



T.C.  
GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**SARI HALİLE ( *TERMINALIA CITRINA ROXB. EX. FLEMING*) TÜRÜNÜN  
ANTIOKSİDAN KAPASİTESİNİN ve FENOLİK İÇERİKLERİNİN  
BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Ebubekir ÖZLER**

**MART 2021  
GÜMÜŞHANE**



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

**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI**

**SARI HALİLE ( *TERMINALIA CITRINA ROXB. EX. FLEMING*) TÜRÜNÜN**  
**ANTIOKSİDAN KAPASİTESİNİN ve FENOLİK İÇERİKLERİNİN**  
**BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Ebubekir ÖZLER**

**Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**  
**“Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı”**  
**Yüksek Lisans Programında Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarihi : 15.02.2021**

**Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 05.03.2021**

**MART 2021**



## TEZ BEYANNAMESİ

Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda, tezin yazımına ait kurallara uygun olarak hazırladığım “Sarı Halile (*Terminalia citrina roxb. ex. fleming*) Türünün Antioksidan Kapasitesinin ve Fenolik İçeriklerinin Belirlenmesi” isimli yüksek lisans tezi çalışmasında; söz konusu tüm bilgi ve belgeleri genel akademik kurallara göre elde ettiğimi, görsel ve yazılı bütün bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğumu, başka kaynaklardan yararlandığım bilgileri metin ve kaynaklarda eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma süresince bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksi durumda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 05/04/2021

**Ebubekir ÖZLER**

**ÖZET**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SARI HALİLE ( *TERMINALIA CITRINA ROXB. EX. FLEMING*) TÜRÜNÜN**  
**ANTIOKSİDAN KAPASİTESİNİN ve FENOLİK İÇERİKLERİNİN**  
**BELİRLENMESİ**

Ebubekir ÖZLER

Gümüşhane Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Fevzi TOPAL

2021, 71 sayfa

Bu çalışmada sarı halile türünün antioksidan kapasitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. *Combretaceae* familyasına ait olan sarı halilenin (*Terminalia citrina roxb. ex. fleming*) meyvelerinin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstralarının antioksidan aktiviteleri değerlendirildi. Sarı halilenin antioksidan aktivitelerini araştırmak için 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil serbest radikal (DPPH<sup>•</sup>) giderme aktivitesi, 2,2'-azino-bis(3-etilbenztiyoazolin-6-sülfonik asit) radikal (ABTS<sup>+</sup>) giderme aktivitesi, CUPRAC metodu ile kuprik iyonları (Cu<sup>+2</sup>) indirgeme kapasitesi, FRAP metoduna göre Fe<sup>+3</sup> indirgeme kapasitesi, potasyum ferriksiyanat indirgeme metodu ile Fe<sup>+3</sup>-Fe<sup>+2</sup> indirgeme kapasitesi, N,N-dimetil-p-fenilendiamin radikal (DMPD<sup>+</sup>) giderme aktivitesi, bipiridil metal şelatlama aktivitesi, total fenolik bileşik miktar tayini, total flavonoid miktarı tayini, ferrik tiyosiyanat metoduna göre total antioksidan aktivite yöntemleri kullanıldı. BHA, BHT, α-tokoferol ve Troloks referans antioksidan olarak kullanıldı. Çalışmada kullanılan yöntemlerde sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstralarının genel olarak iyi bir antioksidan

aktivitesi gösterdiği belirlendi. Radikal giderme aktivitelerinde, standart antioksidanlardan Troloks antioksidanına yakın değerler gösterdi ancak ABTS<sup>+</sup> metodunda Troloks standardından daha iyi sonuç verdiği belirlendi. İndirgeme kapasitesi metotlarına bakıldığı zaman BHA standardı gibi davrandığı ve diğer standartlardan daha iyi indirgeme kapasitesine sahip olduğu gözlemlendi. Ayrıca şelatlama aktivitesi değerlendirildiği zaman  $\alpha$ -tokoferol ve Troloks standartlarından daha yüksek olduğu belirlendi. Sarı halilenin su ve alkol ekstralarının lipit peroksidasyonu inhibe etme yüzdeleri sırasıyla 89.93-93.76 olarak bulundu. Ayrıca sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve etil alkol ekstralarının LC-HRMS (Sıvı Kromatografisi Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometresi) cihazı kullanılarak fenolik içeriğide belirlendi. Sarı halilenin su ekstresinde syringic asit, alkol ekstresinde ise ellagic asit miktarı diğer asitlere göre fazla oranda bulundu. Sarı halilenin antioksidan kapasiteli bir meyve olduğu belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidan aktivite, fenolik bileşikler, radikal giderme, metal şelatlama, LC-HRMS

**ABSTRACT  
MS THESIS**

**DETERMINATION OF ANTIOXIDANT CAPACITIES and PHENOLIC  
CONTENTS OF YELLOW HALİLE (*TERMINALIA CITRINA ROXB. EX  
FLEMING*)**

Ebubekir ÖZLER

Gümüşhane University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Fevzi TOPAL

2021, 71 pages

This study was aimed to determine the antioxidant capacity of *Terminalia citrina roxb. ex. fleming*. The antioxidant activities of lyophilized water and alcohol extracts of the fruits of *Terminalia citrina roxb. ex. fleming* belonging to the *Combretaceae* family were evaluated. 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl free radical (DPPH $\cdot$ ) scavenging activity, 2,2'-azino-bis (3ethylbenzthioazoline-6-sulfonic acid) radical (ABTS $^{+}$ ) removal to investigate the antioxidant activities of *Terminalia citrina roxb. ex. fleming* activity, reduction capacity of cupric ions (Cu $^{+2}$ ) by CUPRAC method, Fe $^{+3}$  reduction capacity according to FRAP method, Fe $^{+3}$ -Fe $^{+2}$  reduction capacity with potassium ferricyanate reduction method, N, N-dimethyl-p-phenylenediamine radical (DMPD $^{+}$ ) removal activity, bipyridyl metal



chelating activity, total phenolic compound assay, total flavonoid determination, total antioxidant activity methods according to the ferric thiocyanate method were used. BHA, BHT,  $\alpha$ -tocopherol and trolox were used as reference antioxidants. The methods used in this study, it was determined that the lyophilized water and alcohol extracts of *Terminalia citrina roxb. ex. fleming* generally showed a good antioxidant activity. In radical scavenging activities, it showed values close to the standard antioxidant trolox antioxidant, but it gave better results than the trolox standard in the ABTS $\cdot^+$  method. When looking at the reduction capacity methods, it has been observed that it behaves like the BHA standard and has a better reduction capacity than other standards. In addition, when the chelating activity was evaluated, it was determined that it was higher than the  $\alpha$ -tocopherol and trolox standards. The percentage of inhibition of lipid peroxidation of water and alcohol extracts of *Terminalia citrina roxb. ex. fleming* was 89.93-93.76 respectively. In addition, the phenolic content of the lyophilized water and ethyl alcohol extracts of *Terminalia citrina roxb. ex. fleming* was determined using LC-HRMS (Liquid Chromatography High Resolution Mass Spectrometer) device. The amount of syringic acid in the water extract of the *Terminalia citrina roxb. ex. fleming* and ellagic acid in the alcohol extract were found to be higher than the other acids. It was determined that the *Terminalia citrina roxb. ex. fleming* is a fruit with antioxidant capacity.

**Keywords:** Antioxidant activity, phenolic compounds, radical scavenging, metal chelating, LC-HRMS

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır. 20.F5115.01.01 No'lu proje kapsamında çalışmaya maddi destek sağlayan Gümüşhane Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkür ederim.

Çalışmalarında hep yanımda olan, yardım ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım danışman hocam Sayın Doç. Dr. Fevzi TOPAL' a,

Gümüşhane Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Dekan Vekili Sayın Prof. Dr. Salim Serkan NAS'a, Gıda Mühendisliği bölümümüzün bütün imkanlarını bana sunan bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Bilge BAHAR'a, çalışmalarım sırasında desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Sevim Beyza ÖZTÜRK SARIKAYA'ya ve Doç. Dr. Meryem TOPAL'a,

Gümüşhane Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Gıda Mühendisliği laboratuvarındaki çalışma arkadaşlarım Selahattin KOCABAŞ, Adem İKTÜ ve Gizem COŞKUN'a

Ayrıca maddi ve manevi yardımını hiçbir zaman esirgemeyen babam Yılmaz ÖZLER ve annem Songül ÖZLER'e, destekleriyle her zaman yanımda olan abim ve ablalarım teşekkür ederim.

Ebubekir ÖZLER

Gümüşhane, 2021

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa No

ÖZET .....	IV
ABSTRACT .....	VI
TEŞEKKÜR .....	VIII
İÇİNDEKİLER .....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	XI
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	XIV
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	XV
1 GİRİŞ .....	1
1.1. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar .....	1
1.1.1. Serbest Radikaller ve Etkileri .....	1
1.1.2. Antioksidanlar .....	8
1.1.3. Fenolik Bileşikler .....	14
1.2. Sarı Halile Meyvesi ( <i>Terminalia citrina roxb. ex. fleming</i> ) .....	16
1.3. Çalışmanın Amacı .....	17
2. KAYNAK ÖZETLERİ .....	19
3. MATERYAL ve YÖNTEM .....	24
3.1. Materyal .....	24
3.1.1 Bitki Materyali .....	24
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Ekipmanlar .....	24
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması .....	25
3.1.3.1. Total Fenolik Bileşik Miktarı Tayini İle İlgili Çözeltiler .....	25
3.1.3.2. Total Flavonoid Bileşik Miktarı Tayini İle İlgili Çözeltiler .....	25
3.1.3.3. CUPRAC Metoduna Göre İndirgeme Kapasitesi Tayini İle İlgili Çözeltiler .....	25
3.1.3.4. FRAP İndirgeme Metodu İle İlgili Çözeltiler .....	26
3.1.3.5. Fe <sup>3+</sup> -Fe <sup>2+</sup> İndirgeme Kapasitesi Tayini İle İlgili Çözeltiler .....	26

3.1.3.6.	DPPH· Serbest Radikal Giderme Aktivitesi İle İlgili Çözeltiler.....	27
3.1.3.7.	ABTS <sup>+</sup> Giderme Aktivitesi Tayini İle İlgili Çözeltiler.....	27
3.1.3.8.	DMPD <sup>+</sup> Giderme Aktivitesi Tayini İle İlgili Çözeltiler .....	27
3.1.3.9.	Bipiridil Metal Şelatlama Metodu İle İlgili Çözeltiler .....	27
3.1.3.10.	Total Antioksidan Aktivitesi Tayini İle İlgili Çözeltiler .....	28
3.2.	Yöntem.....	28
3.2.1.	Sarı Halile Ekstraktlarının Hazırlanması .....	28
3.2.2.	Total Fenolik Bileşik Miktarı Tayini .....	28
3.2.3.	Total Flavonoid Miktarı Tayini .....	29
3.2.4.	Sarı Halile Meyvesinin Fenolik Asit İçeriklerinin Belirlenmesi .....	29
3.2.4.a.	Test Çözeltisinin Hazırlanması.....	30
3.2.4.b.	Cihazlar ve Kromatografik Şartlar .....	30
3.2.4.c.	LC-HRMS Prosedürü.....	30
3.2.5.	Cu <sup>2+</sup> -Cu <sup>+</sup> İndirgeme Kapasitesi (CUPRAC Metodu).....	30
3.2.6.	FRAP İndirgeme Kapasitesi .....	31
3.2.7.	Fe <sup>3+</sup> -Fe <sup>2+</sup> İndirgeme Kapasitesi .....	31
3.2.8.	DPPH Serbest Radikalleri Giderme Aktivitesi .....	31
3.2.9.	ABTS Radikali Giderme Aktivitesi .....	32
3.2.10.	DMPD Radikali Giderme Aktivitesi.....	32
3.2.11.	Bipiridil Metal Şelatlama Aktivitesi .....	32
3.2.12.	Total Antioksidan Aktivitesi.....	33
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI.....	34
4.1.	Total Fenolik Bileşik Miktarı Tayini Bulguları.....	34
4.2.	Total Flavonoid Bileşik Miktarı Tayini Bulguları .....	34
4.3.	Sarı Halilenin Liyofilize Edilmiş Su ve Alkol Ekstresinin Fenolik Asit İçerikleri İle İlgili Bulgular .....	35
4.4.	Cu <sup>2+</sup> - Cu <sup>+</sup> İndirgeme Kuvveti (CUPRAC Metodu) Bulguları.....	40

4.5.	Ferrik İndirgeme Kuvveti (FRAP) Bulguları.....	41
4.6.	Fe <sup>3+</sup> -Fe <sup>2+</sup> İndirgeme Kuvveti Bulguları .....	42
4.7.	DPPH Serbest Radikal Giderme Aktivitesi Bulguları .....	43
4.8.	ABTS <sup>•+</sup> Giderme Aktivitesi Bulguları.....	44
4.9.	DMPD Radikal Giderme Aktivitesi Bulguları.....	45
4.10.	Bipiridil Metal Şelatlama Aktivitesi Bulguları.....	47
4.11.	Total Antioksidan Aktivitesi Bulguları .....	48
5.	TARTIŞMA ve SONUÇ .....	51
6.	KAYNAKLAR .....	61
	ÖZGEÇMİŞ	

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 1.1.	Moleküler oksijenden ara ürünler oluşması .....	5
Şekil 1.2.	Lipid peroksidasyonu mekanizması .....	7
Şekil 1.3.	Bazı sentetik antioksidanların kimyasal yapıları.....	11
Şekil 1.4.	C vitamininin (askorbik asit) kimyasal yapısı.....	11
Şekil 1.5.	Tokoferoller ve tokotrienollerin kimyasal yapıları .....	13
Şekil 4.1.	Total fenolik bileşik miktarı tayini sonucu elde edilen standart grafik.....	34
Şekil 4.2.	Total flavonoid bileşik miktarı tayini sonucu elde edilen standart grafik.....	35
Şekil 4.3.	Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ekstresinden kantitatif olarak belirlenen fenolik asit içeriklerini belirten kromatogramlar .....	38
Şekil 4.4.	Sarı halilenin alkol ekstresinden kantitatif olarak belirlenen fenolik asit içeriklerini belirten kromatogramlar .....	39
Şekil 4.5.	Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinin farklı konsantrasyonlardaki (10, 20 ve 30 µg mL <sup>-1</sup> ) kuprik iyonlarını (Cu <sup>2+</sup> ) indirgeme aktivitesinin standart antioksidanlar ile karşılaştırılması .....	40
Şekil 4.6.	Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinin farklı konsantrasyonlardaki (10, 20 ve 30 µg mL <sup>-1</sup> ) FRAP metoduna indirgeme aktivitesinin standart antioksidanlar ile karşılaştırılması .....	41
Şekil 4.7.	Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinin farklı konsantrasyonlardaki (10, 20 ve 30 µg mL <sup>-1</sup> ) ferrik iyonlarını (Fe <sup>3+</sup> ) indirgeme kuvvetinin standart antioksidanlar ile karşılaştırılması.....	42
Şekil 4.8.	Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinin farklı konsantrasyonlardaki (10, 20 ve 30 µg mL <sup>-1</sup> ) DPPH serbest radikali giderme aktivitelerinin BHA, BHT, α-tokoferol ve Troloks gibi standart antioksidanlar ile karşılaştırılması .....	44
Şekil 4.9.	Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinin farklı konsantrasyonlardaki (5, 10 ve 15 µg mL <sup>-1</sup> ) ABTS <sup>+</sup> giderme aktivitelerinin BHA, BHT, α-tokoferol ve Troloks gibi standart antioksidanlar ile karşılaştırılması .....	45

Şekil 4.10.	Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinin farklı konsantrasyonlardaki (10, 20 ve 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) DMPD <sup>+</sup> giderme aktivitelerinin BHA ve Troloks gibi standart antioksidanlar ile karşılaştırılması .....	46
Şekil 4.11.	Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresi, EDTA, BHA, BHT, Troloks ve $\alpha$ -tokoferolun 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonda bipiridil metal iyonlarını şelatlama aktivitelerinin yüzde olarak karşılaştırılması.....	48
Şekil 4.12.	Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinin 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyondaki total antioksidan aktivitesinin BHA, BHT, $\alpha$ -tokoferol ve Troloks gibi standart antioksidanlar ile karşılaştırılması .....	49
Şekil 5.1.	Gallik asitin kimyasal yapısı .....	53
Şekil 5.2.	Kuersetinin kimyasal yapısı .....	54
Şekil 5.3.	Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresi, EDTA, BHA, BHT, Troloks ve $\alpha$ -tokoferolun 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonda bipiridil metal iyonlarını şelatlama aktivitelerinin yüzde olarak karşılaştırılması.....	57

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa No

Çizelge 1.1.	Endojen ve ekzojen kaynaklı serbest radikaller.....	3
Çizelge 1.2.	Antioksidanların endojen ve ekzojen olarak sınıflandırılması.....	9
Çizelge 1.3.	Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması .....	15
Çizelge 4.1.	Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinde (750 µg mL <sup>-1</sup> ) fenolik bileşiklerin gallik asit ekivalen (GAE) ve flavonoid bileşiklerin kuersetin ekivalen (KE) olarak hesaplanan miktarları.....	35
Çizelge 4.2.	Sarı Halile bitkisinin su ekstresi ve alkol ekstresinde tayin edilen fenolik bileşik miktarları (mg/g) .....	36
Çizelge 4.3.	LC-HRMS ile fenoliklerin belirlenmesi için uygulanan yöntemin kütle parametreleri ve lineer regresyon denklemi.....	37
Çizelge 4.4.	20 µg mL <sup>-1</sup> konsantrasyonda sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinin ferrik iyonlarını (Fe <sup>3+</sup> ) ve kuprik (Cu <sup>2+</sup> ) iyonlarını indirgeme kapasitelerinin ve FRAP metoduna göre ferrik iyonlarını (Fe <sup>3+</sup> ) indirgeme kapasitelerinin standart antioksidanlar ile karşılaştırılması .....	43
Çizelge 4.5.	Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstrelerinin DPPH <sup>•</sup> , ABTS <sup>•+</sup> ve DMPD <sup>•+</sup> radikali giderme aktivitelerinin IC <sub>50</sub> değerlerinin BHA, BHT, α-tokoferol ve Troloks gibi standart antioksidanlar ile karşılaştırılması.....	47
Çizelge 4.6.	Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstrelerinin (20 µg mL <sup>-1</sup> ) lipid peroksidasyonunu giderme yüzdeleri .....	47
Çizelge 5.1.	Sarı halile-Su, Sarı halile-Alkol ve standart antioksidanların DPPH <sup>•</sup> , ABTS <sup>•+</sup> ve DMPD <sup>•+</sup> giderme aktivitelerinin IC <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> ) değerleri .....	53
Çizelge 5.2.	Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinde (750 µL) fenolik bileşiklerin gallik asit ekivalen (GAE) ve flavonoid bileşiklerin kuersetin ekivalen (KE) olarak hesaplanan miktarları .....	54
Çizelge 5.3.	Sarı halile-Su, Sarı halile-Alkol ve standart antioksidanların 20 µg mL <sup>-1</sup> konsantrasyonda CUPRAC, FRAP ve Fe <sup>3+</sup> indirgeme kapasiteleri .....	56
Çizelge 5.4.	Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinin (20 µg mL <sup>-1</sup> ) lipid peroksidasyonunu giderme yüzdeleri .....	58



## SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS	: 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzttiyazolin-6-sülfonik asit)
ABTS <sup>·+</sup>	: 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzttiyazolin-6-sülfonik asit) radikali
GAE	: Gallik asit ekivalen
HRMS	: Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi
IC <sub>50</sub>	: Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
KE	: Kuersetin ekivalen
LC	: Sıvı kromatografisi
LOO <sup>·</sup>	: Lipit peroksit radikali
LOOH	: Lipit hidroperoksit
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Mili molar
P	: Permeabilite faktörü
PG	: Propilgallat
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
ROS	: Serbest oksijen radikali
TBHQ	: Tersiyer bütıl hidrokinon
TCA	: Triklorasetik asit
Tris	: Trihidroksimetil amino metan
Troloks	: 6-Hidroksi-2,5,7,8-tetramethilkroman-2-karboksilik asit
UV	: Ultraviyole
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre

## **1. GİRİŞ**

### **1.1. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar**

#### **1.1.1. Serbest Radikaller ve Etkileri**

Ortaklanmamış elektrona sahip, kararsız yapıda bulunan ve kendilerini kararlı bir yapıya getirmek amacıyla etrafında bulunan atom ve moleküllere saldırıp kısa sürede tepkimeye giren moleküllere serbest radikal molekülleri adı verilir (Gökpınar vd., 2006).

Serbest radikaller çok aktif moleküllerdir. Serbest radikaller bu özellikleri sayesinde sürekli başka moleküllere saldırırlar, bu şekilde diğer moleküllere saldırdıklarında onların elektronlarını alarak diğer molekülleri de kendileri gibi serbest radikal yaparlar. Böylece serbest radikal zincir reaksiyonu başlayarak hücrelerin hasar görmesine neden olurlar. Serbest radikallerin zararlarından en çok etkilenenlerden biride hücre zarıdır. Çünkü hücre zarından elektron alarak eşlenmeye başlar ve yapısında bozulmaya sebep olur (Gökpınar vd., 2006).

Serbest radikaller reaktivlik konusunda farklılık gösterir. Bazıları nispeten kararlıdır, ancak biyolojik ilginin çoğu serbest radikali aşırı reaktif ve kararsız olma eğilimindedir; sonuç olarak, çok kısa bir ömre sahiptirler (bir saniyenin fraksiyonları ile ölçülür). Oksijen radikallerinin en reaktifi hidroksildir (Pryor, 1986).

Serbest radikaller negatif, pozitif veya sıfır yükleri olabilir. Eşleşmemiş elektronlar radikallerin kimyasal olarak oldukça reaktif olmasına neden olur. Hidroksil ve alkoksil serbest radikalleri çok reaktiftir ve yakındaki hücrelerdeki moleküllere hızla saldırır ve muhtemelen bunların neden olduğu hasar kaçınılmazdır. Öte yandan, süperoksit anyon, lipid hidroperoksitler ve nitrik oksit daha az reaktiftir (Ames vd., 1993).

Serbest radikaller hücre için çok önemli yeri olan protein, lipid ve karbonhidratlar gibi organik bileşiklere etkilerini göstererek zarar verirler. Vücuda fayda sağlayan enzimleri oksidatif hasara uğratar. Bu sebeplerden dolayı insanlarda astım, diyabet, parkinson ve tansiyon gibi çok fazla sayıda hastalığa neden olmaktadır (Mates ve Sanchez-Jimenez, 2000).

Bir molekülde birden fazla radikal merkez bulunabilmektedir. Bu moleküller, iki radikal merkez içeren diradikaller olarak adlandırılır. Atmosferik oksijenin yüksek reaktivitesi diradikal durumundan kaynaklanmaktadır. Radikal olmayan dioksijen durumları, aslında daha az karardır. Serbest radikaller, granüositler ve makrofajlar gibi fagositik hücreler tarafından bakterilerin hücre içinde öldürülmesi gibi bazıları yaşam için gerekli olan bir dizi biyolojik süreçte önemli bir rol oynar. Bazı araştırmacılar, belirli hücre sinyalleme süreçlerinde serbest radikalleri de dahil etmişlerdir (Pacher vd., 2007).

Oksidan ve antioksidan sistemler arasında bir denge vardır. Bu dengenin korunması, hücre ve dokuların yapısal bütünlüğünün korunmasında ve normal fonksiyonlarını yerine getirmelerinde büyük etkiye sahiptir (Serafani ve Del Rio, 2004).

Oksijen, canlıların hayatlarında çok önemli bir yere sahiptir. Solunum olayının tamamlanmasında vücudun sahip olduğu oksijenin büyük bir kısmını kullanmasıyla gerçekleşir. Geriye kalan kısımdan oksijen gerektiren tepkimelerde yararlanır (Bulkley, 1983). Serbest radikal oluşumunda oksijen molekülü çok büyük etkiye sahiptir. Oksijen molekülünün doğası gereği birçok serbest radikal ile basit bir şekilde reaksiyona girebilirler. Genellikle serbest radikallerden elektron alarak tepkime gerçekleştirirler (Cheeseman ve Slater, 1993).

Reaktif oksijen türleri (ROS) oksijenin metabolizmada normal kullanılması sırasında meydana gelebilir (Gülçin, 2010). Oksijen molekülü su üretimi için dört elektrona gereksinim duymaktadır. Su üretimi için oksijenin %98'i kullanılırken geriye kalan küçük kısımdan ise ara ürünler (reaktif oksijenler) oluşur. Hidroksil radikali, süperoksit radikali ve hidrojen peroksit oluşan reaktif oksijen türleridir (Davies, 1995; Öztürk Sarıkaya, 2009).

ROS, süperoksit anyon radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil ( $OH^{\cdot}$ ) radikalidir. Serbest radikal olmayan ROS olan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), singlet oksijen ( $^1O_2$ ), hipoklorik asit (HOCl), ozon ( $O_3$ ) ve peroksinitrit ( $ONOO^{\cdot-}$ ) gibi türlerini kapsamaktadır (Halliwell ve Gutteridge 1999; Gülçin, 2012). Serbest radikal oluşumu dış etkenler sebebiyle de gerçekleşebilir. Dış etkenlere örnek verilecek olursa bunlar: sigara ve nargile gibi tütün ürünleri tüketimi, alkol tüketimi, sağlıksız beslenme, çevre kirliliği ve radyasyon gibi birçok sebepten meydana gelebilir (Gökpınar vd., 2006).

Oksidasyon reaksiyonları birçok gıda türünün bozulmasına neden olurlar. Örnek verilecek olursa; süt ve süt ürünlerinin ekşimesi, et türlerinin bozulması ve bitkisel ürünlerin kokmasına sebep olur (Davies, 2000). ROS, hücrel bileşenler tarafından etkili bir şekilde atılmazsa, hastalık koşullarına yol açar (Sharma vd., 2005; Ak ve Gülçin., 2008) İnsanlarda görülen kanser türlerinin çok büyük bir kısmının gelişme olasılığı, hücreler ve dokulardaki serbest radikal reaksiyonları ile desteklenir (Harman, 1984).

Organizmalarda serbest radikaller farklı yöntemler kullanarak oluşabilirler. Çiftçilik işlerinde kullanılan ilaçlar, sigara, UV ışınları serbest radikal oluşum kaynaklarından sadece birkaç tanesidir. Serbest radikaller endojen ve eksojen kaynaklı 2 farklı yolla meydana gelebilirler (Alhan ve Şan, 2002).

Çizelge 1.1. Endojen ve eksojen kaynaklı serbest radikaller (Annakkaya, 2012).

<b>Endojen Kaynaklar</b>	<b>Eksojen Kaynaklar</b>
Mitokondrial ETS	Diyet faktörleri
Redoks reaksiyonları	Sigara dumanı
Oksidatif reaksiyonlar	Zararlı ışınlar
Otooksidasyon reaksiyonları	İlaçlar
Araşidonik asit metabolizması	Organik çözücüler
Bazı enzimler	Pestisitler

ROS, normal fizyolojik olaylar sırasında sürekli olarak üretilir ve membran lipidlerinin peroksidasyonunu kolayca başlatarak lipid peroksitlerin birikmesine yol açabilir. ROS, oksidatif hasara neden olurlar. Aynı zamanda serbest radikaller lipitler, protein ve nükleik asitlere ciddi anlamda zarar verebilirler. Serbest radikaller vücutta kanser, kalp hastalığı, diyabet, mide ülseri gibi 100'den fazla hastalığın başrollerindedir (Gülçin, 2007; Gülçin, 2010). ROS'nin, hastalıkların metabolizmayı etkilerindeki gücün artışına sebep olduklarını gösteren çok fazla belge ve araştırma vardır. Antioksidan sistemler zararlı sistemlerin güçlerini söndürme yeteneğini kullanarak insan sağlığı için büyük bir öneme sahiptir (Cao ve Prior, 2002).

Reaktif oksijen türleri hücrel bileşenler tarafından etkin bir şekilde temizlenmezse, serbest radikal zincir reaksiyonlarını uyarıp lipitler, proteinler ve nükleik asitler gibi hücrel biyomoleküllere hasarda bulunup, sonunda hastalık koşullarına yol açabilirler (Gülçin, 2012).

Lipitlere, proteinlere ve nükleik asitlere çeşitli hasarlar veren ve bu hasarlar sonucu hastalıklara sebep olan pro-oksidan zehirli bir maddedir. Pro-oksidanlar ROS'ni ve RNS'nden oluşurlar. Bu yüzden pro-oksidanların yapılan araştırmalar ve bulgular sonucunda hastalıklara neden olduğu bildirilmektedir. Fakat vücudun antioksidan savunma sisteminin bu zararlılara karşı korumasıyla ne kadar önemli bir yere sahip olduğu görülmektedir (Prior ve Cao, 2001).

Gıdaların depolama ve pişirilme zamanlarında kullanılan antioksidan değeri yüksek baharatlar gıdalardaki tat ve doku bozulmalarına önemli derecede gerilettiği, çok eski zamandan günümüze kadar bilinmektedir (Halliwell, 2002). Serbest radikaller insanlarda görülen kanserin başlangıç evresinden daha ileri safhalara katetmesine etki ederek zararın büyümesine neden olurlar. Ancak antikarsinojen etkiye sahip antioksidanların bu zarara zıt yönde etki göstererek engellemeye çalıştığı bilinmektedir (Landvik vd., 2002).

Serbes radikallerin hücre ve dokularda hangi zararlara neden oldukları şu şekilde sıralanabilir (Kehre ve Smith, 1994; Halliwell ve Gutteridge, 1999).

- Mutasyon sonucu DNA tahribi
- Nükleotit yapılı koenzimlerin tahribi
- Protein yapılarında tahrip oluşumu
- Steroid ve yaş pigmenti adı verilen maddelerin birikimi
- Membran proteinlerin yıkımı ve membran transport sisteminin tahribi
- Mukopolisakkaritlerin tahribi

Serbest radikallerin gereğinden fazla birikimi vücudumuz için tehlike arz eder. Fakat vücudun normal görevlerini yerine getirebilmesi içinde ihtiyaç duyulur (Temur, 2006). Serbest radikaller 3 farklı olayla meydana gelebilir.

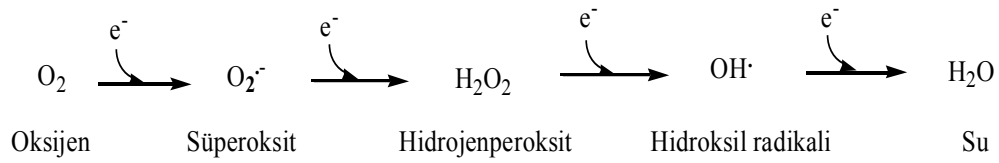
- 1) elektron transferi ile
- 2) homolitik parçalanma ile
- 3) heterolitik parçalanma ile radikal oluşur (Cheeseman ve Slater, 1993).

Elektron transferi sonucu meydana gelen radikal oluşumu:  $A + e^- \longrightarrow A^\cdot$

Homolitik parçalanma sonucu meydana gelen radikal oluşumu:  $C : D \longrightarrow C^\cdot + D^\cdot$

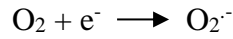
Heterolitik parçalanma sonucu meydana gelen radikal oluşumu:  $C : D \longrightarrow C^- + D^+$

Serbest radikal molekülleri için oksijen molekülü önemli bir yere sahiptir. Oksijenin molekülünün 2 elektronu eşleşmediği için di-radikal olarak da adlandırılabilir. Oksijen molekülünün di-radikal özelliğinden dolayı diğer serbest radikallerle hızlı ve kolay bir şekilde reaksiyona girebilirler (Cheeseman ve Slater, 1993).



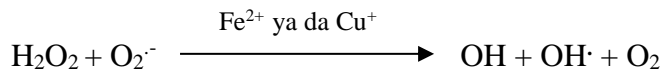
Şekil 1.1. Moleküler oksijenden ara ürünler oluşması (Öztürk Sarıkaya, 2009).

Süperoksit radikali dış etkenler ve bazı reaksiyonlar sonucunda en fazla ve en basit meydana gelen oksijen kaynaklı radikaldir (Halliwell, 1989). Süperoksit radikali seri bir şekilde dismutaz enzimi ile hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) dönüştürüldüğü için oksidatif zarara neden olmaları çok nadir görülür (Öztürk Sarıkaya, 2009).

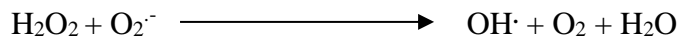


Hidroksil radikali ( $OH^\cdot$ ) fazla reaktif bir moleküldür ve diğer moleküllere saldırarak hasar görmelerine neden olurlar (Gülçin, 2012). Hidroksil radikali Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu meydana gelir (Halliwell ve Gutteridge, 1989; Malo Wilson, 2000).

Fenton reaksiyonları:



Haber-Weiss reaksiyonu:

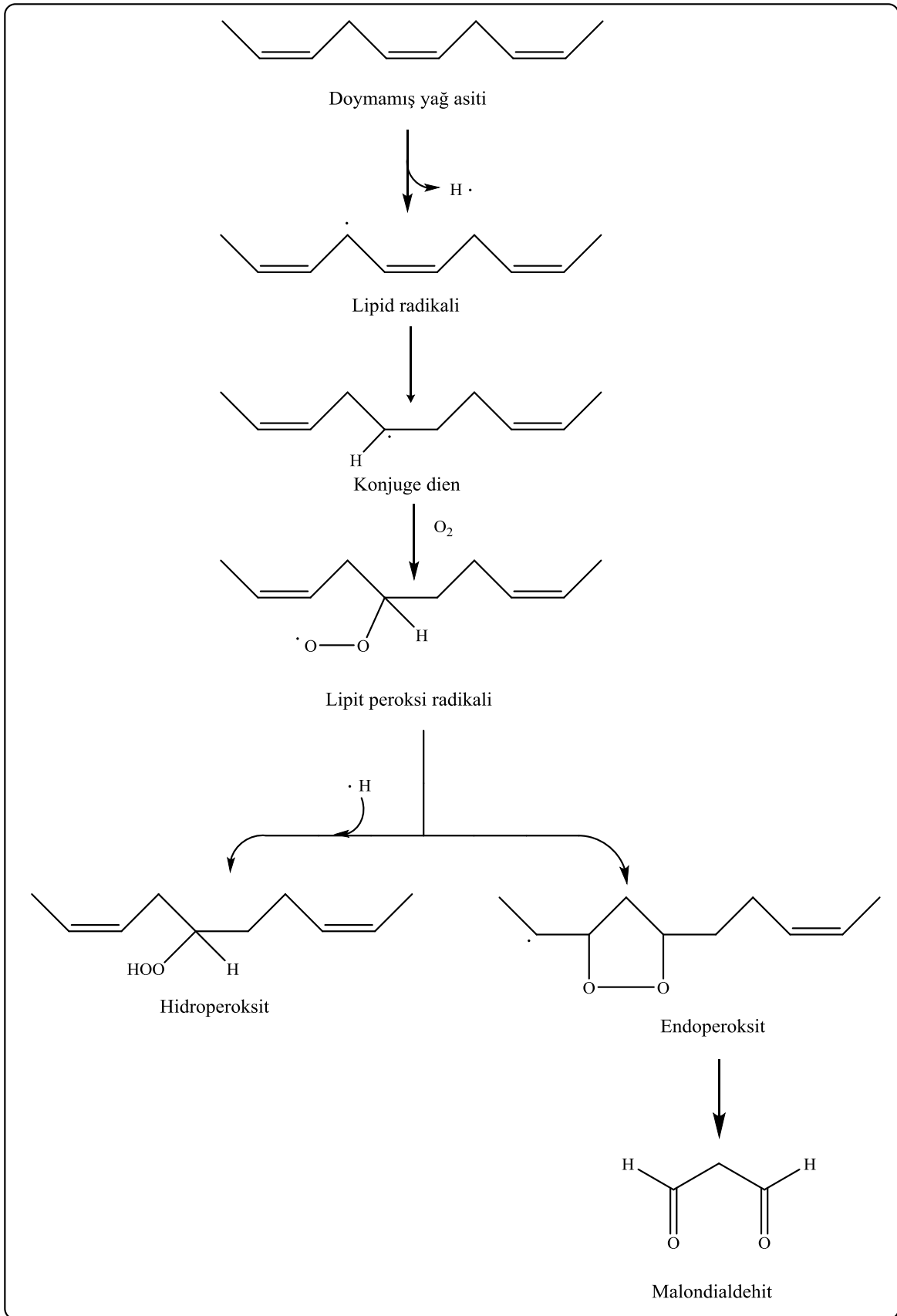


Singlet oksijen bir radikal değildir, ROS'nden biridir ve ultraviyole ışınlamanın neden olduğu cilt hasarından ve sitotoksik anti-kanser etkisinden sorumludur. Fotodinamik tedavi ve ciltte yaşlanma sırasında tümör hücrelerinde sitotoksik bir zamana neden olur. Önemli görevleri olmasına karşın, singlet oksijenin biyolojik faaliyetleri tam anlamıyla belirlenememiştir (Homma vd., 2019; Gülçin, 2020).

UV ışığının etkisi sonucu farklı ROS meydana gelerek miktarlarının artmasında büyük bir etkiye sahiptirler. UV ışığının etkisi sonucu oluşan ROS'nin en önemlisi hidrojen peroksittir (Pourzand vd., 1999).

Serbest radikallerin bir diğer etkili oldukları yer de lipidlerdir (De Zwart vd., 1999). Lipidlerdeki zararlarına da lipid peroksidasyonu ismi verilmiştir (Öztürk Sarıkaya, 2009). Serbest radikaller lipidlere saldırdığı zaman bir hidrojen atomunu ayırırlar ve hidrojen atomu ayrılan zincirde radikal özellik kazanır. Bu özelliği kazanan yağ asitleri çok zararlıdır. Membran yapısına ve hücre bileşenlerine zarar verir (Han, 2012; Öztürk Sarıkaya, 2009).

Lipid peroksidasyonu, depolama ve işleme sırasında gıdalarda önemli bir bozulma reaksiyonudur. Sadece gıda kalitesinde bir kayba neden olmakla kalmaz, aynı zamanda karsinogenez, mutajenez, yaşlanma ve arteriyoskleroz gibi bazı hastalıklarla ilişkili olduğuna inanılmaktadır (Yagi, 1987; Gülçin vd., 2004b).



Şekil 1.2. Lipid peroksidasyonu mekanizması (Murray vd., 1996)



### 1.1.2. Antioksidanlar

Vücudumuzda serbest radikallerin birikimi hücrelerde zararlara neden olur (Temur, 2006). Serbest radikalleri nötralize ederek onların bu zararlarını engelleyen sistemlere antioksidan adı verilir (Prior ve Cao, 2000).

Serbest radikallerle antioksidanlar birbirleri ile denge içerisindeyler. Bu denge bozulur ve serbest radikallerin vücutta ki birikimi artarsa, antioksidan sistemi hücreleri koruyamaz bunun sonucunda, lipid peroksidasyonu ve oksidatif stres gibi zararlara neden olur (Gülçin vd., 2003). Antioksidanların serbest radikallere karşı aktiviteleri sıcaklığa, ışık düzeyine ve substrat çeşidine göre farklılıklar gösterir (Gülçin, 2020).

Antioksidanlar farklı yöntemler kullanarak serbest radikallerin zararlarını geciktirirler (Gülçin, 2012). Antioksidanların bu önemli özellikleri sayesinde gıdaların bozulmasını önleyerek raf ömrünü uzatırlar (Gülçin, 2010). Gıdalarda ki antioksidan özellikler açıklanırken iki terim kullanılır. Antioksidanla serbest radikalın reaksiyon sabiti oranına “antioksidan aktivite” denilir. Antioksidan temizleme miktarının ölçüsüne de “antioksidan kapasite” olarak adlandırılmıştır (Gülçin, 2012). Yapılan son çalışmalara dayanarak düşük konsantrasyona sahip antioksidanlar bile, substrat oksidasyonunu durdurabilme yeteneğine sahiptir (Gülçin, 2020).

Antioksidanlar, organik veya inorganik bileşiklerdir. Birincil ve ikincil antioksidanlar olarak kategorize edilirler. Bu sınıflandırma, antioksidanların etki mekanizmasına dayanmaktadır. Örneğin, birincil antioksidanlar, bir H-atomu bağışlayarak (HAT) veya tek bir elektron transfer (SET) mekanizması ile serbest radikalleri nötralize eder. Bu antioksidanlar çok etkilidir ve çok sayıda serbest radikali nötralize etmek için normalde çok sınırlı miktarda gereklidir (Zeb, 2020).

Bu antioksidanların yüksek katalitik özellikleri, doğadaki çeşitliliklerinin ana nedenlerinden biridir. Fenolik antioksidanlar bu kategoriye girer. Bu antioksidanlar kolaylıkla yenilenir. İkincil antioksidanlar, prooksidan katalizörlerin nötralizasyon mekanizması ile karakterize edilmiştir. Örnekler, etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ve sitrik asit (CA) gibi pro-oksidan metal iyonlarının (örn., Fe ve Cu) şelatörlerini içerir. B-

karoten gibi ikincil antioksidan, singlet oksijen gibi reaktif türleri nötralize edebilir. Bu antioksidanlar genellikle bir serbest radikali söndürmektedir (Zeb, 2020).

Tüm aerobik organizmalar, hasarlı molekülleri uzaklaştırmak ve onarmak için antioksidan enzimler ve antioksidan gıda bileşenleri dahil olmak üzere antioksidan savunmalara sahip olmuştur. Antioksidan bileşikler, işleme veya depolama sırasında gıda ve farmasötik ürünlerin bozulmasının başlıca nedenlerinden biri olan lipid peroksidasyon sürecini geciktirerek serbest radikalleri temizleyebilir ve raf ömrünü uzatabilir. Gıda endüstrisinde raf ömrü önemli bir ölçüttür. (Kalpana vd., 2005).

Antioksidan savunma mekanizması canlılarda ikiye ayrılır. Metabolizmada sentezlenen (endojen) ve dışarıdan diyetle alınan (ekzojen) antioksidan mekanizmasıdır (Gülçin, 2007). Çizelge 1.2’de antioksidanların endojen ve ekzojen olarak sınıflandırılması verilmiştir.

Çizelge 1.2. Antioksidanların endojen ve ekzojen olarak sınıflandırılması (Annakkaya, 2012).

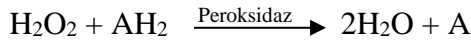
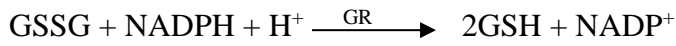
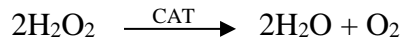
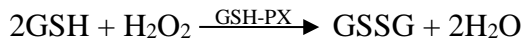
Antioksidanlar			
Endojen antioksidanlar		Eksojen antioksidanlar	
Enzimler	Küçük moleküller	Sentetik	Doğal
Katalaz	Glutasyon	BHA	Tokoferoller
Peroksidaz	Melatonin	BHT	Karotenler
Süperoksit dismutaz	Serotonin	TBHQ	Fenoller
Glutasyon peroksidaz	Adrenalin	Etoksikuin	Flavonitler
Glutasyon redüktaz	Noradrenalin	Trolox	C vitamini

Hücre içerisinde etkisini gösteren antioksidanlar enzimatik, etkisini hücre dışında gösterenler ise enzimatik olmayan antioksidanlar olarak ifade edilebilir (Temur, 2006). Gıda maddelerinin genelinde az miktarda da olsa antioksidan içerir. E vitamini yönünden zengin gıda kaynakları ve bitkisel yağların konsantrasyonları daha fazladır. Bu antioksidanlar içerisinde en dikkat çeken  $\alpha$ -tokoferol'dür.  $\alpha$ - tokoferoller yağda

çözünebilirler ve lipid peroksidasyonu seviyesini düşürerek serbest radikallerin zararlarına karşı etki gösterirler (Topal, 2014).

Endojen kaynaklı enzimler olarak katalaz, peroksidaz, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon peroksidaz (GSH-PX) gösterilebilir. Bu enzimlerin her birinin farklı reaksiyonları vardır. Örneğin; katalaz (CAT) hidrojen peroksidi suya indirger, süperoksit dismutaz süper oksit anyonunu hidrojen peroksite çevirir, glutatyon peroksidaz organik peroksitleri temizler (Arosio vd., 2000). Glutatyon redüktaz yükseltgenmiş glutatyon formunu indirgenmiş glutatyon formuna döndüren enzimdir (Goulart vd., 2005). Peroksidazlarda katalizleme görevi görürler, organik ve inorganik bileşiklerle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bileşiğinin başlattığı reaksiyonu katalizlerler (Gülçin, 2002; Köksal, 2007).

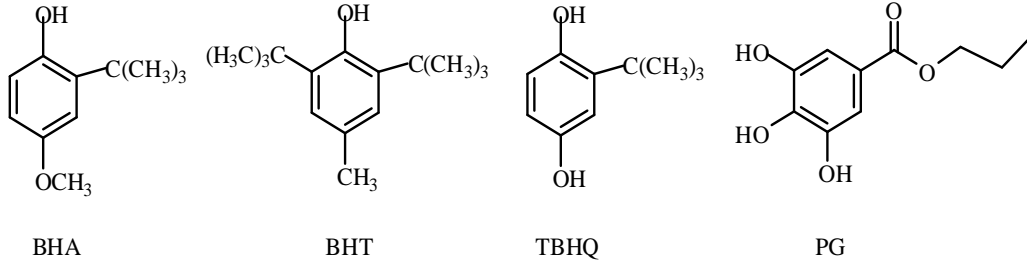
Aşağıda endojen kaynaklı enzimlerin başlattığı reaksiyonlar gösterilmiştir:



Antioksidanlar endojen kaynaklı olduğu gibi dışarıdan diyetle de alınabilirler (Halliwell, 1991). Dışarıdan diyetle alınan antioksidanlar da kendi içerisinde sentetik ve doğal olarak iki gruba ayrılırlar. Gıda endüstrisinde doğal antioksidanlar çok pahalı oldukları için, sentetik antioksidanlara ilgi artmıştır (Haigh, 1986). Günümüzde antioksidan aktivitesi yüksek olan sentetik antioksidanlar doğal antioksidanlara karşı tercih edilse de, insan vücuduna zararlı etkilerinden dolayı kullanımları önemli derece kısıtlanmıştır. Bu sebeplerden dolayı gıda sanayisinde doğal antioksidanlara (C vitamini, α- tokoferol, flavonoid) yönelim artmıştır (Gülçin, 2020).

Sentetik antioksidanlar içerisinde bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), propilgallat (PG) ve tersiyer bütıl hidrokinon (TBHQ) antioksidanları yer alır (Gülçin, 2012). Bu antioksidanlar doğal antioksidanlara göre

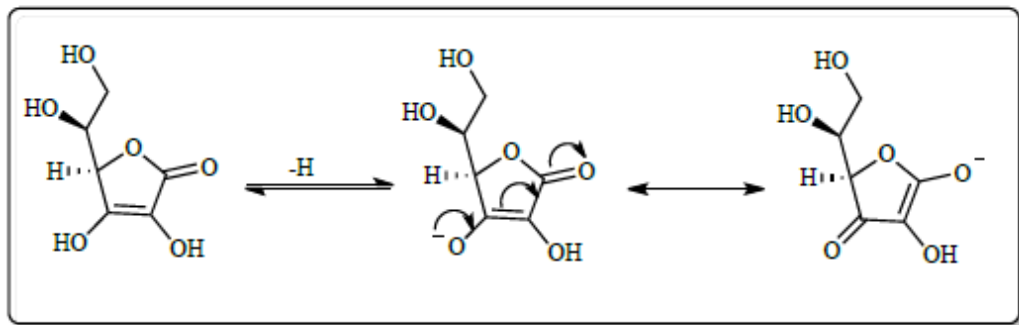
ucuzdurlar ve daha yüksek antioksidan aktiviteye sahiptirler (Gülçin, 2011). Ancak bu sentetik antioksidanların son yıllarda toksik zararlarından ve insan sağlığını olumsuz etkilemesinden dolayı gıda endüstrisinde kullanımları kritik düzeyde sınırlandırılmıştır (Gülçin, 2012).



Şekil 1.3. Bazı sentetik antioksidanların kimyasal yapıları

Sentetik antioksidanlar arasından TBHQ, bitkisel kaynaklı üretilen yağlarda kullanılması tercih edilir. Diğer sentetik antioksidanlardan BHA ve BHT, yüksek ısılarla karşı dayanıklı oldukları için kızartma işlemi yapılan yağlarda tercih edilir (Sherwin, 1972; Omura, 1995).

Dışarıdan alınan en önemli antioksidan temsilcileri olarak; tokoferoller, C vitamini, flavonitler, karatonler ve fenoller olarak söylenebilir. Doğal antioksidanlar farklı bileşiklerden oluşurken, C vitamini bu konuda diğerlerinden ayrılır. Buna örnek gösterilirse; dünya üzerinde 600'den fazla karotenoid tespit edilmiştir ancak insan gıdasında 50 tanesi kullanılabilir (Stahl vd., 2002; Gülçin, 2012).



Şekil 1.4. C vitamininin (askorbik asit) kimyasal yapısı

C vitamini insan metabolizması tarafından üretilmeyen bunun yüzünden diyetle alınması gereken bir antioksidandır. C vitamini  $\alpha$ - tokoferoller gibi yağda değilde suda çözünen bir antioksidandır. Serbest radikallerin hasarlarına karşı giderici etkiye sahiptir.

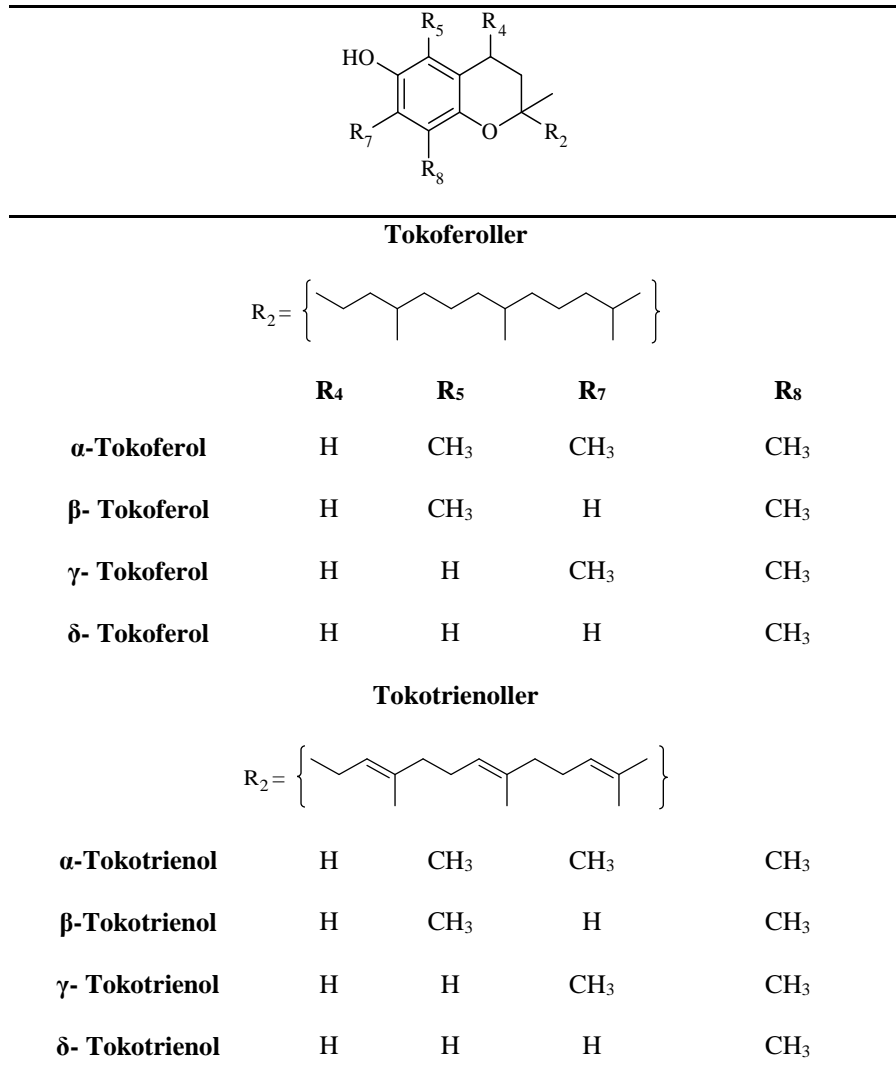
Ayrıca lipid peroksidasyonunun başlamasına engel olarak hücreleri zararlara karşı korurlar (Gökpınar vd., 2006). C vitamini bitkilerde fazla miktarlarda bulunan suda çözünebilir yeteneğine sahip olan vitamin çeşitidir. C vitamini yeteri kadar tüketilmediği zaman iskorbüt ismi ile tanınan ölüme sebebiyet veren hastalığa neden olabilir (Padayatty vd., 2002). C vitamini ROS'ni temizlemeye yardımcı olan bir moleküldür. Bu molekülün metabolizmaya alınan miktarı arttırıldığı zaman ROS'nin hasarlarını azaltmada önemli role sahip olduğu söylenmektedir. C vitamininin hastalıklara karşı savunma oluşturmadaki bağlantı gözlemsel ve müdahale testleri ile belirlenir (Enstrom, 2001).

Askorbik asidinin hastalıkların önlenmesindeki rolünün, biyolojik sistemlerdeki serbest radikalleri süpürme kabiliyetinden kaynaklandığına inanılmaktadır. Kontrolsüz hücre çoğalmasına bağlı olan kanser, DNA ve hücreye oksidatif ve serbest radikal hasarı ile başlayabilir. Askorbik asit, etkili bir antioksidan görevi görebileceğinden, bu tür hasarı yavaşlatabilir veya önleyebilmektedir (Block, 1993).

C vitamini doğal antioksidanların en güçlüsüdür. Ayrıca en az zararlı etkiye sahip doğal antioksidandır. Askorbik asit meyve ve sebzelerde oldukça bol miktarda bulunur (Gülçin, 2012). Askorbik asit ROS'ni temizlemede önemli bir etkiye sahip olduğu belirtilmektedir. Meyvelerde çok fazla miktarlarda askorbik asit bulunmaktadır. Kiraz, kivi, kavun, domates, brokoli gibi sebze ve meyveler askorbik asit kaynağı olarak gösterilmektedir (Bursal ve Gülçin, 2011).

Metabolizmada ki doğal aktiviteler sonucu ROS oluşabilmektedir. Serbest radikallerin tümörün başlama evresi veya ileri evrelerinde etki gösterdikleri bildirilmektedir. Bunun yüzünden antioksidan özelliklere sahip diyetlerin kullanımı çok büyük önem arz etmektedir. Bu sayede vücuda alınan C vitamini serbest radikallerin meydana getirdiği olumsuz sonuçları iyileştirme etkisine sahip olduğu belirlenmiştir (Enstrom, 2001).

Tokoferoller insan metabolizması tarafından sentezlenemediği için dışarıdan alınması gereken doğal antioksidanlardan biridir. Tokoferoller “E vitamini” olarak adlandırılan bileşiklerdir. Yağlı gıdalar, yumurta sarısı ve yeşil yapraklı bitkiler gibi çok farklı gıdalarda tokoferol ( E vitamini) bulunur (Gülçin, 2020). Bu bileşikler tokoferol tokotrienol olarak iki sınıfa ayrılırlar. Her bir sınıf 4 izomere ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - ve  $\delta$ -) sahiptir. Bununla birlikte 8 izomer oluşur (Gülçin, 2012).



Şekil 1.5. Tokoferoller ve tokotrienollerin kimyasal yapıları (Topal, 2014)

Tokoferoller içerisinde doğada bol miktarda bulunan ve serbest radikallere karşı en yüksek antioksidan etkiye sahip olan  $\alpha$ -tokoferoldür (Temur, 2006). Tokoferol türleri singlet oksijeni farklı kapasitelerde giderirler. Alfa > beta > gamma > delta şeklinde giderme kapasitesine sahiptirler (Gökpinar vd., 2006).  $\alpha$ -tokoferol önemli antioksidan

özelliklere sahip olmasının yanı sıra bazı dezavantajları da vardır. En önemli dezavantajlarından birisi, laboratuvar da yapılan deneylerdeki tamponlu reaksiyonlarda güçlükler neden olmasıdır (Gülçin, 2020).

Diğer bir antioksidan kaynağı olarak flavonoidler gösterilir. Bitkilerde yüksek oranlarda bulunan ve insan metabolizmasında olumlu etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Carlo, 1999). Flavonoidler birçok serbest radikali temizleyici etki gösterdikleri için antioksidan kapasitelerinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca günlük diyetimizde 100 mg'dan fazla flavonoid içeren gıda tüketildiği belirlenmiştir (Gülçin, 2012).

Artan kanıtlar kanser ve diğer hastalıklara karşı korumanın, meyve ve sebzelerin içeriğinde var olan flavonoidler olarak isimlendirilen antioksidan fitokimyasal grubuna dayanmaktadır. Flavonoidlerin görevleri dikkate alındığında, öncelikle meyveler, sebzeler, kuruyemişler, tohumlar, saplar ve çiçeklerde ve ayrıca çay ve şarapta bulunan fitokimyasal gruplara değinilmektedir. Flavonoidler difenilpropanlardır bitkilerde 4000'den fazla flavonoid belirlenmiştir. Flavonoidlere benzer gruplar arasında flavonlar, izoflavonlar, flavanonlar, antosiyaninler, flavanlar ve proantosiyanidin bulunur (Prior ve Cao, 2000).

### **1.1.3. Fenolik bileşikler**

Benzen halkasına hidroksil grubun bağlanması ile oluşan kimyasal bileşiklere fenolik bileşikler denmektedir (Cemeroğlu, 2016). Fenolik bileşikler genel anlamda tüketilebilen ve tüketilemeyen tüm bitkilerde bulunur. Fenolik bileşikler lipidlerin oksidasyonunu engelleyerek tüketim amacıyla kullanılan gıdaların besin değerlerinde iyileştirme gibi etki gösterirler (Kahkönen vd., 1999). Fenolik bileşikler, metal şelatlama, singlet oksijenin başlamasına engel olma ve ROS'ni giderici etki gibi antioksidan aktiviteye sahiptirler (Rice-Evans vd., 1995). Fenolik bileşiklere polifenolde denmektedir ve polifenoller hidroksil gruplarındaki hidrojeni vererek protein, karbohidrat, lipidler gibi moleküllerin oksidasyona uğramasını engellerler (Burda ve Oleszek, 2001).

Bitki türlerinde bulunan en önemli metabolitlerden biride fenolik bileşiklerdir. Fenolik bileşikler doğal antioksidan gruba dâhil oldukları için tüketilmesi gerektiği bilinmektedir. Fenolik bileşiklerin diyetle alınması vücut sağlığı içinde çok önemlidir. Polifenoller kan basıncını istenilen seviyeye indirmesi sebebiyle de P vitamini ya da P

faktörü ismiyle de anılmaktadır (Öztürk ve Tunalıer, 2002). Polifenoller insan metabolizmasının direnç seviyesini artırarak serbest radikallerin hasarlarına engel olurlar (Gülçin, 2012).

Polifenollerin en değerli özelliklerinden biri, bitkileri oksidatif zarara karşı savunmasıdır. Gallik asit, kumarinler ve tanenler doğada yer alan polifenol gruplarından bazılarıdır (Ranabahu ve Harborne, 1993).

Fenolik bileşikler kendi içerisinde, fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Flavonoidler bitkilerin genelinde bulunurlar. Fenolik bileşikler meyve ve sebzelerde sarı, kırmızı, mavi renklerini teşkil etmesinin yanı sıra meyve ve sebzelerin tüketimi sırasında acılık ve burukluk gibi tatların hissedilmesine neden olurlar (Cemeroğlu vd., 2004; Zor, 2007).

Flavonoidler lipit peroksidasyonunu önleme yeteneğine sahiptirler. Süperoksit anyon ve hidroksil radikallerine karşı savaşarak lipit peroksidasyonunun başlama evresindeyken durdurmayı gerçekleştirir (Torel vd., 1986; Cook ve Samman, 1996).

Çizelge 1.3. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması (Annakkaya, 2012)

Fenolik Bileşikler	
Fenolik Asitler	Flavonoidler
	Kateşinler
Hidroksibenzoik asit	Antosiyanidinler
Hidroksisinamik asit	Proantosiyanidinler
	Flavonoller
	Flavononlar

Flavonoidler, bitkilerde ve özellikle bitki besinlerinde yaygın olarak görülen siklize difenilpropanlardır (Gülçin, 2020). Genel olarak, flavonoidlerin etkili antioksidan yeteneği bazı faktörlere bağlıdır: molekül etrafındaki hidroksil ve karbonil grubunun düzenlenmesine büyük ölçüde bağlı olan metal şelatlama potansiyeli, serbest radikalleri azaltabilen hidrojen veya elektron veren ikame edicilerin varlığı ve flavonoidin



eşlenmemiş elektronun yerini belirleme yeteneği, kararlı bir fenoksi radikali oluşumuna yol açar (Gülçin vd., 2011; Gülçin 2012). Flavonoid yönünden zengin besinler olarak: kırmızı şarap, elma, soğan gibi örnekler gösterilebilir. Bu tür gıdaların araştırmasına devam edilerek, insanlara daha fazla yarar sağladığı düşünülmektedir (Cook ve Samman, 1996).

Fenolik bileşikler içerisindeki fenolik asitlerde ikiye ayrılırlar. Hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik fenolik asitlerin iki ayrı dalıdır. Salisilik asit, gallik asit, vanilik asitlere benzer asit gruplarıdır (Balasundram vd., 2006; Saldamlı, 2007).

Fenolik asitlerin dışarıdan alınmasıyla kanser, koroner kalp hastalığı gibi insan metabolizmasında ki zararlara karşı savaşan özelliklerinden dolayı tüketimine olan eğilim zamanla artış göstermektedir (Annakkaya, 2012).

### **1.2. Sarı Halile Meyvesi (*Terminalia citrina roxb. ex. fleming*)**

Sarı halile (*Terminalia citrina roxb. ex. fleming*), (*Combretaceae*) familyasının bir üyesidir. Asya, Afrika ve Avustralya kıtalarının tropikal bölgelerinde yoğun şekilde yetiştirilmektedir (Cock, 2015). Ayrıca Hindistan ve Bangladeş'te yaygın olarak üretimi yapılmaktadır. Bangladeş'te sarı halileye “haritaki” adı verilmiştir. Bangladeş halkı tarafından kalp hastalığı, dizanteri ve kabızlık gibi hastalıkların tedavisinde tercih edilmiştir (Yusuf vd., 2009).

Sarı halile meyvesi, 20-30 metreye kadar uzayabilen ve yaprak dökmeyen ağaçlarda yetişir. Sarı halile meyvesi ham (yeşil) haldeyken ağaçlardan toplanır ve sonradan kurutulur. Sarı halile meyvesi 2-5 cm uzunluğunda 1-3 cm genişliğinde sarımtırak renkte ve girintili yüzeye sahiptir.



Sarı halile meyvesi çok farklı hastalıkları tedavi etmede kullanılır. İştah kaybı, ishal, sindirim bozuklukları gibi hastalıkların tedavisinde ve cinsel gücü uyarıcı olarak kullanılmaktadır (Hossan vd., 2009; Amiri ve Joharchi, 2013). Ayrıca sarı halile meyveleri bu hastalıklardan farklı olarak ateş düşürücü, astım, migren, diş yapısının bozukluklarında, hemoroid, enfeksiyonlar ve baş dönmesinin tedavisinde kullanılmaya devam edilmektedir (Soe, 2004).

### **1.3. Çalışmanın Amacı**

ROS vücudumuzda bulunan biyomoleküllere (lipit, protein, nükleik asit, karbohidrat) ciddi zararlar verdiği bildirilmiştir. ROS'nin hasarlarına karşı antioksidanlarla savaş açılmazsa, vücudumuzda çok farklı hastalıklara neden olduğu bilinmektedir (Öztürk Sarıkaya, 2009).

ROS ve serbest radikallerin hasarları sonucu çok farklı hastalık çeşitlerinin meydana geldiği ve bitki çeşitlerindeki antioksidanların bu durumlarda vücudu koruma görevi gördükleri için çok fazla sayıda araştırma yapılmıştır (Hou vd., 2003; Gülçin, 2020).

Yapılan araştırmalarda antioksidan kaynaklarına yönelik çalışmalar gün geçtikçe artış göstermektedir ve doğal kaynaklı bitkisel antioksidanlara ilgideki artışta gözlemlenmektedir. Antioksidanlar ROS'ne savaş açarak gıdaların besin değerlerini koruduğu bildirilmiştir (Harborne, 1994; Gülçin vd., 2009a). Doğal kaynaklı antioksidanlar ROS'nin zararlarına engel olarak kronik problemlere engel olurlar (Gülçin, 2007a; Gülçin, 2012). Sentetik antioksidanlara getirilen sınırlandırmalar yüzünden, doğal antioksidanların tercih edilmesine başlanmıştır (Gülçin vd., 2003).

Yapılan araştırmalar sonucu elde edilen bulgular ve sonuçlara dayanarak insan vücutundaki karşı antioksidanlar ciddi ve çok önemli bir yere sahip olduğu saptanmıştır. Bu yüzden hem doğal bir kaynak olması hem de literatürde daha önce bitkiye ait bir çalışma olmaması nedeniyle sarı halilenin (*Terminalia citrina roxb. ex. fleming*) antioksidan kapasitesinin ve fenolik içeriğinin belirlenmesinin literatüre katkı sağlayacağı düşünöldüğünden araştırmada materyal olarak seçilmiştir.

Sarı halilenin (*Terminalia citrina roxb. ex. fleming*) antioksidan ve radikal giderme aktivitelerini değerlendirmek amacıyla 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil serbest radikal (DPPH $\cdot$ ) giderme aktivitesi, 2,2'-azino-bis(3-etilbenztiyoazolin-6-sülfonik asit) radikal (ABTS $^{+}$ ) giderme aktivitesi, CUPRAC yöntemi kullanılarak (Cu $^{+2}$ ) indirgeme yeteneği, FRAP yöntemi kullanılarak Fe $^{+3}$  indirgeme yeteneği, potasyum ferriksiyanat indirgeme metodu ile Fe $^{+3}$ -Fe $^{+2}$  indirgeme kapasitesi, N,N-dimetil-p-fenilendiamin radikal (DMPD $^{+}$ ) giderme aktivitesi, ferrik tiyosiyanat metoduna göre total antioksidan aktivitesi, total fenolik ve flavonoid bileşik miktar tayini, bipiridil metal şelatlama aktivitesinin yanı sıra fenolik asit içeriğini belirlemek amacıyla sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve etil alkol ekstratlerinin LC-HRMS (Sıvı Kromatografisi Yüksek Çözünörlöklö Kütle Spektrometresi) cihazı kullanıldı. BHA, BHT, Troloks ve  $\alpha$  - tokoferol standart antioksidanlar referans olarak kullanıldı.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

İnsan metabolizmasında, diyetle alınan doğal antioksidanlar serbest radikallere karşı koruma kalkanı oluşturur. Genellikle meyve ve sebzelerin yüksek oranda antioksidan aktiviteye sahip olmaları doğal antioksidanların içerisinde önemli bir yere sahiptir. Doğal antioksidanlar kanser, kalp hastalığı ve Parkinson ile Alzheimer gibi beyinsel hastalıklarında oluşmasını engeller (Koca ve Karadeniz, 2005). İnsanlarda görülen katarakt, ilerleyen yaşlarda oluşan göz hastalıklarının bir çeşitidir. Lens proteinlerinin oksidasyona uğraması sonucu ve ROS'nin etkisiyle kataraktın oluşma ve ileri safhalarını hızlandırdığı öngörülmektedir (Taylor ve Nowell, 1997).

*H. Musciformis*, *C. Sinuosa*, *J. Rubens* gibi deniz alglerinde karotenoid, askorbik asit ve fenolik bileşikler içeren antioksidanlar bulunmaktadır. Ayrıca algler fazla miktarda bulunduğu için ekonomik yönden de kolaylık sağlamaktadır (Karakaş, 2019).

Günlük hayatta kolay bir şekilde bulunup tüketilen eriğin çok farklı antioksidan asitleri içerdiğini ve serbest radikallere karşı savunma mekanizması oluşturduğu bildirilmiştir. Genel olarak %17.6 ile %47.4 değerleri arasında bir antioksidan aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir (Küçükçoban, 2009). Elmalarda da birçok antioksidan çeşidi bulunmuştur. Elmalar kabuk, et ve suyu olarak kendi içerisinde üçe ayrılarak bir dizi deneyler yapılmıştır ve antioksidan aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. Elma kabuğu ve suyunun, etine oranla antioksidan kapasitesi daha yüksek bulunmuştur (Karaman, 2008).

Sentetik antioksidanların doğal antioksidanlara göre daha az etkiye sahip oldukları ve zararlarından dolayı birçok hastalığa davetiye çıkardıkları gerekçesiyle kullanım alanları büyük ölçüde daraltılmıştır (Yavaşer, 2011).

Suda çözünbilme yeteneğine sahip olan ve bitkilerde bol miktarda bulunan vitamin çeşitlerinden biride C vitaminidir. Eksikliğinde ölümcül hastalıklardan biri olan iskorbüt hastalığına neden olabilir. Ama çok eski zamanlarda görülen bu olaylar günümüz koşullarında nerdeyse hiç görülmemeye başlanmıştır (Padayatty vd., 2002).

Sentetik antioksidanlar gıda ve türevlerinde kullanıldıklarında birçok hastalığa sebebiyet vermektedir. Bu gibi durumların en aza indirilmesi için çok fazla sayıda

araştırmalar yapılmaktadır. Bu amaçla sedir ve köknar bitkilerinin antioksidan özellikleri incelenmiştir (Altaş, 2009).

Sentetik antioksidanlar yerine doğal antioksidanların tercih edilmesi sebebiyle son yıllardaki araştırmalar artmıştır. Bu araştırmalara değinecek olursak algler (Karakaş, 2019), elma (Karaman, 2008), erik (Küçükçoban, 2009), turna yemişi (*Vaccinium macrocarpon*) ve mersin (*Myrtus communis*) (Annakkaya, 2012), altın çilek (*Physalis peruviana*) ve keten (*Linum usitatissimum*) tohumu (Han, 2012), dişbudak (Aydoğan, 2016), pancar (Kasapoğlu, 2015), kiraz (Kapçı, 2013), kivi (Bursal ve Gülçin, 2009), madımak (Yıldırım vd., 2003), muşmula (Gülçin vd., 2011a), zeytin (Gökce, 2009), anason (Gülçin vd., 2003), reyhan (Gülçin, 2007a), karabiber (Gülçin, 2005), domates ve portakal (Yücel, 2002), çörekotu (Erkan, 2008),karnabahar (Köksal, 2007), üzüm (Payan, 2007), iğde çiçeği ve kedi nanesi (Çalışkan, 2007), biberiye ve mercanköşk (Aysel, 2008), dereotu ve kuzukulağı (İşbilir, 2008), kayısı ve incir (Görünmezoğlu, 2008), sedir ve köknar (Altaş, 2009), ahududu (Sarıburun, 2009), lavanta (Gülçin vd., 2004a), ısırgan (Gülçin vd., 2004b), tere (İşbilir, 2008), adaçayı (*Melisa officinalis*) (Köksal vd., 2011), roka (İşbilir, 2008), gelincik (İşbilir, 2008), mantar (Sarıkürkcü, 2009), böğürtlen (Sarıburun, 2009), çiriş otu (İmamoğlu, 2010), çay (Akış, 2010), kızılıcık (Eser, 2010), *Picea orientalis* kozalağı (Topal, 2018) ve *Pinus sylvestris* kozalağı (Topal, 2020) antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır.

Bunların yanı sıra anason ve rezenede bir dizi antioksidan belirleme çalışmaları yapılmıştır. Fenolik madde ve flavonoid madde miktarlarında anasonun rezeneye göre daha yüksek oranlarda bulunduğu belirlenmiş. Metal şelatlama yönteminde ise rezenenin anasona göre daha iyi bir sonuç verdiği belirlenmiştir (Bakır, 2010). Ayrıca bitkilerde ki antioksidan çalışmalara devam edecek olursak tarçın (Gülçin vd., 2019a), yarpuz (Gülçin vd., 2019b), *Stachys annua* (Bursal vd., 2020), baklakeklik (Taslimi vd., 2019), avokado (Köse vd., 2020), buğday (İktü, 2020), eugenol (Gülçin, 2011).

Sağlıklı beslenme konusunda insanların diyetinde sebzelerin olması çok önemlidir. Sebzeler sayesinde vücuda alınan vitamin, mineral ve lifler gibi insan sağlığının korunmasında yararlı bileşikler bulunmaktadır. Bu bileşiklerin antioksidan özellikleri hastalıklara karşı savunma sistemi oluştururlar. Bu sebepler göz önünde tutularak bir araştırmada pancar sebzесinin antioksidan özellikleri incelenmiştir. Çalışmada fenolik asit

olarak hidroksi-benzoik asit diğer asitlere göre yüksek oranda bulunduğu belirlenmiştir (Kasapoğlu, 2015).

Provitamin A aktivitesinin yanı sıra bazı karotenoidler antioksidan kapasiteye sahiptir. Karotenoidler, lipidik fraksiyonlarla ilişkili yağda çözünen bileşiklerdir. Yapısal özellikleri, kimyasal, biyokimyasal ve fiziksel özelliklerini etkileyen birleşik çift bağ sistemidir. Bu antioksidan özellikleri, yüksek sebze alımı ile belirli kanser türleri veya kardiyovasküler hastalıklar gibi daha düşük kronik dejeneratif hastalık riski arasında bir ilişki kuran epidemiyolojik çalışmalarla desteklenmiştir. Böylelikle sebze örneklerinde ve insanlarda karotenoidlerin analizine olan ilgiyi artırmıştır (De Quirós ve Costa, 2006).

Antioksidan besinler ve katarakt hastalığı arasındaki bağlantı üzerine yapılan farklı epidemiyolojik çalışmalar kanda C vitamini, E vitamini, A vitamini ve karotenoid içeren bireyler için daha düşük risk teşkil ettiği belirtilmiştir (Taylor ve Nowell, 1997).

Karotenoidler, ROS'nin etkili temizleyicilerinden biridir ve bu doğal polienlerin fotooksidatif hasara karşı savunmada etkin bir görevi olduğuna dair fazla miktarda kanıtlar vardır. Elde edilen sonuçlar, karotenoidlerle oral tedavinin eritem oluşumunda önleyici etkisi konusunda önem taşımaktadır. Ama daha fazla bilgi ve sonuca ulaşmak için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir (Stahl ve Sies, 2002).

İnsanlarda bulunan karotenoid grupları olarak lutein, zeaksantin,  $\beta$ -kriptoksantin, likopen,  $\alpha$ -karoten ve  $\beta$ -karotendir (Ito vd.,1990). A vitamininin görevlerine değinerek normal görme işlevinin gerçekleşmesi için karotenoidlere ihtiyaç duyulduğu çok önceden bilinmektedir. Buna dayanarak, karotenoidin göz dokusunda, yani retinadaki görevi fazlaca incelenmiştir. İki polar madde olan, lutein ve zeaksantin, gözde bulunan önemli karotenoid grupları olduğu gösterilmiştir (Handelman vd., 1988).

Göz retinasındaki karotenoidlerin görevleri konusunda farklı öneriler sunulmuştur. 50 yıl öncesinde, maküler pigmentin mavi ışığı absorbe etme yeteneğine sahip söylenmiştir. Ama ilerleyen zamanda karotenoidlerin, membran lipidlerini peroksidasyona karşı savunan iyi bir antioksidanlar olduğu bildirilmiştir (Sies ve Stahl, 1995; Burton ve Ingold, 1984). Karotenoidler singlet oksijeni söndürmede güçlü bir yapıya sahiptir (Foote ve Denny, 1969; DiMascio vd., 1989).

*Rosa* türlerinin meyveleri olan kuşburnu, bağışıklık sistemini güçlendirmek ve sindirim bozukluklarını tedavi etmek gibi çeşitli sağlık yararları ile bilinir. Antioksidan, antienflamatuar ve hücre yenileyici etkileri de sağlık arttırıcı etkileri arasındadır. Kuşburnu, C vitamini, karotenoidler ve fenolikler gibi antioksidan özelliklere sahip bileşikler bakımından zengindir (Koczka vd., 2018).

Güneş ışıkları sonucu oluşan hastalıkların en büyük etkenleri UV ve radyasyon olduğu bildirilmiştir. UV ışığının çok büyük bir kısmı ozon tabakası sayesinde yeryüzüne geçemez ama son yıllarda ozon tabakası incelendiği için bu oran düşmüştür. Vücut UV ışığının emme süresi arttıkça katarakt, cilt kanseri ve ciltte yaşlanma gibi hastalıklara yol açtığı belirtilmiştir. Ama diyetle temin edilen karotenoid ve tokoferol gibi antioksidanlar UV ışığının etkisi sonucu oluşan hastalıklara karşı savunma gösterdiği bildirilmiştir (Stahl ve Sies, 2002).

Doğal olarak oluşan bir bitki polifenolu olan tanik asit, bir veya daha fazla gallol kalıntısı ile hidroksil gruplarında türetilmiş merkezi bir glikoz molekülünden oluşur. Yapılan çalışmalarda tannik asidin lipit peroksidasyonu inhibe edici özellikte olduğu belirlenmiştir. Tannik asidin  $15 \mu\text{g mL}^{-1}$  konsantrasyonunda hazırlanan ekstraksiyonun linoleik asit emilisinin % 97.7 lipit peroksidasyonunu inhibe ettiği tespit edildi (Gülçin vd.,2010).

Beş farklı ahududu ve dört farklı böğürtlen çeşidinde bir dizi antioksidan aktivite yöntemleri uygulanmış. Elde edilen verilere göre ahududunun su ekstresinin böğürtlene göre daha yüksek değerler gösterdiği belirlenmiştir. Araştırmaya göre 2 meyve çeşidinin de yüksek antioksidan aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir (Sarıburun, 2009).

Bazı tahıl ürünlerinde de antioksidan özellikler incelenmiştir. Bir çalışmada farklı buğday çeşitlerinde DPPH ve ABTS yöntemleri kullanılarak buğday danelerinin çeşitlere göre antioksidan özelliklerinde farklılık gösterdiği bildirilmiştir (Moore vd., 2006).

Yapılan bir çalışmada portakal, limon ve greyfurt gibi meyvelerin israf edilen kısımlarının fenolik bileşikleri, C vitamini ve antioksidan aktivitesi araştırılmıştır. Her turunçgil türünde sonuçlar, kabukların, boşa harcanan çoğunlukla atılan iç kısımlarından

(küspe ve tohumlar) daha yüksek miktarda fenolik bileşik, flavonoid, C vitamini ve antioksidan aktivite içerdiğini ortaya koydu. Greyfurt kabukları en yüksek toplam fenolik içeriğe sahip olduğu gözlemlenmiştir. Buna karşılık portakal kabukları, bu çalışmada kullanılan diğer turuncgillerin kabuklarına kıyasla en yüksek miktarda flavonoid (83.3 mg kateşin eşdeğeri / g) ve C vitamini (110.4 mg / 100 g) içerir. Genel olarak, turuncgillerin atık kısımlarının, özellikle kabukların yüksek antioksidan kapasitesi ve aktivitesi içerdiği belirlenmiştir. Doğal bir antioksidan olarak gıda endüstrisine dahil edildiğinde sağlık ve besinsel fayda sağlayabilecekleri vurgulanmıştır (Sir Elkhatim vd., 2018).

İlerleyen zamanda çocuk doktorları biyolojik sistemlerdeki antioksidan ve oskidan dengesi ile ilgili daha fazla bilgi sahibi oldu. Sonuç olarak, diyetlerde bulunan antioksidan besinlerin önemi bildirildi. Bilindik A, C veya E vitaminleri çeşitleri, vitamin eksikliğine bağlı hastalıkları önlemek için bebeklerin mamalarına düzenli bir şekilde takviyesi sağlanmaktadır. Buna bağlı olarak, diğer biyolojik olarak aktif besinler, bitkisel tıpta yer alan diyet bitkilerden fayda sağlanabilir (Khachik vd., 1992; Luper, 1998).

Başka bir çalışmada da zeytin yaprakları öğütüldükten sonra CUPRAC ve DPPH yöntemleri uygulanarak antioksidan özellikleri incelenmiştir. Araştırma sonucunda standart antioksidanlardan Troloks antioksidanı ile karşılaştırılması yapılmıştır (Aydoğan, 2016).

Flavonoller, güçlü antioksidanlar olarak hareket edebilir. Şimdiye kadar sebze ve bitkilerde yaklaşık 200 flavonol tespit edilmiştir. Esas olarak dış ve hava dokularında birikirler, bu nedenle biyosentezleri ışıkla uyarıldığı için meyvelerin, bitkilerin ve sebzelerin kabuk ve yapraklarında birikirler (Samsonowicz ve Regulska, 2017).



### **3. MATERİYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Bitki Materyali**

Bitki materyali olarakta sarı halile (*Terminalia citrina roxb. ex. fleming*) meyveleri kullanılmıştır ve temini piyasadan sağlanmıştır.

##### **3.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Ekipmanlar**

Neokuprin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin), 2,2'-Azino-bis (3-etilbenztiyoazolin-6-sulfonikası) (ABTS), Ferrozin, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) radikali, N,N-dimetil-p fenilendiamin (DMPD),  $\alpha$ -tokoferol, BHT, BHA, Troloks, linoleik asit, kuersetin, gallik asit, Folin-Ciocalteu, ve trikloroasetik asit (TCA) Sigma-Aldrich GmbH, (Sternheim Germany)'dan satın alındı. Ayrıca fenolik içeriklerinin belirlenmesinde de Acacetin (>97%, TRC Canada), Apigenin 7-glucoside (>97%, EDQM CS), Chrysin ( $\geq 96\%$ , Sigma-Aldrich), Ellagic acid (>97%, TRC Canada), Fumaric Acid ( $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich), Hederagenin (>97%, TRC Canada), Hyperoside (>97%, TRC Canada), Myricetin (>95%, Carl Roth GmbH + Co), Naringenin ( $\geq 95\%$ , Sigma-Aldrich), Quillaic Acid (>97%, TRC Canada), Rhamnocitrin (>97%, Phytolab), Rutin ( $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich), Gallic Acid ( $\geq 97\%$ , Sigma-Aldrich), Protocatechuic acid ( $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich), Syringic Acid ( $\geq 95\%$ , Sigma-Aldrich), Vanilic Acid ( $\geq 97\%$ , Sigma-Aldrich) kullanılmıştır.

UV-VIS Spektrofotometre (Optizen)

UV-Spektrofotometre küveti (1 cm<sup>3</sup>'lük Kuartz küvet)

Vorteks (WiseStir)

Manyetik karıştırıcı (Wishshake)

pH metre (OHAUS)

Hassas terazi (OHAUS)

Evaporatör (Heidolph)

İnkübatör (Elektro-Mag 0-300°C)

Liyofilizatör (Alpha 1-2 LD plus)

Blender (Waring Commercial)

Otomatik pipetler (Eppendorf, Oxford Pipettors)

### **3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması**

Yapılan çalışma süresince deneylerde kullanılan çözeltilerin hazırlanışı ve kullanım şekilleri aşağıda belirtilmiştir.

#### **3.1.3.1. Total Fenolik Bileşik Miktarı Tayini İle İlgili Çözeltiler**

1. Folin-Ciocalteu Reaktifi'ni satın alındığımız şekilde kullanılmıştır.

2. %2'lik  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  çözeltisinin hazırlanması: 1 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  tartılıp 40 mL saf suda çözüldü ve son hacmi saf suyla 50 mL olacak şekilde ayarlandı.

#### **3.1.3.2. Total Flavonoid Bileşik Miktarı Tayini İle İlgili Çözeltiler**

1. %2'lik  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  çözeltisinin hazırlanması: 1 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  tartılıp 40 mL saf suda çözülerek çözelti hacmi saf su ile 50 mL olacak şekilde ayarlandı.

2. Standart kuersetin çözeltisinin hazırlanması: 15 mg kuersetin 15 mL saf etanolda çözüldü.

3. 1 M'lik  $\text{CH}_3\text{COOK}$  çözeltisinin hazırlanması: 5.2 g  $\text{CH}_3\text{COOK}$  alınarak 40 mL saf suda çözüldükten sonra total hacim 50 mL olacak şekilde tekrar saf su ilave edildi.

4. %10'luk  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  çözeltisinin hazırlanması: 5 g Aliminyum nitrat alındı ve 45 mL destile suda çözüldü.

#### **3.1.3.3. CUPRAC Metoduna Göre İndirgeme Kapasitesi Tayini İle İlgili Çözeltiler**

1. 1 M'lik  $\text{CH}_3\text{COONa}$  tamponunun hazırlanması (pH:6.5): 4 g  $\text{CH}_3\text{COONa}$  alınıp 40 mL destile suda çözündürülüp, pH'sı 6.5'e ayarlandıktan sonra çözeltinin hacmi 50 mL olacak şekilde ayarlandı.

2.  $7.5 \times 10^{-3}$  M'lık etil alkol içeren neokuprin çözeltisinin hazırlanması: 0.035 g neokuprin alınıp 25 mL etil alkolde çözündürüldü.

3. 0.01 M  $\text{CuCl}_2$  çözeltisinin hazırlanması: 0.033 g  $\text{CuCl}_2$  (MA:  $134.5 \text{ g mol}^{-1}$ ) alınıp 25 mL saf suda çözündürüldü.

#### 3.1.3.4. FRAP İndirgeme Metodu İle İlgili Çözeltiler

1. FRAP Reaktifinin Hazırlanması: 0.3 M'lık asetat tamponundan 10 hacim, 20 mM'lık  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 'dan 1 hacim ve 10 mM'lık TPTZ'den 1 hacim çözeltilerinden meydana gelmektedir.

2. 0.3 M'lık Asetat Tamponunun Hazırlanması:  $\text{NaCH}_3\text{COO}$  2.46 g alınarak, 75 mL saf suda çözündürüldü. Daha sonra pH: 3.6'ya ayarlanan çözeltinin hacmi saf su ile 100 mL olacak şekilde ayarlandı.

3. 40 mM'lık HCl Çözeltisinin Hazırlanması: % 37 lik hidroklorik asit çözeltisinden 334  $\mu\text{L}$  alınıp, saf su ile son hacim 100 mL'ye ayarlandı.

4. 20 mM'lık  $\text{FeCl}_3$  Çözeltisinin Hazırlanması:  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 'dan 0,25 g alınıp 50 mL saf suda çözündürüldü.

5. 10 mM'lık TPTZ Çözeltisinin Hazırlanması: 100 mL 40 mM'lık hidroklorik asit içerisinde 312 mg TPTZ çözündürüldü.

#### 3.1.3.5. $\text{Fe}^{3+}$ - $\text{Fe}^{2+}$ İndirgeme Kapasitesi Tayini İle İlgili Çözeltiler

1. Fosfat tamponunun hazırlanması (0.2 M, pH:6.6): 2.4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  90 mL saf suda çözündükten sonra pH'sı 6.6 olacak şekilde ayarlandı. Son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

2. % 0.1'lik  $\text{FeCl}_3$  çözeltisinin hazırlanması: 0.165 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  destile suda çözündürülüp son hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

3. %10'luk TCA çözeltisinin hazırlanması: 10 g TCA destile suda çözündürülüp, son hacim 100 mL'ye saf suyla tamamlandı.

4. %1'lik  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  çözeltisinin hazırlanması: 1 g  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  alındıktan sonra belli bir miktar saf suda çözündürüldükten sonra son hacim 100 mL olacak şekilde tamamlandı.

### **3.1.3.6. DPPH· Serbest Radikal Giderme Aktivitesi İle İlgili Çözeltiler**

1. 0,001 M'lık DPPH· çözeltisinin hazırlanması: 0.050 g DPPH· 200 mL etil alkolde tamamiyle çözülünceye 6 saat boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırılır. Işıktan korumak için beherin etrafı alüminyum folyo ile kapatılmıştır.

### **3.1.3.7. ABTS<sup>+</sup> Giderme Aktivitesi Tayini İle İlgili Çözeltiler**

1. ABTS<sup>+</sup> çözeltisinin hazırlanması: 50 mL saf su içerisinde 0.075 g ABTS alınarak çözöldü.

2. Potasyum persölfat çözeltisinin hazırlanması: 0.02 g K<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>, 50 mL'lik ABTS<sup>+</sup> çözeltisi içerisinde azar azar eklenildi. Yarım saat magnetik karıştırıcıda karıştırıldı.

### **3.1.3.8. DMPD<sup>+</sup> Giderme Aktivitesi Tayini İle İlgili Çözeltiler**

1. Asetat tamponunun hazırlanması (0.1 M, pH: 5.3): CH<sub>3</sub>COONa'dan 2.05 g alınarak 230 mL destile suda çözöldükten sonra pH: 5.3'e ayarlanarak çözeltinin son hacmi destile su ile beraber 250 mL'ye ayarlandı.

2. DMPD<sup>+</sup> çözeltisinin hazırlanması (0.1 M): 0.105 g DMPD, 5 mL saf su ile beraber çözölererek hazır hale getirildi.

3. FeCl<sub>3</sub> çözeltisinin hazırlanması (5.10<sup>-2</sup> M ): 1.60 g FeCl<sub>3</sub> 200 mL destile suyla çözölererek hazırlandı.

4. DMPD<sup>+</sup> çözeltisinin hazırlanması (10<sup>-3</sup> M): 0.1 M'lık DMPD çözeltisinden 1000 µL çekilip 0.1 L'lik ve asetat tamponuna (0.1 M, pH:5.3) ilave edildi. Daha sonrasında üzerine 200 µL ve 0.05 M'lık FeCl<sub>3</sub> eklenerek hazır hale getirildi.

### **3.1.3.9. Bipiridil Metal Şelatlama Metodu İle İlgili Çözeltiler**

1. 2.10<sup>-1</sup> M'lık HCl Çözeltisinin Hazırlanması: % 37 lik hidroklorik asit çözeltisinden 1600 µL alınarak, çözeltinin son hacmi 100 mL olacak şekilde destile suyla ayarlandı.

2. 2 mM'lık FeSO<sub>4</sub> Çözeltisinin Hazırlanması: 0.112 g FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O tartılarak 200 mL saf suda çözöndüröldü.

3. Bipiridil Çözeltisinin Hazırlanması (% 0.2): 200 mg Bipiridil alınıp 0.2 M, 100 mL'lik hidroklorik asit çözeltisi içerisinde çözündürüldü.

4. 0.1 M'lık Tris-HCl Tamponunun Hazırlanması: 2.42 gram Tris alınıp, 180 mL destile suda çözündürüldü. pH:7.4'e getirildi. Saf su ile son hacim 100 mL'ye ayarlandı.

#### **3.1.3.10. Total Antioksidan Aktivitesi Tayini İle İlgili Çözeltiler**

1. HCl Çözeltisinin Hazırlanması (% 3.5): 9.46 mL % 37'lik Hidroklorik asit'ten alınıp saf su ile 100 mL'ye ayarlandı.

2.  $4 \cdot 10^{-2}$  M pH:7.4 Fosfat Tamponunun Hazırlanması: 0.96 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  alınıp 180 mL saf suda çözüldü, daha sonra pH metre yardımıyla pH 7.4'e ayarlanıp son hacmi saf su ile 200 mL'ye ayarlandı.

3. 20 mM  $\text{FeCl}_2$  Çözeltisi Hazırlanması: % 3.5'luk Hidroklorik asit içinde 0.281 g  $\text{FeCl}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  çözündürülerek, son hacmi 100 mL'ye aynı çözeltiyle ayarlandı.

4. 0.017 M Linoleik Asit Emülsiyonunun Hazırlanışı: 50 mL fosfat tamponuna (pH: 7.4) 265  $\mu\text{L}$  linoleik asit eklendi. Karışımın homojenize olması için emülgatör olarak Tween-20'den 175  $\mu\text{L}$  eklendi.

5. % 30'luk  $\text{NH}_4\text{SCN}$  Çözeltisinin Hazırlanışı: 30 g  $\text{NH}_4\text{SCN}$  tartılarak bir miktar saf suda çözündürüldü. Daha sonra hacim 100 mL'ye saf suyla tamamlandı.

### **3.2. Yöntem**

#### **3.2.1. Sarı Halile Ekstraktlarının Hazırlanması**

Ekstraktların hazırlanmasında su ve etil alkol kullanıldı. Antioksidan ve fenolik içeriklerinin belirlenmesi amacıyla çalışmamızda kullanılan sarı halile meyvesi 200 g tartılıp blendırda parçalandı. Parçalanmış karışım ikiye ayrıldı birinci kısmına 200 mL su ilave edildi, bir gece boyunca oda sıcaklığında ekstrakte edildikten sonra karışım tülbent bezinden süzüldü. Süzüntü balon içine alınarak derin dondurucuda ( $-80^\circ\text{C}$ 'de) bekletildi. Daha sonra liyofilizatörde kuruyuncaya kadar liyofilize edildi. İkinci kısmına etil alkol ilave edildi 12 saat boyunca oda sıcaklığında ekstrakte edildikten sonra karışım tülbent bezinden süzüldü. Daha sonra evaporatör ile çözücüsü uzaklaştırıldı.

### **3.2.2. Total Fenolik Bileşik Miktarı Tayini**

Hazırlanan ekstrelerde bulunan total fenolik bileşik miktarı, Folin-Ciocalteu reaktifi ile Singleton vd. (1999)'nin yöntemine göre belirlendi. Gallik asit, standart fenolik bileşik olarak kullanıldı. Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve evaporate edilmiş etil alkol ekstrelerinin fenolik bileşik miktarını belirlemek için ilk olarak gallik asitten bir standart grafik çizildi. Sarı halilenin ekstrelerinin mevcut fenolik bileşik miktarını belirlemek için hazırlanmış olan stok çözelti kullanıldı. Stok çözeltiden 750 µL alınarak bir vezin kabına konuldu ve hacim 23 mL'ye destile su ile tamamlandı.

Karışıma 500 µL Folin-Ciocalteu reaktifi ve 3 dakika sonra da % 2'lik  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 'den 1.5 mL ilave edildi. Numuneler oda sıcaklığında çalkalayıcıda 2 saat karıştırıldıktan sonra numunelerin absorbansı 760 nm'de destile sudan oluşan köre karşı okundu. Numunelerin absorbans değerlerine karşılık gelen gallik asit ekivalen (GAE) miktarı, hazırlanmış olan standart grafikteki denklemden oluşturuldu. Sonuçlar, gallik asit ekivalen olarak verildi (Bursal, 2009).

### **3.2.3. Total Flavonoid Miktarı Tayini**

Hazırlanan sarı halile meyvesinin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstrelerinde bulunan total flavonoid miktarı, Park vd. (1997)'nin metoduna göre yapıldı. Bunun için bir vezin kabına 750 µL sarı halile meyvesinin liyofilize edilmiş su ve etil alkol ekstresi ilave edildi. Daha sonra, 100 µL (1 M) suda hazırlanmış  $\text{CH}_3\text{COOK}$  ve 100 µL (%10)  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  çözeltilerini içeren 4300 µL etanol çözeltisi ile seyreltilerek vortekste karıştırıldı. Oda sıcaklığında 40 dakika inkübe edildikten sonra 415 nm'de absorbansları kaydedildi. Toplam flavonoid konsantrasyonu tayini için kuersetin standart olarak kullanıldı ve standart kuersetin grafiğinden elde edilen denklemden toplam flavonoid konsantrasyonu µg kuersetin ekivalen (KE) olarak belirlendi.

### **3.2.4. Sarı Halile Meyvesinin Fenolik Asit İçeriklerinin Belirlenmesi**

Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinin fenolik asit içeriklerinin belirlenmesi LC-HRMS analiz metoduna göre yapıldı. LC-HRMS (Sıvı

kromatografisi/yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi) cihazı ile fenolik asit içerikleri belirlendi.

#### **3.2.4.a. Test Çözeltisinin Hazırlanması**

Sarı halile meyvesinin (su ekstresi 0.1 g/5mL ve alkol ekstresi 0.1 g/5mL) etil alkol ve su içinde hazırlanmış çözeltilerin üzerine 100 mg/L'lik internal standart çözeltisinden nihai derişimi 3 ppm olacak şekilde eklendi. Numuneler 0.45 µ filtreden geçirildi. Daha sonra cihaza 2 µL olacak şekilde ilave edildi ve son olarak ölçümleri yapıldı (Kalin vd., 2015; Hamad vd., 2017; Han vd., 2018).

#### **3.2.4.b. Cihazlar ve Kromatografik Şartlar**

Sıvı Kromatografi Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometresi (LC-HRMS) ölçümleri, ESI Kaynağında bir Thermo Orbitrap Q-Exactive cihazı ile gerçekleştirildi ve bir Fortis C18 kolon (150x2.1 mm, 3 µm partikül boyutu) ile desteklendi. Mobil faz, gradyan programı 0-1.00 dk % 50 A ve % 50 B, 1.01-05.00 dk % 100 B olan su (A, % 1 formik asit) ve metanolden (B, % 1 formik asit) oluşmuştur. Mobil fazın akış hızı 0.35 mL / dak ve kolon sıcaklığı 22 °C'ye ayarlandı (Sarıkahya vd., 2019; Özer vd., 2010).

#### **3.2.4.c. LC-HRMS Prosedürü**

En iyi mobil faz çözeltisinin asitleştirilmiş su ve metanol sisteminin bir gradyanı olduğu belirlendi. Böyle bir mobil fazın bileşiklerin iyonlaşma bolluğu ve ayrılması için tatmin edici olduğu belirlendi. Küçük ve nispeten polar antioksidanların iyi iyonizasyonu ESI kaynağı ile elde edildi. m/z 175-450 arası iyonlar aletin yüksek çözünürlüklü modunda tarandı (Topal, 2020). Bileşiklerin tanımlanması standart bileşiklerin (% 95-99 saflık aralığında) tutulma süreleri ile Bezmialem Vakıf Üniversitesi İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezi Kütüphanesi (İLMER) HRMS verilerinin karşılaştırılmasıyla yapılmıştır. LC-HRMS ölçümlerinde standart olarak Dihidro kapsaisin kullanılmıştır.

#### **3.2.5. Cu<sup>2+</sup>-Cu<sup>+</sup> İndirgeme Kapasitesi (CUPRAC Metodu)**

Hazırlanan ekstrelerde, CUPRAC metodunun (Apak vd., 2006), küçük bir modifikasyonu (Ak ve Gülçin, 2008) yapıldı. 10, 20 ve 30 µg mL<sup>-1</sup> konsantrasyonlarda

hazırlanan Sarı halile meyvesinin su ve etil alkol ekstraları içeren tüplere sıra ile 0.01 M'lık 250 µL CuCl<sub>2</sub> çözeltisi, (7.5x10<sup>-3</sup> M) etanolik neokuprin çözeltisinden 250 µL ve 1 M'lık CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> tampon çözeltisinden 250 µL eklenildi. Yarım saat sonra 450 nm'de köre karşı absorbans değerleri ölçüldü. Kör olarak destile su kullanılmıştır.

### **3.2.6. FRAP İndirgeme Kapasitesi**

FRAP metodu, (Benzie ve Strain 1996, 1999) yöntemine göre yapıldı. İlk olarak deney tüplerine farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg mL<sup>-1</sup>) olacak şekilde sarı halile meyvesinin liyofilize edilmiş su ve evaporate edilmiş etil alkol ekstraları ile standart çözeltiler ilave edildi. Bu çözeltilerin hacimleri tampon çözelti ile 500 µL'ye ayarlandı. Sonrasın da tüplere sırasıyla 20 mM'lık FeCl<sub>3</sub> çözeltisinden 2.25 mL ve FRAP reaktifinden de 2.25 mL eklenerek son hacim 5000 µL olması sağlandı. Hazırlanmış olan bu tüpler vortex'de karıştırıldı. 10 dk bekletilerek absorbansları 593 nm'de okutuldu. Bu deneyde asetat tamponu kör olarak kullanıldı.

### **3.2.7. Fe<sup>3+</sup>-Fe<sup>2+</sup> İndirgeme Kapasitesi**

Toplam indirgeme tayini Oyaizu yönteminin (1986) küçük bir modifikasyonuna (Gülçin, 2012) göre yapıldı. İlk olarak 1 mg mL<sup>-1</sup> konsantrasyonunda stok çözelti hazır hale getirildi. Deney tüplerine bu çözeltiden farklı konsantrasyonlarda aktarılıp, hacim saf su ile 750 µL olacak şekilde ayarlandı. Ardından her tüpe 0.2 M'lık fosfat tamponundan (pH:6.6) 1000 µL ve %1'lik potasyumferrisiyanür K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>'den 1000 µL eklendi. Çözelti 50 °C'de 20 dakika etüvde bekletildi. Daha sonra karışıma % 10'luk TCA'dan 1000 µL eklendi. Son olarak % 0.1'lik FeCl<sub>3</sub> 250 µL ilave edilerek, köre karşı absorbans (700 nm) okundu. Kör olarak saf su kullanıldı. Kontrol için ise numunenin yerine destile su kullanıldı.

### **3.2.8. DPPH Serbest Radikalleri Giderme Aktivitesi**

Blois metoduna göre, DPPH serbest radikal giderme aktivitesi yapıldı (1958). Deney tüplerine farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg µL<sup>-1</sup>) olacak şekilde sarı halile meyvesinin liyofilize edilmiş su ve evaporate edilmiş etil alkol ekstraları ile standart



çözeltiler ilave edildi. Deney tüplerinin hacimleri toplamı 2 mL'ye ayarlanacak şekilde etanol ile tamamlandı. Ardından her bir deney tüpüne, önceden hazırlanmış olan DPPH' çözeltilisinden 500 µL eklendikten sonra, deney tüpleri vortex'de karıştırılarak oda sıcaklığı ve karanlıkta yarım saat bekletildikten sonra etanoldan oluşan köre karşı 517 nm'de absorbansları okundu. Azalan absorbans değeri geriye kalan DPPH serbest radikal giderme aktivitesini verdi.

### **3.2.9. ABTS Radikalı Giderme Aktivitesi**

ABTS radikalı giderme aktivitesi Re ve arkadaşlarının yapmış oldukları metoda göre belirlendi (Re vd., 1999). Bunun için ilk önce 7 mM'lık ABTS çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiye 2.45 nM'lık persülfat çözeltisi ilave edilerek ABTS radikalleri elde edildi. Hazırlanan bu radikal çözeltiyle ilgili olarak öncelikle kontrol çözeltisinin 734 nm'de absorbansı  $0.700 \pm 0.025$  nm'ye ayarlandı. Sarı halile meyvesinin su ve etil alkol ekstraktları ile standart olarak kullanılan antioksidanların farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri (5, 10 ve 20 µg mL<sup>-1</sup>) deney tüplerine eklenerek hacimleri etanolle 1.5 mL'ye tamamlanmıştır. Ardından 0.5 mL ABTS radikal çözeltisi ilave edilerek karanlıkta yarım saat inkübe edildi. Kör olarak etanol kullanıldı ve absorbanslar 734 nm'de ölçüldü.

### **3.2.10. DMPD Radikalı Giderme Aktivitesi**

Bu deney, Fogliano ve arkadaşlarının (1999) yöntemine göre yapıldı. İlk önce renkli radikal katyon (DMPD<sup>+</sup>) elde edildi. Sarı halile meyvesinin su ve etil alkol ekstraktları ile standart olarak kullanılan antioksidanların farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri (10, 20 ve 30 µg mL<sup>-1</sup>) deney tüplerine eklenerek hacimleri saf su ile 500 µL'ye ayarlandı. Deney tüplerinin üzerlerine 1000 µL DMPD<sup>+</sup> çözeltisi ilave edildi. Karanlıkta 50 dk inkübasyonun ardından 505 nm'de absorbansları ölçüldü. Tampon çözelti, kör olarak kullanıldı.

### **3.2.11. Bipiridil Metal Şelatlama Aktivitesi**

Fe<sup>2+</sup> şelatlama aktivitesi, belirlenen metoda göre yapıldı (Re vd., 1999). İlk olarak deney tüplerine 2 mM'lık FeSO<sub>4</sub> çözeltisinden 125 µL eklendi. Daha sonra sarı halile

meyvesinin su ve etil alkol ekstreleri ile standart olarak kullanılan antioksidanların farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri (10, 20 ve 30 µg mL<sup>-1</sup>) deney tüplerine eklendi. Ardından sırasıyla pH'sı 7.4 olan 500 µL Tris-HCl tamponu eklenerek 30 dk karanlıkta bekletildi. Sonra ve 0.2 M HCl içerisinde çözünmüş 500 µL % 0.2'lik bipiridil çözeltisi eklendi. 1250 µL etanol ve 625 µL destile su içeren numunenin 522 nm'de absorbanları ölçüldü. Kontrolde numune yerine Tris-HCl tamponu kullanıldı. Kör olarak etanol kullanılmıştır.

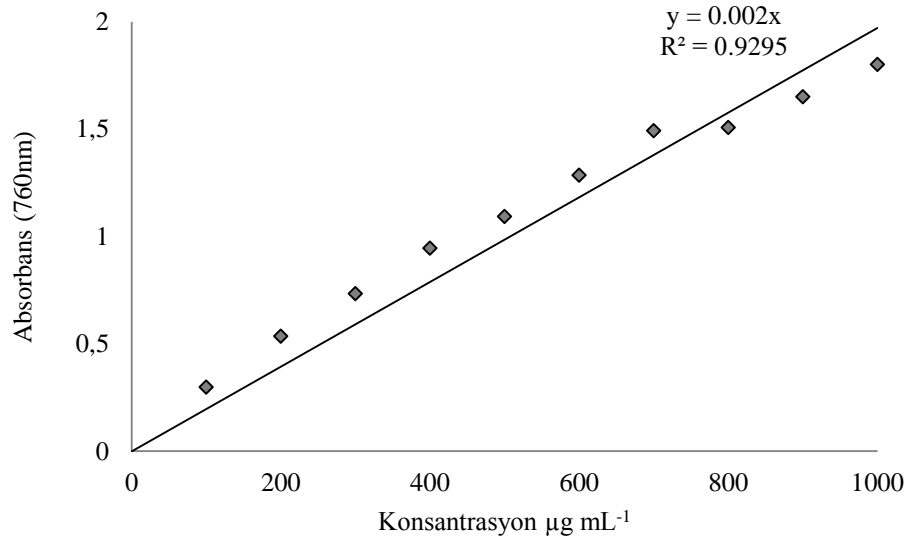
### **3.2.12. Total Antioksidan Aktivitesi**

Hazırlanan ekstrelerin antioksidan aktivitesi tiyosiyanat metoduna göre belirlendi (Yen ve Chen, 1995). Bunun için önceden hazırlanan sarı halile meyvesinin su ve etil alkol ekstrelerinin stok çözeltileri kullanıldı. İstenilen miktarlara karşılık gelen hacimde stok çözelti vezin kaplarına ilave edilerek tampon çözeltiyle (0.01 M'luk pH: 7.4) 2.5 mL'ye tamamlanıp vezin kaplarının her birine 2.5 mL linoleik asit emülsiyonu eklendi. Kontrol için ise tampon çözeltiden 2.5 mL ve linoleik asit emülsiyondan 2.5 mL kullanıldı. İnkübasyon ise karanlıkta ve 37°C'de gerçekleştirilmiş olup; her 12 saatte bir 100'er µL vezin kaplarından alınarak 4.7 mL etil alkol bulunan deney tüplerine ilave edildi. Bunun üzerine sırasıyla Fe<sup>2+</sup> çözeltisinden 100 µL ve SCN<sup>-</sup> çözeltisinden 100 µL eklendi. Kör numune ise 4.8 mL etanole Fe<sup>2+</sup> çözeltisinden 100 µL ve NH<sub>4</sub>SCN çözeltisinden de 100 µL eklenerek hazırlandı. Hazırlanan numuneler için absorbanları 500 nm'de köre karşı okunup; inkübasyon işlemine kontrol maksimum absorbansa ulaştığı noktadan sonra son verilmiştir.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Total Fenolik Bileşik Miktarı Tayini Bulguları

Sarı halile meyvesinin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstralarında gallik asit kullanılarak total fenolik bileşik miktarı belirlendi. Bunun için sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinde total fenolik bileşik miktarı gallik asit ekivalenti (GAE) olarak hesaplandı ( $r^2$ : 0.9295) ve standart gallik asit grafiği elde edildi (Şekil 4.1).



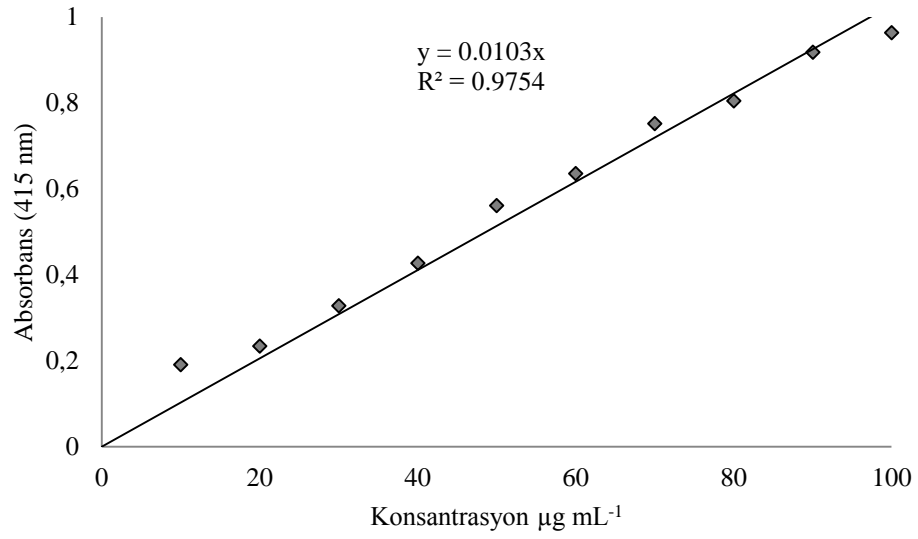
Şekil 4.1. Total fenolik bileşik miktarı tayini sonucu elde edilen standart grafik

$$\text{Absorbans} = 0,002 \times [\text{Gallik Asit}]$$

Yukarıda ki eşitlik kullanılarak sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinde bulunan total fenolik bileşik miktarı hesaplanarak Çizelge 4.1’de verilmiştir.

### 4.2. Total Flavonoid Bileşik Miktarı Tayini Bulguları

Sarı halile meyvesinin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinde kuersetin kullanılarak total flavonoid bileşik miktarı belirlendi. Bunun için sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinde total flavonoid bileşik miktarı kuersetin ekivalen (KE) olarak hesaplandı ( $r^2$ : 0.9754) ve standart grafik elde edildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Total flavonoid bileşik miktarı tayini sonucu elde edilen standart grafik

$$\text{Absorbans} = 0,0103 \times [\text{KE}]$$

Yukarıda ki eşitlik kullanılarak sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinde bulunan total flavonoid bileşik miktarı hesaplanarak Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinde (750 µg mL<sup>-1</sup>) fenolik bileşiklerin gallik asit ekivalen (GAE) ve flavonoid bileşiklerin kuersetin ekivalen (KE) olarak hesaplanan miktarları

Ekstre	Total Fenolik (µg GAE/mg ekstre)	Total Flavonoid (µg KE/mg ekstre)
Sarı halile- Su	288.5	30.68
Sarı halile- Alkol	266.0	23.20

#### 4.3. Sarı Halilenin Liyofilize Edilmiş Su ve Alkol Ekstresinin Fenolik Asit İçerikleri İle İlgili Bulgular

Sarı halile meyvesinin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinin fenolik asit içeriğinin belirlenmesi LC-HRMS analiz metodu ile belirlendi. Belirlenen fenolik asitlerin LC-HRMS parametreleri ile ilgili bulgular Çizelge 4.2 ve 4.3’te verilmiştir.

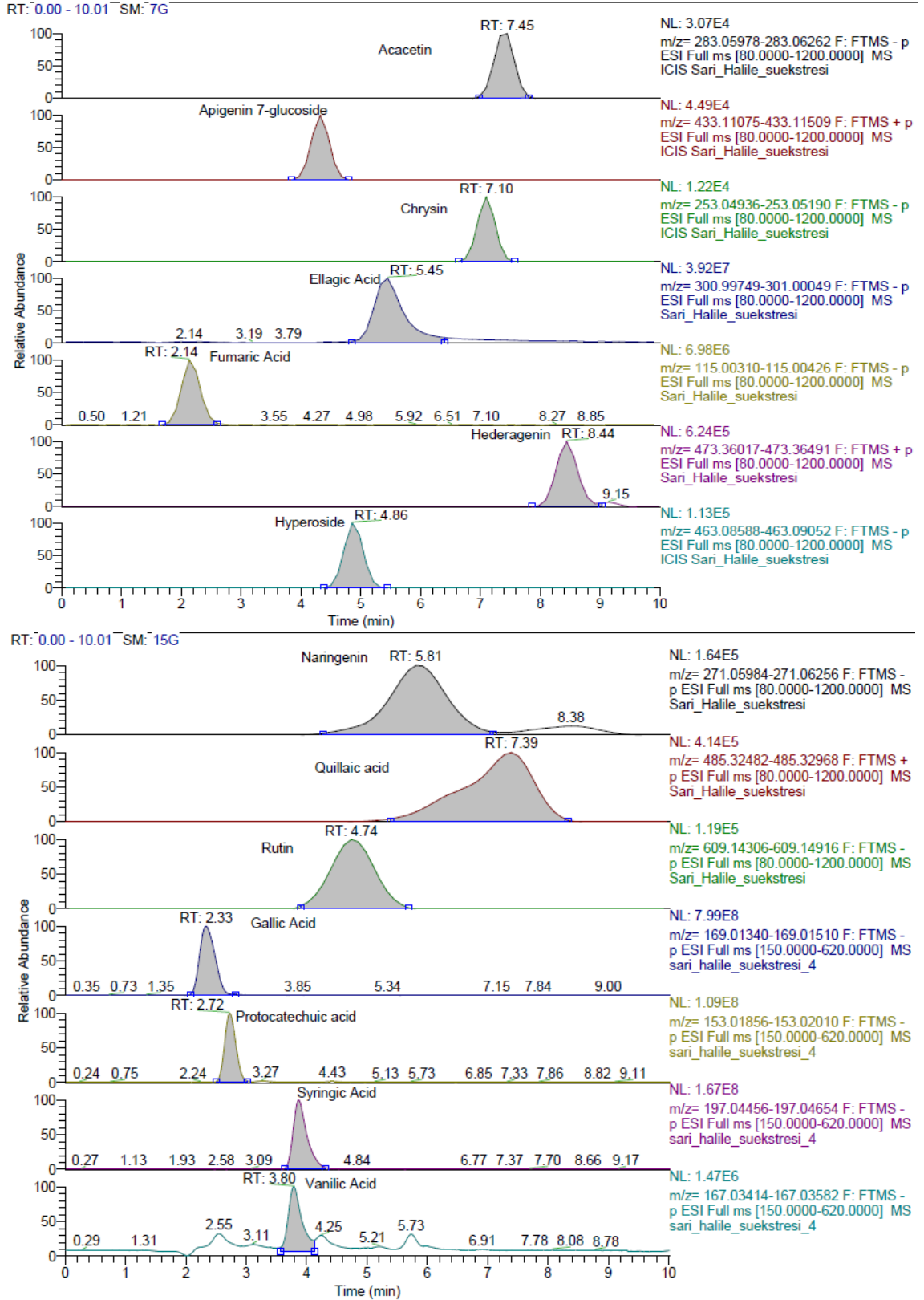
Çizelge 4.2. Sarı Halile bitkisinin su ekstresi ve alkol ekstresinde tayin edilen fenolik bileşik miktarları (mg/g)

Madde Adı	m/z	İyonizasyon Modu	Lineer Aralık (ppm)	Su Ekstresi (mg/g)	Alkol Ekstresi (mg/g)	LOD/LOQ (mg/L)	U % (k=2)
Acacetin	283.0612	Negative	0.1-7	0.006	0.006	0.13/0.42	1.50
Apigenin 7-glucoside	433.1129	Positive	0.1-7	0.002	0.008	0.18/0.60	3.13
Chrysin	253.0506	Negative	0.1-7	0.003	0.003	0.21/0.69	1.19
Ellagic Acid	300.99899	Negative	0.1-7	8.823	39.940	0.29/0.98	1.14
Fumaric Acid	115.0037	Negative	0.1-7	1.487	0.560	0.26/0.88	3.15
Hederagenin	473.36254	Positive	0.1-7	0.630	6.565	2.56/8.53	9.23
Hyperoside	463.0882	Negative	0.1-7	0.025	0.020	0.33/1.09	3.01
Myricetin	317.03029	Negative	0.1-7	<LOD	0.010	0.13/0.45	1.71
Naringenin	271.0612	Negative	0.1-7	0.009	0.017	0.2/0.67	4.15
Quillaic acid	485.32725	Negative	0.1-7	0.064	0.255	0.08/0.28	3.01
Rhamnocitrin	299.05611	Negative	0.1-7	<LOD	0.003	0.16/0.53	3.21
Rutin	609.1461	Negative	0.1-7	0.029	0.029	0.25/0.85	4.47
Gallic Acid	169.01425	Negative	0.5-8	1.152	1.587	0.1/0.32	0.75
Protocatechuic acid	153.01933	Negative	0.5-8	0.022	0.019	0.13/0.45	0.39
Syringic Acid	197.04555	Negative	0.5-8	17.227	27.339	0.7/2.32	2.21
Vanilic Acid	167.03498	Negative	0.5-8	0.084	0.069	0.41/1.37	1.18

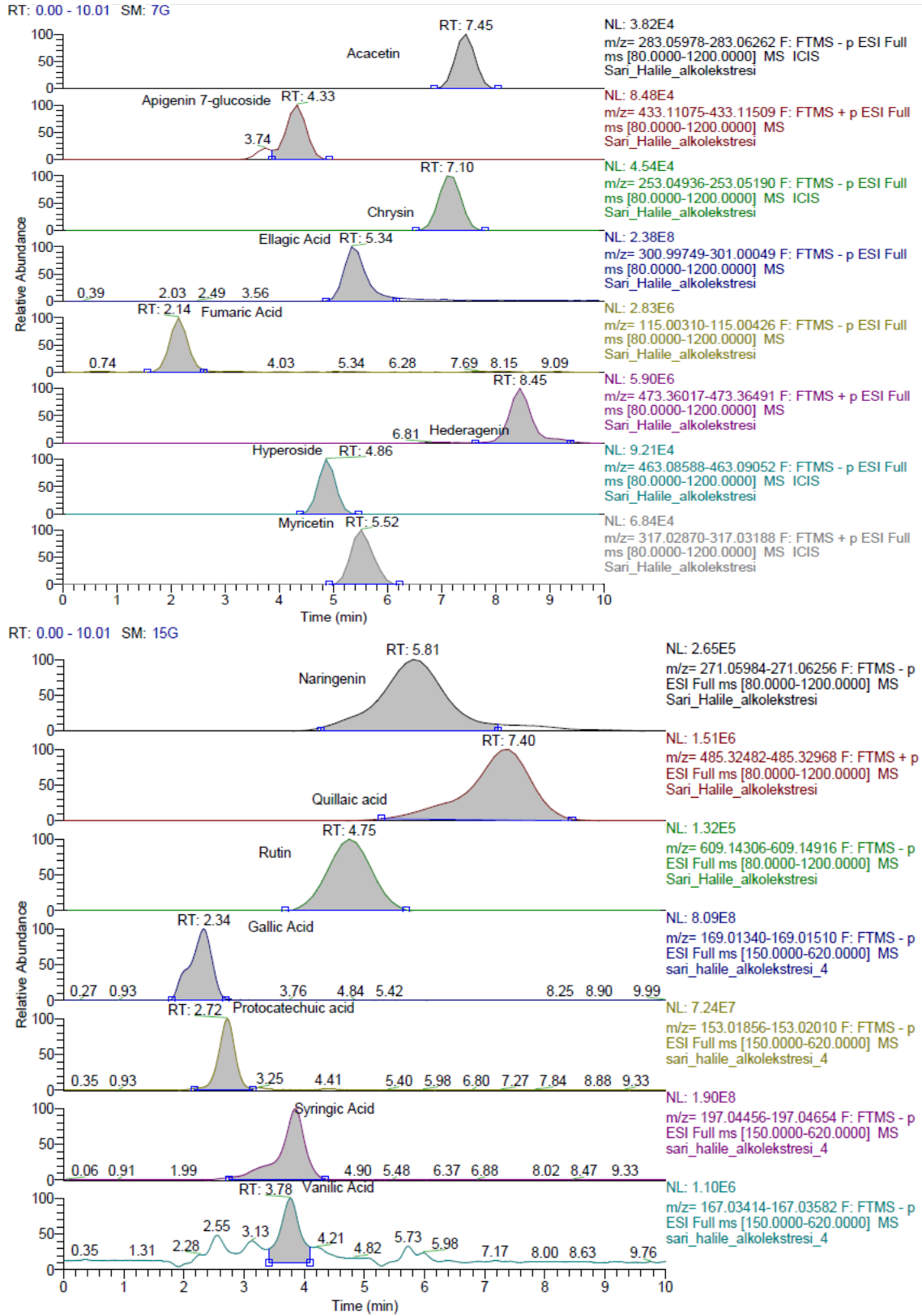
Çizelge 4.3. LC-HRMS ile fenoliklerin belirlenmesi için uygulanan yöntemin kütle parametreleri ve lineer regresyon denklemi

Madde Adı	m/z	İyonizasyon Modu	Lineer Aralık (ppm)	LOD/LOQ (mg/L)	Lineer Regrasyon Denklemi	R <sup>2</sup>
Acacetin	283.0612	Negative	0.1-7	0.13/0.42	$y=0.01867x - 0.001874$	0.998
Apigenin 7-glucoside	433.1129	Positive	0.1-7	0.18/0.60	$y=0.002935x + 0.0002157$	0.996
Chrysin	253.0506	Negative	0.1-7	0.21/0.69	$y=0.02735x - 0.001414$	0.996
Ellagic Acid	300.99899	Negative	0.1-7	0.29/0.98	$y=0.002886x + 0.0002338$	0.999
Fumaric Acid	115.0037	Negative	0.1-7	0.26/0.88	$y=0.001855x + 0.0005312$	0.997
Hederagenin	473.36254	Positive	0.1-7	2.56/8.53	$y=0.0003913x + 0.000682$	1.000
Hyperoside	463.0882	Negative	0.1-7	0.33/1.09	$y=0.002326x - 0.0002487$	0.989
Myricetin	317.03029	Negative	0.1-7	0.13/0.45	$y=0.01229x - 0.001743$	0.998
Naringenin	271.0612	Negative	0.1-7	0.2/0.67	$y=0.0108x + 0.001351$	0.997
Quillaic acid	485.32725	Negative	0.1-7	0.08/0.28	$y=0.005453x + 0.00009866$	0.999
Rhamnocitrin	299.05611	Negative	0.1-7	0.16/0.53	$y=0.004362x + 0.000006084$	0.998
Rutin	609.1461	Negative	0.1-7	0.25/0.85	$y=0.002365x + 0.0007711$	0.993
Gallic Acid	169.01425	Negative	0.5-8	0.1/0.32	$y=0.06255x - 0.005573$	0.999
Protocatechuic acid	153.01933	Negative	0.5-8	0.13/0.45	$y=0.6229x + 0.02947$	0.999
Syringic Acid	197.04555	Negative	0.5-8	0.7/2.32	$y=0.0007823x - 0.0001306$	0.991
Vanilic Acid	167.03498	Negative	0.5-8	0.41/1.37	$y=0.001395x - 0.000411$	0.999

Ayrıca sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinin fenolik asit içeriklerini gösteren kromatogramlar Şekil 4.3 ile Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ekstresinden kantitatif olarak belirlenen fenolik asit içeriklerini belirten kromatogramlar

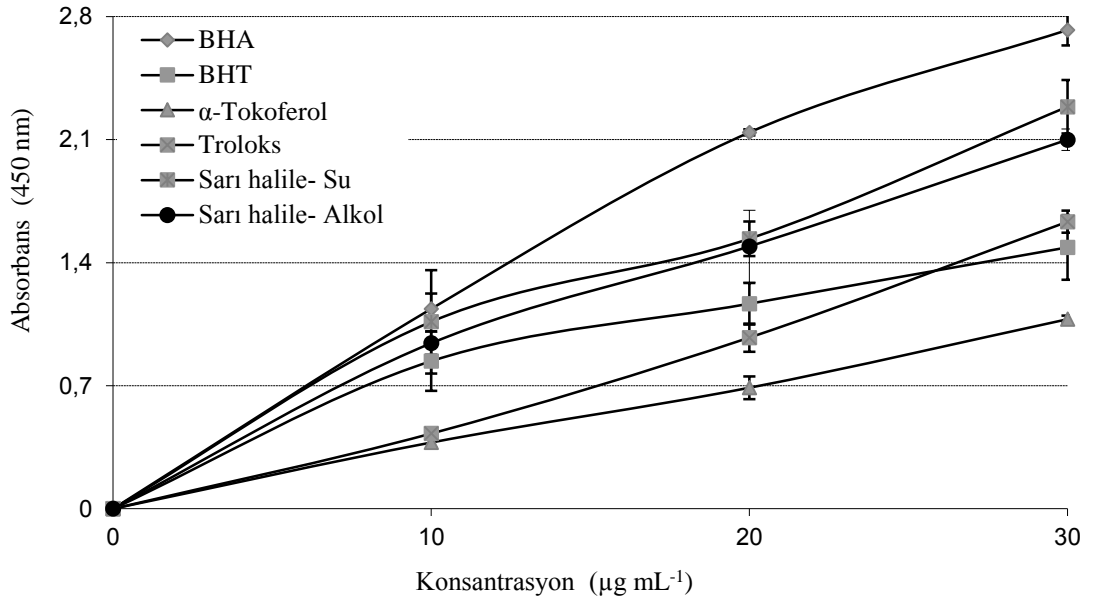


Şekil 4.4. Sarı halilenin alkol ekstresinden kantitatif olarak belirlenen fenolik asit içeriklerini belirten kromatogramlar



#### 4.4. $\text{Cu}^{2+}$ - $\text{Cu}^+$ İndirgeme Kuvveti (CUPRAC Metodu) Bulguları

Sarı halile meyvesinin liyofilize edilmiş su ve evapore edilmiş alkol ekstralarının kuprik iyonlarını ( $\text{Cu}^{2+}$ ) indirgeme kapasitesinin, konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artışı gözlemlendi. Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstralarının kuprik iyonlarını ( $\text{Cu}^{2+}$ ) indirgeme kapasitesi farklı konsantrasyondaki (10, 20 ve 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) çözeltilerinin 450 nm'deki absorbansları ölçülerek bulundu. Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstralarıyla beraber kullanılan standart antioksidanların kuprik iyonlarını indirgeme grafiği çizildikten sonra (Şekil 4.5) numuneler ve standart antioksidanların 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'de okunan absorbans değerleri Çizelge 4.4'te verilerek karşılaştırılması yapıldı.

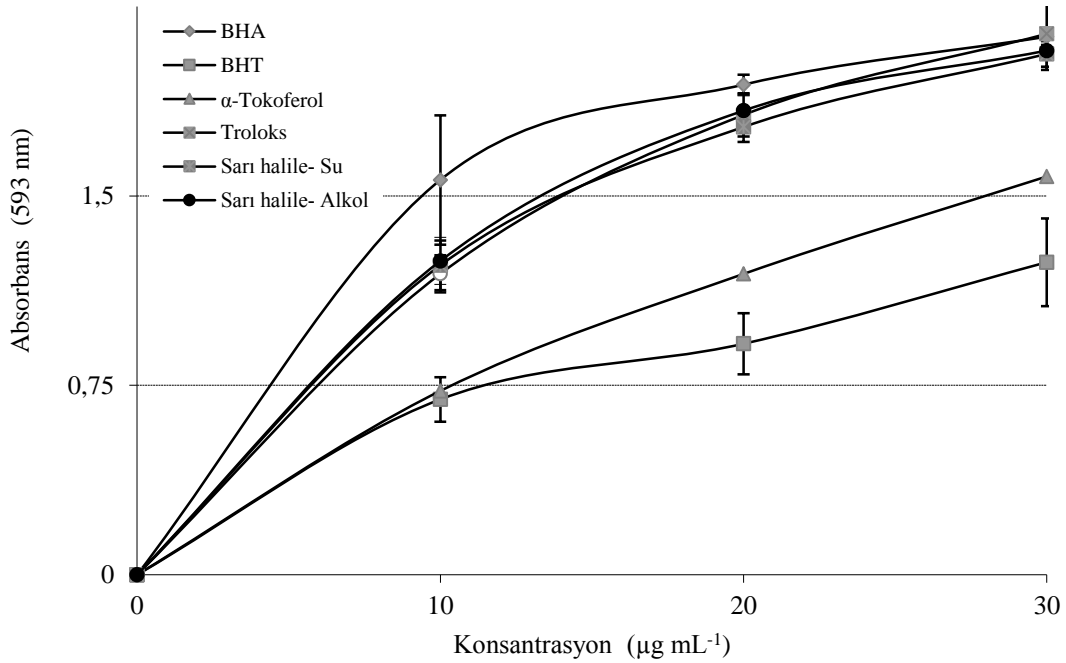


Şekil 4.5. Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstralarının farklı konsantrasyonlardaki (10, 20 ve 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) kuprik iyonlarını ( $\text{Cu}^{2+}$ ) indirgeme aktivitesinin standart antioksidanlar ile karşılaştırılması

Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstraları ve çalışmada kullanılan standart antioksidanların ( $\text{Cu}^{2+}$ ) indirgeme aktivitesindeki sıralama ölçütü  $\text{BHA} > \text{sarı halile-su} > \text{sarı halile-alkol} > \text{BHT} > \text{Troloks} > \alpha\text{-tokoferol}$  şeklindedir.

#### 4.5. Ferrik İndirgeme Kuvveti (FRAP) Bulguları

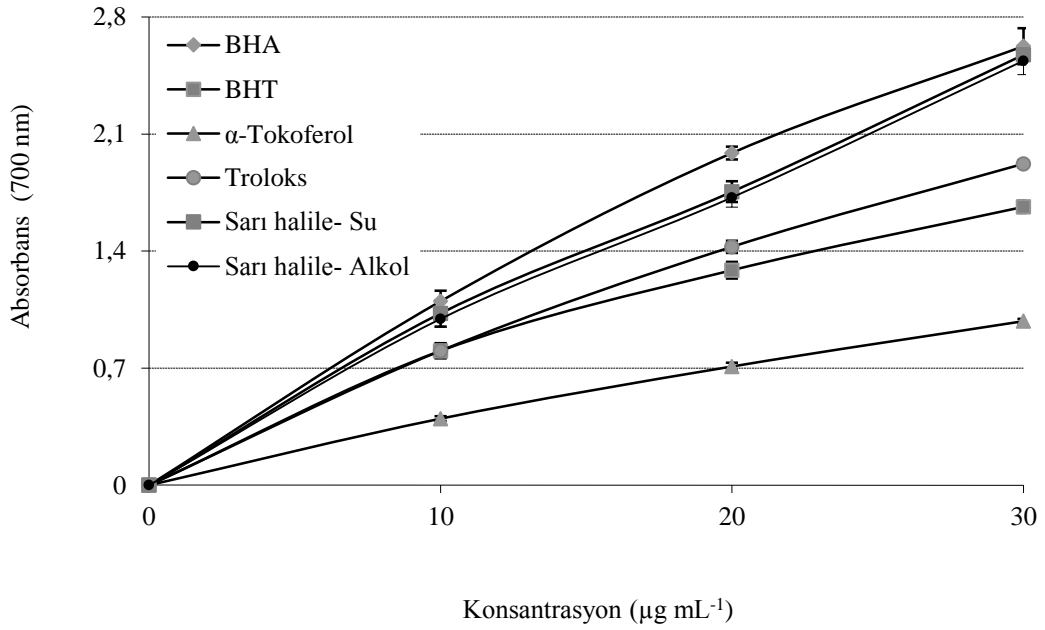
FRAP metodunun amacı elektron vererek antioksidan aktivitesinin belirlendiği yöntemdir. Yöntemde öncelikle ferrik iyonları ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ferröz iyonlarına ( $\text{Fe}^{2+}$ ) indirgenir. Elde edilen ferröz ( $\text{Fe}^{2+}$ ) iyonlarıda Tripiridil triazin ile mavi renkli bir yapı oluşturur. Elde edilen mavi renkli yapı maksimum absorbands değerini 593 nm'de verir. Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstraktları FRAP deneyine göre  $\text{Fe}^{3+}$ 'ün  $\text{Fe}^{2+}$ 'ye indirgeme kapasitesi, ve standart antioksidanların konsantrasyonu ile doğru orantılı şekilde arttığı gözlemlendi (Şekil 4.6). Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstraktları ve çalışmada kullanılan standart antioksidanların FRAP metoduna göre indirgeme aktivitesindeki sıralama ölçütü  $\text{BHA} > \text{sarı halile-alkol} > \text{Troloks} > \text{sarı halile-su} > \alpha\text{-tokoferol} > \text{BHT}$  şeklindedir. Numuneler ve standart antioksidanların  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'de okunan absorbands değerleri Çizelge 4.4'te verilerek karşılaştırılması yapıldı.



Şekil 4.6. Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstraktlarının farklı konsantrasyonlardaki (10, 20 ve  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) FRAP metoduna indirgeme aktivitesinin standart antioksidanlar ile karşılaştırılması

#### 4.6. Fe<sup>3+</sup>-Fe<sup>2+</sup> İndirgeme Kuvveti Bulguları

Bu metotta sarı renkteki test çözeltisi ortamda bulunan numunelerin antioksidan aktivitelerinin azalmasının etkisiyle çeşitli tonlarda mavi ve yeşil renge dönüşmektedir (Gülçin vd., 2006). Metotta kullanılan sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresi konsantrasyon ile doğru orantılı bir şekilde artmaktadır. Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinin farklı konsantrasyonlardaki (10, 20 ve 30 µg mL<sup>-1</sup>) çözeltilerin 700 nm'deki absorbansları ölçülerek gözlemlendi (Şekil 4.7). Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstreleri ve çalışmada kullanılan standart antioksidanların ferrik iyonlarını (Fe<sup>3+</sup>) indirgeme kuvvetlerinin sıralama ölçütü BHA > sarı halile-su > sarı halile-alkol > Troloks > BHT > α-tokoferol şeklindedir. Numuneler ve standart antioksidanların 20 µg/ml'de okunan absorbans değerleri Çizelge 4.4'te verilerek karşılaştırılması yapıldı.



Şekil 4.7. Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinin farklı konsantrasyonlardaki (10, 20 ve 30 µg mL<sup>-1</sup>) ferrik iyonlarını (Fe<sup>3+</sup>) indirgeme kuvvetinin standart antioksidanlar ile karşılaştırılması

Çizelge 4.4. 20 µg mL<sup>-1</sup> konsantrasyonda sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinin ferrik iyonlarını (Fe<sup>3+</sup>) ve kuprik (Cu<sup>2+</sup>) iyonlarını indirgeme kapasitelerinin ve FRAP metoduna göre ferrik iyonlarını (Fe<sup>3+</sup>) indirgeme kapasitelerinin standart antioksidanlar ile karşılaştırılması

<b>Antioksidanlar</b>	<b>Fe<sup>3+</sup> İndirgeme (700 nm)</b>	<b>CUPRAC Metodu (450 nm)</b>	<b>FRAP Metodu (593 nm)</b>
BHA	1,986	2,141	1,941
BHT	1,286	1,166	0,915
α-Tokoferol	0,710	0,688	1,191
Troloks	1,426	0,974	1,821
Sarı halile-Su	1,755	1,536	1,773
Sarı halile-Alkol	1,721	1,492	1,838

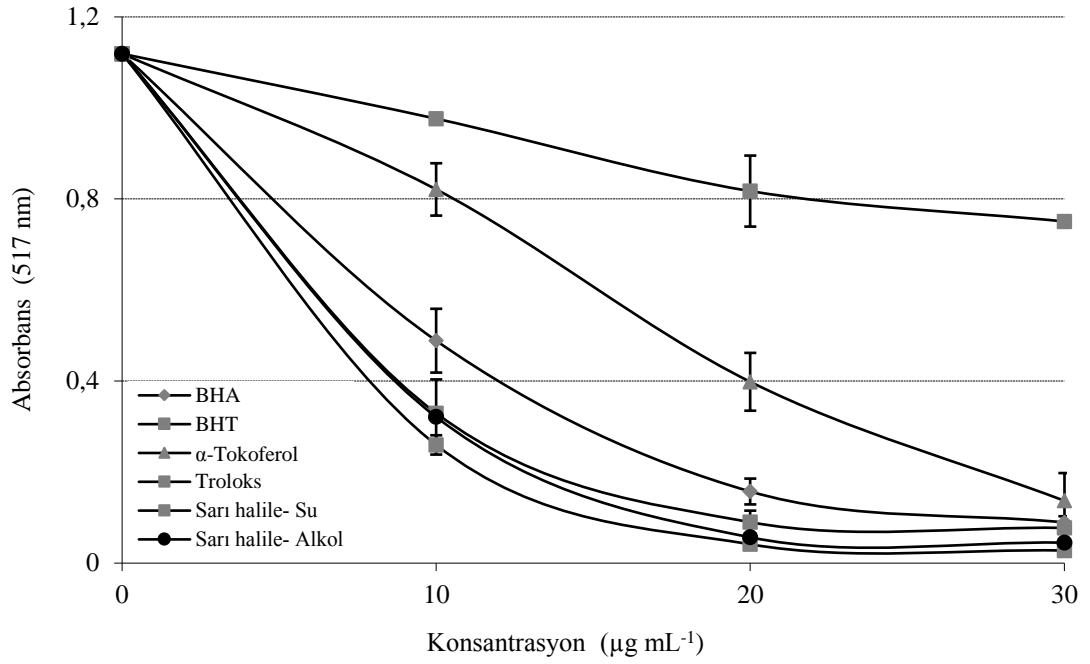
#### 4.7. DPPH Serbest Radikal Giderme Aktivitesi Bulguları

DPPH serbest radikali ile ilgili hesaplamalar aşağıda verilen eşitlik kullanılarak yapıldı.

$$\text{DPPH}^\cdot \text{ giderme aktivitesi (\%)} = [1 - (\lambda_{517(N)} / \lambda_{517(K)})] \times 100$$

DPPH karışımına örnek aktırıldıktan sonra okunan absorbans değeri  $\lambda_{517(N)}$  ifade ederken,  $\lambda_{517(K)}$  yalnızca DPPH serbest radikal karışımı bulunduran kontrol çözeltisinin absorbans değerini gösterir. Yapılan çalışmada BHA, BHT, α-tokoferol ve Troloks standart antioksidan bileşiklerinden yararlanıldı.

Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstraları kullanılarak hazırlanan çözeltilerin DPPH serbest radikali giderme aktiviteleri şekil 4.8’de görüldüğü üzere konsantrasyona bağlı bir şekilde arttığı görülmektedir.



Şekil 4.8. Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinin farklı konsantrasyonlardaki (10, 20 ve 30 µg mL<sup>-1</sup>) DPPH serbest radikali giderme aktivitelerinin BHA, BHT, α-tokoferol ve Troloks gibi standart antioksidanlar ile karşılaştırılması

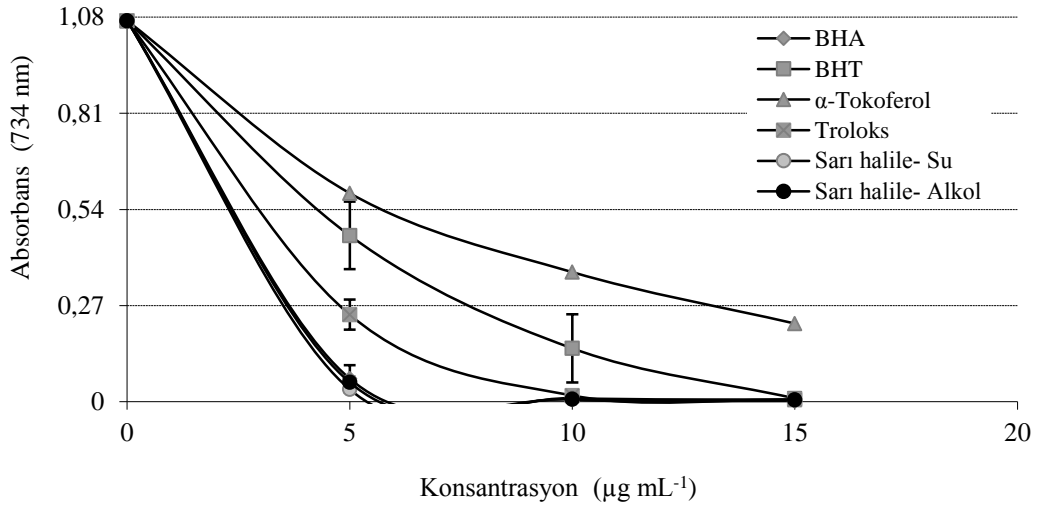
Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstreleri ve çalışmada kullanılan standart antioksidanların DPPH serbest radikali giderme aktivitelerindeki sıralama ölçütü Troloks > sarı halile-alkol > sarı halile-su > BHA > α-tokoferol > BHT şeklindedir. Ayrıca sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstrelerinin IC<sub>50</sub> değerleri Çizelge 4.5'te gösterildi.

#### 4.8. ABTS<sup>+</sup> Giderme Aktivitesi Bulguları

ABTS<sup>+</sup> giderme aktivitesi de DPPH gibi sulu çözeltilerde, ekstrelerde veya saf maddelerin radikal giderme aktivitelerinde çoğunlukla kullanılan yöntemlerden birisidir (Miller vd., 1996; Gülçin vd., 2007b). ABTS<sup>+</sup> radikali giderme ile ilgili hesaplamalar aşağıda verilen eşitlik kullanılarak yapıldı.

$$\text{ABTS}^{+} \text{ giderme aktivitesi (\%)} = [1 - (\lambda_{734(N)} / \lambda_{734(K)})] \times 100$$

ABTS<sup>+</sup> giderme radikali içeren çözeltiye numune ilavesinden sonra okunan absorbans değeri  $\lambda_{734(N)}$  ifade ederken,  $\lambda_{734(K)}$  ise sadece ABTS<sup>+</sup> giderme radikali içeren çözeltinin göstermiş olduğu absorbans değerini gösterir. Yapılan çalışmada BHA, BHT,  $\alpha$ -tokoferol ve Troloks standart antioksidan bileşiklerinden yararlanıldı (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinin farklı konsantrasyonlardaki (5, 10 ve 15 µg mL<sup>-1</sup>) ABTS<sup>+</sup> giderme aktivitelerinin BHA, BHT,  $\alpha$ -tokoferol ve Troloks gibi standart antioksidanlar ile karşılaştırılması

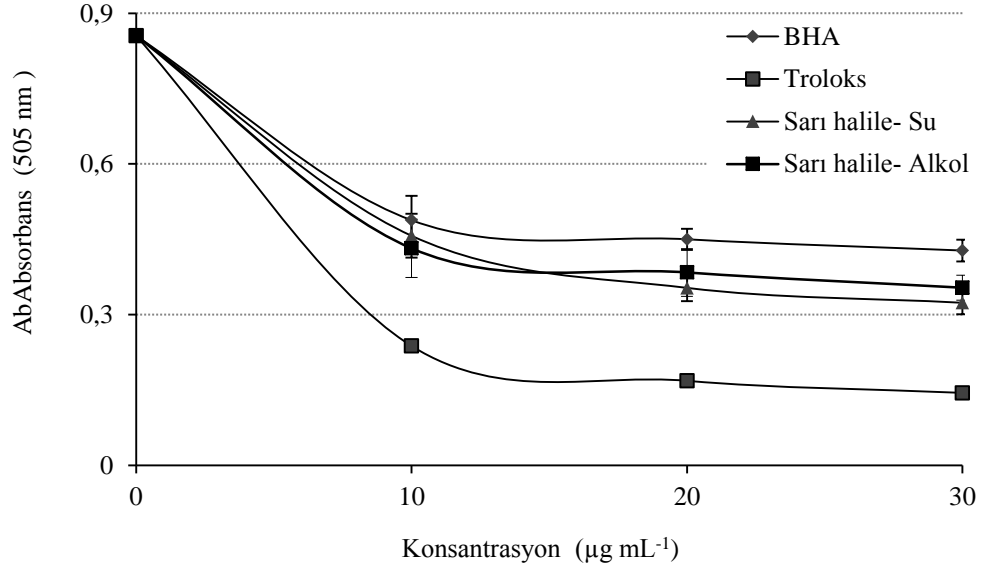
Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstraktları ve çalışmada kullanılan standart antioksidanların ABTS<sup>+</sup> serbest radikali giderme aktivitesindeki sıralama ölçütü BHA > sarı halile-alkol > sarı halile-su > Troloks > BHT >  $\alpha$ -tokoferol şeklindedir. Ayrıca sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstraktlarının IC<sub>50</sub> değerleri Çizelge 4.5'te gösterildi.

#### 4.9. DMPD Radikal Giderme Aktivitesi Bulguları

Deneyde kullanılan DMPD<sup>+</sup> oranındaki azalma alt tarafta gösterilen eşitlik kullanılarak belirlendi.

$$\text{DMPD}^{++} \text{ giderme aktivitesi (\%)} = [1 - (\lambda_{505(N)} / \lambda_{505(K)})] \times 100$$

DMPD<sup>+</sup> karışımına örnek aktarıldıktan sonra okunan absorbands değeri  $\lambda_{505(N)}$  ifade ederken,  $\lambda_{505(K)}$  ise sadece DMPD<sup>+</sup> içeren çözeltinin göstermiş olduğu absorbands değerini gösterir. Yapılan çalışmada standart antioksidanlar olarak BHA ve Troloks'tan yararlanıldı (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinin farklı konsantrasyonlardaki (10, 20 ve 30 µg mL<sup>-1</sup>) DMPD<sup>+</sup> giderme aktivitelerinin BHA ve Troloks gibi standart antioksidanlar ile karşılaştırılması

Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstreleri ve çalışmada kullanılan standart antioksidanların DMPD<sup>+</sup> serbest radikali giderme aktivitesindeki sıralama ölçütü Troloks > sarı halile-su > sarı halile-alkol > BHA şeklindedir. Ayrıca sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstrelerinin IC<sub>50</sub> değerleri Çizelge 4.5'te gösterildi.

Çizelge 4.5. Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstralarının ABTS<sup>•+</sup>, DPPH<sup>•</sup>, ve DMPD<sup>•+</sup> radikali giderme aktivitelerinin IC<sub>50</sub> değerlerinin BHA, BHT, α-tokoferol ve Troloks gibi standart antioksidanlar ile karşılaştırılması

Antioksidanlar	DPPH <sup>•</sup> Giderme	ABTS <sup>•+</sup> Giderme	DMPD <sup>•+</sup> Giderme
BHA	7.87	1.54	24.75
BHT	49.50	2.57	*
α-Tokoferol	11.17	6.48	*
Troloks	5.05	1.92	9.90
Sarı halile-Su	6.79	1.69	18.24
Sarı halile-Alkol	5.78	1.68	19.80

\*DMPD<sup>•+</sup> giderme metodunda aktivite göstermeyen iki antioksidan bileşik bu deneyde kullanılmamıştır (Gülçin, 2008)

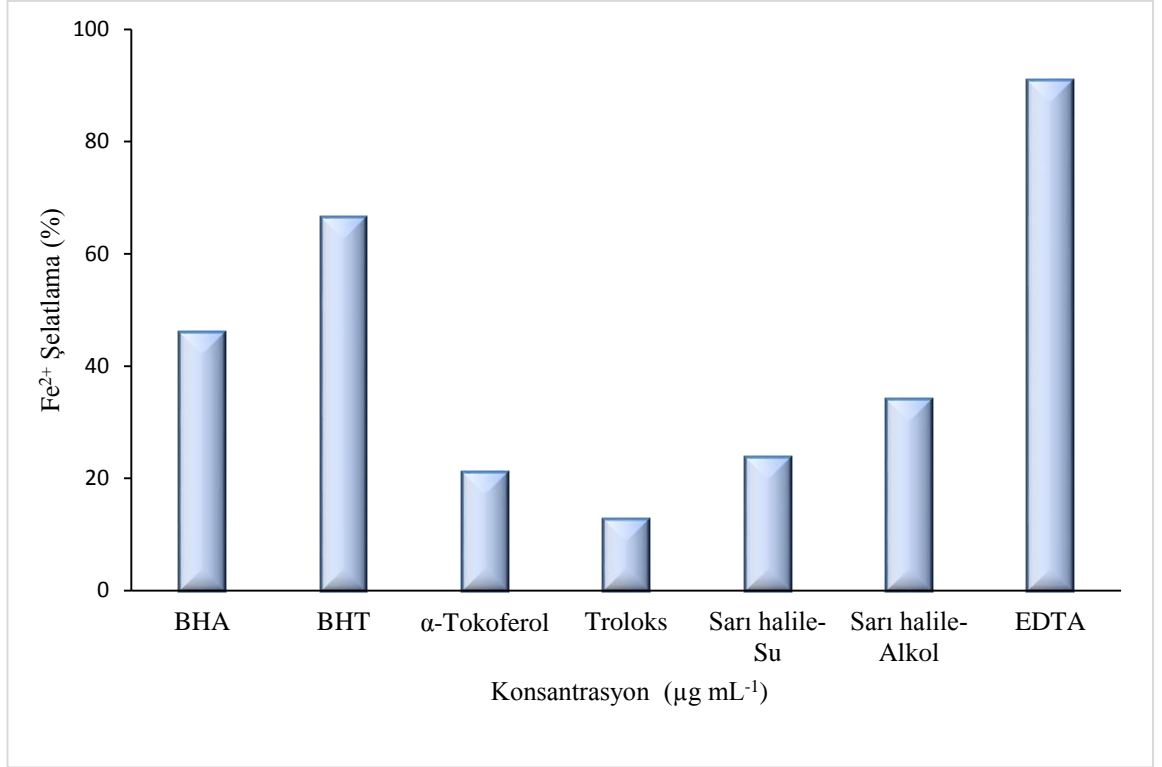
#### 4.10. Bipiridil Metal Şelatlama Aktivitesi Bulguları

Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve evaporate edilmiş etil alkol ekstralarıyla birlikte kullanılan standart antioksidanların metal şelatlama aktiviteleri bipiridil kullanılarak belirtildi. Numunelerin absorbens değerleri 522 nm’de okundu.

Sarı halilenin liyofilize edilmiş su, alkol ekstraları ve çalışmada kullanılan standart antioksidanların bipiridil metal şelatlama aktivitesindeki sıralama ölçütü EDTA > BHT > BHA > sarı halile-alkol > sarı halile-su > α-tokoferol > Troloks şeklindedir. Bipiridil metal iyonlarını şelatlama aktiviteleri aşağıda verilen eşitlikten yüzde olarak bulundu Şekil 4.11’de gösterildi.

$$\text{Bipiridil metal şelatlama aktivitesi (\%)} = \left[ \frac{(\lambda_{522K} - \lambda_{522N})}{\lambda_{522K}} \right] \times 100$$





Şekil 4.11. Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresi, EDTA, BHA, BHT, Troloks ve  $\alpha$ -tokoferolun  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  konsantrasyonda bipiridil metal iyonlarını şelatlama aktivitelerinin yüzde olarak karşılaştırılması

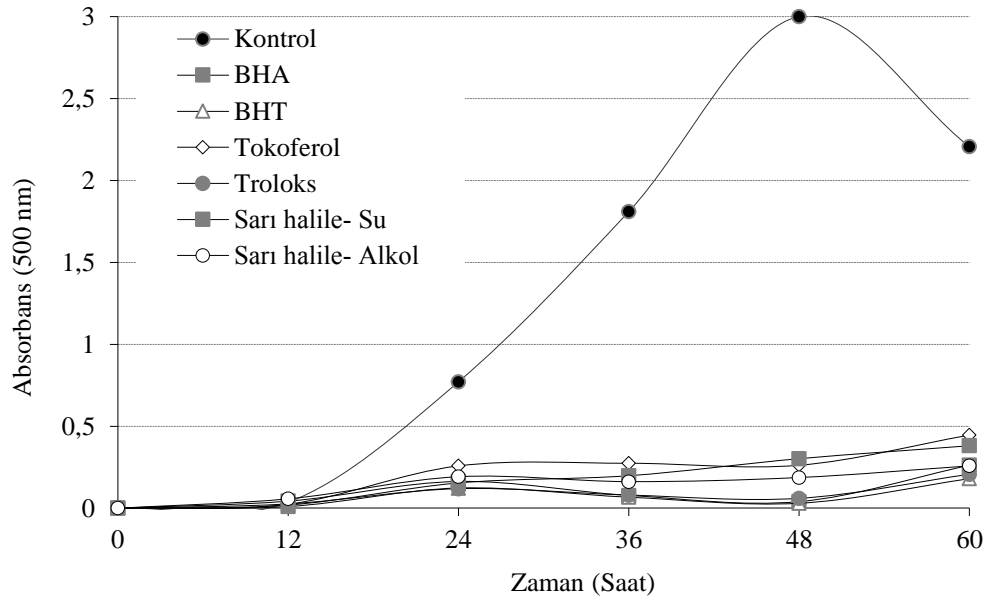
#### 4.11. Total Antioksidan Aktivitesi Bulguları

Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresi total antioksidan aktivitesi “Tiosiyanat Metoduna” göre belirlendi. Bu metotta linoleik asit emülsiyonunun oto-oksidasyonu sonucu oluşan peroksitler  $\text{Fe}^{2+}$ 'yi  $\text{Fe}^{3+}$ 'e yükseltir. Daha sonra yükseltgenen ferrik iyonları ( $\text{Fe}^{3+}$ ) tiyosiyanat ( $\text{SCN}^-$ ) ile  $\text{Fe}(\text{SCN})^{2+}$  kompleksi oluşturur. Elde edilen kompleksin spektrofotometrik olarak  $500 \text{ nm}$ 'de maksimum absorbans göstermesi temeline dayanır. Elde edilen yüksek absorbans, peroksidasyon sonucu oluşan peroksit miktarının fazlalığını gösterir. Total antioksidan aktivite sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresi  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  konsantrasyonundaki emülsiyonunun etanoldeki çözeltisinin  $500 \text{ nm}$ 'deki absorbansı ölçülerek belirlenmiştir (Şekil 4.12).

Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinin ve standart antioksidanların linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonu inhibe etme miktarı aşağıda verilen eşitlikten yüzde olarak bulundu.

$$\text{Lipit peroksidasyonun inhibisyonu (\%)} = [1 - (\lambda_{500(N)} / \lambda_{500(K)})] \times 100$$

Numune veya standart antioksidanların linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonu için bulunan absorbans değerini  $\lambda_{500(N)}$  ifade ederken,  $\lambda_{500(K)}$  ise linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonu için bulunan absorbans değerini belirtir. Çalışmada kontrol amaçlı standart antioksidanlardan Troloks, BHT,  $\alpha$ -tokoferol ve BHA'dan yararlanıldı (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinin  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  konsantrasyondaki total antioksidan aktivitesinin BHA, BHT,  $\alpha$ -tokoferol ve Troloks gibi standart antioksidanlar ile karşılaştırılması

Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinin ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) ve standart antioksidanların lipit peroksidasyonunu giderme yüzdeleri karşılaştırıldığında Sarı halile-Alkol değerinin  $\alpha$ -Tokoferol'den daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6 Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinin ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) lipid peroksidasyonunu giderme yüzdeleri

Antioksidanlar	Lipit Peroksidasyonu İnhibisyonu (%)
BHA	98.67
BHT	99.00
$\alpha$ -Tokoferol	91.26
Troloks	98.00
Sarı halile-Su	89.93
Sarı halile-Alkol	93.76

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Serbest radikallerle antioksidanlar hücre içerisinde bir dengeye sahiptirler. Hücre içerisinde oluşan bu denge bozulur ve serbest radikallerin sayısı artarsa, antioksidanlar hücreyi koruyamaz hale gelir ve bunun sonucunda lipid peroksidasyonu ve oksidatif stres gibi zararlara neden olur (Gülçin vd., 2003). Serbest radikaller vücutta kanser, kalp hastalığı, diyabet, mide ülseri gibi 100'den fazla hastalığın başrollerindedir (Gülçin, 2010). Antioksidanlar serbest radikallerin zararlarını azaltarak bu hastalıkların oluşmasını engellemeye çalışır (Gülçin, 2012). Antioksidanların serbest radikallere karşı aktiviteleri sıcaklığa, ışık düzeyine ve substrat çeşidine göre farklılıklar gösterir (Gülçin, 2020).

Fenolik bileşiklerdeki hidroksil gruplarının sayısı fazladır. Bu grupların sayısının artmasıyla serbest radikallerin neden olduğu zararları engellemeye çalışarak antioksidan bir özellik gösterirler. Bitkilerde ve bitkisel ürünlerde fenolik bileşiklerin fazla miktarlarda bulunduğu gözlemlenmiştir (Annakkaya, 2012).

Bu yüzden doğal antioksidanlar, dünya üzerinde çok fazla bilimsel araştırmaya konu olmuştur ve zamanla önemi katlanarak artmıştır. Gelecekte öneminin azalmayacağı aşikârdır. Bu doğrultuda tez çalışmamızda kullanılan sarı halile (*Terminalia citrina roxb. ex. fleming*) bitkisinin antioksidan ve radikal giderme aktivitelerini değerlendirmek için 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil serbest radikal (DPPH $\cdot$ ) giderme aktivitesi, 2,2'-azino-bis(3-etilbenztiyoazolin-6-sülfonik asit) radikal (ABTS $^{+}$ ) giderme aktivitesi, CUPRAC yöntemi kullanılarak (Cu $^{+2}$ ) indirgeme yeteneği, FRAP yöntemi kullanılarak Fe $^{+3}$  indirgeme yeteneği, N,N-dimetil-p-fenilendiamin radikal (DMPD $^{+}$ ) giderme aktivitesi, potasyum ferriksiyanat indirgeme metodu ile Fe $^{+3}$ -Fe $^{+2}$  indirgeme kapasitesi, total flavonoid miktarı tayini, bipiridil metal şelatlama aktivitesi, ferrik tiyosiyanat metoduna göre total antioksidan aktivite, total fenolik bileşik miktar tayini yöntemleri kullanılarak antioksidan özellikleri araştırıldı. Kullanılan yöntemlerde sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstraktları yönteme göre farklı konsantrasyonları tez çalışmasında kullanıldı.

Laboratuvarında gerçekleştirilen deneysel çalışmalar sonucunda elde edilen veriler BHA, BHT,  $\alpha$ -tokoferol ve Troloks gibi standart antioksidanlar ile karşılaştırılmaları yapıldı.

DPPH<sup>·</sup>, ABTS<sup>++</sup> ve DMPD<sup>++</sup> radikal giderme aktiviteleri, sürekli kullanılan basit spektrofotometrik yöntemlerdir. Koyu mor renkli DPPH<sup>·</sup> radikali, antioksidan içeren maddeyle etkileşime girerek renksizleşmenin meydana geldiği hızlı, seçici ve tekrarlanabilir bir yöntemdir (Gülçin, 2020). Etil alkol içerisinde çözünen DPPH<sup>·</sup> radikalleri antioksidanların etkisiyle indirgenir. Bu indirgemen sonra radikal özelliği olmayan DPPH-H molekülü elde edilir ve 517 nm’de absorbans vermez. Bu yüzden 517 nm’de ölçüm yapılarak aktivite tayini yapılabilir (Gülçin, 2012).

Bu tez kapsamında sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinin DPPH<sup>·</sup> radikali giderme aktivitelerinde IC<sub>50</sub> değerleri 6.79-5.78 µg mL<sup>-1</sup> olarak hesaplandı (Çizelge 5.1). Bu sonuçlar doğrultusunda literatürdeki farklı DPPH<sup>·</sup> radikali giderme çalışmaları ile karşılaştırıldığı zaman IC<sub>50</sub> değerlerinin daha düşük olduğu belirlendi.

ABTS<sup>++</sup> radikal giderme yönteminde ilk olarak, ABTS ve potasyum persülfat (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) etkileşime sokularak ABTS<sup>++</sup> radikali elde edilir. Elde edilen ABTS<sup>++</sup> radikalının maksimum absorbans verdiği 734 nm’de ölçüm yapılarak aktivite tayini yapılabilir (Annakkaya, 2012). ABTS radikalleri aşağıda verilen reaksiyonla meydana gelir.



ABTS<sup>++</sup> radikalleri DPPH radikallerine göre daha hızlı reaksiyon verir. Farklı pH seviyelerinde kullanılmaya elverişlidir (Gülçin, 2012). ABTS<sup>++</sup> radikal giderme yöntemi de DPPH<sup>·</sup> radikali giderme yöntemi gibi sıklıkla kullanılan bir metottur.

Bu tez kapsamında sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinin ABTS<sup>++</sup> radikali giderme aktivitelerinde IC<sub>50</sub> değerleri 1.69-1.68 µg mL<sup>-1</sup> olarak hesaplandı (Çizelge 5.1). Çalışmada kullanılan standart antioksidanlardan BHT, α-tokoferol ve Troloks’tan daha düşük IC<sub>50</sub> değerine sahip olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar doğrultusunda literatürdeki farklı ABTS<sup>++</sup> radikali giderme çalışmaları ile karşılaştırıldığı zaman IC<sub>50</sub> değerlerinin daha düşük olduğu belirlendi.

Diğer radikal giderme yöntemlerinden biri olan DMPD<sup>++</sup> metodu, sarı halilenin antioksidan kapasitesini öğrenebilme adına uygulanan yöntemlerden birisidir. DMPD<sup>++</sup> metodunun amacı, antioksidan özelliğe sahip numune DMPD<sup>++</sup>’ye H atomu transfer ederek çözeltideki renkli yapı kendini renksiz bir çözeltiye dönüştürür. Elde edilen bu çözeltinin

maksimum absorbans verdiği 505 nm’de ölçümü yapılarak aktivite tayini yapılabilmektedir (Ak ve Gülçin, 2008).

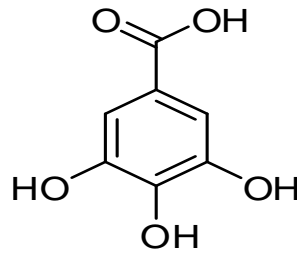
Bu tez kapsamında sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinin DMPD<sup>+</sup> giderme aktivitesinde IC<sub>50</sub> değerleri, çalışmada kullanılan BHA ve Troloks gibi standart antioksidanların IC<sub>50</sub> değerlerine yakın değerler bulunmuştur. Standart antioksidanlardan BHT ve α-tokoferol’un hidrofobik özelliklerinden dolayı sonuçlarında bir netlik bulunamamıştır (Gülçin, 2008). IC<sub>50</sub> değerleri Çizelge 5.1’de verilmektedir.

Çizelge 5.1. Sarı halile-Su, Sarı halile-Alkol ve standart antioksidanların DPPH·, ABTS<sup>+</sup> ve DMPD<sup>+</sup> giderme aktivitelerinin IC<sub>50</sub> (µg mL<sup>-1</sup>) değerleri

Antioksidanlar	DPPH· Giderme	ABTS <sup>+</sup> Giderme	DMPD <sup>+</sup> Giderme
BHA	7.87	1.54	24.75
BHT	49.50	2.57	*
α-Tokoferol	11.17	6.48	*
Troloks	5.05	1.92	9.90
Sarı halile-Su	6.79	1.69	18.24
Sarı halile-Alkol	5.78	1.68	19.80

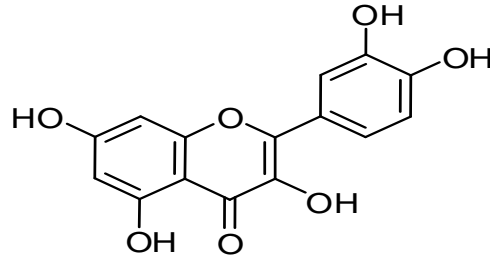
\*DMPD<sup>+</sup> giderme metodunda aktivite göstermeyen iki antioksidan bileşik bu deneyde kullanılmamıştır (Gülçin, 2008)

Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinde gallik asit kullanılarak total fenolik bileşik miktarı belirlendi (Şekil 5.1). Hazırlanan çözeltiler 760 nm’de ölçülerek elde edilen verilerle standart grafik hazırlandı. Standart grafiğin yardımıyla sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinde total fenolik bileşik miktarı gallik asit ekivalenti (GAE) olarak hesaplandı. Elde edilen değerler Çizelge 5.2’de verilmiştir.



Şekil 5.1. Gallik asitin kimyasal yapısı

Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinde kuersetin kullanılarak total flavonoid bileşik miktarı belirlendi (Şekil 5.2). Hazırlanan çözeltiler 415 nm’de ölçülerek elde edilen verilerle standart grafik hazırlandı. Standart grafiğin yardımıyla sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinde total flavonoid bileşik miktarı kuersetin ekivalen (KE) olarak hesaplandı.



Şekil 5.2. Kuersetinin kimyasal yapısı

Çizelge 5.2. Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinde (750 µL) fenolik bileşiklerin gallik asit ekivalen (GAE) ve flavonoid bileşiklerin kuersetin ekivalen (KE) olarak hesaplanan miktarları

<b>Ekstre</b>	<b>Total Fenolik</b> (µg GAE/mg ekstre)	<b>Total Flavonoid</b> (µg KE/mg ekstre)
<b>Sarı halile- Su</b>	288.5	30.68
<b>Sarı halile- Alkol</b>	266.0	23.20

Sarı halilenin antioksidan kapasitesini belirlemek amacıyla 3 farklı indirgeme kapasitesi yöntemi olan (CUPRAC, FRAP,  $Fe^{3+}$ ) metotları uygulandı. Çalışmada uygulanan ilk indirgeme yöntemi olan CUPRAC, antioksidan özellik içeren numunelerin ortamda bulunan neokuprinin etkisiyle kuprik iyonlarını kupröz iyonlarına indirgenmesi olayıdır. Elde edilen çözelti maksimum absorbans verdiği 450 nm’de ölçümü yapılarak belirlenir. Uygulanan CUPRAC metodu kolay, maliyeti düşük ve hızlı olduğu için çokça tercih edilen bir yöntemdir (Gülçin, 2012).

Bu tez kapsamında sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstraları, çalışmada kullanılan standart antioksidanlarla benzer özellikler sergiledikleri gözlemlendi. Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstraları ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) ve çalışmada kullanılan standart antioksidanların ( $Cu^{2+}$ ) indirgeme kapasitesinin karşılaştırılması yapıldığında

BHA > Sarı halile-Su > Sarı halile-Alkol > BHT > Troloks >  $\alpha$ -Tokoferol sıralaması elde edildi (Çizelge 5.3).

Sarı halilenin antioksidan kapasitesini belirlemek amacıyla çalışmada uygulanan ikinci indirgeme yöntemi olan FRAP metodunun amacı elektron vererek antioksidan aktivitesinin belirlendiği yöntemdir. Uygulanan yöntem sayesinde  $Fe^{3+}$ -  $Fe^{2+}$ 'ye indirgenir. Elde edilen ferröz ( $Fe^{2+}$ ) iyonları Tripiridil triazin sayesinde mavi renkli yapı oluşturur. Elde edilen mavi renkli yapı ise 593 nm'de en yüksek seviyede absorbans değeri okunur. Bu metot maliyeti düşük ve kolay bir yöntemdir (Han, 2012). Ayrıca demirin çözünürlüğünü muhafaza etmek için kullanılan FRAP metodu asidik ortamda gerçekleştirilir (Topal, 2014).

Bu tez kapsamında sarı halilenin liyofilize edilmiş su alkol ekstraktları, çalışmada kullanılan bazı standart antioksidanlardan daha yüksek antioksidan özellikler sergiledikleri gözlemlendi. Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstraktları ve çalışmada kullanılan standart antioksidanların FRAP indirgeme kapasitesinin karşılaştırılması yapıldığında BHA > Sarı halile-Alkol > Troloks > Sarı halile-Su >  $\alpha$ -Tokoferol > BHT sıralaması elde edildi (Çizelge 5.3).

Sarı halilenin antioksidan kapasitesini belirlemek amacıyla çalışmada uygulanan son indirgeme yöntemi ise  $Fe^{3+}$  indirgeme kuvveti metodudur.  $Fe^{3+}$  indirgeme metodunun amacı ferrik iyonlarının ( $Fe^{3+}$ ) ferröz iyonlarına ( $Fe^{2+}$ ) indirgeme olayıdır. Bu indirgenme kapasitesinde  $Fe[(CN)_6]^{3+}$ 'nin  $Fe[(CN)_6]^{2+}$ 'ye indirgenmesiyle ölçülebilir (Gülçin, 2012). Bu metotta sarı renkteki test çözeltisi ortamda bulunan numunelerin antioksidan aktivitelerinin azalmasının etkisiyle çeşitli tonlarda mavi ve yeşil renge dönüşmektedir (Gülçin vd., 2006). 700 nm'de absorbans ölçümü yapılarak belirlenir.

Bu tez kapsamında sarı halilenin liyofilize edilmiş su alkol ekstraktları, çalışmada kullanılan bazı standart antioksidanlardan daha yüksek  $Fe^{3+}$  indirgeme kuvveti sergiledikleri gözlemlendi. Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstraktları ve çalışmada kullanılan standart antioksidanların  $Fe^{3+}$  indirgeme kuvveti karşılaştırılması yapıldığında BHA > Sarı halile-Su > Sarı halile-Alkol > Troloks > BHT >  $\alpha$ -Tokoferol sıralaması elde edildi (Çizelge 5.3).

Laboratuvar ortamında yapılan çalışmalar sonucunda sarı halilenin su ve alkol ekstraktlarının indirgeme kapasiteleri çalışmada kullanılan standart antioksidanların

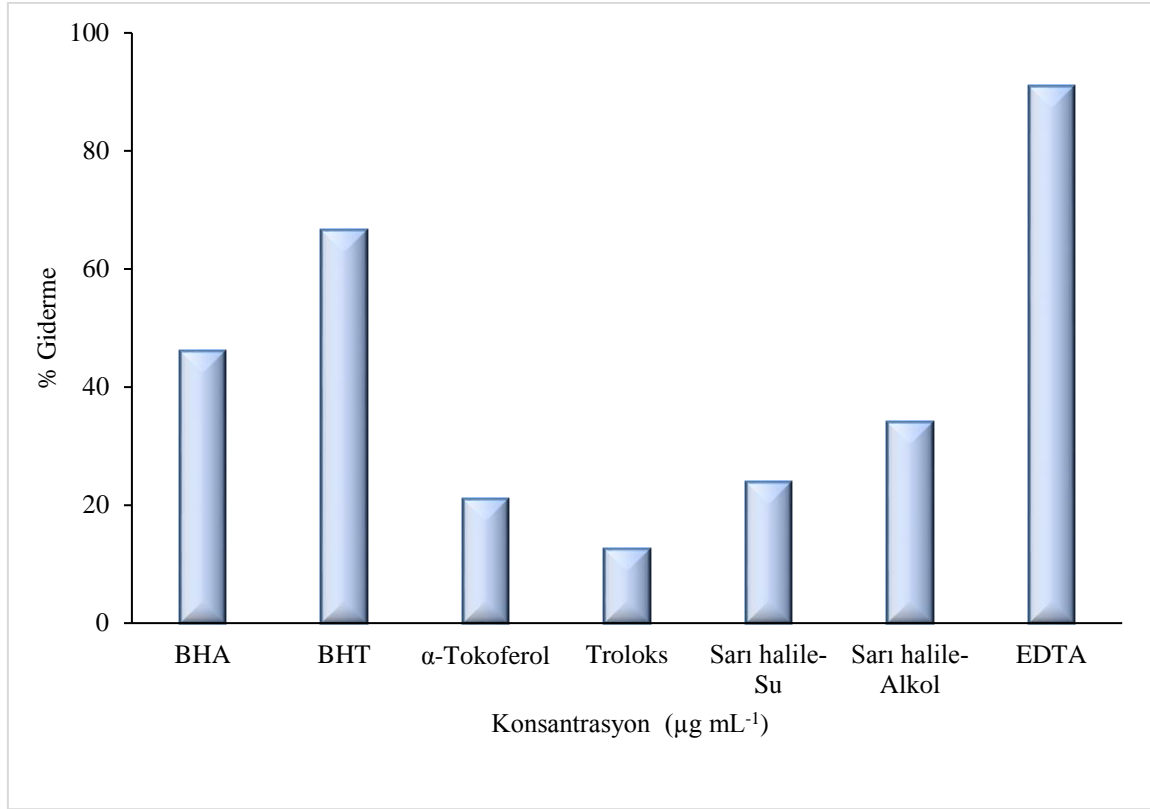


bazılarından yüksek seviyede olduğu gözlemlendi. Sarı halile-Su, Sarı halile-Alkol ve standart antioksidanların 20 µg mL<sup>-1</sup> konsantrasyonda CUPRAC, FRAP ve Fe<sup>3+</sup> indirgeme kapasitelerinin absorbans değerleri Çizelge 5.3'te verilmektedir. Yüksek absorbans değeri yüksek indirgeme kapasitesini göstermektedir.

Çizelge 5.3. Sarı halile-Su, Sarı halile-Alkol ve standart antioksidanların 20 µg mL<sup>-1</sup> konsantrasyonda CUPRAC, FRAP ve Fe<sup>3+</sup> indirgeme kapasiteleri

<b>Antioksidanlar</b>	<b>Fe<sup>3+</sup> İndirgeme (700 nm)</b>	<b>CUPRAC Metodu (450 nm)</b>	<b>FRAP Metodu (593 nm)</b>
BHA	1.986	2.141	1.941
BHT	1.286	1.166	0.915
α-Tokoferol	0.710	0.688	1.191
Troloks	1.426	0.974	1.821
Sarı halile-Su	1.755	1.536	1.773
Sarı halile-Alkol	1.721	1.492	1.838

Demir minerali canlı metabolizması için önemli bir yere sahiptir. Fakat fazla miktarlarda alındığı zaman hücrede hasara neden olabilir. Ferröz iyonları canlı organizmada ROS ve serbest radikallerin sayılarını artırarak organizmaya zarar verebilir, bu yüzden metal iyonlarının şelatlama esasına dayanarak uygulanan bipiridil metal şelatlama metodu ferröz iyonu gibi türlerin zararlarını önleyen bir yöntemdir (Gülçin, 2012). Bipiridil metal şelatlama aktivitesi Re ve arkadaşlarının belirlediği metoda göre yapıldı (1999). 522 nm'de absorbans ölçümleri yapılarak belirlendi. Laboratuvar ortamında yapılan çalışmalar sonucunda sarı halilenin su ve alkol ekstraktlarının (10 µg mL<sup>-1</sup>) bipiridil metal şelatlama aktivitesi standart antioksidanlarla karşılaştırıldı (Şekil 5.3).



Şekil 5.3. Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresi, EDTA, BHA, BHT, Troloks ve  $\alpha$ -tokoferolün  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  konsantrasyonda bipiridil metal iyonlarını şelatlama aktivitelerinin yüzde olarak karşılaştırılması

Yapılan çalışmalar doğrultusunda elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığı zaman EDTA > BHT > BHA > Sarı halile-Alkol > Sarı halile-Su >  $\alpha$ -Tokoferol > Troloks sıralaması gözlemlendi.

Çalışmamızda son olarak total antioksidan kapasitesi yöntemi kullanılarak sarı halilenin antioksidan aktivitesi araştırıldı. Bu metodun amacı oksidatif bozulmalara neden olan lipid peroksidasyonu gibi reaksiyonları engelleyen bir bileşiğin kapasitesi olarak tarif edilmiştir. Lipid peroksidasyonu engellenmediği zaman ROS'nin etkisiyle sürekli devam eden tepkimeler haline dönüşür. Sonuç olarak organizmada istenmeyen hasarlara sebebiyet verir. Antioksidanlar lipid peroksidasyonunu engelleyerek hasarlarına karşı korumada ciddi bir görev üstlenirler (Gülçin, 2012).

Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstreleri total antioksidan aktivitesi “Tiosiyanat Metoduna” göre belirlendi. Bu yöntemde linoleik asit emülsiyonunun oto-

oksidasyonu sonucu oluşan peroksitler ferröz iyonlarını ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ferrik iyonlarına ( $\text{Fe}^{3+}$ ) yükseltir. Yükseltgenme sonucu elde edilen ferrik iyonları ( $\text{Fe}^{3+}$ ) tiyosiyanat ( $\text{SCN}^-$ ) ile 500 nm’de maksimum absorbans veren  $\text{Fe}(\text{SCN})^{2+}$  kompleksini oluşturur. Okunan yüksek absorbans değeri, peroksidasyon sonucu oluşan peroksit miktarının yüksek olduğunu ifade eder. Laboratuvar ortamında gerçekleştirilen deney 12 saatte bir ölçüm alınarak toplam 60 saatte sonuçlandı. Total antioksidan aktivite, sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstralarının 20  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonundaki çözeltinin 500 nm’deki absorbansı ölçülerek tespit edildi. Elde edilen veriler kullanılarak absorbansa karşı inkübasyon süresine ait grafik hazırlandı ve sonuçlar çalışmada kullanılan standart antioksidanlar ile karşılaştırılması yapıldı Çizelge 5.4’te verildi.

Çizelge 5.4. Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinin (20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) lipit peroksidasyonunu giderme yüzdeleri

Antioksidanlar	Lipit Peroksidasyonu İnhibisyonu (%)
BHA	98,67
BHT	99,00
$\alpha$ -Tokoferol	91,26
Troloks	98,00
Sarı halile-Su	89,93
Sarı halile-Alkol	93,76

Total antioksidan yönteminde sarı halilenin liyofilize edilmiş su ekstresinin  $\alpha$ -tokoferol standardına yakın davrandığı, sarı halile alkol ekstresinin ise  $\alpha$ -tokoferol standardından daha yüksek lipit peroksidasyonu inhibe etme yüzdesine sahip olduğu belirlenmiştir.

Radikal giderme yöntemlerinde literatürdeki diğer çalışmaların sonuçlarına bakıldığı zaman; DPPH çalışmalarındaki farklı  $\text{IC}_{50}$  değerleri, Eugonel türevleri 2,38-8,05  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Topal, 2014), Turna yemişi 99,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Annakkaya, 2012), Keten tohumu 27,72-25,67  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Han, 2012) olarak elde edilmiştir. Sarı halilenin  $\text{IC}_{50}$  değerleri yukarıda verilen çalışmalar ile karşılaştırıldığı zaman yüksek antioksidan özelliklere sahip olduğunu göstermektedir.

ABTS çalışmalarındaki farklı IC<sub>50</sub> değerleri, Eugenol türevleri 9.90-15.75 µg mL<sup>-1</sup> (Topal, 2014), Kurkumin 34.9 µg mL<sup>-1</sup> (Ak ve Gülçin, 2008), L-Adrenalin 30,6 µg mL<sup>-1</sup> (Gülçin, 2009a), Turna yemişi ve Mersin 86,63-46,20 µg mL<sup>-1</sup> (Annakkaya, 2012), Keten tohumu 53,30-49,50 µg mL<sup>-1</sup> (Han, 2012) olarak elde edilmiştir. Sarı halilenin IC<sub>50</sub> değerleri verilen çalışmalar ile karşılaştırıldığı zaman yüksek ABTS<sup>+</sup> radikal giderme aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir.

Yapılan bir araştırmada, Gümüşhane ilindeki çam kozalaklarının antioksidan aktivitelerine bakılmıştır. Gümüşhane'deki çam kozalaklarının DPPH IC<sub>50</sub> değeri (14.75 µg mL<sup>-1</sup>), ABTS değeri (12.56 µg mL<sup>-1</sup>) olarak bulunmuştur. Aynı çalışma için, LC-HRMS metodu kullanılarak fenolik asit içerikleri olarak kuersitrin, *t*-taksifolin, fumarik asit ve (-) epikateşin belirlenmiştir (Topal, 2020).

Fenolik bileşikler ROS'nin hasarlarına karşı koyan savunma mekanizmalarından bazılarıdır. Bunun üzerine sarı halile (*Terminalia citrina roxb. ex. fleming*) meyvesinin yaprakları üzerine bazı antioksidan araştırmalar yapılmıştır. Yapılan bir araştırmada sarı halile meyvesinin yaprakları metil alkol ile çözünmesi gerçekleştirilmiştir. Antioksidan aktivite belirleme çalışmasında, total fenolik bileşik miktarı (190.23±5.24) GAE/g, total flavonoid bileşik miktarı (99.51±0.221) QE/g değerlerini göstermiştir, ayrıca total antioksidan kapasitesi (10.17±0.02) mg olarak belirlenmiştir (Das vd., 2015). Bu tezin diğer çalışmalardan farkı; sarı halilenin yaprağı değilde meyvesi kullanılmıştır, 10 farklı antioksidan yöntemi uygulanmış ve fenolik asit içeriğinin belirlenmesi için LC-HRMS metodu uygulanmıştır, yöntemlerde hem etil alkol hemde su ekstraktları kullanılmıştır.

Sonuçlara bakıldığı zaman sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstresinin radikal giderme aktivitelerinde, standart antioksidanlardan Troloks antioksidanına yakın değerler göstermiştir ama ABTS<sup>+</sup> metodunda Troloks standardından daha iyi sonuç vermiştir. İndirgeme kapasitesi metotlarına bakıldığı zaman BHA standardı gibi davrandığı ve diğer standartlardan daha iyi indirgeme kapasitesine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca şelatlama aktivitesi değerlendirildiği zaman α-tokoferol ve Troloks standartlarından daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Sarı halilenin fenolik asit içeriği LC-HRMS analiz metodu kullanılarak belirlendi. Sarı halilenin liyofilize edilmiş su ve alkol ekstraktlarından belirlenen 16 tane fenolik bileşik incelendiğinde, su ekstresinde en yüksek fenolik bileşik

miktarları olarak Syringic asit ( $17.227 \text{ mg g}^{-1}$ ) ve Ellagic asit ( $8.823 \text{ mg g}^{-1}$ ), alkol ekstresinde ise Ellagic asit ( $39.940 \text{ mg g}^{-1}$ ) ve Syringic asit ( $27.339 \text{ mg g}^{-1}$ ) değerleri bulunmuştur.

## 6. KAYNAKLAR

- Ak, T. ve Gülçin, İ., 2008. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin, Chemico Biological Interaction, 174, 27-37.
- Akış, T., 2010. Piyasada Çay Olarak Tüketilen Bazı Bitkilerin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi ve Fenolik Yapılarının İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 227s.
- Alhan, C. ve Şan, M., 2002. Kroner Kalp Hastalığı Tedavisinde Anti-Oksidanlar Yararlı mı?, Türkiye Klinikleri Kardiyoloji Dergisi, 15, 203-213.
- Altaş, S., 2009. Cedrus libani (SEDİR) ve Abies cilicia (KÖKNAR) Reçine Özütlerinin Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivitelerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır, 146s.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K. ve Hagen, T.M., 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging, Proceedings of the National Academy of Sciences, 90(17), 7915-7922.
- Amiri M.S. ve Joharchi M.R., 2013. Ethnobotanical investigation of traditional medicinal plants commercialized in the markets of Mashhad Iran, Avicenna Journal Phytomed 3, 254-71.
- Annakkaya, P., 2012. Turna yemişi (*Vaccinium macrocarpon*) ve mersinin (*Myrtus communis*) liyofilize edilmiş su ekstraktlarının antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve fenolik içeriklerinin aydınlatılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 101s.
- Apak, R., Güçlü K., Özyürek, M., Karademir, S.E. ve Erça, E., 2006. The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas, International Journal of Food Science and Nutrition, 57, 292-304.
- Arosio, B., Gagliano N. ve Fusaro L.M.P., 2000. Aloe-emodin quinone pretreatment reduces acute liver injury induced by carbon tetrachloride, Pharmacology and Toxicology, 87, 229-233.
- Aydoğan, B., 2016. Dişbudak (*Fraxinus Excelsior*-*Fraxinus Americana*) Ağacının Yapraklarındaki Toplam Fenolik Bileşikler ve Antioksidan Kapasitelerinin Tayini. Yüksek Lisans Tezi, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa, 74s.
- Aysel, M.B., 2008. Biberiye (*Rosmanirus officinalis L.*) ve Mercanköşk (*Origanum onites L.*) Bitkilerindeki Antioksidan Aktivite Potansiyellerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 48s.
- Bakır, C., 2010. Anason (*Pimpinella Anisum*) ve Rezene (*Foeniculum Vulgaris*)’de Toplam Fenol/Flavonoid Miktarları ve Antioksidan Aktivitelerinin Metal İçeriği İle

Değişiminin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ, 84s.

- Balasundram, N., Sundram, K. ve Samman, S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products. Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, Food Chemistry, 99, 191-203.
- Benzie, I.F. ve Strain, J.J.1996. The ferric reducing ability of plasma as a measure of 'antioxidant power': the FRAP assay, Analytical Biochemistry, 239, 70-76.
- Benzie, I.F.F. ve Strain, J.J., 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration, Methods in Enzymology, 299, 15-27.
- Block, G., 1993. Vitamin C, cancer and aging, Gero Science, 16(2), 55-58.
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant deteminations by the use of a stable free radical. Nature, 26, 1199-1200.
- Bulkley, G.B., 1983. The role of free oxygen radicals in human disease processes, Surgery, 94, 407-411.
- Burda, S. ve Oleszek, W., 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 2774-2777.
- Bursal, E. ve Gülçin, İ., 2011. Polyphenol contents and in vitro antioxidant activities of lyophilised aqueous extract of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*), Food Research International, 44, 1482-1489.
- Bursal, E., 2009. Kivi meyvesinin (*Actinidia deliciosa*) antioksidan ve antiradikal aktivitelerinin belirlenmesi, karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 107s.
- Bursal, E., Taslimi, P., Gören, A.C. ve Gülçin, İ., 2020. Assessments of anticholinergic, antidiabetic, antioxidant activities and phenolic content of *Stachys annua*, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 28, 1878-1881.
- Burton, G.W. ve Ingold, K.U., 1984.  $\beta$ -Carotene: an unusual type of lipid antioxidant, Science, 224, 569-573.
- Cao, G. ve Prior, L.R., 2002. Measurement of Total Antioxidant Capacity in Nutritional and Clinical Studies. Handbook of Antioxidants. Packer, L. and Cadenas, E. (eds.), Crc press, California. pp. 1-732.
- Carlo, G., 1999. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs Life Sciences, 4, 337-353.

- Cemeroğlu, B., 2016. Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi, Bizim Grup Basımevi, Ankara, 1. Cilt, 1-707.
- Cemeroğlu, B., Yemenicioğlu, A. ve Özkan, M., 2004. Meyve ve sebzelerin bileşimi, meyve sebze işleme teknolojisi, 1-174. In Ed. B. Cemeroğlu, meyve sebze teknolojisi. 2. Baskı, Başkent Matbaacılık, Ankara.
- Cheeseman, K.H. ve Slater, T.F., 1993. An intruduction to free radical biochemistry, British Medical Bulletin, 49, 481-493.
- Cock, I.E., 2015. The medicinal properties and phytochemistry of plants of the genus *Terminalia* (*Combretaceae*), Inflammopharmacol. 23, 203-229.
- Cook, N.C. ve Samman, S., 1996. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources, Nutritional Biochemistry, 7, 66-76.
- Çalışkan, E., 2007. İğde Çiçeği (*Elaeagnus angustifolia*) ve Kedi Nanesi (*Nepeta catoria*) Bitkilerinin Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat, 45s.
- Das, N., Goshwami, D., Hasan, M.S., Raihan, S.Z. ve Subedi, N.K., 2015. Phytochemical screening and anthelmintic activity of methanol extract of *Terminalia citrina* leaves, Asian Pacific Journal of Tropical Disease. 5, 166-168.
- Davies, K.J.A., 1995. Oxidative stress: the paradox of aerobic life, Biochemical Society Symposia, 61, 1-31.
- Davies, K.J.A., 2000. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems, International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life, 50, 279-289.
- De Quirós, A.R.B. ve Costa, H.S., 2006. Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review, Journal of Food Composition and Analysis, 19(2-3), 97-111.
- De Zwart, L.L., Meerman, J.H., Commandeur, J.N. ve Vermeulen, N.P., 1999. Biomarkers of Free Radical Damage Applications in Experimental Animals and in Human, Free Radical Biology & Medicine, 26, 202-226.
- DiMascio, P., Kaiser, S. ve Sies, H., 1989. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher, Archives Biochemistry Biophysics, 274, 532-538.
- Enstrom, E.J., 2001. Epidemiological and Clinical Aspects of Ascorbate and Cancer. Handbook of Antioxidants. Packer, L. and Cadenas, E. (eds.), Crc press, California. pp. 1-732.
- Erkan, N., 2008. Kuşdili (*Rosmarinus officinalis* L.) ve Çörekotu (*Nigella sativa* L.) Ekstratlarının Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi ve Lipid Oksidasyon Kinetiği Üzerine Etkilerinin Takip Edilmesi, Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Antalya, 210s.
- Eser, Z., 2010. Kızılcık Meyvesi ve Marmelatının Bazı Kimyasal, Fiziksel Özellikleri İle Antioksidan Aktivitesi ve Antosiyanin Profilinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 104s.



- Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G. ve Ritiene, A., 1999. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 1035-1040.
- Foote, C.S. ve Denny, R.W., 1969. Chemistry of singlet oxygen VII. Quenching by  $\beta$ -carotene, Journal of American Chemistry Society, 90, 6233-6235.
- Goulart, M., Batore'u, MC., Rodriguez, AS., Laires, A. ve Rueff, J., 2005. Lipoperoxidation products and thiol antioxidants in chromium exposed workers. Mutagen, 20, 311-315.
- Gökce, M., 2009. Muğla Yöresinde Yetiştirilen Bazı Zeytin Meyvelerinin Antioksidan Kapasitelerinin Araştırılması ve Sızma Zeytin Yağlarının Aromasının Kimyasal Analizi. Yüksek Lisans Tezi, Muğla Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla, 87s.
- Gökpınar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T. ve Durmaz, Y., 2006. Algal antioksidanlar, Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 23, 85-89.
- Görünmezoğlu, Ö., 2008. Kayısı ve İncir Meyvelerinin Antioksidan Kapasitelerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, 82s.
- Gülçin, İ., Topal, F., Çakmakçı, R., Gören, A.C., Bilsel, M. ve Erdoğan, U., 2011. Pomological features, nutritional quality, polyphenol content analysis and antioxidant properties of domesticated and three wild ecotype forms of raspberries (*Rubus idaeus* L.), Journal Food Science, 76, 585-593.
- Gülçin İ., 2007. Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa. Amino Acids, 32, 431-438.
- Gülçin, İ., 2002. Isırgan otunun (*Urtica dioica*) antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, oksidatif enzimlerinin karakterizasyonu ve bazı *in vivo* etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, s114.
- Gülçin, İ., 2005. The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds, International Journal of Food Sciences and Nutrition, 56, 491-499.
- Gülçin, İ., 2008. Measurement of antioxidant ability of melatonin and serotonin by the DMPD and CUPRAC methods as trolox equivalent, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 23, 871-876.
- Gülçin, İ., 2010. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight, Innovative Food Science and Emerging Technologies, 11, 210-218.
- Gülçin, İ., 2011. Antioxidant activity of eugenol-a structure and activity relationship study, Journal of Medicinal Food, 14, 975-985.
- Gülçin, İ., 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview, Archives of Toxicology, 86, 345-391.
- Gülçin, İ., 2020. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview, Archives of Toxicology, 94, 651-715

- Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., Chea, A. ve Topal, F., 2009a. Antioxidant activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania rotunda*: cepharanthine and fangchinoline, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 25, 44-53.
- Gülçin, İ., Elmastas, M. ve Aboul-Enein, H.Y., 2007a. Determination of antioxidant and radical scavenging activity of basil (*Ocimum basilicum*) assayed by different methodologies, Phytotherapy Research, 21, 354-361.
- Gülçin, İ., Gören, A.C., Taslimi, P., Alwasel, S.H., Kılıç, Ö. ve Bursal, E., 2019b. Anticholinergic, Antidiabetic and Antioxidant Activities of Anatolian Pennyroyal (*Mentha pulegium*)-Analysis of Its Polyphenol Contents by LC-MS/MS, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 19, 1878-8181.
- Gülçin, İ., Huyut, Z., Elmastaş, M. ve Aboul-Enein, H.Y. 2010. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid, Arabian Journal of Chemistry, 3(1), 43-53.
- Gülçin, İ., Kaya, R., Gören, A.C., Akıncıoğlu, H., Topal, M., Bingöl, Z., Çakmak, K., Öztürk Sarıkaya, S.B., Durmaz, L. ve Alwasel, S., 2019a. Anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities of cinnamon (*cinnamomum verum*) bark extracts: polyphenol contents analysis by LC-MS/MS, International Journal of Food Properties, 22 (1), 1511-1526.
- Gülçin, İ., Köksal, E., Elmastas, M. ve Aboul-Enein, H.Y., 2007b. Determination of *in vitro* antioxidant and radical scavenging activity of *Verbascum oreophilum* C. Koch var. Joannis, Research Journal of Biological Sciences, 2, 372-382.
- Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö.İ., Oktay, M. ve Büyükokuroğlu, M.E., 2004b. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.), Journal of Ethnopharmacology, 90, 205-215.
- Gülçin, İ., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A. ve Elias, R., 2006. Antioxidant activity of a triterpenoid glycoside isolated from the berries of *Hedera colchica*: 3-O-( $\beta$ -Dglucopyranosyl)- hederagenin, Phytotherapy Research, 20, 130-134.
- Gülçin, İ., Oktay, M., Kireççi, E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2003, Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts, Food Chemistry, 83, 371-382.
- Gülçin, İ., Şat, İ.G., Beydemir, Ş., Elmastaş, M. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004a. Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.), Food Chemistry, 87, 393-400.
- Gülçin, İ., Topal, F., Öztürk Sarıkaya, S.B., Bursal, E., Gören, A.C. ve Bilsel M., 2011a. Polyphenol contents and antioxidant properties of medlar (*Mespilus germanica* L.), Records of Natural Products, 5, 158-175.
- Haigh, R., 1986. Safety and necessity of antioxidants, Food Chemistry and Toxicology, 24, 1031-1036.
- Halliwell, B. ve Gutteridge J.M.C., 1989. Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press Oxford, pp 543.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J.M.C., 1999. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed., Clarendon Press Oxford, pp 530-533.

- Halliwell, B., 1989. Oxidants and the central nervous system: Some fundamental questions. Acto Neurologica Scandivanica, 126, 23-33.
- Halliwell, B., 1991. Drug antioxidant effects. Drug, 42, 569-605.
- Halliwell, B., 2002. Food-Derived Antioxidants: How to Evaluate Their Importance in Food and *In Vivo*. Handbook of Antioxidants. Packer, L. and Cadenas, E. (eds.), Crc press, California. pp. 1-732.
- Hamad, H.O., Alma, M.H., Gülçin, İ., Yılmaz, M.A. ve Karaoğlu, E., 2017. Evaluation of phenolic contents and bioactivity of root and nutgall extracts from Iraqi Quercus infectoria Olivier. Records of Natural Products, 11, 205-210. 766.
- Han, H., 2012. Altın çilek (*Physalis peruviana*) ve keten (*Linum usitatissimum*) tohumunun antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve fenolik içeriklerinin aydınlatılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 112s.
- Han, H., Yılmaz, H. ve Gülçin, İ., 2018. Antioxidant activity of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) and analysis of its polyphenol contents by LC-MS/MS. Records of Natural Products, 12(4), 397-402.
- Handelman, G.J., Dratz, E.A., Reay, C.C. ve van Kuijk, F.J.G.M., 1988. Carotenoids in the human macula and whole retina, Investigati Ophthalmology Visual Science, 29, 850-855.
- Harborne, J.B., 1994. The Flavonoids advances in research since 1986. Chapman and Hall/CRC, p.638, USA.
- Harman, D., 1984. Free radical theory of aging: the “free radical” diseases, Gero Science, 7(4), 111-131.
- Homma, T., Kobayashi, S. ve Fujii, J., 2019. Induction of ferroptosis by singlet oxygen generated from naphthalene endoperoxide, Biochemical and Biophysical Research Communications, 518, 519-525.
- Hossan, M.S., Hanif, A., Khan, M., Bari, S., Jahan, R. ve Rahmatullah, M., 2009. Ethnobotanical survey of the Tripura tribe of Bangladesh. American Eurasian Journal of Sustainable Agriculture, 3(2), 253-261.
- Hou, W.C., Lin, R.D., Cheng, K.T., Hung, Y.T., Cho, C.H., Chen, C.H. ve Lee, M.H., 2003. Free radical-scavenging activity of Taiwanese native plants, Phytomedicine, 10(2-3), 170-175.
- Ito, I., Ochiai, J., Sasaki, R., Suzuki, S., Kusuhara, Y., Morimitsu, Y., Otani, M. ve Aoki, K., 1990. Serum concentrations of carotenoids, retinol, and  $\alpha$ -tocopherol in healthy persons determined by high-performance liquid chromatography, Clinica Chimica Acta, 194,131-144.
- İktü, A., 2020. Gümüşhane’de Farklı Çevrelerde Yetiştirilmiş Bazı Kışlık Ekmeklik Buğday Genotiplerinin Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gümüşhane, 81s.

- İmamoğlu, S., 2010. *Asphodelus aestivus* Brot. (Çiriş Otu) Bitkisinin Çeşitli Ekstraktlarının İn Vitro Antioksidan Aktivitelerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 80s.
- İşbilir, Ş.S., 2008. Yaprakları Salata-Baharat Olarak Tüketilen Bazı Bitkilerin Antioksidan Aktivitelerinin İncelemesi, Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, 132s.
- Kahkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S. ve Heinonen, M., 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 3954-3962.
- Kalın, P., Gülçin, İ. ve Gören, A.C., 2015. Antioxidant activity and polyphenol content of cranberries (*Vaccinium macrocarpon*). Records of Natural Products, 9(4), 496-502.
- Kalpana, C., Rajasekharan, K.N. ve Menon, V.P., 2005. Modulatory effects of curcumin and curcumin analog on circulatory lipid profiles during nicotine-induced toxicity in Wistar rats. Journal of Medicinal Food, 8(2), 246-250.
- Kapçı, B., 2013. Characteristic Components and Antioxidant Potential Of Black Chokeberry (*Aronia Melanocarpa*) Products. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 110s.
- Karakaş, Ö., 2019. Çeşitli Deniz Alglerinin Antioksidan Bileşenlerinin ve Toplam Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, İstanbul, 82s.
- Karaman, Ş., 2008. Türkiye’de Yetiştirilen Bazı Elma Çeşitlerinin Toplam Antioksidan Kapasitelerinin ve Antioksidan Özellik Gösteren Başlıca Bileşenlerinin Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 158s.
- Kasapoğlu, K.N., 2015. Phenolic Profile, Antioxidant Activity and Bioaccessibility Of Peels and Fleshes Of A Local Red Beet Variety Native To Turkey. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 89s.
- Kehre, J.P. ve Smith J.V., 1994. Free radicals in biology: sources, reactivities and roles in etiology of human diseases; in Frei B(ed): natural antioxidants in human health and disease. San Diego, Academic Press, 25-62.
- Khachik, F., Beecher, G.R., Goli, M.B. ve Lusby, W.R., 1992. Separation and quantitation of carotenoids in foods, Methods Enzymol, 213,347-359.
- Koca, N. ve Karadeniz, F., 2005. Gıdalardaki Doğal Antioksidan Bileşikler. 30, 229-236.
- Koczka, N., Stefanovits-Bányai, É. ve Ombódi, A., 2018. Total polyphenol content and antioxidant capacity of rosehips of some *Rosa* species, Medicines, 5(3), 84.
- Köksal, E., 2007. Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) peroksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, antioksidan ve antiradikal aktivitesinin belirlenmesi, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 123s.
- Köksal, E., Bursal, E., Dikici, E., Tozoğlu, F. ve Gülçin, İ., 2011. Antioxidant activity of *melissa officinalis* leaves, Journal of Medicinal Plants Research, 5, 217-222.

- Köse, L.P., Bingöl, Z., Kaya, R., Gören, A.C., Akıncıoğlu, H., Durmaz, L., Köksal, E., Alwasel, S.H. ve Gülçin, İ., 2020. Anticholinergic and antioxidant activities of avocado (*Folium perseae*) leaves-phytochemical content by LC-MS/MS analysis, International Journal of Food Properties, 23 (1), 878-893.
- Küçükçoban, Ç., 2009. Türkiye’de Yetiştirilen Bazı Erik Çeşitlerinin Toplam Antioksidan Kapasitelerinin ve Başlıca Antioksidan Bileşenlerinin Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 99s.
- Landvik, V.S., Diplock, T.A. ve Packer, L., 2002. Efficacy of Vitamin E in Human Health and Disease. Handbook of Antioxidants. Packer, L. and Cadenas, E. (eds.), Crc press, California. pp. 1-732.
- Lemoyne, M., Van Gossum, A., Kurian, R., Ostro, M., Axler, J. ve Jeejeebhoy, KN., 1987. Breath pentane analysis as an index of lipid peroxidation: a functional test of vitamin E status, American Journal of Clinical Nutrition, 46,267-272.
- Luper, S., 1998. A review of plants used in the treatment of liver disease: part 1, Alternative Medicine Review, 3,410-421.
- Malo, C. ve Wilson, J.X., 2000. Glucose modulates vitamin C transport in adult human small intestinal brush border membrane vesicles, Journal of Nutrition, 130, 63-69.
- Mates, J.M. ve Sanchez-Jimenez, F.M., 2000. Role of oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy, International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 32, 157-170.
- Miller, D.D., 1996. Mineral. Food Chemistry, Fennema, O.R. (Ed.), Dekker: New York, pp. 618-649.
- Moore, J., Liu, G.J., Zhou, K. ve Yu, L., 2006. Effects of Genotype and Environment on the Antioxidant Properties of Hard Winter Wheat Bran, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 5313-5322.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, R.A. ve Rodwell, V.W., 1996. Fizyolojik öneme sahip lipidler. N. Dikmen, T. Özgönen. Harper’ın Biyokimyası, Yirmidördüncü baskı, Barış Kitabevi, İstanbul.
- Omura, K., 1995. Antioxidant synergism between butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene, Journal of the American Oil Chemists’ Society, 72,1565-1570.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine, Japanese Journal of Nutrition, 44, 307-315.
- Özer, Z., Çarıkçı, S., Yılmaz, H., Kılıç, T., Dirmenci, T. ve Gören, A.C., 2020. Determination of secondary metabolites of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* and *O. vulgare* subsp. *vulgare* by LC-MS/MS. Journal of Chemical Metrology, 14, 25-34.
- Öztürk Sarıkaya, S.B., 2009. Bazı fenolik asitlerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) üzerine etkilerinin incelenmesi, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 162s.

- Öztürk, N. ve Tunalier, Z., 2002. Antioksidan etki ve fenolik bileşikler, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir.
- Pacher, P., Beckman, J.S. ve Liaudet, L., 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease, Physiological reviews, 87(1), 315-424.
- Padayatty, J.S., Daruwala, R., Wang, Y., Eck, K.P., Song, J., Koh, S.W. ve Levine, M., 2002. Vitamin C: From Molecular Actions to Optimum Intake. Handbook of Antioxidants. Packer, L. and Cadenas, E. (eds.), Crc press, California. pp. 1-732.
- Park, Y.K., Koo, M.H., Ikegaki, M. ve Contado, J.L., 1997. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil, Arquivos de Biologiae Technologia, 40, 97-106.
- Payan, A., 2007. Üzüm Meyvesi ve Çekirdeğinden Antioksidan Eldesi. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, 73s.
- Pourzand, C., Watkin, R.D., Brown, J.E. ve Tyrrell R.M., 1999. Ultraviolet A radiation induces immediate release of iron in human primary skin fibroblasts : the role of ferritin. Proc Natl Acad Sci USA, 96, 6751-6756.
- Prior, R.L. ve Cao, G., 2000. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: Diet and health implications, Horticulture Science, 35, 588-592.
- Prior, R.L. ve Cao, G., 2001. Measurement of Total Antioxidant Capacity in Nutritional and Clinical Studies. Handbook of Antioxidants. Packer, L. Cadenas, E. (eds.), Crc press, California. pp. 1-732.
- Pryor, W.A., 1986. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions, Annual Review of Physiology, 48(1), 657-667.
- Ranabahu, P. ve Harborne, J.B., 1993. The flavonoids of the genus *Lathyrus* and a comparison of flavonoid patterns within the tribe Viciaeae, Biochemical Systematics and Ecology, 21(6-7), 715-722.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. ve Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, Free Radical Bioology and Medicine, 26, 1231-1237.
- Rice-Avans, CA., Miller, NJ., Bolwell, PG., Bramley, PM. ve Pridham, JB., 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenol flavonoids, Free Radical Research, 22, 375-383.
- Saldamlı, İ., 2007. Gıda Kimyası Hacettepe Üniversitesi Yayınları. Ankara, 463-492.
- Samsonowicz, M. ve Regulska, E., 2017. Spectroscopic study of molecular structure, antioxidant activity and biological effects of metal hydroxyflavonol complexes, Spectrochimica Acta Part A: Molecular Biomolecular Spectroscopy, 173, 757-771.
- Sarıburun, E., 2009. Bursa’da Yetiştirilen Bazı Ahududu (*Rubus idaeus* L.) ve Böğürtlen (*Rubus fruticosus* L.) Çeşitlerinin Fenolik Bileşiklerinin Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi (LC-MS) İle İncelenmesi ve Antioksidan Aktivite Tayinleri. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa, 157s.

- Sarıkürkcü, C., 2009. Akdeniz Bölgesi Yenilebilir Bazı Mantarlarının Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi, Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Isparta, 107s.
- Sarikahya, N.B., Gören, A.C. ve Kirmizigül, S., 2019. Simultaneous determination of several flavonoids and phenolic compounds in nineteen different *Cephalaria* species by HPLC-MS/MS. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 173, 120-125.
- Serafini, M. ve Del Rio, D., 2004. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool, Redox Report, 9, 145-152.
- Sharma, R.A., Gescher, A.J. ve Steward, W.P., 2005. Curcumin: the story so far. European journal of cancer, 41(13), 1955-1968
- Sherwin, E.R., 1972. Antioxidants for food fats and oils, Journal of the American Oil Chemists' Society, 49,468-472.
- Sies, H. ve Stahl, W., 1995. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants, American Journal of Clinical Nutrition, 62,1315-1321.
- Singleton, V.L., Orthofer, R. ve Lamuela-Raventos, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, Methods in Enzymology, 299, 152-178.
- Sir Elkhatim, K. A., Elagib, R. A. ve Hassan, A. B., 2018. Content of phenolic compounds and vitamin C and antioxidant activity in wasted parts of Sudanese citrus fruits, Food science and nutrition, 6(5), 1214-1219.
- Soe, K.N.T., 2004. Medicinal plants in Myanmar. Forest Resource Environment Development and Conservation Association, FRED. pp 37-65.
- Stahl, W. ve Sies, H., 2002. Introduction: Reactive oxygen species. Research Monographs, 1-2.
- Taslimi, P., Köksal, E., Gören, A.C., Bursal, E., Aras, A., Kılıç, Ö., Alwasel, S. ve Gülçin, İ., 2019. Anti-Alzheimer, Antidiabetic and Antioxidant Potential of *Satureja cuneifolia* and Analysis of Its Phenolic Contents by LC-MS/MS, Arabian Journal of Chemistry, 19, 1878-5352.
- Taylor, A. ve Nowell, T., 1997. Oxidative stress and antioxidant function in relation to risk for cataract. Adv Pharmacol, 38, 516-536.
- Temür N., 2006. Cam, kavak, söğüt ve armut ağaçları üzerinde yetişen ökse otu (*Viscum album l.*) bitkilerinin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat, 58s.
- Topal, F., 2014. Bazı Eugenol Türevlerinin Sentezi ve Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 172s.
- Topal, M., 2018. Determination of antioxidant and antiradical properties of *Picea orientalis* cone, Anadolu Journal of Agricultural Sciences, 33, 232-236.

- Topal, M., 2020. Secondary Metabolites of Ethanol Extracts of *Pinus sylvestris* Cones from Eastern Anatolia and Their Antioxidant, Cholinesterase and  $\alpha$ -Glucosidase Activities, Records of Natural Products, 14,2, 129-138.
- Torel, J., Cillard, J. ve Cillard, P., 1986. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical, Phytochemistry, 25(2), 383-385.
- Van Gossum, A., Shariff, R., Lemoyne, M., Kurian, R. ve Jeejeebhoy, K., 1988. Increased lipid peroxidation after lipid infusion as measured by breath pentane output, American Journal of Clinical Nutrition, 48,1394-1399.
- Yagi, K., 1987. Lipid peroxides and human disease, Chemistry and Physics of Lipid, 45, 337-341.
- Yavaşer, R., 2011. Doğal ve sentetik antioksidan bileşiklerin antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Aydın, 124s.
- Yen, G.C. ve Chen, H.Y., 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their mutagenicity, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 27-32.
- Yildirim, A., Mavi, A. ve Kara, A.A., 2003. Antioxidant and antimicrobial activities of *Polygonum cognatum* Meissn extracts, Journal of the Science of Food and Agriculture, 83, 64-69.
- Yusuf, M., Begum, J., Hoque, M.N. ve Chowdhury, J.U., 2009. Medicinal Plants of Bangladesh, second ed. Bangladesh Council of Scientific and Industrial Research Laboratories, Chittagong, 625.
- Yücel, E.S., 2002. Taze Sıkılmış ve Ticari Domates ve Portakal Sularının Antioksidan Aktivitelerinin Saptanması ve Toplam Fenolik Madde ve Askorbik Asit İçeriklerinin Antioksidan Aktivitelerine Olan Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 59s.
- Zeb, A., 2020. Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods, Journal of Food Biochemistry, 44, e13394.
- Zor, M., 2007. Depolamanın ayva reçelinin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri ile antioksidan aktivitesi üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 74s.



## **ÖZGEÇMİŞ**

İlk ve orta öğrenimini Yozgat'ta, lise öğrenimini Kayseri'de tamamladı. 2014 yılında girdiği Gümüşhane Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü'nden 2018 yılında mezun oldu. 2018-2019 Eğitim Öğretim yılında Gümüşhane Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim dalında yüksek lisans öğrenimine başladı.