle reaksiyon pH'ı dikkatlice izlenmelidir (MacDonald ve ark., 2006). ORAC yöntemi peroksil radikallerine karşı hidrofilik ve lipofilik zincir kırma antioksidan kapasitesinin direk ölçülmesini sağlar (Wu ve ark., 2004).

Peroksil radikalleri organik molekül AAPH tarafından üretilir. Bu radikaller B-PE ya da FL gibi bileşiklerin flüoresansını azaltır. Antioksidanlar AAP radikallerini yakalar ve flüoresan bozulmayı azaltır (Tomer ve ark., 2007; Pérez ve ark., 2006; Bonanni ve ark., 2007). Trolox (Vitamin E'nin suda çözülebilir analogu) antioksidan aktivite için yaygın

olarak kabul edilen bir standarttır ve ORAC sonuçları mikromol Trolox eşiti (TE) olarak belirtilir (Ellefson ve ark., 2006; Pérez ve ark., 2006).

Bu yöntem hem lipofilik hem de hidrofilik ekstrelerin antioksidan kapasitesinin ölçülmesini mümkün kılar. Aynı zamanda farklı radikal kaynaklar kullanılabilir (Ellefson ve ark., 2006; Ou ve ark., 2002). ORAC yöntemi farklı laboratuvarlarda uygulanmış; melatonin, dopamin ve flavonoid gibi saf bileşikler ile çay, meyve, sebze ve hayvan dokuları gibi çeşitli kompleks biyolojik örneklerin antioksidan kapasitesine ilişkin önemli bilgi sağlamıştır (Prior ve ark., 1999).

ORAC yönteminde pro-oksidan olarak peroksil ya da hidroksil radikallerinin kullanılması bu yöntemi prooksidan gerektirmeyen diğer yöntemlerden farklı kılmaktadır. Ayrıca substrat olarak protein (PE) kullanılması bu yöntemi, oksidasyon için substrat olarak luminol ya da krosin kullanılan diğer yöntemlerden farklı kılmaktadır. Bu yöntemde antioksidanlar için çok yüksek oranda (>2000 molar) AAPH kullanılmaktadır (Prior ve ark., 1999). Yaygın olarak kullanılan ORAC yönteminin FRAP yönteminden daha duyarlı olduğu belirtilmiştir (Price ve ark., 2006). Dondurularak kurutulmuş 927 adet sebze örneği için FRAP ve ORAC teknikleri arasında bir uyum olmadığı, fakat bu yöntemlerin yabancısını meyvesi için uyum gösterdiği belirtilmiştir. Benzer olarak darı ve ürünleri için ORAC, DPPH ve TEAC yöntemleri arasında uyum olduğu kaydedilmiştir (Thaipong ve ark., 2006).

### **1.5.2. Toplam radikal yakalayıcı parametre (TRAP) tayini**

Toplam radikal yakalayıcı parametre (TRAP) yöntemi ilk defa Wayner ve ark. (Somogyi ve ark., 2007) tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem bir azo bileşiğin sıcaklıkla bozulması ile oluşturulan kontrollü lipid peroksidasyonu boyunca oksijen tüketiminin ölçülmesini temel almaktadır. Bu yöntemde serbest radikal üretimini başlatıcı olarak AAPH tarafından üretilen peroksil radikalleri kullanılmaktadır (Somogyi ve ark., 2007). Plazmaya AAPH eklendikten sonra okside olabilen materyalin oksidasyonu, reaksiyon süresince tüketilen oksijen yoluyla izlenir. Bu oksidasyon plazmada bulunan antioksidan tarafından engellenir. Sonuçlar Troloks C (6-hidroksil-2,5,7,8,-tetramethylchroman-2-carboxylicacid)'nin sonuçları ile kıyaslanır (MacDonald ve ark., 2006; Prior ve ark., 1999; Somogyi ve ark., 2007). Bu yöntemde karşılaşılan problemlerden biri oksijen elektrodunun gereken zaman boyunca stabilitesinin sağlanamamasıdır (Prior ve ark., 1999). TRAP yönteminin geçmişi ve bugün ki durumu ile ilgili detaylı bilgi Ghiselli ve arkadaşlarının (Ghiselli ve ark., 2000) çalışmasından elde edilebilmektedir. Yöntemde flüoresan prob olarak

R fikoeritrin (R-PE) kullanılmaktadır ve plazmanın, AAPH tarafından oluşturulan peroksil radikallerinden R-PE'yi koruyabilme özelliğini ölçmektedir. Antioksidanlar bozulmayı önler ve flüoresansı geciktirir (Somogyi ve ark., 2007).

TRAP yöntemi suda çözünebilir peroksil radikallerinin üretimi ve lipit peroksidasyonunun başlatılması ile alkalıdır ve bilinen tüm zincir kırıcı antioksidanlara hassastır. Fakat yöntem zaman gerektiren oldukça kompleks bir yöntem olup; oldukça fazla tecrübe gerektirmektedir (Prior ve ark., 2005).

### **1.5.3. Krosin beyazlatma yöntemi**

Lussignoli ve ark. (Lussignoli ve ark., 1999) tarafından geliştirilen kolorimetrik bir yöntemdir. Bu yöntemde azo başlatıcının sıcaklıkla bozulması sonucu oluşan peroksil radikalleri tarafından bir karotenoid olan krosinin beyazlama derecesi ölçülmektedir. Yöntem AAPH'ın sıcaklıkla bozulması ile oluşan peroksil radikallerinin krosini oksidasyona uğratmasına (beyazlatma) dayanmaktadır (Prior ve ark., 1999; Somogyi ve ark., 2007; Huang ve ark., 2005). Karışıma eklenen maddedeki antioksidanlar bu beyazlamayı önlemektedir. Deneysel olarak reaksiyon krosin içeren fosfat tamponu ve bilinen miktarda antioksidan ile gerçekleştirilir. Reaksiyon AAPH eklenmesi ile başlatılır ve krosin beyazlaması 443 nm dalga boyunda spektrofotometre ile izlenmektedir. Beyazlama oranı AAPH ilavesinden sonra 10 dak boyunca izlenir (MacDonald ve ark., 2006; Huang ve ark., 2005).

Bu kinetik yöntem kullanılarak analiz edilen askorbik asitin antioksidan kapasitesi 7.7 troloks eşiti olarak kaydedilmiştir ki diğer yöntemlerden elde edilen değerlerden çok daha yüksektir (ORAC değeri 0.95'dir) (Prior ve ark., 1999; Huang ve ark., 2005). Bu yönteminin gıda örnekleri için uygulanması sınırlıdır. Yöntem antioksidanlarda konsantrasyon değişimine duyarlı değildir. Ayrıca krosin safrandan ekstrakte edilen doğal pigmentler karışımı olduğu ve çok fazla çeşitlilik gösterdiği için sayısal değerlendirmelerde yöntemin endüstriyel alanda kullanımını sınırlandırmaktadır (MacDonald ve ark., 2006; Huang ve ark., 2005).

### **1.5.4. Toplam oksiradikal söndürme kapasite (TOSC) tayini**

Toplam oksiradikal söndürme kapasite yönteminde 2,2'-azobis (2-metilpropionamidin) (ABAP)diklorid'in sıcaklıkla bozulması sonucunda peroksil radikalleri oluşur. Bunlar  $\alpha$ -keto- $\gamma$ -(methilthio) butirikasit sodyum tuzu (KMBA)'na oksitlenerek etilen gazı oluşturur. Oluşan etilen gazı, gaz kromatografisi (GC) tarafından ölçülür. Eğer ortamda

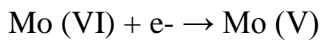
antioksidanlar varsa peroksil radikallerini söndürür ve etilen oluşumunu önler (Prior ve ark., 1999; Tomer ve ark., 2007).

Bu yöntemde biyolojik dokularda hasara neden olan önemli üç farklı ROS kullanılmaktadır: peroksil radikalleri, hidroksil radikalleri ve peroksinitrit. Bu yöntemin hem suda hem de yağda çözünebilen antioksidanları belirleyebildiği belirtilmiştir. Aynı zamanda mikromolardan daha küçük miktarlarda bileşikler ile çalışılabilmektedir. TOSC yönteminin sakıncaları elle GC enjeksiyonlarına ihtiyaç duyulması ve test çözeltilerinin kısa ömürlü olmasıdır (Lichtenthaler ve ark., 2003).

### **1.5.5. Toplam fenolik madde tayini**

FC yöntemi fenolik bileşikler ve diğer indirgeyici bileşiklerden molibdenyum'a elektron transfer edilmesine dayanmaktadır. Mavi renkli kompleks oluşumu 750-765 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenir. Standart bileşik olarak genellikle gallik asit kullanılır ve sonuçlar gallik asit eşiti (mg/L) olarak verilir. FC ayırıcı fenolik bileşikler için spesifik değildir. Fenolik olmayan birçok bileşik (aromatik aminler, sülfür dioksit, askorbik asit, Cu (I) ve Fe (II) gibi) tarafından indirgenebilir. Bu nedenle "toplam fenolik madde" belirlenmesi için uygun değildir. Son zamanlarda FC yöntemi toplam indirgeyici kapasitenin ölçülmesinde kullanılmaktadır. FC yöntemi ile diğer yöntemler (TEAC ve DPPH) arasında ilişki bulunmaktadır (Magalhaes ve ark., 2008).

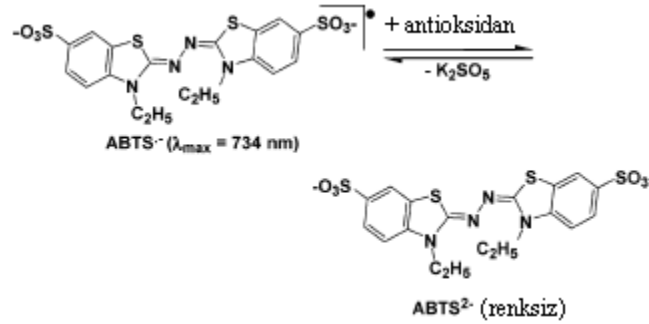
Bu yöntem orijinal olarak protein analizi için tasarlanmıştır. Daha sonra Singleton ve arkadaşları (Singleton ve ark., 1999) şaraptaki toplam fenollerini ölçmek için bu yöntemi geliştirmişlerdir. Folin-Ciocalteu ayırıcı (FCR) temelli yöntem toplam fenolik (ya da fenol) yöntem olarak bilinir. Fakat gerçekte örneğin indirgeyici kapasitesini ölçer. Fenolik bileşikler sadece bazik koşullarda (pH =10) FCR ile reaksiyona girer.



FC yöntemi, gıdaların antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde basit, tekrarlanabilir ve güvenilir bir yöntemdir. Antioksidan çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. FC ayırıcı ticari olarak satılmaktadır. Fakat yöntemin uzun zaman alması (2 saat) rutin analizler için uygulanmasını zorlaştırmaktadır. Aynı zamanda sulu fazda gerçekleştirildiği için lipofilik bileşikler için uygulanamamaktadır (MacDonald ve ark., 2006; Huang ve ark., 2005; Magalhaes ve ark., 2008).

### 1.5.6. Troloksa eşdeğer antioksidan kapasite (TEAC) tayini

TEAC yöntemi ilk defa Miller ve ark. (Miller ve ark., 1993) tarafından geliştirilmiştir. Daha sonra, Re ve ark. (Re ve ark., 1999) tarafından değiştirilmiş olan bu yöntem gıda örneklerinin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi için yaygın bir şekilde kullanılmıştır (MacDonald ve ark., 2006; Prior ve ark., 1999; Huang ve ark., 2005). 660, 734 ve 820 nm’de maksimum olan karakteristik uzun dalga boylu absorpsiyon spektrumu gösteren ABST radikal katyonun absorbansının antioksidan tarafından inhibisyonuna dayanmaktadır (Prior ve ark., 1999). Orijinal yöntemde hidrojen peroksit ile metmiyoglobinin aktivasyonu sonucu ferrilmiyoglobin oluşur. Bu bileşik daha sonra 2,2-azinobis (3-etilbenzothiazollin-6-sulfonik asit) (ABTS) (Şekil 1.4)’ten ABTS<sup>•-</sup> radikal katyonunun oluşmasına neden olmaktadır. Bu yöntemde test edilecek örnek ABTS<sup>•-</sup> radikalleri oluşumundan önce eklenir. Test bileşiği/örneği ABTS<sup>•-</sup> radikallerinin oluşumunu azaltır (Magalhaes ve ark., 2008). Bu yöntemin olumsuz yönü hızlı reaksiyona giren antioksidanların ferrilmiyoglobin radikalini de indirgeyebilmeleridir. İyileştirilmiş şeklinde ABTS<sup>•-</sup>, oksidan ABTS<sup>2-•</sup>’nin potasyum persülfat oksidasyonu ile oluşturulur (MacDonald ve ark., 2006; Huang, Ou ve ark., 2005).



Şekil 1.4. Potasyum persülfat oksidasyonu ile ABTS<sup>2-•</sup>’den oksidan ABTS<sup>•-</sup>’nin oluşması (Huang ve ark., 2005).

Uygulama kolaylığından dolayı TEAC yöntemi antioksidan kapasiteyi araştırmak için sıklıkla kullanılmış, birçok bileşik ve gıda örneklerinin TEAC değerleri kaydedilmiştir. ABTS<sup>•-</sup>’nin biyolojik sistemlerde bulunmaması ve bu sistemlerdeki radikallere benzememesi de bir problemdir. Olumlu yanı ise hem sulu hem de lipit fazlarda kullanılabilir olmasıdır. Bu nedenle her ikisinde de antioksidan kapasiteyi belirlemede kullanılabilir (MacDonald ve ark., 2006). Ayrıca ticari TEAC yöntem kitleri elde edilebilir ve yöntem nispeten hızlıdır. Orijinal TEAC yöntemi, bazı eksikliklerine rağmen fitokimyasalların antioksidan aktivitesi ile ilgili kullanışlı bilgi sağlamaktadır (Prior ve ark., 1999).



Bu spektrofotometrik yöntem teknik olarak basit bir yöntemdir. Yöntem geniş pH aralığında kullanılabilir ki antioksidan mekanizmasında pH'ın etkisini çalışmayı sağlar. Böylece antioksidan mekanizmasında pH'ın etkisinin çalışılması için kullanılabilir. Lipofilik ve hidrofilik bileşiklerin antioksidan kapasitesini belirlemek için kullanılabilir (Prior ve ark., 2005; Magalhaes ve ark., 2008).

### **1.5.7. Demir indirgeme gücü (FRAP)**

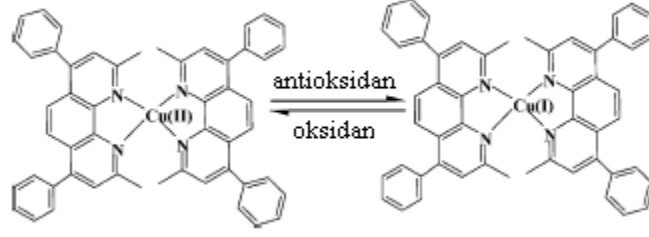
Düşük pH'da  $Fe^{+3}$ 'ün  $Fe^{+2}$ 'ye indirgenmesi renkli ferrous- tripyridyltriazine [ $Fe$  (III) (TPTZ) $_2Cl_3$  (TPTZ = 2,4,6-tripyridyl-*s*-triazine) = Herein] kompleksinin oluşmasına neden olur. Oluşan bu demir tuzu oksidan olarak kullanılır (Benzie ve ark., 1996).

$Fe^{+3}$  tuzunun (yaklaşık 0.70 V) redoks potansiyeli ABTS $^{\cdot-}$ 'nin ki ile (0.68 V) birbirine yakındır. Bu nedenle FRAP ve TEAC yöntemleri arasında çok fazla fark yoktur. Yalnız TEAC nötr pH'da FRAP ise asidik koşullarda (pH = 3.6) gerçekleştirilir (MacDonald ve ark., 2006; Huang ve ark., 2005). Asidik ortamda, antioksidanların varlığında ferric tripyridyltriazine kompleksi  $Fe^{+2}$ 'ye indirgenir ve oluşan renkli çözelti 595 nm'de absorbanda artışa neden olur. Sonuçlar troloksa eşdeğer olarak ifade edilir. Orijinal yöntemde absorbanda 4 dak izlenir. Fakat bu zamanda reaksiyon tamamlanmaz. Bu nedenle izleme zamanının 30 dakikaya uzatılması tavsiye edilmektedir (Pérez ve ark., 2006).

$Fe^{+3} / Fe^{+2}$  redoks çiftinin redoks potansiyelinden daha düşük potansiyelli birçok bileşik teorik olarak  $Fe^{+3}$ 'ü  $Fe^{+2}$ 'ye indirgeyebilir. Bu nedenle FRAP değerleri daha yüksek çıkabilir. FRAP sonuçları analiz zamanına bağlı olarak değişebilir. Bazı polifenoller (kafeik asit, ferulik asit, kuersetin ve tannik asit gibi) daha yavaş hareket eder ve belirlemek için daha uzun reaksiyon zamanı gerekmektedir. Yöntem sadece demir iyonunu temel almaktadır. Bu nedenle mekanik ve fizyolojik olarak antioksidan aktivitesi için uygun değildir. Ancak diğer yöntemlerin aksine FRAP yöntemi basit, hızlı ve ucuzdur, özel aletler gerektirmemektedir (Prior ve ark., 2005; Magalhaes ve ark., 2008).

### **1.5.8. Bakır indirgeme gücü (KUPRAK)**

Bu yöntem örnekte bulunan antioksidanlar (redükta) tarafından Cu (II)'nin Cu (I)'e indirgenmesini temel almaktadır (Şekil 1.5). Kromojenik ayıraç olan bathocuproin (2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-phenanthrolin), Cu (I) ile 2:1 oranında bir kompleks oluşturur. Bu kompleks 490 nm'de maksimum absorbanda sahiptir. Standart olarak Kuersetin kullanılır (MacDonald ve ark., 2006; Huang ve ark., 2005).

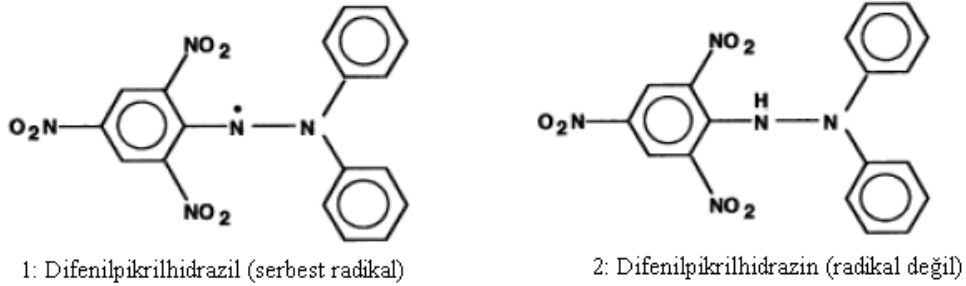


**Şekil1.5.** Cu (II)'nin Cu (I)'e indirgenmesi (Huang ve ark., 2005).

Örnek başına sadece 10 dk gereken çok hızlı bir yöntem olması avantajdır. Askorbik asit, ürik asit, gallik asit ve kuersetin için KUPRAK yöntemi birkaç dakikada tamamlanırken daha kompleks moleküller için 30-60 dk gerekmektedir (Prior ve ark., 2005). Yöntemde kullanılan ayıraçlar oldukça ucuzdur, yöntem çok fazla uzmanlık gerektirmez. Bakır reaksiyon kinetikleri demirden daha hızlıdır.

### 1.5.9. DPPH tayini

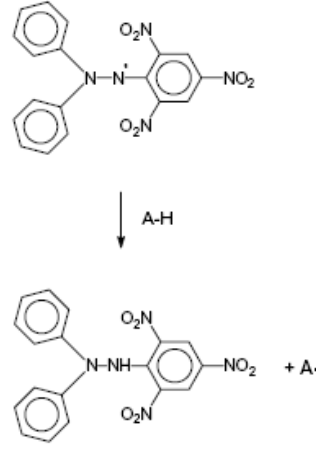
DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak elde edilebilen stabil organik nitrojen radikalıdır. 515 nm'de maksimum absorbanza sahiptir (Şekil 1.6) (Huang ve ark., 2005).



**Şekil 1.6.** 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH)'in moleküler yapısı (Molyneux, 2004).

Molekülde bir serbest elektronun yer değiştirmesi menekşe renginin oluşmasına neden olur. DPPH solüsyonu hidrojen atomu verebilen madde (antioksidan) ile karıştırıldığı zaman koyu menekşe rengin kaybı ile indirgenmiş form oluşur.

Antioksidan (A-H) tarafından DPPH serbest radikale proton transferi reaksiyonu 517 nm'de absorbanın azalmasına neden olur. Bu süreç görünür alanda spektrofotometre ile absorban sabitlenene kadar takip edilir. (Şekil 1.7) (MacDonald ve ark., 2006; Scalzo, 2008).



Şekil 1.7. DPPH radikalinin kimyasal yapısı ve A-H ile reaksiyonu (Scalzo, 2008).

DPPH-H indirgenmiş formudur. A· ise ilk adımda oluşturulan serbest radikaldir. Daha sonra bu radikal daha başka reaksiyonlara girecektir (Molyneux, 2004; Frankel ve ark., 2000).

Bu yöntem bitkiler ve gıdalardan elde edilen ekstratlar ya da bileşiklerdeki serbest radikal söndürücü aktiviteyi belirlemek için araştırmacılar tarafından yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Scalzo, 2008). Teknik olarak basit ve hızlı bir yöntemdir. Fakat uygulamasını sınırlandıran bazı dezavantajlara sahiptir. Uzun ömürlü nitrojen radikali olan DPPH, lipid peroksidasyonu ile ilişkili olan hayli reaktif ve kısa ömürlü peroksil radikallerine benzerlik göstermez. Peroksil radikalleri ile hızla reaksiyona giren birçok antioksidan DPPH ile yavaş reaksiyona girebilir, hatta hiç reaksiyona girmeyebilir (Prior ve ark., 2005; Magalhaes ve ark., 2008; Huang ve ark., 2005).

## **2. *Ziziphus zizyphus* (HÜNNAP)**

*Ziziphus zizyphus* (Hünnap), cehrigiller (Rhamnaceae) familyasından olup bahar aylarında sarı renkli çiçekler açan dikenli bir ağaç türüdür.

### **2.1. *Ziziphus zizyphus* İle İlgili Botanik Bilgi**

Nisan-mayıs ayları arasında, sarı renkli çiçekler açan, hoş kokulu, 4-5 m yüksekliğinde dikenli bir ağacın, kırmızı kabuklu, sert çekirdekli, iri zeytin biçiminde ve büyüklüğünde bir yemiştir. En dış çeperi derimsi ve ince, pulpası (yumuşak kısım) sarı renkli, tatlı ve lezzetlidir. Ünnap da denilir. Bahçelerde yetiştirildiği gibi yabânî olarak da bulunur. Asıl vatanı Suriye'dir. Ağacının gövdeleri silindir biçiminde, esmer kabuklu, çok dallıdır. Yapraklar karşılıklı iki sıra halinde, kısa saplı, diken şeklinde iki küçük yaprakçıklıdır. Çiçekler 3-6 tanesi bir arada ve oldukça küçüktür. Çanak yaprakları beş parçalı ve yeşil renklidir. Taç yaprakları sarı renkli, kıvrık olup beş parçalıdır.

### **2.2. *Ziziphus zizyphus*'un Yetiştığı Yerler**

Kuzey Afrika ve Suriye'den Hindistan'a ve Çin'e yayıldığı düşünülmektedir. Ağaç birçok iklime uyum sağlamakla birlikte, iyi meyve vermesi için sıcak yazlara ihtiyaç duymaktadır. Marmara, Batı ve Güney Anadolu'da bulunmaktadır. Ayrıca Doğu Karadeniz'de ve özellikle Çoruh Vadisi Havzasında değişik türleri görülmektedir.

### **2.3. *Ziziphus zizyphus*'un Faydaları**

Çok eskiden beri yumuşatıcı, balgam ve idrar söktürücü olarak kullanılmaktadır. Kalp damar sertliği, nefes darlığı gibi hastalıklarda çok faydalıdır. Kolesterol ve lipid düşürücü olarak kullanılır. Sabahları aç karna içilmesi zayıflamada etkilidir.

### **3. MATERYAL VE METOT**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler**

Bu çalışmada kullanılan Folin reaktifi, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH•) Sigma-Aldrich firmasından ve Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, metanol, gallik asit, bütillendirilmiş hidroksianisol (BHA), bütillendirilmiş hidroksitoluen (BHT), kloroform (CHCl<sub>3</sub>), β-karoten, lineolik asit, polioksietilensorbitan monolaurat (Tween 20), deiyonize su, FeCl<sub>3</sub>, Fosfat tamponu, potasyum ferrosiyanat, trikloroasetikasit (TCA), CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, amonyum asetat ve troloks Merck firmasından temin edilmiştir.

##### **3.1.2. Cihazlar**

Analizlerde kullanılan cihazlar: absorpsiyon ölçümleri için Shimadzu U.V. 1700 spektrofotometre, pH ölçümleri için Inolap marka pH metre, tartımlar için Precisa XB 220A hassas terazi, ısıtma ve kurutma işlemleri için Nüve marka inkübatör, ekstraksiyon sonrası çözücüyu uzaklaştırmak amacıyla Heidholph marka evaporatör ve Lancome marka liyofilizatör kullanılmıştır.

#### **3.2. Metot**

##### **3.2.1. Bitki ekstraktlarının hazırlanması**

Bitkilerin meyveleri toplandı, küçük parçalara dilimlenip, kurutuldu. Sonra her birinden yaklaşık 15 g alınıp sokslet kartuşuna yerleştirildi. 30°C'de metanol çözücüsünde 6 saat ekstrakte edildi. Elde edilen ekstraktın çözücüsünü uzaklaştırmak için evaporatörde vakum altında 40°C'ye tabi tutuldu. Evaporasyondan sonra saat camına alındı ve analiz yapılmak üzere 4°C'de saklandı.

##### **3.2.2. Toplam fenolik ve flavonoid madde tayini**

Toplam fenolik madde tayini Folin-Ciocaltaeu metoduna göre yapıldı (Singleton ve ark., 1999). Standart olarak kullanılan gallik asit ve bitki ekstraktlarının çözeltileri metanol içerisinde hazırlandı. Gallik asit kalibrasyon eğrisi için, gallik asidin 5 farklı konsantrasyonda metanol çözeltileri hazırlandı. Bitki ekstraktlarının konsantrasyonu için ise metanolde bir seri çözeltisi (0,05-0,5 mg/mL) hazırlandı ve her bir deney tüpüne bitki ekstraktlarından 0,5 mL

alındı. Üzerine 2,5 mL folin reaktifi (suda, %10'luk) ve 7,5 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (suda, %20'lik) ilave edildi ve kuvvetlice karıştırıldı. Oda sıcaklığında karanlıkta 2 saat bekletildi ve sonra 750 nm'de çözeltilerin absorbansları okundu. Aynı işlemler kalibrasyon eğrisi için hazırlanmış farklı konsantrasyonlardaki gallik asit çözeltilerine de uygulandı. Ekstraktların absorbansları, çizilen gallik asit kalibrasyon eğrisinden okunarak toplam fenolik madde konsantrasyonu eşdeğer gallik asit olarak hesaplandı (mg/mL GAE).

### 3.2.3. DPPH tayini

Blois (1958)'e göre Sanchez-Moreno metodu esas alınarak yapılmıştır. Metotta kullanılan ve güçlü bir radikal olan DPPH'in kalibrasyon eğrisi için farklı konsantrasyonlarda ( $6.10^{-5}$ - $1,85.10^{-7}$  M) metanoldeki çözeltileri hazırlandı. *Ziziphus zizyphus*'un metanol ekstraktının ve sentetik antioksidan BHT ve BHA'nın metanolde bir seri çözeltisi (0,05-0,5 mg/mL) hazırlandı. Hazırlanan ekstrakt ve standart çözeltilerden 0,5 mL alınarak her birinin üzerine 3 mL DPPH çözeltisi ( $6.10^{-5}$  M) ilave edildi. Kuvvetlice karıştırılıp ağzı kapatıldıktan sonra 30 dk karanlıkta bekletildi. Bu sürenin sonunda her bir karışımın absorbansları spektrofotometrede 517 nm'de okundu. Her bir bitkinin ayrı ayrı inhibisyon değerleri aşağıda verilen eşitliğe göre hesaplandı;

$$I(\%) = \left[ \frac{A_{bos} - A_{numune}}{A_{bos}} \right] \times 100$$

Bu değerlerden ve DPPH'in kalibrasyon eğrisinden yararlanarak her bir bitki için DPPH serbest radikalının yarısının süpürüldüğü andaki bitki ekstraktı konsantrasyonu ( $IC_{50}$ ) değerleri hesaplandı. Sentetik antioksidan olan BHT ve BHA ile kıyaslandı.

### 3.2.4. $\beta$ -karoten lineolik asit emülsiyon yöntemi

Bu metot Miller (1971)'e göre yapıldı. 0,2 mg  $\beta$ -karoten, 1 mL kloroformda çözüldü. Üzerine 0,02 mL lineolik asit çözeltisi ve 200 mg tween 40 ilave edildi. Kloroform 40°C'de tamamen uzaklaştırıldı. 100 mL deiyonize suda çözüldü. Şiddetli şekilde karıştırıldı. Kontrol çözeltisi içinde aynı işlemleri tekrarlandı. Fakat sadece  $\beta$ -karoten ilave edilmedi. Numunelerin ve karıştırılmak üzere hazırlanan sentetik antioksidan konsantrasyonu 2 mg/mL olacak şekilde metanolde hazırlandı. Deney tüplerine, hazırlanan drog, BHA ve BHT çözeltilerinden 0,2' şer mL alınarak üzerlerine 5 mL, hazırlanan emülsiyon çözeltisi ilave edildi. 40°C'de su

banyosunda inkübasyona bırakıldı. Deney tüplerindeki numunelerin ve kontrol çözeltisinin absorbansı 470 nm’de okundu ( $t_0$ ). Bu andan itibaren inkübasyondaki çözeltilerin absorbansı her 15 dakikada bir 120 dakika boyunca okundu.

Bu absorbansa dayanarak, yapılan hesaplamalarda absorbans değişim oranı (AO) ve buna bağlı olarak da % oksidasyonu engelleme katsayıları hesaplandı.

$$R = \ln(a/b)$$

Burada;  $\ln$  doğal logaritmayı,  $a$  başlangıç absorbansını,  $b$  120 dakika inkübasyondan sonraki absorbansı göstermektedir. AA; antioksidan aktivitedir.

$$AA = \left[ \frac{R_{kontrol} - R_{numune}}{R_{kontrol}} \right] \times 100$$

### 3.2.5. Demir İndirgeme Gücü (FRAP)

Drogların indirgeme gücü Oyaizu (1986) metodu ile belirlendi. Drogların 5 farklı konsantrasyonda metanol çözeltileri hazırlandı (0,1-0,5 mg/mL). Hazırlanan her bir çözeltilerden deney tüplerine 2,5 mL numune alındı. Her birinin üzerine 200  $\mu$ M, 2,5 mL fosfat tamponu ve %1’lik potasyum ferrosiyanat çözeltisi ilave edildi. Tüpler 45<sup>0</sup>C’de 20 dk boyunca su banyosunda inkübe edildi. Daha sonra 2,5 mL %10’luk trikloro asetik asit (TCA) ilave edildi, 10 dk boyunca 700 rpm’de santrifüj edildi. Tüplerdeki karışımların üst kısımlarından 5’er mL alıp başka tüplere aktarıldı. Yeni tüplere aktarılan numunelerin her birinin üzerine 5 mL deiyonize su eklendi. %0,1’lik FeCl<sub>3</sub> ilave edildikten sonra oluşan yeşil renkli çözeltilerin absorbansı spektrofotometrede 700 nm - 450 nm’de ölçüldü. Aynı metod uygulanarak 450 nm’de ölçülen absorbans değerlerinden elde edilen troloksun kalibrasyon eğrisi denkleminde ekstraktın troloks eşdeğeri cinsinden antioksidan kapasiteleri hesaplandı (Apak ve ark., 2006).

### 3.2.6. Bakır indirgeme gücü (KUPRAK)

İçerisine sırasıyla 1 mL 10<sup>-2</sup> M CuCl<sub>2</sub>, 1 mL 7,5x10<sup>-3</sup> M Nc ve 1 mL 1 M NH<sub>4</sub>Ac konulup çalkalanan tüplere, bitki ekstraktlarından (duruma göre eğer yüksek absorbans verirse ona göre bitki ekstraktlarına gerekli seyreltme yapılmalı) 0,5 mL eklenip üzerine (Bitki ekstraktlarından alınacak hacmi çok yüksek absorbans değeri vermeyecek şekilde seçilerek, örneğin 0,5 mL alındığında) toplam hacim 4,1 mL olacak şekilde 0,6 mL H<sub>2</sub>O ilave edildi.

Tüpler ağız kapalı bir biçimde 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 450 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Ardından her bitkinin troloks eşdeğeri cinsinden antioksidan kapasiteleri hesaplandı (Apak ve ark., 2006).

### **3.2.7. HPLC analizi**

Bitki ekstraktlarındaki fenolik bileşiklerin HPLC analizi için öncelikle 15 farklı fenolik bileşik standardının ayrı ayrı kalibrasyon grafiği çizilerek analiz metodu geliştirildi. Numunelerden 20'şer mg tartılıp 1 mL metanolde çözüldükten sonra, çözeltilerin 20 mikrolitresi HPLC'ye enjekte edildi. Öncelikle standart fenolik maddelerin enjeksiyonu yapıldı. Sonuçlar mikrogram/gram olarak %95 güven aralığı ile verildi.



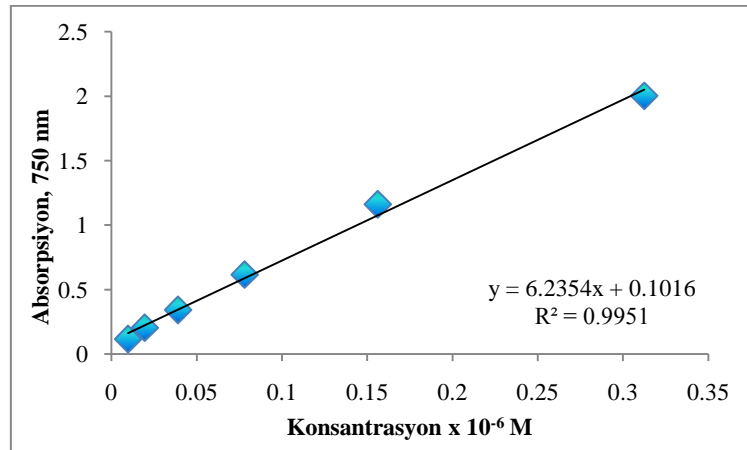
#### 4. DENEYSEL SONUÇLAR

Son yıllarda bitkilerin tedavi edici özelliği üzerine pek çok çalışma yapılmaktadır. Bitkilerin bu tedavi edici özelliği antioksidan madde ihtiva etmelerinden kaynaklanmaktadır. Antioksidanlar insan metabolizmasında normal yollarla oluşan radikallerin giderilmesini sağlamaktadır. Bitkilerde bulunan en önemli antioksidanlar flavonoid, karatenoid ve fenolik bileşiklerdir. Bu bileşiklerin tanımlanması için çeşitli spektroskopik ve kromatografik yöntemler geliştirilmiş, bunula birlikte bitki ve yiyecek numunelerinde kateşin, gallik asit, rutin, kuersetin gibi pek çok antioksidan maddenin tayini yapılabilmektedir. Ancak bu yöntemler hem pahalıdır hemde moleküller tanımlandıktan sonra antioksidan özellik verip veremeyeceği hakkında tam olarak yorum yapılamaz. Antioksidan tayini için toplam antioksidan aktivite tayini, toplam indirgeme kapasitesi, DPPH,  $\beta$ -karoten ve kuprak yöntemi, toplam flavonoid madde tayini ve buna benzer yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır.

##### 4.1. Toplam Fenolik ve Flavonoid Madde Tayini Sonuçları

En önemli antioksidan bileşikler fenolik yapıli maddelerdir. Fenoller yapısı bakımından taşıdıkları fonksiyonel gruplar dolayısıyla elektron ve hidrojen verebilir. Bu gruplar radikalleri ve oksitleyici grupları elimine eder. Fenolik gruplar OH grubunca zengindir. Bu gruplar onlara polar olma özelliği katar ve antioksidan özelliğini artırır.

Bu çalışmada toplam fenolik madde tayini, Folin-Ciocaltaeu metoduna göre yapıldı. Toplam flavonoid madde miktarı ise alüminyum şelatlamaya dayalı bir metotla gerçekleştirildi. Standart olarak kullanılan gallik asit ve kuersetinin kalibrasyon eğrileri için bu maddelerin beş farklı konsantrasyonda metanoldeki çözeltileri hazırlandı.



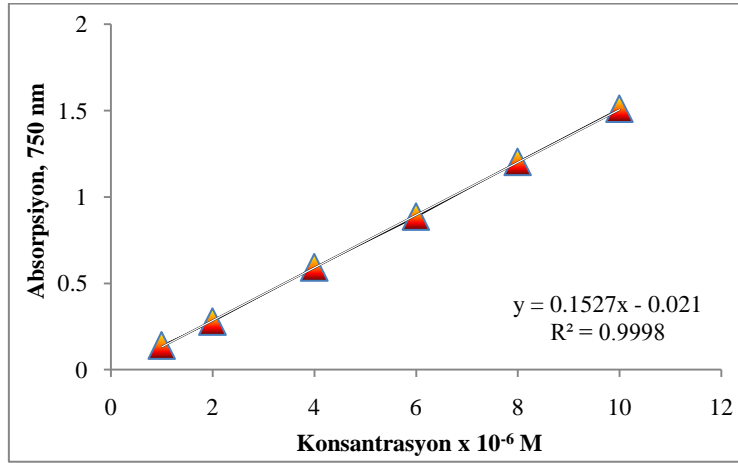
Şekil 4.1. Gallik asit kalibrasyon eğrisi grafiği

*Ziziphus zizyphus* ekstraktlarında bulunan toplam fenolik bileşiklerin konsantrasyonları Şekil 4.1’de verilen gallik asitin metanol çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerinden elde edilen grafik denkleminde toplam fenolik madde miktarı gallik asite eşdeğer olarak hesaplandı. Elde edilen grafik denkleminin  $y = 6,235x + 0,101$  olarak bulundu.

**Çizelge 4.1.** *Ziziphus zizyphus* ekstraktlarının (mg/mL) gallik aside eşdeğer konsantrasyonları

Bitki	Antalya’da yetişen <i>Z. zizyphus</i> ekstraktı	Özbekistan’da yetişen <i>Z. zizyphus</i> ekstraktı
mg/mL GAE	0,58	0,90

Çizelge 4.1’de verilen sonuçlara göre *Ziziphus zizyphus*’un Özbekistan’da yetişen metanol ekstraktının Antalya’da yetişen metanol ekstraktına oranla daha yüksek miktarda fenolik madde içerdiği gözlemlendi.



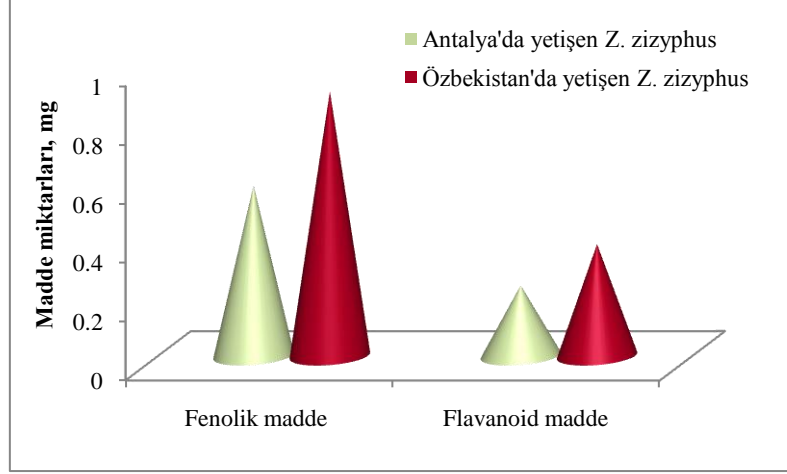
**Şekil 4.2.** Kuersetinin kalibrasyon eğrisi grafiği

*Ziziphus zizyphus* ekstraktlarında bulunan toplam flavanoid bileşiklerin konsantrasyonları ise Şekil 4.2’de verilen kuersetinin metanol çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerinden elde edilen grafik denkleminde toplam flavanoid madde miktarı kuersetine eşdeğer olarak hesaplandı. Elde edilen grafik denkleminin de  $y = 0,152x - 0,021$  olarak bulundu.

**Çizelge 4.2.** *Ziziphus zizyphus* ekstraktlarının (mg/mL) kuersetine eşdeğer konsantrasyonları

Bitki	Antalya’da yetişen <i>Z. zizyphus</i> ekstraktı	Özbekistan’da yetişen <i>Z. zizyphus</i> ekstraktı
mg/mL QE	0,24	0,38

Çizelge 4.2’de verilen sonuçlara göre de *Ziziphus zizyphus* Özbekistan’da yetişen metanol ekstraktının Antalya’da yetişen metanol ekstraktına oranla daha yüksek miktarda flavanoid madde içerdiği gözlemlendi.



Şekil 4.3. Farklı yerlerden elde edilen ekstraktlar incelendiğinde toplam fenolik ve flavonoid madde miktarlarına ilişkin sütun grafiği

Yapılan incelemeler sonucunda Özbekistan’da yetişen *Ziziphus zizyphus* bitkisinin toplam fenolik ve toplam flavanoid madde miktarlarının Antalya’da yetişen *Ziziphus zizyphus* bitkisine göre daha fazla olduğu saptanmıştır.

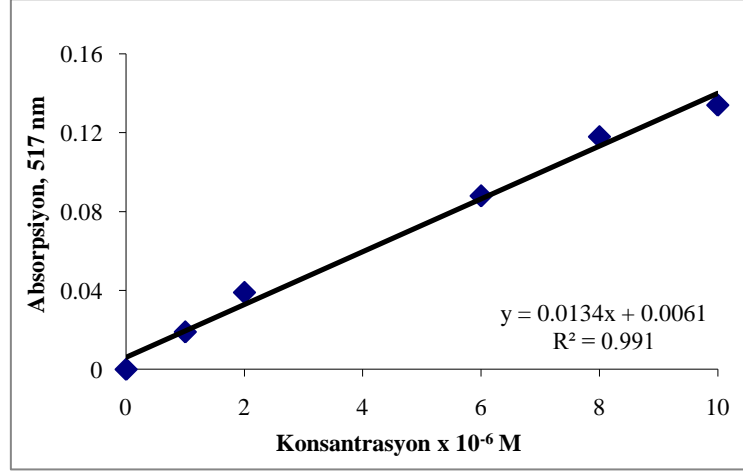
#### 4.2. DPPH Tayini Sonuçları

Antioksidanların, radikal giderme aktiviteleri biyolojik sistem ve gıda sanayi açısından oldukça önemlidir. Serbest radikallerin fazla oluşması lipid peroksidasyonunu hızlandırır. Bu da gıdalarda istenmeyen bir durumdur ve insanda bazı hastalıklara sebep olur. Bu hastalıkların başında erken yaşlanma, kanser, unutkanlık gelir.

Bu metotta *Ziziphus zizyphus*’un metanol ekstraktı ile BHA ve BHT gibi standart antioksidan bileşiklerin DPPH• radikal giderme aktivite tayini için DPPH’in metanolde kalibrasyon eğrisi çizildi (Şekil 4.4). Elde edilen grafik denkleminde ( $y = 0,013x + 0,006$ ) *Ziziphus zizyphus*’un metanol ekstraktı ile BHA ve BHT’nin  $IC_{50}$  değeri olarak ifade edilen DPPH radikal konsantrasyonunun yarıya düşüren ekstrakt ya da standardın miktarı hesaplandı ve her biri için  $IC_{50}$  değerleri Çizelge 4.3’te verildi.

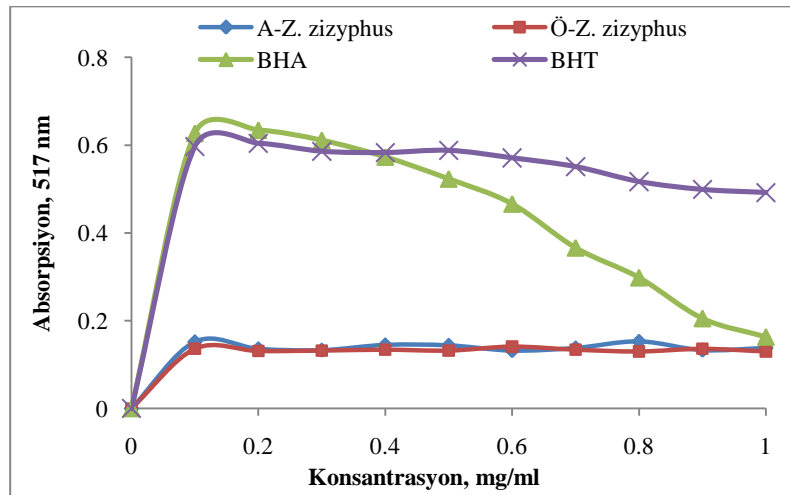
Çizelge 4.3. *Ziziphus zizyphus* ekstraktları ile sentetik antioksidanlara (BHA ve BHT) ilişkin  $IC_{50}$  değerleri

mg/mL	Antalya'da yetişen <i>Z. zizyphus</i> ekstraktı	Özbekistan'da yetişen <i>Z. zizyphus</i> ekstraktı	BHA	BHT
$IC_{50}$	10,34	9,82	3,5	1,5



Şekil 4.4. DPPH radikalinin kalibrasyon eğrisi

*Ziziphus zizyphus*'un metanol ekstraktı ile BHA ve BHT'nin farklı konsantrasyonları için DPPH radikalini süpürme aktivitesi belirlendi. Bu amaçla elde edilen absorpsiyon değerlerinden her bir konsantrasyondaki inhibisyon değerleri hesaplanarak konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.5).



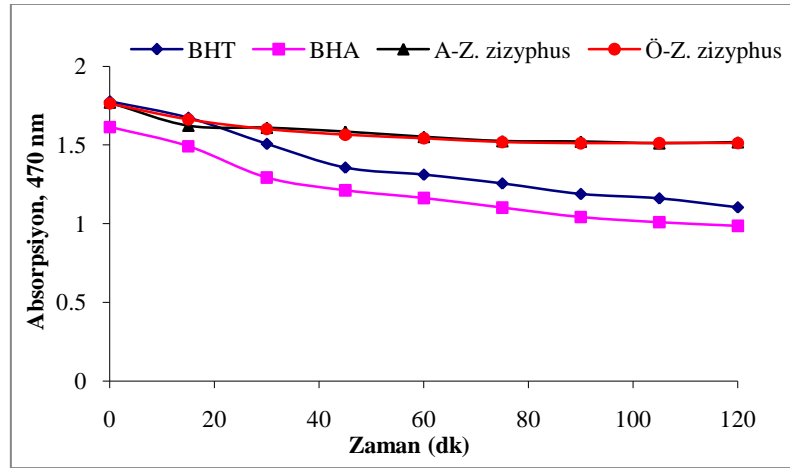
Şekil 4.5. *Ziziphus zizyphus*'un metanol ekstraktları ile BHA ve BHT'nin farklı konsantrasyonları için DPPH radikalini süpürme aktivitesinin kıyaslanması

*Ziziphus zizyphus*'un Antalya'da yetişen ve Özbekistan'da yetişen metanol ekstraktlarının DPPH radikal giderme aktivitelerinde Şekil 4.5.'te görüldüğü gibi çok büyük oranlarada artma ve azalma görülmemektedir. Antalya'da yetişen ekstrakt ile Özbekistan'da yetişen ekstraktın DPPH radikal giderme aktivitesi kıyaslandığında ise aralarında çok büyük konsantrasyon farkı olmadığı görüldü.

### 4.3. $\beta$ - Karoten Lineolik Asit Emülsiyon Yöntemi Sonuçları

Serbest radikaller, hücre zarında bulunan yağ moleküllerine saldırdığında yağ molekülü değişime uğrar. Yağlar vücutta değişime uğradığında ise hücre zarının yapısı ve fonksiyonları zarar görür. Bundan dolayı hücre zarı gıdaların, oksijenin ve suyun uzun süreli olarak transferini yapamaz. Ayrıca harcanan ürünlerin atılmasını da düzenleyemez. Serbest radikallerin saldırılarının uzun süre devam etmesi hücre zarının yapısında bulunan yağların parçalanmasına, bitki zarının yırtılmasına ve hücre bileşenlerinin dağılmasına sebep olur.

$\beta$ -Karoten-lineolik asit emülsiyon sistemi yöntemi, emülsiyondaki lineolik asit oksidasyonu sonucu oluşan radikallerin  $\beta$ -karoten'le reaksiyonundan oluşan sarı rengin zamanla kaybolmasına dayanmaktadır. Antioksidan varlığı rengin açılmasını önlemektedir.  $\beta$ -karoten lineolik asit sisteminde test süresi (120 dakika) boyunca sarı rengin hemen solmaması yüksek potansiyelde antioksidan varlığını göstermektedir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6.  $\beta$ -karoten lineolik asit emülsiyon sistemindeki *Ziziphus zizyphus*, BHA ve BHT'nin zamana karşı absorpsiyon değişim grafiği

Bu metotta *Ziziphus zizyphus*'un Antalya'da yetişen metanol ekstraktı ile Özbekistan'da yetişen metanol ekstraktının antioksidan aktiviteleri ölçülüp, sentetik antioksidanlar olan BHA ve BHT'nin antioksidan aktiviteleri ile karşılaştırıldı.

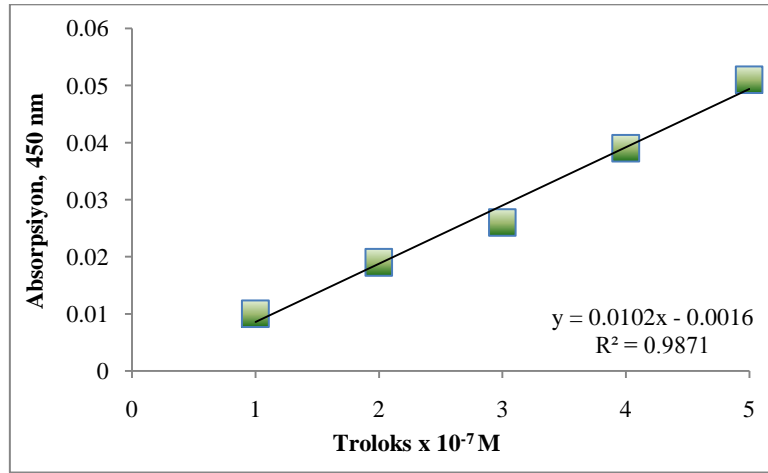
**Çizelge 4.4.** *Ziziphus zizyphus* ekstraktları ile BHA ve BHT'ye ilişkin % inhibisyon değerleri

Ekstrakt	Antalya'da yetişen <i>Z. Zizyphus</i> ekstraktı	Özbekistan'da yetişen <i>Z. zizyphus</i> ekstraktı	BHA	BHT
İnhibisyon, %	88,83	94,49	81,4	84,2

Analizler sonucunda  $\beta$ -karoten lineoleik asit emülsiyon sistemi yönteminde *Ziziphus zizyphus*'un Özbekistan'da yetişen metanol ekstraktının Antalya'dakine oranla daha yüksek antioksidan aktivitesi gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca iki ekstraktında standartlara göre daha yüksek aktivite gösterdiği gözlenmiştir.

#### 4.4. Bakır İndirgeme Gücü (KUPRAK) Sonuçları

Yöntem, Cu (II) klorür çözeltisi, neokuproin çözeltisi ve amonyum asetat (pH=7 tamponu) çözeltilerinin karıştırılmasından sonra, üzerine tayin edilecek antioksidan çözeltisinin ilave edilmesi ve bunu takip eden 30 dakika sonunda içerisinde antioksidan bulunmayan referansa karşı 450 nm'de absorbans değerlerinin ölçülmesinden ibarettir.



**Şekil 4.7.** KUPRAK yöntemi ile elde edilen metanollü standart troloksun kalibrasyon grafiği

Kuprak yöntemine göre *Ziziphus zizyphus* ekstraktlarında bulunan toplam fenolik bileşiklerin konsantrasyonları Şekil 4.7'de verilen troloksun 450 nm'deki metanol çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerinden elde edilen grafik denkleminde trolokse eşdeğer olarak hesaplandı. Elde edilen grafiğin denklemi  $y = 0,013x - 0,002$  olarak bulundu.

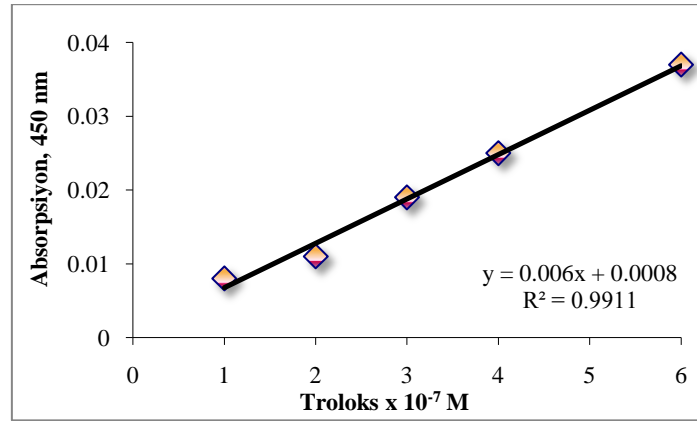
**Çizelge 4.5.** *Ziziphus zizyphus* ekstraktların troloksa eşdeğer (CUPRAC<sub>TEAC</sub>) konsantrasyonlarının karşılaştırılması

Konsantrasyon (mg/mL)	Antalya'da yetişen <i>Z. Zizyphus</i> ekstraktı (CUPRAC <sub>TEAC</sub> )	Özbekistan'da yetişen <i>Z. zizyphus</i> ekstraktı (CUPRAC <sub>TEAC</sub> )
2	18,3	13,9

Çizelge 4.5'de verilen sonuçlara göre *Ziziphus zizyphus*'un Antalya'da yetişen metanol ekstraktının Özbekistan'da yetişen metanol ekstraktına oranla daha yüksek miktarda fenolik madde içerdiğinden daha fazla kuprik iyonunu kupröze indirgemektedir. Buna bağlı olarakta *Ziziphus zizyphus*'un Antalya'da yetişen metanol ekstraktının TEAC miktarının Özbekistan'da yetişen metanol ekstraktının TEAC miktarına göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

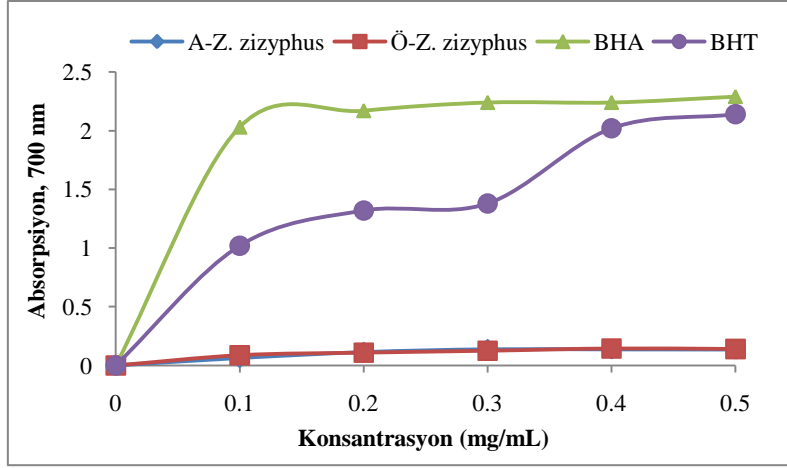
#### 4.5. Demir İndirgeme Gücü (FRAP) Sonuçları

Oyaizu metodunda çözeltinin sarı rengi ortamda bulunan antioksidan maddelerin indirgenme aktivitelerinden dolayı farklı tonlardaki yeşil rengine dönüşmektedir. Antioksidan madde varlığında ferriksiyanit (Fe<sup>3+</sup>) kompleksi ferriksiyanit (Fe<sup>2+</sup>) kompleksi olan ferröz formuna indirgenir. K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> kompleksi bu kompleks ilave edilen FeCl<sub>3</sub> ile Perl's prussian mavisi Fe<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]<sub>3</sub> kompleksi oluşturarak 700 nm'de maksimum absorpsiyon verir (Ak Tuba, 2006).



**Şekil 4.8.** İndirgeme gücü (FRAP) yöntemi uygulanarak elde edilen troloksun kalibrasyon grafiği

FRAP yöntemine göre *Ziziphus zizyphus* ekstraktlarında bulunan toplam fenolik bileşiklerin konsantrasyonları Şekil 4.8'de verilen troloksun 450 nm'deki metanol çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerinden elde edilen grafik denkleminde troloksa eşdeğer olarak hesaplandı. Elde edilen grafiğin denklemi  $y = 0,006x$  olarak bulundu.



Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonlardaki *Ziziphus zizyphus* ekstraktının indirgeme kuvvetlerinin absorbans olarak birer standart antioksidan olan BHT ve BHA ile karşılaştırılması

Çizelge4.6. *Ziziphus zizyphus* ekstraktların trolokse eşdeğer (FRAP<sub>TEAC</sub>) konsantrasyonlarının karşılaştırılması

Konsantrasyon (mg/mL)	Antalya'da yetişen <i>Z. Zizyphus</i> ekstraktı (FRAP <sub>TEAC</sub> )	Özbekistan'da yetişen <i>Z. zizyphus</i> ekstraktı (FRAP <sub>TEAC</sub> )
2	19,63	20,16

Şekil 4.9.'da görüldüğü gibi *Ziziphus zizyphus* ekstraktları standart antioksidan olan BHT ve BHA'dan daha düşük bir antioksidan etki (indirgeme kapasitesi) göstermiştir. Çizelge 4.6. incelendiğinde ise 2mg/ml konsantrasyonda aralarında çok fazla bir değer farkı olmadığı fakat *Ziziphus zizyphus*'un Özbekistan'da yetişen metanol ekstraktının Antalya'dakine oranla biraz daha yüksek antioksidan aktivitesi gösterdiği bulunmuştur.

#### 4.6. HPLC Analizi Sonuçları

*Ziziphus zizyphus* ekstraktlarına antioksidan özellik sağlayan fenolik bileşikler ve flavonoidlerden bazıları yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile kalitatif ve kantitatif olarak tayin edilmiştir. Analizi yapılan bu bileşenler ve bu bileşenlerin metanol ekstraktının her birinden ne kadar bulunduğu Çizelge 4.7.'de verilmiştir. Tüm standartların analizine ilişkin kromatogram ise Şekil 4.10'da verilmiştir. Ayrıca Şekil 4.11'de Antalya'da yetişen *Ziziphus zizyphus*'un kromatogramı ve Şekil 4.12'de Özbekistan'da yetişen *Ziziphus zizyphus*'un kromatogramı görülmektedir. Sonuç olarak *Ziziphus zizyphus* ekstraktlarında analizlenen tüm antioksidan özellik gösteren standartlar *Ziziphus zizyphus* ekstraktlarının antioksidan kapasitesine katkıda bulunmuştur. En büyük katkı ise yüksek oranda bulunan



gallik asit, kateşin, p-kumarik asit, sinnamik asit ve ferulik asitten gelmiştir. Ancak bu standartlardan kafeik asit sadece Antalya’da yetişen *Ziziphus zizyphus* ekstraktında bulunurken kuersetine hiçbir ekstraktta rastlanmamıştır. Bununla birlikte her bir ekstraktta analiz edilemeyen bazı antioksidan maddelerin de bulunması muhtemeldir.

**Çizelge 4.7.** HPLC ile fenolik madde analiz sonuçları

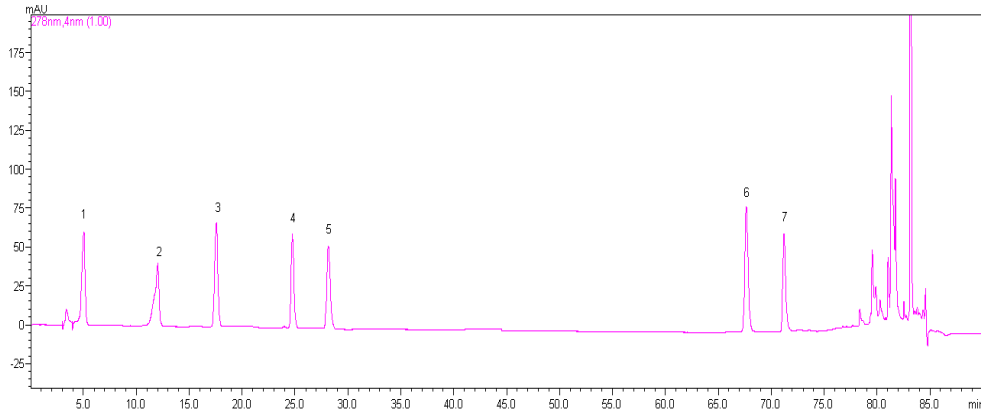
Numuneler	gallik asit	kateşin	kafeik asit	p-kumaric asit	ferulik asit	sinnamik asit	kuersetin
HA	6,39	3,90	2,15	1,36	2,56	0,43	*
HÖ	31,20	20,75	*	1,76	5,01	0,98	*

HA: Antalya’da yetişen *Ziziphus zizyphus* bitkisi,

HÖ: Özbekistan’da yetişen *Ziziphus zizyphus* bitkisi

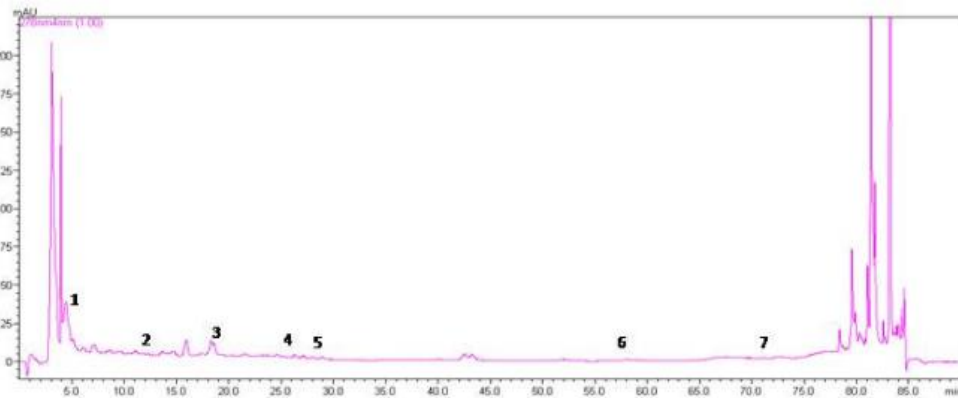
\*, tespit edilemedi

Sonuçlar mikrogram/gram olarak %95 güven aralığı ile verilmektedir.

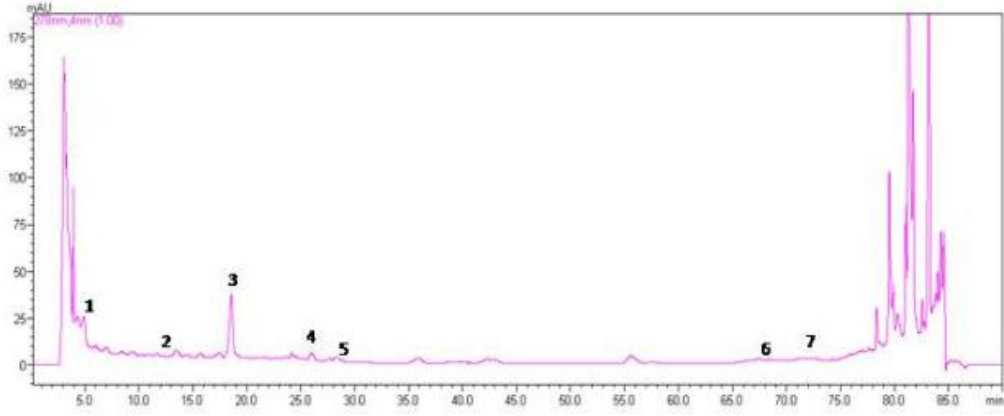


**Şekil 4.10.** Standart kromatogramı

1:gallik asit 2:kateşin 3:kafeik asit 4:p-kumarik asit 5:ferulik asit 6:sinnamik asit 7:kuersetin



**Şekil 4.11.** Antalya’da yetişen *Ziziphus zizyphus*’un kromatogramı



Şekil 4.12. Özbekistan'da yetişen *Ziziphus zizyphus*'un kromatogramı

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yaptığımız analizlerde Antalya’da yetişen *Ziziphus zizyphus* bitkisinin meyvesinin ve Özbekistan’da yetişen *Ziziphus zizyphus* bitkisinin meyvesinin metanol ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı tayini, toplam flavanoid madde miktarı tayini, DPPH• radikalinin süpürme etkisi,  $\beta$ -karoten lineolik asit emülsiyon sistemi, Kuprak yöntemi, indirgeme gücü aktiviteleri belirlendi. Elde edilen sonuçlar her iki ekstrakt için ayrı ayrı sentetik antioksidanlar olan BHA ve BHT ile karşılaştırıldı.

Toplam fenolik madde tayini ile ilgili ilk çalışmayı 1965 yılında Singleton ve arkadaşları yapmıştır. Folin Ciocalteu Metodunu kullanmışlardır. Atanassova ve arkadaşları *Melissa officinalis*, *Salvia officinalis* ve *Mentha piperita* bitkilerinin toplam fenolik madde içeriğini incelemişler. *Melissa officinalis* için 48,86 mg GAE/100g, *Salvia officinalis* için 27,94 mg GAE/100g ve *Mentha piperita* için ise 45,25 mg GAE/100g değerlerini elde etmişlerdir (Atanassova ve ark., 2011). Javanmardi ve arkadaşları *Ocimum basilicum* adlı bitkinin farklı türlerinin toplam fenolik madde içeriğini çalışmışlar, sonuç olarak 22,9 mg GAE/g’den 65,5 mg GAE/g’a kadar değişen değerler bulmuşlardır (Javanmardi ve ark., 2003). Biz de *Ziziphus zizyphus*’un 2 mg/mL metanol ekstraktlarının ihtiva ettiği fenolik madde miktarlarını gallik asite eşdeğer olarak hesapladık. Özbekistan’da yetişen *Ziziphus zizyphus* ekstraktının fenolik madde miktarını 0,90 mg GAE/g, Antalya’da yetişen *Ziziphus zizyphus* ekstraktının fenolik madde miktarını ise 0,58 mg GAE/g olarak bulduk.

Toplam flavanoid madde tayini ile ilgili ilk çalışmayı 2000 yılında Moreno ve arkadaşları yapmıştır. Kalorimetrik metot uygulamışlardır. Atanassova ve arkadaşları, *Melissa officinalis*, *Salvia officinalis* ve *Mentha piperita* bitkilerinin toplam fenolik madde içeriğinin yanında toplam flavanoid madde içeriğini de incelemişlerdir. Toplam flavanoid madde içeriklerini sırasıyla, *Melissa officinalis* için 45,06 mg CE/100g, *Salvia officinalis* için 27,54 mg CE/100g ve *Mentha piperita* için ise 25,17 mg CE/100g değerlerini elde etmişlerdir (Atanassova ve ark., 2011). Chang ve arkadaşları propolisteki toplam flavanoid madde içeriğini incelemişler, sonuç olarak 10,38 mg QE/g’den 24,91 mg QE/g’e kadar değişen değerler bulmuşlardır (Chang ve ark., 2002). Biz de ekstraktlarımızın ihtiva ettiği flavanol miktarlarını kuersetine eşdeğer olarak hesapladık. Özbekistan’da yetişen *Ziziphus zizyphus* ekstraktının flavanoid madde miktarını 0,38 mg GAE/g, Antalya’da yetişen *Ziziphus zizyphus* ekstraktın flavanoid madde miktarını ise 0,24 mg GAE/g olarak bulduk.

DPPH tayini ilk olarak 1958 yılında Blois tarafından yapılmıştır. Blois’ten sonra işlemin kısa süreli ve kolay olması nedeniyle metot sıklıkla uygulanmıştır. Reguia ve

arkadaşları *Ammi visnaga* bitkisinin antioksidan aktivitesini tayin etmek için dpph yöntemini uygulamışlardır. Bitkinin  $IC_{50}$  değerini  $8,77\pm 0,2 \mu\text{g/mL}$  ve bir standart olan Rutin'in  $IC_{50}$  değerini  $3,01\pm 0,2 \mu\text{g/mL}$  olarak bulmuşlar ve birbirleriyle kıyaslamışlardır. Buna bağlı olarakta DPPH radikalini süpürme aktivitesini saptamışlardır. Biz de *Ziziphus zizyphus*'un 2 mg/ml konsantrasyonda DPPH• radikalini % 50'sini söndüren ekstrakt miktarlarını ( $IC_{50}$ ) hesapladık. (Antalya'da yetişen *Z. Zizyphus* =  $10,34 \mu\text{g/mL}$ , Özbekistan'da yetişen *Z. Zizyphus* =  $9,82 \mu\text{g/mL}$ , BHA =  $3,5 \mu\text{g/mL}$ , BHT =  $1,5 \mu\text{g/mL}$ ) Ekstraktların ve sentetik antioksidanların DPPH radikalini süpürme aktivitelerini, Antalya'da yetişen *Z. zizyphus* > Özbekistan'da yetişen *Z. zizyphus* > BHA > BHT şeklinde sıraladık.

$\beta$ -karoten lineolik asit emülsiyon yöntemi ilk olarak 1971 yılında Miller tarafından yapılmıştır. Bu metotta antioksidan aktivite,  $\beta$ -karoten varlığında linoleik asitin oksidasyonu ölçülerek tayin edilmektedir. Aziz Türkoğlu ve arkadaşları *Laetiporus sulphureus*'un antioksidan aktivitesinin tayini için  $\beta$ -karoten lineolik asit emülsiyon yöntemini uygulamışlar ve ekstraktın inhibisyon değerini %82,2 bulmuşlardır. Bizim  $\beta$ -karoten lineolik asit emülsiyon yöntemi sonuçlarını incelediğimizde 2 mg/mL *Ziziphus zizyphus*'un Özbekistan'da yetişen metanol ekstraktının inhibisyon değerini %94,49 Antalya'da yetişen metanol ekstraktının inhibisyon değerini %88,83 olarak bulduk. Ayrıca bu yöntemle birer sentetik antioksidan olan BHT ve BHA'nin inhibisyon değerlerini hesapladık. BHT ve BHA için inhibisyon değerlerini sırasıyla, %84,2 ve %81,4 olarak elde ettik.

Benzie ve Strain ilk defa 1996 yılında indirgenme gücü Oyaizu metodunu uygulamışlardır. İndirgenmeye bağlı kalorimetrik metot kullanmışlardır. 593 nm'de 100  $\mu\text{mol/L}$  bilirubin, 280  $\mu\text{mol/L}$  albümin tayin etmişlerdir. Biz indirgeme gücü Oyaizu metoduna göre 2 mg/mL'deki *Ziziphus zizyphus*'un indirgeme kapasitesini, Özbekistan'da yetişen 1 gram *Z. zizyphus* ekstraktında 20,16 mg TEAC, Antalya'da yetişen *Z. zizyphus* ekstraktında ise 19,63 mg TEAC olarak tespit ettik.

Kuprak metodunu ilk olarak 2004 yılında Apak ve arkadaşları uygulamıştır. Metot bileşiklerde antioksidanlar varlığında kuprik iyonlarının kupröz iyonlarına indirgenmesini esas almaktadır. Simay Çıkrıkçı ve arkadaşları *Curcuma longa* bitkisinin antioksidan aktivitesini belirlemek için Kuprak yöntemini uygulamışlardır. Tayinde curcumin ve turmerik kullanmışlardır. Curcumin için  $KUPRAK_{TEAC}$  değeri 0,8 mg TEAC/g iken, turmerik için  $KUPRAK_{TEAC}$  değeri 0,7 mg TEAC/g'dır. Biz kuprak yöntemi antioksidan kapasite tayini için 2 mg/mL *Ziziphus zizyphus*'un Antalya'da yetişen metanol ekstraktı ile Özbekistan'da yetişen metanol ekstrastının  $KUPRAK_{TEAC}$  değerlerini hesapladık. Bu metoda göre *Ziziphus*

*zizyphus*'un Antalya'daki ekstraktının ve Özbekistan'daki ekstraktının trolokse eşdeğer miktarlarını sırasıyla, 18,3 mg TEAC/g ve 13,9 mg TEAC/g olarak elde ettik.

*Zizyphus zizyphus* estraklarının antioksidan aktivitede olduğu gibi indirgeme kapasitesinde de artan konsantrasyona bağlı olarak arttığı gözlemlenmiştir. İndirgeme gücü bir bileşiğin antioksidan aktivite göstermesinde önemli bir etken olabilir. Ancak herhangi bir saf maddenin antioksidan özelliği farklı mekanizmalar üzerinde gidebilir. Özetle antioksidan bileşikler antioksidatif özelliklerini geçiş metallerini bağlama, peroksitleri parçalama, radikal giderme gibi değişik mekanizmalar ile ortaya koyabilirler.

$\beta$ -karoten lineolik asit yöntemi ise hidrojen atom transferi esaslıdır. Elektron transfer esasına dayanan yöntemler, indirgendiğinde renk değiştiren yükseltgenlerin indirgenmesi sonucu antioksidanların kapasitesini ölçer. Bu olay bir absorbans artışı veya azalışı şeklinde olabilir. Renk değişiminin derecesi, numunenin toplam antioksidan konsantrasyonu ile ilişkilidir. Gerçekte hidrojen atomu transferi ve elektron transferi esaslı reaksiyonlar bir anlamda içiçedir ve aralarında aşılmaz sınırlar yoktur.

Bu çalışmada yapılan HPLC analizi ile ekstraktlarda gallik asit, kateşin, p-kumarik asit, sinnamik asit, ferulik asit, kafeik asit ve kuersetin kalitatif ve kantitatif olarak tayin edilmiştir. Elde edilen kromatogramlardan Özbekistan'da yetişen *Zizyphus zizyphus*'un metanol ekstraktının HPLC değerlerinin Antalya'da yetişenden daha yüksek olduğu görülmüştür. Her iki ekstraktta da gallik asit en yüksek değerde ve kateşin onun ardından gelmektedir. Özbekistan'dan elde edilen ekstrakttaki gallik asit değeri 31,20  $\mu\text{g/g}$  iken Antalya'dan elde edilende ise 6,39  $\mu\text{g/g}$ 'dır. Kateşin değerleri incelendiğinde ise Özbekistan ekstraktı 20,75  $\mu\text{g/g}$  ve Antalya ekstraktı ise 3,90  $\mu\text{g/g}$ 'dır. Diğer değerlerde de aynı şekilde Özbekistan'dan elde edilen ekstraktın Antalya'dan elde edilenden daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Sonuç olarak Antalya'da ve Özbekistan'da yetişen *Zizyphus zizyphus*'un metanol ekstraktlarının HPLC analizi ile biyokimyasal bileşimini belirledik. Yine aynı ekstraktlara toplam fenolik madde tayini ve toplam flavanoid madde tayini yöntemlerini uyguladık. Hem HPLC hem de fenolik ve flavanoid madde tayini yöntemleri sonucunda bitkilerdeki fenolik madde miktarının flavanoid madde miktarından fazla olduğunu bulduk.

Antioksidan kapasite tayini için de Antalya'da ve Özbekistan'da yetişen *Zizyphus zizyphus*'un metanol ekstraktlarına  $\beta$ -karoten lineolik asit emülsiyon yöntemi ile Kuprak yöntemini uyguladık, ardından ekstraktların indirgeme gücü ve DPPH radikal giderme aktivitelerini belirledik.

Elde ettiğimiz sonuçları standartlarla ve yapılmış olan bazı çalışmalarla kıyasladığımızda, *Ziziphus zizyphus* bitkisinin meyvelerinin tıp, farmasötik ve gıda sanayinde potansiyel bir antioksidan olarak kullanılabileceğini söyleyebiliriz.

## 6. KAYNAKLAR

Akkuş, İ., 1995, Serbest Radikaller ve Fizyolojik Etkileri, *Mimosa yayınları*, Konya, 134s.

Ak, Tuba., 2006, Curcuminin antioksidan ve antiradikal özelliklerinin incelenmesi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum.

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.*, 90, 7915-7922.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E., 2004, Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 7970-7981.

Aruoma, O.I., 1998, Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75(2), 199–212.

Barber, D, A., Harris, S, R., 1994, Oxygen Free Radicals and Antioxidants: A review, *Am. Pharmacy*, 34(9), 26-35.

Basaga, H, S., 1990, Biochemical Aspects of Free Radicals, *Biochem. Cell Biol.*, 68, 989-998.

Bast, A., Haenen, G, R, M, M., Doelman C, J, A., 1991, Oxidants and antioxidants: State of the art., *Am. J. Med.*, 91, 3625-3635.

Benzie, İ.F.F. and Strain, J.J., 1996, The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay, *Anal. Biochem.*, 239 (1), 70-76.

Bilinski, T., Litwinska, J., Blaszczynski, M., Verzej, B., 1989, Süperoxide Dismutase Deficiency and The Toxicity of The Products of Auto oxidation of Poly unsaturated Fatty Acid in Yeast, *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1001, 102-106.

- Blois, M.S., 1958, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 181, 1199-1200.
- Bonanni, A., Campanella, L., Gatta, T., Gregori, E., Tomassetti M., 2007, Evaluation of the antioxidant and prooxidant properties of several commercial dry spices by different analytical methods, *Food Chem.*, 102, 751–758.
- Brunori, M., Rotilio, G., 1984, Biochemistry of Oxygen Radical Species Method *Enzymol*, 105, 22-35.
- Burtis CA, Ashwood ER., 1999, Tietz Textbook of Clinical Chemistry, *W.B. Saunders Company*, Philadelphia, Pennsylvania.
- Cao, G., Prior, R.L., 1998, Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum, *Clin. Chem.*, 44,1309–1315.
- Cheeseman, K, H., Slater, T,F., 1993, An Introduction to Free Radical Biochemistry, *Br. Med. Bull.*, 49(3), 479-480.
- Dawn BM, Allan DM, Colleen MS., 1996, Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach, *Lippincott Williams & Wilkins Baltimore*, Maryland.
- Decker, E.A., K. Wagner, Richards, M.P., Shahidi, F., 2005, Measuring Antioxidant Effectiveness in Food, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4303-4310.
- Ellefson, W., Lilla Z., Crowley, R., 2006, Quantification and Evaluation of Antioxidants in Food and Botanical Products, *International Conference on Nutraceuticals and Functional Foods*, November 5-8, Reno, Nevada.
- Erden, M., 1992, Serbest radikaller , *T. Klin. Tip Bilimleri Dergisi*, 12, 201-207.
- Frankel, E.N., Meyer, A.S., 2000, The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants, *J. Sci. Food Agr.*, 80, 1925-1941.



- Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F., Scaccini, C., 2000, Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data, *Free Radical Biol. Med.*, 29, 1106- 1114.
- Gillespie, K.M., Chae, J.M., Ainsworth, E.A., 2007, Rapid measurement of total antioxidant capacity in plants, *Nat. Protoc.*, 2 (4), 867-870.
- Halliwell, B., Gutteridge, J, M, C., 1989, Oxygen radicals and singlet oxygen, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford, Clarendon., 93-109.
- Halliwell, B., Gutteridge, J, M, C., Cross, C, E., 1993, Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med.*, 119(6), 598-613.
- Halliwell, B., 1994, Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *The Lancet.*, 344, 721-24.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., 2005, The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1841-1856.
- Igari, T., Kaneda, H., Hourichi, S., Onu, S., 1982, A remarkable increase of superoxide dismutase activity in synovial fluid of patient with rheumatoid arthritis, *Clin Orthop and Related Research*, 162, 282-287.
- Lichtenthaler, R., Marx, F., Kind, O.M., 2003, Determination of antioxidative capacities using an enhanced total oxidant scavenging capacity (TOSC) assay, *Eur. Food Res. Technol.*, 216, 166–173.
- Lussignoli, S., Fraccaroli, M., Verioli, G., Brocco, G. and Bellavite, P., 1999, A microplate-based colorimetric assay of the total peroxyl radical trapping capability of human plasma, *Anal. Biochem.*, 269, 38–44.
- Magalhaes, L.M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J.L.F.C., 2008, Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties, *Anal. Chim. Acta*, 613, 1–19.

- MacDonald-Wicks, L.K., Wood L.G., Garg, M.L., 2006, Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review, *J. Sci. Food Agric.*, 86, 2046–2056.
- Markesbery, W.R., 1997, Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer, Disease, *Free Radical Biology and Medicine*, 23(1), 134-147.
- Mccord, J, M., Fridovich, I., 1969, Superoxide dismutase, *J. Biological Chemistry*, 244(22), 6049-6055.
- Mccord, J, M., Day, E, D., 1978, Superoxide-depent production of hydroxyl radical catalyzed by iron, EDTA complex, *FEBS Letters*, 86(1), 139-142.
- Mccord, J, M., 1985, Oxygen Derived Free Radicals in Postichemic Tissue Injury, *New Engl. J. Med.*, 17, 159-163.
- Mccord, J, M., 1993, Human Disease, Free Radicals and The Oxidant/Antioxidant Balance, *Clin. Biochem.*, 26, 351- 357.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A., 1993, A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clin. Sci.*, 84, 407–412.
- Miller H.E., 1971, A simplified method for evaluation of antioxidant, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 45, 91.
- Molyneux, P., 2004, The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *J. Sci.Technol.*, Songklanakar, 26 (2), 211- 219.
- Moreno, M.I.N., Isla, M.I., Sampietro, A.R., Vattuone, M.A, 2000, Comparison of the free radical-scavenging activity of Propolis from several regions of Argentina, *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 109–114.

- M. Atanassova, S. Georgieva, K. Ivancheva, 2011, Total phenolic and total flavanoid contents, antioxidant capacity and biological contaminants in medical herbs, *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 46, 1, 81-88.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R.L., 2001, Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity using fluoresce in as the fluorescent probe, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4619–4626.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., Deemer, E.K., Prior, R.L., Huang, D., 2002, Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluoresce in as the probe, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2772-2777.
- Oyaizu, M., 1986, Studies on Product of Browning Reaction Prepared from Glucose amine, *Japan of Nutrition*, 44: 307-315.
- Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M. and Brighenti, F., 2003, Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays, *J. Nutr.*, 133, 2812–2819.
- Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., 2006, Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays, *Food Res. Int.*, 39, 791–800.
- Price, J.A., Sanny, C.G., Shevlin, D., 2006, Application of manual assessment of oxygen radical absorbent capacity (ORAC) for use in high through put assay of “total” antioxidant, activity of drugs and natural products, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 54, 56 – 61.
- Prior, R.L., Cao, G., 1999, In vivo Total Antioxidant Capacity: Comparison of Different Analytical Methods, *Free Radical Bio. Med.*, 27, 1173–1181.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K., 2005, Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4290-4302.

- Reiter, R. J., 1998, Oxidative damage in the central nervous system: Protection by melatonin. *Progress in Neurobiology*, 56, 359-384.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999, Antioxidant activity applying an improved ABTS radicalcation decolorization assay, *Free Radic. Biol.Med.*, 26, 1231–1237.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F., 1998, A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols, *Journal of Science Food Agriculture*, 76, 270-276.
- Scalzo, R.L., 2008, Organic acids influence on DPPH scavenging by ascorbic acid, *Food Chem.*, 107,40–43,.
- Schoneich, C., 1999, Reactive oxygen species and biological aging: a mechanistic approach, *Experimental Gerontology*, 34(1), 19-34.
- Simay Çıkrıkçı, Erkan Mozioglu, Hasibe Yılmaz, 2008, Biological Activity of Curcuminoids Isolated from *Curcuma longa*, *Rec. Nat. Prod.*, 2:1, 19-24.
- Simonian, N, A., Coyle, J, T., 1996, Oxidative stress in neuro degenerative diseases, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 36, 83-106.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M., 1999, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by meansof Folin-Ciocalteu reagent, *Methods Enzymol.*, 2 99, 152-178.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A., 1965, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology Viticulture*, 16, 144–158.
- Somogyi, A., Rosta, K., Pusztai, P., Tulassay Z., Nagy, G., Antioxidant measurements, *Physiol. Meas.*, 28, R41–R55.

- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Byrne, D.H., 2006, Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts, *J. Food Compos. Anal.*, 19, 669–675,.
- Tietz NW., 1995, Clinical Guide to Laboratory Tests, *W.B. Saunders Company*, Philadelphia, Pennsylvania.
- Tomer, P.D., McLeman, L.D., Ohmine, S., Scherer, P.M., Murray, B.K., O’Neill, K.L., 2007, Comparison of the Total Oxyradical scavenging capacity and oxygen radical absorbance capacity antioxidant assays, *J. Med. Food*, 10 (2), 337-344.
- Türkoğlu, A., Duru, M.E., Mercan, N., Kıvrak, İ., K. Gezer, 2007, “Antioxidant and antimicrobial activity of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr”. *Food Chemistry*, 101, 267-273.
- Weiss, S.J., 1986, Oxygen, Ischemia and Inflammation, *Acta Physiol. Scve*, 548,9-13.
- Winrow, V, R., Winyard, P, G., Morris, C, J., Blake, D, R., 1993, Free radicals in inflammation: Second messengers and mediators of tissue destruction, *Dr MED Bull.*, 49, 506-522.
- Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E., Prior, R.L., 2004, Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 4026-4037.
- Yıldız, M., Oyar, O., Gülsoy, U, K., Yeşildağ, A., Baykal, B., Köroğlu, M., 2003, Tıbbi Görüntüleme Fiziği, *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi*, Isparta.

## 7. ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Fatih UÇKAYA  
**Uyruğu** : T.C.  
**Doğum Yeri ve Tarihi** : Alanya / 25.11.1985  
**Telefon** : 0 242522 47 43, 0 535 601 04 38  
**Faks** :  
**e-mail** : fatihuckaya@hotmail.com

### EĞİTİM

**Lise** : Alanya Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi, Alanya, 2004  
Antalya  
**Üniversite** : Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, Konya 2009  
**Yüksek Lisans:** Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, Konya -  
**Doktora** :

**YABANCI DİLLER:** İngilizce

**İLGİ ALANLARI:** Kitap okumak, gezmek, spor yapmak, fotoğraf çekmek.