

ÇEŞİTLİ BİTKİLERİN ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN  
İNCELENMESİ

**Latifşah ŞİT**  
Yüksek Lisans Tezi  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Danışman  
**Doç.Dr.Yeşim YEŞİLOĞLU**  
EDİRNE-2011

**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇEŞİTLİ BİTKİLERİN ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN**  
**İNCELENMESİ**

**Latifşah ŞİT**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**Danışman**  
**Doç. Dr. Yeşim YEŞİLOĞLU**

**EDİRNE-2011**



**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇEŞİTLİ BİTKİLERİN ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

**LATİFŞAH ŞİT**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

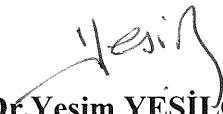
**Bu tez 20-01-2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından kabul edilmiştir.**



**Prof.Dr.Ayten SAĞIROĞLU**



**Doç.Dr.Murat YURTCAN**



**Doç.Dr.Yeşim YEŞİLOĞLU**

**Danışman**

## İÇİNDEKİLER

|                                                  | Sayfa No |
|--------------------------------------------------|----------|
| TABLolar DİZİNİ                                  | I        |
| ŞEKİLLER DİZİNİ                                  | II       |
| ÖZET                                             | V        |
| ABSTRACT                                         | VII      |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ                   | IX       |
| 1. GİRİŞ                                         | 1        |
| 2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI       | 3        |
| 2.1. Serbest Radikaller                          | 3        |
| 2.2. Reaktif Oksijen Türleri (ROT)               | 5        |
| 2.2.1. Süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ )    | 7        |
| 2.2.2. Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )            | 7        |
| 2.2.3. Hidroksil radikali ( $HO^{\cdot}$ )       | 8        |
| 2.2.4. Singlet oksijen ( $^1O_2$ )               | 9        |
| 2.2.5. Nitrik oksit ( $NO^{\cdot}$ )             | 10       |
| 2.2.6. Hipoklorik asit ( $HOCl$ )                | 10       |
| 2.2.7. Hidroperoksit radikali ( $NO_2^{\cdot}$ ) | 11       |
| 2.3. Oksidatif Stres                             | 11       |
| 2.4. Serbest Radikallerin Kaynakları             | 11       |

|                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------|----|
| 2.4.1. Endojen serbest radikal kaynakları                 | 11 |
| 2.4.2. Eksojen serbest radikal kaynakları                 | 15 |
| 2.5. Serbest Radikallerin Etkileri                        | 15 |
| 2.5.1. DNA ve Nükleik asitlere etkileri                   | 16 |
| 2.5.2. Proteinlere etkileri                               | 17 |
| 2.5.3. Karbonhidratlara etkileri                          | 17 |
| 2.5.4. Lipidlere etkileri                                 | 18 |
| 2.6. Antioksidan Sistem                                   | 19 |
| 2.7. Antioksidan Çeşitleri                                | 20 |
| 2.7.1. Endojen Antioksidanlar                             | 20 |
| 2.7.1.1 Enzimatik Endojen Antioksidanlar                  | 20 |
| 2.7.2. Eksojen antioksidanlar                             | 25 |
| 2.7.2.1. Vitamin Olarak Kullanılan Eksojen Antioksidanlar | 25 |
| 2.7.2.2. İlaç Olarak Kullanılan Eksojen Antioksidanlar    | 27 |
| 2.7.2.3. Gıdalardaki Eksojen Antioksidanlar               | 27 |
| 2.8. Antioksidan Aktivitesi Tayin Metodları               | 27 |
| 2.8.1. HAT-temelli metodlar                               | 28 |
| 2.8.2. ET-temelli metodlar                                | 29 |
| 2.8.3. Lipid oksidasyon markerlarını ölçen metodlar       | 30 |
| 2.8.4. Diğer ROS giderici kapasiteleri ölçen metodlar     | 31 |
| 2.9. Çalışmada Kullanılan Bitkiler ve Özellikleri         | 33 |
| 2.9.1. Reyhan ( <i>Ocimum basilicum</i> L.)               | 33 |
| 2.9.2. Çıbrıka ( <i>Satureja hortensis</i> L.)            | 34 |

|                                                                                     |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3. MATERYAL VE METOD</b>                                                         | <b>36</b> |
| <b>3.1. Materyal</b>                                                                | <b>36</b> |
| 3.1.1. Bitki Örnekleri                                                              | 36        |
| 3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Cihazlar                                                | 36        |
| 3.1.3. Kullanılan Kimyasal Çözeltiler                                               | 36        |
| <b>3.2. Metod</b>                                                                   | <b>39</b> |
| 3.2.1. Ekstraktların Hazırlanışı                                                    | 39        |
| 3.2.2. Toplam Fenolik Madde Tayini                                                  | 39        |
| 3.2.3. Toplam Flavonoid İçeriğinin Tayini                                           | 40        |
| 3.2.4. Ferrik Tiyosiyanat Metoduna Göre Toplam Antioksidan Aktivite Tayini          | 40        |
| 3.2.5. Toplam Ferrik İyonlarını ( $\text{Fe}^{+3}$ ) İndirgeme Kapasitesinin Tayini | 41        |
| 3.2.6. Ferröz ( $\text{Fe}^{+2}$ ) Metal İyonları Şelatlama Aktivitesi Tayini       | 42        |
| 3.2.7. $\text{H}_2\text{O}_2$ Giderme Aktivitesinin Tayini                          | 42        |
| 3.2.8. DPPH• Serbest Radikalleri Giderme (Antiradikal) Aktivitesinin Tayini         | 43        |
| 3.2.9. Süperoksit Anyon Radikali Giderme Aktivitesi Tayini                          | 43        |
| 3.2.10. İstatistik Analizler                                                        | 44        |
| <b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI</b>                                                       | <b>45</b> |
| 4.1. Toplam Fenolik Maddeler                                                        | 45        |
| 4.2. Toplam Flavonoid içeriği                                                       | 49        |

|                                                                |        |
|----------------------------------------------------------------|--------|
| 4.3. Linoleik asit emülsiyonunda toplam antioksidan aktivitesi | 53     |
| 4.4. İndirgeme potansiyeli                                     | 55     |
| 4.5. Metal Şelatlama Aktivitesi                                | 57     |
| 4.6. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> giderme aktivitesi          | 58     |
| 4.7. Antiradikal aktivitesi                                    | 60     |
| 4.8. Süperoksit radikali giderme aktivitesi                    | 61     |
| <br>5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA                                    | <br>63 |
| <br>6. KAYNAKLAR                                               | <br>72 |
| <br>TEŞEKKÜR                                                   | <br>85 |
| <br>ÖZGEÇMİŞ                                                   | <br>86 |

## TABLolar DİZİNİ

|                                                                                         | Sayfa No |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| 2.1. Reaktif Oksijen Türleri                                                            | 6        |
| 2.2. Reaktif Oksijen Ürünlerinin Tahmini Yarı Ömürleri                                  | 6        |
| 2.3. Reaktif azot türleri                                                               | 6        |
| 2.4. Çalışmada Kullanılan Bitkiler                                                      | 32       |
| 4.1. Reyhan ( <i>O. basilicum</i> L.)'dan mg/g Ekstrakte Edilen Bileşiklerin Verimleri  | 45       |
| 4.2. Çıbrıka ( <i>S. hortensis</i> L.)'dan mg/g Ekstrakte Edilen Bileşiklerin Verimleri | 45       |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                       | Sayfa No |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| 2.1. Solunumsal Patlama Sırasında Serbest Radikal Oluşumu                                             | 14       |
| 2.2. Serbest Radikallerin Hücredeki Başlıca Zararlı Etkileri                                          | 16       |
| 2.3. Reyhan ( <i>Ocimum basilicum</i> L.) Bitkisi                                                     | 33       |
| 2.4. Çıbrıka ( <i>Satureja hortensis</i> L.) Bitkisi                                                  | 34       |
| 4.1. Toplam Fenolik Bileşik Miktarı Tayini İçin Kateşol İle Hazırlanan Standart Grafiği               | 46       |
| 4.2. Toplam Fenolik Bileşik Miktarı Tayini İçin Gallik Asit İle Hazırlanan Standart Grafiği           | 47       |
| 4. 3. Reyhan ( <i>O. basilicum</i> L.) Bitkisinin Kateşol Eşdeğeri Olan Fenolik Madde İçerikleri      | 47       |
| 4. 4. Çıbrıka ( <i>S. hortensis</i> L.) Bitkisinin Kateşol Eşdeğeri Olan Fenolik Madde İçerikleri     | 48       |
| 4. 5. Reyhan ( <i>O. basilicum</i> L.) Bitkisinin Gallik Asit Eşdeğeri Olan Fenolik Madde İçerikleri  | 48       |
| 4. 6. Çıbrıka ( <i>S. hortensis</i> L.) Bitkisinin Gallik Asit Eşdeğeri Olan Fenolik Madde İçerikleri | 49       |
| 4. 7. Toplam Flavonoit İçeriğinin Tayini İçin Kateşol İle Hazırlanan Standart Grafiği                 | 50       |

|        |                                                                                                                                                                                                   |    |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4. 8.  | Toplam Flavonoit İçeriğinin Tayini İçin Gallik Asit İle Hazırlanan Standart Grafiği                                                                                                               | 50 |
| 4. 9.  | Reyhan ( <i>O. basilicum</i> L.) Bitkisinin Kateşol Eşdeğeri Olan Flavonoit Madde İçerikleri                                                                                                      | 51 |
| 4. 10. | Çıbrıka ( <i>S. hortensis</i> L.) Bitkisinin Kateşol Eşdeğeri Olan Flavonoit Madde İçerikleri                                                                                                     | 51 |
| 4. 11. | Reyhan ( <i>O. basilicum</i> L.) Bitkisinin Gallik Asit Eşdeğeri Olan Flavonoit Madde İçerikleri                                                                                                  | 52 |
| 4. 12. | Çıbrıka ( <i>S. hortensis</i> L.) Bitkisinin Gallik Asit Eşdeğeri Olan Flavonoit Madde İçerikleri                                                                                                 | 52 |
| 4. 13. | Linoleik Asit Peroksidasyonunda Reyhan ( <i>O. basilicum</i> L.) Ekstraktlarının Etkisi                                                                                                           | 53 |
| 4. 14. | Linoleik Asit Peroksidasyonunda Çıbrıka ( <i>S. hortensis</i> L.) Ekstraktlarının Etkisi                                                                                                          | 54 |
| 4. 15. | Reyhan ( <i>O. basilicum</i> L.) Bitkisinin Su, Etanol ve Aseton Ekstrelerinin 60 µg/mL Konsantrasyonunda Lipit Peroksidasyonunu İnhibe Yüzdelerinin Standart Antioksidanlarla Karşılaştırılması  | 54 |
| 4. 16. | Çıbrıka ( <i>S. hortensis</i> L.) Bitkisinin Su, Etanol ve Aseton Ekstrelerinin 60 µg/mL Konsantrasyonunda Lipit Peroksidasyonunu İnhibe Yüzdelerinin Standart Antioksidanlarla Karşılaştırılması | 55 |



|                                                                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4. 17. Reyhan ( <i>O. basilicum</i> L.) Bitkisinin Su, Etanol ve Aseton Ekstraktlarının<br>Fe <sup>+3</sup> ,ü Fe <sup>+2</sup> ,ye İndirgeme Kapasitesi  | 56 |
| 4. 18. Çıbrıka ( <i>S. hortensis</i> L.) Bitkisinin Su, Etanol ve Aseton Ekstraktlarının<br>Fe <sup>+3</sup> ,ü Fe <sup>+2</sup> ,ye İndirgeme Kapasitesi | 56 |
| 4. 19. Reyhan ( <i>O. basilicum</i> L.) Ekstraktlarının Metal Şelatlama Kapasitesi                                                                        | 57 |
| 4. 20. Çıbrıka ( <i>S. hortensis</i> L.) Ekstraktlarının Metal Şelatlama Kapasitesi                                                                       | 58 |
| 4. 21. Reyhan ( <i>O. basilicum</i> L.) Ekstraktlarının H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Giderme Aktivitesi                                                  | 58 |
| 4. 22. Çıbrıka ( <i>S. hortensis</i> L.) Ekstraktlarının H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Giderme Aktivitesi                                                 | 59 |
| 4. 23. Reyhan ( <i>O. basilicum</i> L.) Ekstraktlarının DPPH Radikali Giderme Aktivitesi                                                                  | 60 |
| 4. 24. Çıbrıka ( <i>S. hortensis</i> L.) Ekstraktlarının DPPH Radikali Giderme Aktivitesi                                                                 | 60 |
| 4. 25. Reyhan ( <i>O. basilicum</i> L.) Bitkisinin Su, Etanol ve Aseton Ekstraktlarının<br>Süperoksit Radikalini Giderme Aktivitesi                       | 61 |
| 4. 26. Çıbrıka ( <i>S. hortensis</i> L.) Bitkisinin Su, Etanol ve Aseton Ekstraktlarının<br>Süperoksit Radikalini Giderme Aktivitesi                      | 62 |
| 5. 1. Reyhan ( <i>O. basilicum</i> L.) ve Çıbrıka ( <i>S. hortensis</i> L.)'in İçerdiği<br>Bileşikler                                                     | 64 |

## ÖZET

Bu çalışmada, reyhan (*Ocimum basilicum* L.) ve çıbrıka (*Satureja hortensis* L.)'nın antioksidan aktiviteleri çeşitli yöntemler kullanılarak incelendi. Bu amaçla, kurutulup toz haline getirildikten sonra çözücü olarak su, etanol ve aseton kullanılarak ekstraksiyonları yapıldı. Bütün ekstraktların antioksidan aktiviteleri total antioksidan aktivite içeren farklı antioksidan denemeler, indirgeme potansiyeli, DPPH serbest radikal giderme, süperoksit anyon radikali giderme, metal şelatlama aktivitesi, toplam flavonoid içeriği, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> giderme aktivitesi ve toplam fenolik içeriği belirlendi. Sonuçlar standart olarak gallik asit, kateşol, askorbik asit,  $\alpha$ - tokoferol, BHA ve BHT ile karşılaştırıldı.

Her iki bitkinin ekstrakte edilebilen bileşenleri 36.14-207.78 mg/g kurutulmuş bitki materyali aralığında belirlendi. Ekstraksiyonlar su, etanol ve aseton çözücülerini ile yürütüldü. En yüksek ekstraksiyon verimi su ekstraktlarında gözlemlendi.

Her iki ekstraktın antioksidan aktivitesi linoleik asit emülsiyonu ile belirlendi. Reyhan ve çıbrıkanın bütün ekstraktlarında yüksek antioksidan aktivite gözlemlendi.

Her iki ekstraktın indirgeme kapasiteleri incelendi, yüksek ve etkili aktivitelere sahip oldukları bulundu. Çıbrıkanın indirgeme kapasitesi reyhandan daha yüksek bulundu.

Serbest radikal giderme aktivitesi denemesi çıbrıkanın etanol ekstraktının aktivitesinin reyhan ekstraktlarından daha yüksek olduğunu gösterdi. Reyhanın etanol ekstraktı diğerlerinden daha yüksek serbest radikal giderme aktivitesi gösterdi. Çıbrıkanın etanol ekstraktının aktivitesi de diğerlerinden daha yüksekti.

Süperoksit anyonu giderme aktivitesinin ölçümü için oksijen radikali PMS/NADH/O<sub>2</sub> sistemi tarafından oluşturuldu ve ekstraktların oksijen aktivitesi giderme yetenekleri belirlendi. Çıbrıkanın su ekstraktlarındaki aktivitenin diğerlerinden daha yüksek olduğu gözlemlendi. Reyhanın etanol ekstraktı diğerlerinden daha yüksek süperoksit anyonu radikali giderme aktivitesi gösterdi.

Reyhan ve çıbrıkanın metal şelatlama etkisi denemesi gerçekleştirildi. Çıbrıkanın su ekstraktı reyhanın su ekstraktından daha yüksek metal şelatlama aktivitesi gösterdi.

Toplam flavonoid içerikleri, toplam fenolik madde tayini gibi belirlendi. Ekstraktların 20-100  $\mu$ g/mL konsantrasyonları gallik asit ve kateşol eşdeğeri olarak belirlendi. Toplam flavonoid madde denemesinde ekstraktların toplam flavonoid madde miktarları gallik asit

eşdeğeri olarak 65.7-102.3 mg/g, kateşol eşdeğeri olarak 24.2-45.5 mg/g olarak belirlendi. Çıbrıka ekstraktlarında daha yüksek miktarlar bulundu.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> giderme aktivitesi denemesinde ekstraktların giderme aktiviteleri belirlendi ve reyhan ve çıbrıkanın aseton ekstraktlarının diğer ekstraktlardan daha yüksek giderme aktivitesi gösterdikleri gözlemlendi.

Toplam fenolik madde denemesinde ekstraktların toplam fenolik madde miktarlarının galik asit eşdeğeri olarak 66-200 mg/g, kateşol eşdeğeri olarak 50-183 mg/g olduğu belirlendi. En yüksek miktarlar çıbrıka ekstraktlarında bulundu.

**Anahtar kelimeler:** Reyhan (*Ocimum basilicum* L.), çıbrıka (*Satureja hortensis* L.), antioksidan aktivitesi, giderme aktivitesi, flavonoid içeriği, toplam fenol.

## ABSTRACT

In the present study, the antioxidant activities of purple basil (*Ocimum basilicum* L.) and cibrika (*Satureja hortensis* L.) were investigated by using various methods. For this purpose, after the plants were dried and ground to fine powder, their extractions were done by using water, ethanol and acetone as solvent. The antioxidant activities of all extracts were examined in the different antioxidant assays including total antioxidant activity, reductive potential, DPPH free radical scavenging, superoxide anion radical scavenging, metal chelating activity, total flavonoid content,  $H_2O_2$  scavenging activity and total phenolic content. The results were compared to those of gallic acid, catechol,  $\alpha$ -tocopherol, ascorbic acid, BHA and BHT as standard.

The extractable compound of both plants were determined in the range of 36.14-207.78 mg/g dried plant at the end of the extractions carried out by water, ethanol and acetone as solvent. The best extraction yield was observed in water extracts.

Total antioxidant activities of both extracts were determined by using linoleic acid emulsion. It was observed that all of extracts of purple basil and cibrika have high antioxidant activity.

The reductive capabilities of both extracts were investigated, it was found that they have high and effective activities. The reducing capacity of cibrika determined higher than purple basil.

Assay of the free radical scavenging activity was shown that activity of the ethanol extract of cibrika has higher than purple basil extracts. The ethanol extract of purple basil showed the higher free radical scavenging activity than the others. The activity of ethanol extract of cibrika was higher, too.

For measurement of superoxide anion scavenging activity, oxygen radical was generated by PMS/NADH/ $O_2$  system, and the abilities of all extracts to scavenge oxygen activity were determined. It was observed the activity in the water extracts of cibrika was higher than others. The ethanol extract of purple basil showed the higher superoxide anion scavenging activity than the others.

Metal chelating effect of purple basil and cibrika assayed. The water extracts of cibrika showed the higher metal chelating activity than water extract of purple basil.



## VIII

Determination of total flavonoid contents were determined as total phenolic compound assay. 20-100 µg/mL concentrations of extracts were determined as gallic acid equivalent and catechol equivalent. In the total flavonoid compound assay, total flavonoid compound amounts of extracts were determined to be 65.7-102.3 mg/g as gallic acid equivalent; 24.2-45.5 mg/g as catechol equivalent. The highest amounts were found in the cibrika extracts.

In the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging activity assay, the scavenging activities of extracts determined and, it was observed that the acetone extracts of cibrika and purple basil showed the higher scavenging activity than the other extracts.

In the total phenolic compound assay, total phenolic compound amounts of extracts were determined to be 66-200 mg/g as gallic acid equivalent; 50-183 mg/g as catechol equivalent. The highest amounts were found in the cibrika extracts.

**Key words:** Reyhan (*Ocimum basilicum* L.), çibrika (*Satureja hortensis* L.), antioxidant activity, scavenging activity, flavonoid content, total phenol.

## KISALTMALAR

|                 |                                              |
|-----------------|----------------------------------------------|
| ATP             | Adenozin tri fosfat                          |
| ADP             | Adenozin di fosfat                           |
| BHA             | Bütillendirilmiş hidroksianisol              |
| BHT             | Bütillendirilmiş hidroksitoluen              |
| CAT             | Katalaz                                      |
| COX             | Siklooksijenaz                               |
| ÇS              | Çıbrıka su ekstraktı                         |
| ÇE              | Çıbrıka etanol ekstraktı                     |
| ÇA              | Çıbrıka aseton ekstraktı                     |
| DNA             | Deoksiribo nükleik asit                      |
| $^1\Delta gO_2$ | Singlet oksijenin delta formu                |
| DPPH            | 1,1-Difenil-2-pikril hidrazil                |
| DPPH•           | 1,1-Difenil-2-pikril hidrazil radikali       |
| DPPH-H          | İndirgenmiş 1,1-Difenil-2-pikril hidrazil    |
| EC-SOD          | Ekstraselluler süperoksit dismutaz           |
| EPO             | Eritropoietin ( Hemopoietik büyüme faktörü ) |
| FCR             | Folin-Ciocalteu reaktifi                     |
| FRAP            | Demir ( III ) iyonu indirgeme gücü           |
| FTC             | Ferrik tiyosiyanat                           |
| g               | Gram                                         |
| GAE             | Gallik asit ekivalent                        |
| G-SH            | Glutasyon                                    |
| GSH-Px          | Glutasyon peroksidaz                         |
| GSH-Red         | Glutasyon redüktaz                           |
| GSSG            | Okside glutasyon                             |
| GST             | Glutasyon-S-transferaz                       |
| Hb              | Hemoglobin                                   |

|                         |                                               |
|-------------------------|-----------------------------------------------|
| HOX                     | Hipohaloz asit                                |
| HNE                     | 4-hidroksinonenal                             |
| L                       | Litre                                         |
| LOOH                    | Lipid hidroperoksit                           |
| LPO                     | Lipid peroksidasyonu                          |
| mg                      | Miligram                                      |
| mL                      | Mililitre                                     |
| $\mu\text{g}$           | Mikrogram                                     |
| M                       | Molarite                                      |
| MDA                     | Malondialdehit                                |
| NAD                     | Nikotinamid adenin dinükleotid                |
| $\text{NAD}^+$          | Yükseltgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid  |
| NADH                    | İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid    |
| NBT                     | Nitro blue tetrazolium                        |
| $\text{NBT}^{+2}$       | Yükseltgenmiş nitroblue tetrazolium           |
| $\text{NO}^{\bullet}$   | Nitrik oksit radikali                         |
| PG                      | Propil gallat                                 |
| PLGPx                   | Fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz |
| PMS                     | Fenazin metasülfat                            |
| RS                      | Reyhan su ekstraktı                           |
| RE                      | Reyhan etanol ekstraktı                       |
| RA                      | Reyhan aseton ekstraktı                       |
| ROT                     | Reaktif oksijen türleri                       |
| $\text{ROO}^{\bullet}$  | Peroksil radikali                             |
| $\text{RO}^{\bullet}$   | Alkoksil radikali                             |
| RNA                     | Ribonükleik asit                              |
| R-NH-X                  | N-Halojenli aminler                           |
| $\text{ONOO}^{\bullet}$ | Peroksinitrit                                 |
| $\text{O}_2^{\bullet-}$ | Süperoksit radikali                           |

|                       |                               |
|-----------------------|-------------------------------|
| $^1\text{O}_2$        | Singlet oksijen               |
| $\text{OH}^\bullet$   | Hidroksil radikali            |
| U                     | Ünite                         |
| UV                    | Ultraviyole ışınlar           |
| sn                    | Saniye                        |
| SOD                   | Süperoksit dismutaz           |
| $1\Sigma+\text{gO}_2$ | Singlet oksijenin sigma formu |
| -SH                   | Sülfidril                     |
| TCA                   | Trikloraasetik asit           |
| yy                    | Yüzyıl                        |
| SD                    | Standart sapma                |



## 1. GİRİŞ

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

Serbest radikaller reaktif yapıları nedeniyle hücrelerde ve dokularda pek çok zarara yol açarlar. Oksijenli yaşamla birlikte oksijen kaynaklı radikaller oluşumu artmış ve oksidatif hasarı engelleyici antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir. Sağlıklı kişilerde serbest radikaller ile antioksidan savunma sistemi arasında bir denge vardır. Radikal üretiminin aşırı artması ve antioksidanların azalması oksidatif strese neden olur. Son yıllardaki araştırmalara göre; serbest radikallerin inflamasyon, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, kanser, diyabet, gut, böbrek hastalıkları, solunum sistemi hastalıkları, sindirim sistemi hastalıkları gibi hastalıklarda rol alır. Serbest radikallerin doğrudan ölçümü için ESR, kemilüminesans ve enzimsel yöntemler kullanılmakta, bu yöntemler deneysel modellerde ve kontrollü sistemlerde iyi sonuç vermektedir. Serbest radikallerin doğrudan ölçümünün zorluğu, araştırmacıları lipid, protein ve nükleik asitlerde oksidatif stresin neden olduğu hasar sonrası ortaya çıkan ürünlerin ölçümüne yöneltmiştir. Antioksidan savunma sisteminin ölçümü için de çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (Deng vd., 2011)

Gıda endüstrisinde gıda ürünlerini oluşturan bileşikler ile havanın oksijenleri arasında kendiliğinden oluşan ve otooksidasyon denilen tepkimeler oluşur. Bu tür tepkimeler gıda ürünlerinde kalite düşmesine neden olur ve istenmeyen olaylardır. Kalitede düşmeye sebep olan renk, koku ve tatta meydana gelen değişimler ile bazı besin öğelerindeki parçalanmalar ve toksik bileşik oluşturma olayıdır. Yağ ve yağlı gıdalardaki otooksidasyon olayı, hem beslenme fizyolojisi açısından hem de teknolojik-ekonomik açıdan büyük önem taşımaktadır. Otooksidasyonun fiziksel ve teknolojik yöntemlerle önlenemediği durumlarda antioksidan ve sinerjistler kullanılmaktadır. Sinerjistler antioksidan etkisini artıran maddelerdir. Antioksidan grubu katkı maddeleri, sanayide bitkisel ve hayvansal yağ içeren maddelerin üretimi, depolanması, taşınması ve pazarlanması sırasında oluşacak otooksidasyondan kaynaklanan zararları önlemede en önemli katkı maddeleridir. Antioksidanlar gıdalarda meydana gelebilecek bozulma ve acımayı da engeller. Yağlarda doğal olarak bazı antioksidanlar bulunduğu gibi, yapay olarak kullanılan antioksidanlarda vardır. Antioksidanlar, diğer stabilizatörler gibi düşük kaliteli gıda maddesinin kalitesini arttırmaz ve gıdalarda herhangi bir yabancı tat ve koku vermez. Antioksidan maddeler, iyi kalitede ham madde, uygun bir imalat tekniği, elverişli ambalajlama ve depolama yöntemleri ile birlikte kullanıldığı ürünün kalitesini korur. Bu maddeler, gıdalardaki oksidasyon sorunlarını da ortadan kaldırır.

Çalışmamızda kullanılan reyhan (*Ocimum basilicum* L.) ve çibrika (*Satureja hortensis* L.) bitkilerinin serbest radikallere karşı çeşitli metodlarla antioksidan aktiviteleri ve bu bitki ekstraktlarının sentetik antioksidanlara alternatif olabilecek doğal antioksidan kaynağı olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Bitkilerin su, etanol ve aseton ekstraktları alınarak, her bir ekstraktın toplam fenolik madde tayini, toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesi,  $Fe^{+3}$  iyonlarını indirgeme potansiyeli, süperoksit radikali giderme aktivitesi, antiradikal aktivitesi,  $H_2O_2$  giderme aktivitesi, toplam antioksidan aktivitesi ve metal iyonlarını şelatlama aktivitesi tayin edilmiştir. Sonuçlar  $\alpha$ -tokoferol, askorbik asit, BHT ve BHA gibi çeşitli standart maddeler ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir.

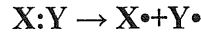
## 2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. SERBEST RADİKALLER

Ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektron içeren atom, atom grubu veya moleküller serbest radikal olarak tanımlanırlar. Serbest radikaller ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktif olup, çevrelerindeki atom ve moleküllere adeta saldırırlar. Çok kısa ömürlü olmalarına karşın, radikal olmayan maddeler ile reaksiyona girip onları da radikal yapmaları ve bir dizi zincir reaksiyonu başlatıp, birçok radikal oluşturmalarından dolayı oldukça tehlikelidirler. Serbest radikaller, ortaklanmamış elektronunun belirtilmesi amacıyla üst kısımlarına yazılan bir nokta ( $X\bullet$ ) ile gösterilirler (Akkuş, 1995; Dikici, 1999). 20.yüzyılın başında depolanan yağların bozulma sebepleri araştırılırken serbest radikal adı verilen bileşiklerin varlığı saptanmıştır. Bu bileşikler organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında oluştuğu gibi, çeşitli dış etkenlerin etkisiyle de meydana gelebilmektedirler. Biyomoleküllerin çoğu, atomları birbirlerine kovalent bağlarla bağlı ve non-radikal yapılardır. Atomlararası kovalent bağlar, elektron çiftlerinin paylaşılmasıyla oluştuğundan serbest radikallerde yarım bağ oluştuğu düşünülebilir. Bu özellik onları kimyasal olarak reaktif yapar (Slater, 1984; Grisham ve Grandner, 1989; Wheeler ve Salzman, 1990; Maxwell, 1995; Fırat, 1997). Radikaller aerobik hücrelerin tüm fraksiyonlarında, metabolizma sırasında veya patolojik durumlarda birer yan ürün olarak meydana gelebilir ve hücrelerde tersinir ya da tersinmez değişikliklere neden olabilirler. Bu değişiklikler oksidasyon, fragmentasyon, köprüleşme (disülfid bağlantısı, protein-protein bağlantısı, protein-lipid bağlantısı), protein sarmalında kesilme, floresans şeklinde olur. Bunun sonucunda ciddi hücre, doku ve organ hasarı meydana gelebilir (Ames ve ark, 1993; Yanbeyi, 1999). Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler. Biyolojik sistemlerde en fazla elektron transferi ile oluşurlar. Her ne kadar serbest radikal reaksiyonları bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofil ve makrofaj gibi hücrelerin savunma mekanizması için gerekli olsa da; serbest radikallerin fazla üretimi doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır. Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, deoksiribonükleik asit (DNA) ve karbonhidratlar gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler ve yapılarının bozulmalarına neden olurlar.

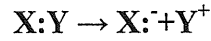
### 1) Kovalent bağın homolitik kırılması ile:

Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık (500-600°C) kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalır ve her iki atom üzerinde de paylaşılmamış elektron kalır. Bir molekülü oluşturan kovalent bağın homolitik yarılması sonucu paylaşılmamış elektronlardan herbirinin ayrı parçada kalması ile serbest radikaller meydana gelmektedir.



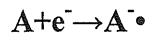
### 2) Bir molekülün elektron kaybetmesi ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi:

Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa radikal formu oluşur. Heterolitik bölünmede kovalent bağ oluşturan her iki elektron atomlardan birisinde kalır.



### 3) Bir molekül yapısına elektron eklenmesi sonucu reaktif özellik taşıyan yapılar oluşmaktadır:

Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşturuluyorsa, bu tür indirgenme radikal oluşumuna neden olabilir.



## 2.2. REAKTİFOKSİJEN TÜRLERİ (ROT)

Canlılar yaşamlarını sürdürebilmek için havanın moleküler oksijenine ( $O_2$ ) ihtiyaç duyarlar. Karbon ve hidrojen zengin besinleri okside ederler (Yanbeyi, 1999). Total oksijen tüketimimizin % 90'ından fazlasından elektron transport zinciri (solunum zinciri), %5-10'undan da diğer oksijen gerektiren reaksiyonlar sorumludur. Elektron transport zincirinde moleküler oksijen, yakıtlardan (glukoz, yağ asidi ve aminoasitlerin karbon iskeleti) türeyen NADH ve  $FADH_2$ 'den elektronları alarak suya indirgenir. Bu yolda oksijen molekülünün kuvvetli oksitleyici gücü, ATP'nin yüksek enerjili fosfat bağı haline dönüştürülür. Moleküler oksijen gerektiren fakat ATP'nin oluşumu reaksiyonuyla eşleşmeyen diğer reaksiyonlar, amino asitlerin katabolizması, ilaçların detoksifikasyonu ve steroid hormonların sentezi gibi spesifik metabolik yollar için önemlidirler. Bu reaksiyonlarda diğer oksidazlar (oksijeni suya veya hidrojen perokside indirgeyen enzimler) ve oksijenazlar (oksijeni okside olan moleküle bağlayan enzimler) görev alırlar. Reaktif oksijen türleri, oksijenin indirgenmesi tepkimeleri ile oluşmaktadır. Biyolojik sistemlerde hücreler, moleküler oksijenin ( $O_2$ ) suya indirgendiği reaksiyonlar zinciri ile adenosin trifosfat (ATP) oluşturmak üzere aerobik olarak enerji üretirler. Sitokrom c oksidazın katalizlediği reaksiyonlar oksijene dört elektronun transferini içerir. Bu yolla moleküler oksijenin % 98'i suya indirgenirken, % 1-2'sinden reaktif oksijen türleri oluşmaktadır. Süperoksit radikali ( $O_2^{\bullet}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikali ( $HO^{\bullet}$ ), 'ROT' sınıflamasına dahildir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşmuş radikallerdir (Cheeseman ve Slater, 1993; Akkuş, 1995). Reaktif oksijen türleri, çeşitli serbest radikallerin oluştuğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli organik radikaller ( $R^{\bullet}$ ), peroksit radikalleri ( $ROO^{\bullet}$ ), alkoksi radikalleri ( $RO^{\bullet}$ ), tiyil radikalleri ( $RS^{\bullet}$ ), sülfenil radikalleri ( $RSO^{\bullet}$ ), tiyil peroksit radikalleri ( $RSO_2^{\bullet}$ ) gibi çeşitli serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar.

Reaktif oksijen türleri serbest radikal olabilir ya da olmayabilir. Örneğin; süperoksit radikali ( $O_2^{\bullet}$ ) bir serbest radikal iken; süperoksit radikalinden spontan olarak ya da süperoksit dismutaz (SOD) enziminin katalizi ile oluşan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) radikal olmayan reaktif oksijen türüdür. Bu durum aynı zamanda serbest radikallerden bir dismutasyon reaksiyonu ile radikal olmayan ürünler oluşabildiği anlamına gelmektedir. Bu reaksiyon kendiliğinden veya enzim katalizi ile oluşabilmektedir. Oksijen radikallerinin etkisiyle ortaya çıkabilecek oksidatif hasarları önlemek amacıyla canlı sistem tarafından gerçekleştirilen pek çok korunma mekanizması vardır.

**Tablo 2.1. Reaktif Oksijen Türleri (Türe, 1998; Yanbeyi, 1999).**

| RADİKALLER                             | RADİKAL OLMAYANLAR               |
|----------------------------------------|----------------------------------|
| Süperoksit radikal ( $O_2^{\bullet}$ ) | Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )   |
| Hidroksil radikal ( $HO^{\bullet}$ )   | Lipid hidroperoksit ( $LOOH$ )   |
| Peroksil radikal ( $ROO^{\bullet}$ )   | Hipohaloit asit ( $HOX$ )        |
| Alkoksil radikal ( $RO^{\bullet}$ )    | N-Halojenli aminler ( $R-NH-X$ ) |
| Semikinon radikal ( $HQ$ )             | Singlet oksijen ( $^1O_2$ )      |
| Hemoproteine bağlı serbest radikaller  | Ozon ( $O_3$ )                   |
|                                        | Azotdioksit ( $NO_2$ )           |

**Tablo 2.2. Reaktif Oksijen Ürünlerinin Tahmini Yarı Ömürleri (Rachmilewitz ve ark., 1994; Dikici, 1999).**

| REAKTİF OKSİJEN ÜRÜNLERİ  |                      | YARI ÖMRÜ ( Saniye )       |
|---------------------------|----------------------|----------------------------|
| Süperoksit anyon radikali | ( $O_2^{\bullet}$ )  | Enzimatik                  |
| Hidrojen peroksit         | ( $H_2O_2$ )         | Enzimatik                  |
| Hidroksil radikali        | ( $HO^{\bullet}$ )   | $10^{-9}$                  |
| Singlet oksijen           | ( $^1O_2$ )          | $10^{-6}$                  |
| Alkoksil radikali         | ( $RO^{\bullet}$ )   | $10^{-6}$                  |
| Peroksil radikali         | ( $ROO^{\bullet}$ )  | 7                          |
| Semikinon radikali        | ( $Q^{\bullet}$ )    | Günler                     |
| Nitrik oksit radikali     | ( $NO^{\bullet}$ )   | 1-10 ( 5,6 ) kalpte 0.1 sn |
| Peroksinitrit             | ( $ONOO^{\bullet}$ ) | 0.05-1                     |

**Tablo 2.3. Reaktif Azot Türleri (Gülçin, 2007).**

| REAKTİF AZOT TÜRÜLERİ             |                                    |
|-----------------------------------|------------------------------------|
| Radikaller                        | Nonradikaller                      |
| Nitrik oksit ( $NO^{\bullet}$ )   | Nitröz asit ( $HNO_2$ )            |
| Azot di oksit ( $NOO^{\bullet}$ ) | Nitrozil katyonu ( $NO^+$ )        |
|                                   | Nitroksi anyonu ( $NO^-$ )         |
|                                   | Diazot tetroksit ( $N_2O_4$ )      |
|                                   | Peroksinitrit ( $ONOO^{\bullet}$ ) |
|                                   | Peroksinitröz asit ( $ONOOH$ )     |
|                                   | Nitronyum katyonu ( $NO_2^+$ )     |
|                                   | Alkilperoksi nitritler ( $ROONO$ ) |



### 2.2.1. SÜPEROKSİT RADİKALİ ( $O_2^{\cdot-}$ )

Moleküler oksijen dış orbitallerinde paylaşılmamış iki elektron içerir. Bu orbitallerin tek elektron alması ile süperoksit anyonu (süperoksit radikali,  $O_2^{\cdot-}$ ), iki elektron alması ile de peroksi anyonu ( $O_2^{2-}$ ) oluşur (Fridovich, 1975; Çakır, 1997). Hem çevresel etkenler, hem de organizmalardaki enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle en çok ve en kolay oluşan oksijen radikali süperoksit radikalidir.



Esas önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Uzun bir yarı ömre sahip olup, lipofilik özellik gösterir. Bu özelliğinden dolayı da oluştuğu yerden uzak bölgelere difüzyonla yayılabilmektedir (Ünal, 1999; Dikici, 1999). Ancak doğrudan doğruya hasar yapıcı etkisi çok fazla değildir. En çok mitokondri, endoplazmik retikulum ve kloroplast gibi hücrel organellerde, elektron transport zincirinin çeşitli komponentlerinden  $O_2$ 'e elektron sızması ile oluşur (Ünal, 1999; Dikici, 1999). İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu sonucu ve çeşitli çevresel etkilerde (fiziksel ve kimyasal) süperoksit radikali meydana getirebilir. Bu reaksiyonlar redoks reaksiyonları olduğu için tersine de dönebilir.

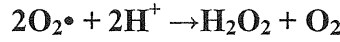


Bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olmasıdır. Süperoksit radikali düşük pH'larda daha reaktif ve etkili bir radikal olan  $HO_2^{\cdot}$  (perhidroksil) radikalini meydana getirir. (Cheeseman ve Slater, 1993; Dikici, 1999).

### 2.2.2. HİDROJEN PEROKSİT ( $H_2O_2$ )

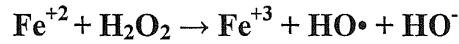
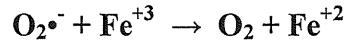
Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksitin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması sonucu oluşan peroksitin iki proton ( $H^+$ ) ile birleşmesi sonucu meydana gelir.





$\text{H}_2\text{O}_2$ , membranlardan geçebilen uzun ömürlü oksidandır. Kendisi bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Geçiş metal iyonları varlığında daha da hızla gerçekleşen bir reaksiyonla süperoksit anyon radikali ile birlikte en reaktif radikal olan hidroksil radikalini oluşturur (Bannister ve ark., 1980; Palmer, 1990; Akkuş, 1995; Gutteridge, 1995; Dikici, 1999).

Haber-Weiss reaksiyonu katalizörlü veya katalizörsüz oluşabilir. Fakat, katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerler. Katalizör olmayınca ortamdaki  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve  $\text{O}_2\bullet$  antioksidanlar tarafından kolayca kaldırılır (Ünal, 1999; Dikici, 1999). Demir gibi geçiş metalleri ile katalizlenen ikinci şekli ise çok hızlıdır (Akkuş, 1995; Fırat, 1997; Yanbeyi, 1999). Bu reaksiyonda önce ferri demir ( $\text{Fe}^{+3}$ ), süperoksit tarafından ferro demire ( $\text{Fe}^{+2}$ ) indirgenir. Sonra bu ferro demir kullanılarak Fenton Reaksiyonu ile hidrojen peroksitten  $\text{HO}^-$  ve  $\text{HO}\bullet$  üretilir (Akkuş, 1995; Bast ve ark., 1997; Fırat, 1997; Yanbeyi, 1999).



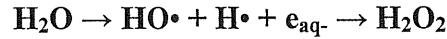
### 2.2.3. HİDROKSİL RADİKALİ ( $\text{HO}\bullet$ )

Hidroksil radikali son derece reaktif bir oksidan radikaldır ve tüm biyolojik moleküllerle reaksiyona girebilir. Hücre içine difüzyon hızı kontrollüdür. Yarılanma ömrü çok kısadır ama yaptığı hasar büyüktür. Hidroksil radikali olasılıkla "ROT" lerin en güçlüsüdür. Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan hidroksil radikali ( $\text{HO}\bullet$ ), su dahil ortamda rastladığı her biyomolekülle difüzyon limiti hızı ile tepkimeye girer. Bu nedenle  $10^9$ - saniyeden daha kısa bir ömre sahiptir. Her tür biyolojik molekül hidroksil radikalının ( $\text{HO}\bullet$ ) bir hedefi ise de, özellikle elektronca zengin bileşikler seçilen tercihlili hedeflerdir. Nükleik asitler, proteinler ve lipidler de başlatılan radikalik tepkimelerde binlerce farklı ara ürünler oluşturabilir. Deoksiribonükleik asit (DNA) ile tepkimesi sonucu baz modifikasyonları, zincir kırılmaları gerçekleşebilir; ileri derecedeki DNA hasarları tamir edilemediğinden hücre ölümüne neden olur. Proteinler üzerinde oluşan oksidasyonlar yapı değişimine neden olacağından proteinler proteolitik



yıkıma götürülür. Hücre zarı su içermediğinden hidroksil radikalının (HO•) başlıca hedefi yağ asitleridir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini arttırıp hücre ölümüne neden olabilir. Bütün bu etkiler ne kadar hidroksil radikali üretildiğine bağlıdır ve gerek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den gerekse de organik peroksitlerden (ROOH), hidroksil radikali (HO•) yapımı ortamdaki serbest metal iyonları tarafından katalizlenir. Metal iyonları varlığında indirgenmiş glutatyon (GSH) ve askorbik asit gibi önemli antioksidanlar da prooksidan gibi davranmaya başlarlar. Özellikle HO• yapımını katalizlemelerindeki etkileri nedeniyle canlılarda metal iyonları radikal hasarlarından birinci derecede sorumludurlar ve bu etkiye sahip olamadıkları formda (esas olarak proteine bağlı) tutulmalıdırlar. Hidroksil radikali, kimyada en aktif radikal olarak bilinir. Bu nedenle in vivo oluşan bir HO• radikali hemen her moleküle saldırır ve oluştuğu yerde de büyük hasara neden olur. Nonradikal biyolojik moleküllerle zincirleme reaksiyonları başlatır (Halliwell, 1987; Cheeseman ve Slater, 1993; Jialal ve Fuller, 1993; Akkuş, 1995; Yanbeyi, 1999).

Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da hidroksil radikali oluşur (Cheeseman ve Slater, 1993; Akkuş, 1995; Fırat, 1997; Dikici, 1999).



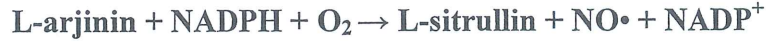
HO• meydana gelebilmesi için O<sub>2</sub><sup>-•</sup> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gereklidir. Bunlarda SOD, CAT veya GSH-Px sistemiyle uzaklaştırılır. Böylece fizyolojik şartlarda fazla miktarlarda HO• oluşamaz. Bu üç enzim intrasellüler major antioksidanlardır (Wheler ve Salzman, 1990; Ames ve ark., 1993; Frei, 1994; Yanbeyi, 1999).

#### 2.2.4. SİNGLET OKSİJEN (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)

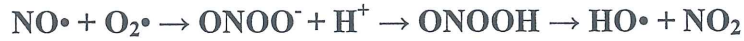
Singlet oksijen, ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Oksijenin yüksek enerjili ve mutajenik formudur (Yanbeyi, 1999). Oksijenin eşleşmemiş elektronlardan birinin verilen enerji sonucu bulunduğu orbitalden başka bir orbitale veya kendi spininin ters yönünde yerdeğiştirmesiyle oluşur (Cross ve Halliwell, 1987; Ames ve ark, 1993; Fırat, 1997; Yanbeyi, 1999; Dikici, 1999).

### 2.2.5. NİTRİK OKSİT (NO•)

NO• enzimatik olarak nitrik oksit sentaz enzimi tarafından L-arjinin'den sentezlenir.



NO• eşleşmemiş elektron bulundurmasına rağmen birçok biyomolekül ile kolayca tepkimeye giremez, öte yandan peroksil, alkil gibi diğer serbest radikallerle kolayca tepkimeye girerek daha az reaktif moleküller oluşturur. Yüksek miktarlarda O<sub>2</sub>• yapımı NO• ile paraleldir ve birbirlerini etkileyerek HO• ve •NO<sub>2</sub> oluşumuna neden olurlar. Tepkime sırasında ise peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>) ve peroksinitröz asit (ONOOH) ara ürünleri oluşur.



NO'nin biyolojik sıvılardaki yarılanma ömrü oldukça kısa olup hemen nitrit ve nitrate dönüşür. Hemen hemen her hücre tarafından üretilir ve her hücre üzerine etkinlik gösterir. Bu nedenle, NO genel aracı bir moleküldür. Diğer serbest oksijen radikalleri her konsantrasyonda zararlı iken, NO düşük konsantrasyonlarda bile bir çok önemli fizyolojik olayların düzenlenmesinde rol oynar. Ancak, uygunsuz yerde ve aşırı miktarda üretildiğinde, bir çok patolojik durumun ortaya çıkmasına neden olur.

Nitrik oksit (NO•) Fe-S proteinlerinden demiri çıkararak yerine kendisi bağlanır, böylece Fenton reaksiyonunu stimüle eder ve bu mekanizma ile karsinogeneziste rol oynar.

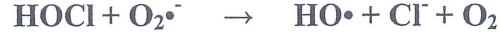
### 2.2.6. HİPOKLORİK ASİT (HClO)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile klorür iyonunun miyeloperoksidaz (MPO) ile katalizlenen tepkimesi sonucunda oluşur.

#### MPO



Hipoklorik asit (HClO) geçiş metallerinin varlığında hidroksil radikali (HO•) oluşturabilir. Elektron vericisi olan indirgeyiciler ile HClO'nun reaksiyona girmesi ile yüksek reaktiviteye sahip HO• meydana gelir.



### 2.2.7. HİDROPEROKSİT RADİKALI (HO<sub>2</sub>•)

Süperoksit radikalının protonlanmasıyla oluşur. Süperoksit radikalinden daha güçlü oksidandır. Biyolojik membranları kolay geçebilmesi ve yağ asitleriyle direkt etkileşime girebilmesi önemlidir.



## 2.3. OKSİDATİF STRES

Aerobik (oksijen soluyan) organizmalarda serbest radikal oluşumunu kontrol altında tutmak ve bu moleküllerin zararlı etkilerine engel olmak üzere antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir. Ancak bazı durumlarda mevcut antioksidan savunma sistemi serbest radikallerin etkisini tamamen önleyemez ve oksidatif stres olarak adlandırılan durum ortaya çıkar. Bu durum vücudun paslanması diye de tanımlanabilir.

## 2.4. SERBEST RADİKALLERİN KAYNAKLARI

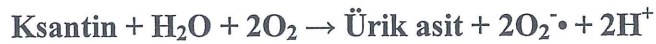
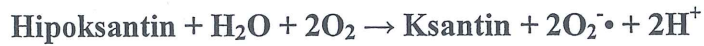
Biyolojik sistemlerde serbest radikal oluşumu, normal metabolik olayların seyri sırasında meydana gelebildiği gibi, organizmada bazı yabancı maddelerin (ksenobiyotikler) metabolize edilmesi sırasında ve organizmanın radyasyon gibi dış etkenlere maruz bırakılmasıyla da meydana gelebilir (Yanbeyi, 1999). Bu nedenle serbest radikal oluşturan mekanizmalar endojen ve ekzojen olarak ikiye ayrılmaktadır (Fırat, 1997; Yanbeyi, 1999).

### 2.4.1. Endojen Serbest Radikal Kaynakları

Normal metabolizma sırasında çeşitli basamaklarda serbest radikal yapısına sahip ara ürünler meydana gelmektedir. Metabolik prosesin ilerleyebilmesi için bu bileşiklerin ara ürün olarak oluşmaları kaçınılmazdır (Freeman ve Crapo, 1982; Fırat, 1997).

**Küçük Moleküllerin Otooksidasyonu:** Nötral ortamda tiyoller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidrobiyopterin gibi pek çok bileşik otooksidasyon ile serbest radikalleri oluşturur (Freeman ve Crapo, 1982; Akkuş, 1995; Marsden ve ark., 1996; Fırat, 1997; Dikici, 1999). Tüm bu bileşikler ile önce  $O_2^{\cdot-}$ , daha sonra  $O_2^{\cdot-}$ 'nin reaksiyonları ile diğer radikaller oluşur (Freeman ve Crapo, 1982; Akkuş, 1995; Marsden ve ark., 1996; Fırat, 1997; Dikici, 1999). Koenzimler, askorbik asitler, tiyoller ve katekolaminler gibi bileşiklerin otooksidasyonu ile süperoksit radikali oluşur.

**Enzimler ve Proteinler:** Birçok enzimin katalitik döngüsü sırasında serbest radikaller ortaya çıkar. Bu enzimlerden biri ksantin oksidazdır. Ksantin oksidaz, aldehit oksidaz ve triptofan dioksijenaz böyle enzimlerden olup,  $O_2^{\cdot-}$  oluşumuna neden olurlar (Akkuş, 1995; Dikici, 1999). Ksantin oksidaz normalde NAD-bağımlı dehidrogenaz olarak etki eder ve herhangi bir serbest radikal üretimine sebep olmaz. Fakat, in vivo olarak oluşturulan iskemi, enzimin dehidrogenaz formundan oksidaz formuna dönüşmesine ve süperoksit radikalının üretimine sebep olur. Ksantin oksidaz enzimi oksijen varlığında hipoksantini ksantine veya ksantini ürik asite oksitler. Bu reaksiyonda elektron alıcısı moleküler oksijendir (Southorn ve Powis, 1988; Fırat, 1997).



**Mitokondriyal Elektron Transferi:** Normalde hücrelerde en büyük serbest oksijen radikali kaynağı mitokondriyal elektron transport zincirinden sızıntıdır. Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgendiği zaman mitokondriyal süperoksit radikal üretimi artar. Mitokondriyal solunum zinciri sırasında NADH,  $\text{FADH}_2$  gibi indirgeyicilerin elektronlarının moleküler oksijene aktarılması sırasında, solunum zinciri taşıyıcılarının indirgenmesi sonucu serbest radikal yapısına sahip ürünler oluşmaktadır (Freeman ve Crapo, 1982; Grisham ve Granger, 1989; Basage, 1990; Fırat, 1997).

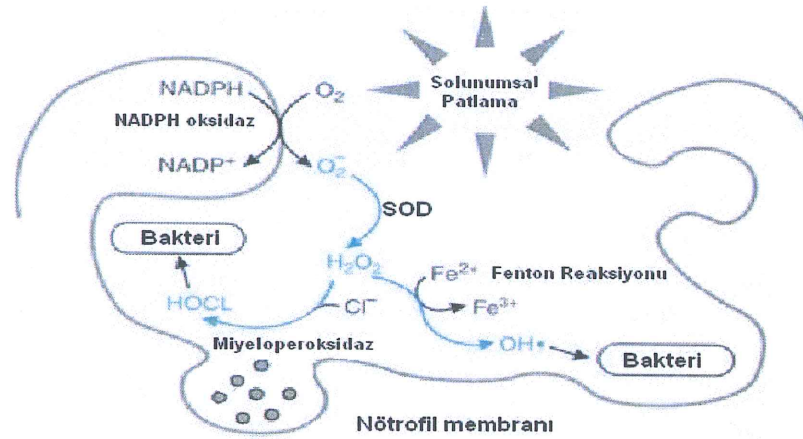


**Mikromozal Membran Elektron Transferi Zincirleri:** Endoplazmik retikulum ve golgi kompleksinin yer aldığı mikrozomal membran sistemi, iki elektron transport sistemini içerir (Freemean ve Crapo, 1982; Fırat, 1997). Mikrozomlarda yer alan bu elektron transport sistemleri, bir yandan normal metabolizma sonucu oluşan nonpolar bileşikleri hidroksillenmiş türevlerine dönüştürüp bunlara daha polar özellik kazandırırken, diğer yandan organizmaya yabancı maddeleri de metabolize ederler (Grisham ve Granger, 1989; Fırat, 1997). Elektron transport sistemlerinin aktivitesi sırasında sadece oksijen türevi radikaller meydana gelirken, ksenobiyotiklerin metabolizması sırasında ek olarak yüksek toksisiteye sahip karbon merkezli radikaller de meydana gelebilir (Cheeseman ve Slater, 1993; Fırat, 1997). Nükleer membran kaynaklı radikaller özellikle DNA hasarına neden olabilirler (Halliwell, 1987; Akkuş, 1995; Maxwell, 1995; Yanbeyi, 1999).

**Peroxisomlar:** Çok önemli hücre içi hidrojen peroksit kaynağıdır. Bu organeldeki D-aminoasid oksidaz, ürat oksidaz, L-hidroksilizin oksidaz ve yağ asidi açıl-CoA oksidaz gibi oksidazlar  $O_2^{\cdot-}$  üretmeden, bol miktarda  $H_2O_2$  üretimine sebep olurlar. Ancak CAT aktivitesi çok yüksek olduğu için bu organelden sitozole ne kadar  $H_2O_2$  geçtiği bilinmemektedir (Freemean ve Crapo, 1982; Akkuş, 1995; Fırat, 1997; Dikici, 1999).

**Plazma Membranı:** Mikrozomal ve plazma membranı tarafından radikal üretiminin önemli enzimleri olan lipoksijenaz ve siklooksijenaz (araşidonik asit metabolizması) aktivitesi, serbest radikaller için önemli bir kaynaktır (Akkuş, 1995; Freeman ve Crapo, 1982; Huysal, 1999).

**Solunumsal patlama:** Aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller ve eozinofillerde fagositik solunumsal patlama sırasında çeşitli serbest radikaller oluşur. Solunumsal patlama sırasında elektron vericisi olarak NADPH kullanılır ve moleküler oksijenin ( $O_2$ ) süperoksit radikaline ( $O_2^{\bullet-}$ ) indirgenmesi sonucu  $NADP^+$  üretimi artar ve heksoz monofosfat yolu aktive olur. Heksoz monofosfat yolunun aktivasyonuna neden olan  $NADP^+$  'nin diğer kaynağı  $H_2O_2$ 'in detoksifikasyonundan sorumlu olan glutatyon peroksidaz-glutatyon redüktaz sistemidir. Nötrofiller ve monositlerin primer lizozomal granüllerinde Fe-hem içeren myeloperoksidaz (MPO) enzimi bulunur. MPO, hidrojen peroksit varlığında klorür, iyodür ve bromürün oksidasyonunu katalizleyerek hipoklorik asit (HClO), hipoiyodik asit (HIO) ve hipobromik asit (HBrO) oluşturur.



**Şekil 2.1. Solunumsal Patlama Sırasında Serbest Radikal Oluşumu**

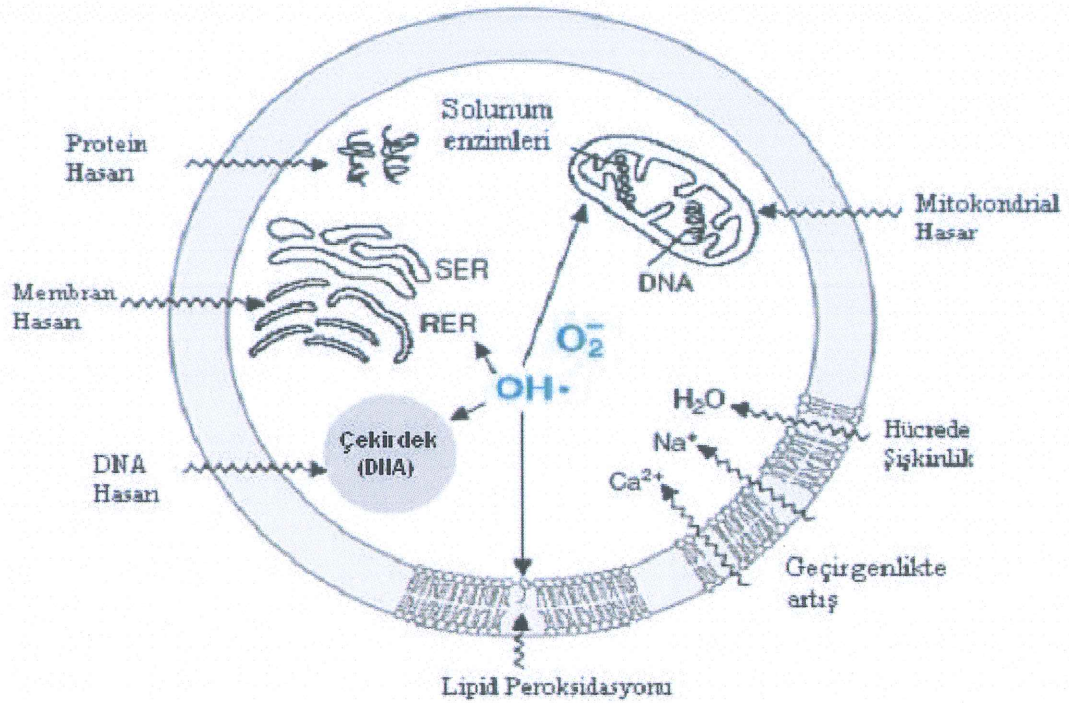
#### 2.4.2. Eksojen Serbest Radikal Kaynakları

Organizmanın doğasından kaynaklanmayan, sadece dış etkenlerin varlığında oluşan reaksiyonlar sonucunda da serbest radikaller açığa çıkabilir. Bunlar şu şekilde sıralanabilir:

- Antineoplastik ajanlar: Antikarsinojen bir ajan olan doxorubicin hücrenin DNA replikasyonu inhibe eder. Bu sırada  $H_2O_2$  ve  $O_2^{\bullet-}$  oluşumuna ve sonuçta lipid peroksidasyonunun başlamasına yol açar.
- Radyasyon ve çevresel ajanlar (hava kirliliği, pestisidler, sigara dumanı, çözücüler, anestezikler, aromatik hidrokarbonlar) serbest radikal oluşumuna neden olmaktadır.
- Alışkanlık yapan maddeler: Alkol ve uyuşturucular.
- Çevresel ajanlar: Ksenobiyotikler (Hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler, hiperoksi, pestisitler, sigara dumanı, solventler, anestezik maddeler, aromatik hidrokarbonlar)
- Stres: Streste katekolamin düzeyi artar. Katekolaminlerin oksidasyonu ise serbest radikal kaynağıdır (Guemouri ve ark., 1991; Akkuş, 1995; Yanbeyi, 1999). Sinirsel uyarılar katekolaminlerin sentezinde artış yapar (Murray vd., 1996).

#### 2.5. SERBEST RADİKALLERİN ETKİLERİ

Serbest radikaller vücutta antioksidan savunma mekanizmasının kapasitesini aştıkları zaman çeşitli bozukluklara yol açarlar. Karbonhidrat, lipid, protein ve DNA gibi biyomoleküllerin tüm sınıfları ve tüm hücre komponentleri ile etkileşme özelliği göstererek hücrede yapısal ve metabolik değişikliklere neden olurlar (Cheeseman ve Slater, 1993; Akkuş, 1995; Gutteridge, 1995; Yanbeyi, 1997; Dikici, 1999).



Şekil 2.2. Serbest Radikallerin Hücredeki Başlıca Zararlı Etkileri (Yanbeyi, 1999).

### 2.5.1. DNA VE NÜKLEİK ASİTLERE ETKİLERİ

İyonize edici radyasyona bağlı hücre ölümünün başlıca nedeni nükleik asitlerin reaktif oksijen türleri ile reaksiyonudur. Reaktif oksijen türleri DNA çift sarmalının ayrılmasına veya nükleik asit baz değişimlerine neden olabilir. Bu da kromozal mutasyonlar ve sitotoksosite ile sonuçlanır (Halliwell, 1984; Ames ve ark., 1993; Frei, 1994; Halliwell, 1994; Yanbeyi, 1990).

Serbest radikaller deoksiribonükleik asiti (DNA) etkileyerek hücrede mutasyonlara ve ölüme yol açarlar. Hidroksil gibi serbest radikal bileşikler DNA bazları üzerine de geri-dönüşümsüz değişikliklere sebep olurlar. Bunlardan en önemlileri timin ile hidroksil radikalının oluşturduğu ürün olan timin glikol ve guanin ile hidroksil radikalının oluşturduğu ürün olan 8-hidroksil guanindir (Halliwell, 1987; Oğuz, 1990; Ames ve ark., 1993; Halliwell, 1994; Akkuş, 1995; Taşdemir, 1997; Yanbeyi, 1999).



### 2.5.2. PROTEİNLERE ETKİLERİ

Serbest radikaller proteinler üzerine olan hasar yapıcı etkilerini proteinlerde serbest radikal birikimi yaparak gösterir. Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikaller ile reaktivitesi yüksek olduğunda fenilalanin, tirozin, triptofan, histidin, metiyonin gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenir. Bunun sonucunda özellikle sülfür ve karbon merkezli radikaller meydana gelir. Bu reaksiyon sonucu albümin ve immünglobulin gibi fazla sayıda disülfid bağ bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozulur ve normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerde fragmentasyon ve çapraz bağlanmalar meydana gelebilir. Bunlar da protein fonksiyonlarında bozulmalara yol açabileceği gibi, immun sistemi uyarabilecek antijenik değişiklikler de oluşturabilirler.

Proteinler serbest radikallere karşı lipidlerden daha az hassastır. Etkilenme dereceleri içerdikleri aminoasit kompozisyonuna bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür içeren amino asitlerden (triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin, sistein gibi) meydana gelmiş proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenir. Karbon merkezli radikaller ve sülfür radikalleri meydana gelir.

### 2.5.3. KARBONHİDRATLARA ETKİLERİ

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Glukoz, mannoz ve deoksi şekerler fizyolojik şartlarda otooksidasyona uğrayarak, süperoksit ve hidrojen peroksiti meydana getirirler. Monosakkaritlerin otooksidasyonunun, protein çapraz bağlanmalarına yol açarak agrega olmalarına sebep olduğu gibi bazal membran kalınlaşmasına ve sonuçta katarakt, mikroanjiopati gelişimine de sebep oldukları ileri sürülmektedir (Yanbeyi, 1999).

Serbest radikaller, bu kabil etkilerinden dolayı çok çeşitli hastalıkların patogenezinde önemli rol oynarlar. Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının gelişimi, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, romatoid artrit, behçet hastalığı, çeşitli deri, kas ve göz hastalıkları, kanser ve yaşlılık gibi birçok hastalıkta serbest radikal üretiminin arttığı ve antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir (Ames ve ark., 1993; Halliwell, 1994; Maxwell, 1995; Yanbeyi, 1999).

#### 2.5.4. LİPİDLERE ETKİLERİ

Membran lipidleri oksidanların en önemli hedeflerindendir. Hücre membranı serbest radikaller için kritik bir bariyerdir, çünkü serbest radikaller hücre komponentleri ile etkileşim için bu bariyeri geçmek zorundadırlar. Membran lipid peroksidasyonu sonucu membran bütünlüğü bozulması ile membran proteinleri, reseptörleri ve ayrıca bunlara bağlanan enzimler inaktive olurlar. Lipid peroksidasyonu, yağların özellikle poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif oksijen bağımlı yıkımı olarak tarif edilir ve dallanan bir zincir reaksiyonudur. Olayda genelde bir enzim varlığı gerekli olmamasına rağmen demir, bakır gibi metaller tarafından katalizlenir. Lipid peroksidasyonun en önemli ürünü malondialdehid (MDA)'dır. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda MDA meydana gelir. Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alış-verişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA ölçümü ile LPO'nun değerlendirilmesi yapılabilmektedir. Lipidlerden, araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine 'enzimatik lipid peroksidasyonu', diğer radikallerin sebep olduğu LPO'na ise 'nonenzimatik lipid peroksidasyonu' adı verilir ( Craig ve ark., 1986; Akkuş, 1995; Gutteridge, 1995; Fırat, 1997; Dikici, 1999; Yanbeyi, 1999 ).

## 2.6. ANTİOKSİDAN SİSTEM

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada koruyucu mekanizmalar vardır. Bu mekanizmalardan bir kısmı serbest radikal oluşumunu, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önler. Reaktif oksijen türlerinin düzeylerini ve bunların meydana getirdiği hasarı sınırlandırmak için vücutta birçok savunma mekanizması gelişmiştir. Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddeler antioksidan savunma sistemleri (antioksidanlar) olarak bilinirler. (Ames ve ark., 1993; Frei, 1994; Akkuş, 1995; Bast ve ark., 1997; Yanbeyi, 1999; Dikici, 1999). Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Antioksidanlar, hem direkt hem de dolaylı olarak ksenobiyotiklerin, ilaçların, karsinojenlerin ve toksik radikal reaksiyonların istenmeyen etkilerine karşı hücreleri koruyan maddelerdir. Kontrol mekanizmasının temel amacı serbest radikallerin aşırı yapılmasını önlemek, aynı zamanda da sağlam olan komşu hücreleri korumaktır. Antioksidanlar endojen ve eksojen kaynaklı antioksidanlar, serbest radikalın meydana gelişini engelleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler, enzim olanlar ve enzim olmayanlar, şeklinde sınıflandırılmaktadır. Antioksidanların etkileri:

- a) Toplayıcı etki: Scavenging (temizleme) etkisi, oksidanları zayıf bir moleküle çevirme şeklinde olan bu etki enzimler tarafından yapılır. Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine "toplayıcı etki" denir.
- b) Bastırıcı etki: Baskılama etkisi, oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme şeklinde olan bu etki vitaminler ve flavonoidler tarafından yapılır. Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya inaktif şekle dönüştüren olaya "bastırıcı etki" denir.
- c) Zincir kırıcı etki: Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleyen ağır metaller şeklinde olan bu etki hemoglobin, seruloplazmin ve E vitamini tarafından yapılır. Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak (hemoglobin gibi) zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye "zincir kırıcı etki" denmektedir.

d) Onarıcı etki: Serbest radikallerin oluşturdıkları hasarın onarılması onarıcı etkidir.

Antioksidanlar, yiyecek katkıları olarak, hücrel komponentler veya plazma bileşenleri olarak çok önemli rol oynamaktadırlar. Çok sayıda yiyecek katkılarının günümüzde koruyucular, antioksidanlar, renk vericiler, tatlandırıcılar, koyulaştırıcı ajanlar, besleyici olmayan şekersiz tatlandırıcılar olarak kullanıldığı açıklanmıştır. Yiyecek katkısı olarak kullanılanların bazılarının yiyeceklerde kullanılmasının yasaklandığı ve bunların mutajenik, karsinojenik ve toksik etkili olduğu belirtilmiştir (Fujise, 1982).

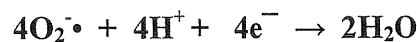
## 2.5. ANTİOKSİDAN ÇEŞİTLERİ

Antioksidanlar, otokside olabilir materyallerin oksidasyon başlangıcını geciktiren veya hızını azaltan maddelerdir. Gerek doğal ve gerekse sentetik yüzlerce bileşiğin antioksidan özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Günümüzde endüstriyel proseslerde gıda maddelerinin depolanma stabilitelerini artırmak için çoğunlukla BHA, BHT ve PG gibi sentetik antioksidanlar kullanılmaktadır. Antioksidan olarak kullanılan kimyasalların toksisiteleri nedeniyle, son yıllarda ilgi doğal antioksidanlar üzerinde yoğunlaşmıştır. Çünkü, doğal antioksidanlar, insanların yüzlerce yıldır tükettikleri veya gıdalara karıştırdıkları katkılardır. Bitkiler (yağlı tohumlar, tahıllar, sebzeler, meyveler, baharatlar ve çay), hayvansal ürünler (peptidler, amino asitler ve karotenoidler), enzimler (glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz) ve bazı mikroorganizmalar en önemli doğal antioksidan kaynaklardır. Bunların antioksidan aktiviteleri C vitamini, fenolik bileşikler, karotenoidler ve E vitamini gibi bileşiklerden kaynaklanmaktadır.

### 2.5.1. Endojen Antioksidanlar

#### 2.5.1.1. Enzimatik Endojen Antioksidanlar

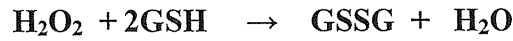
**Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz:** Solunum zincirinin son enzimi olan sitokrom oksidaz, aşağıdaki reaksiyonla süperoksidi detoksifiye eden enzimdir.



Bu reaksiyon, fizyolojik şartlarda sürekli cereyan eden normal bir reaksiyon olup, bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol miktarda enerji üretimi sağlanır (Frei, 1994; Halliwell, 1994; Akkuş, 1995; Smirnov ve Palanca, 1995; Bast ve ark., 1997; Yanbeyi, 1999; Dikici, 1999).

**Glutasyon peroksidaz enzimi (GSH-Px):** Hücrelerde oluşan hidroperoksitlerin uzaklaştırılmasından sorumlu olan bir enzimdir. Molekül ağırlığı ise yaklaşık olarak 85000 Dalton'dur. % 25-40'ı ise mitokondridedir. Enzim aktivitesinin en fazla olduğu dokular ise eritrositler ve karaciğerdir (Fırat, 1997). GSH-Px, intrasellüler mesafede lipidleri peroksidasyondan koruyan en önemli enzimdir. Bu nedenle hücrenin özellikle sitozolik kompartmanında yer alan bu enzim hücrenin yapısını ve fonksiyonunu korur (Neches ve ark., 1968; Mc Cray ve ark., 1976; Beloqui ve Cederbaum, 1986; Michiels ve ark., 1994; Akkuş, 1995; Fırat, 1997; Yanbeyi, 1999). GSH-Px, aşağıdaki reaksiyonları katalizler (Paglia ve Valentine, 1967; Jones ve ark., 1981; Flohe, 1988; Michiels ve ark., 1994; Akkuş, 1995; Fırat, 1997; Dikici, 1999).

#### GSH-Px



#### GSH-Px



**Glutasyon redüktaz enzimi (GSH-RD):** Hidroperoksitlerin redükte olması esnasında meydana gelen okside glutasyon (GSSG), GSSG-R'ın katalizlediği reaksiyonla tekrar redükte hale (GSH) dönüşür. Reaksiyonun gerçekleşmesi için NADPH'a ihtiyaç vardır (Rice-Evans ve ark., 1991; Akkuş, 1995; Dikici, 1999).

#### GSSG-R



**Glutasyon-S-transferaz enzimi (GST):** Selenyuma bağlı olmayan GSH-Px' olarak adlandırılır. Öncelikle araşidonik asit olmak üzere lipid peroksitlerine karşı Se bağımsız GSH peroksidaz gibi aktivite göstererek antioksidan etki gösterir (Mannervik, 1985; Akkuş, 1995; Fırat, 1997; Dikici, 1999; Yanbeyi, 1999).



## GST



**Süperoksit dismutaz enzimi (SOD):** SOD, antioksidan savunmanın ilk basamağı olan süperoksitin  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'e dismutasyonunu katalize eden bir metaloenzimdir. (Mc Cord ve Fridovich, 1969; Fridovich, 1975; Henry ve ark., 1976; Flohe ve Otting, 1984; Gonzales ve ark., 1984; Cerutti ve ark., 1988; Wheeler, 1990; Bast ve ark., 1997; Çakır, 1997).

## SOD



**Katalaz enzimi (CAT):** Katalaz (CAT), tüm hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan dört tane hem grubu içeren bir hemoproteindir. Molekül ağırlığı 248 000 Dalton'dur. Hidrojen peroksidi moleküler oksijen ve suya katalizler (Tudhope, 1967; Palmer, 1990; Akkuş, 1995; Yanbeyi, 1999; Dikici, 1999).

## CAT

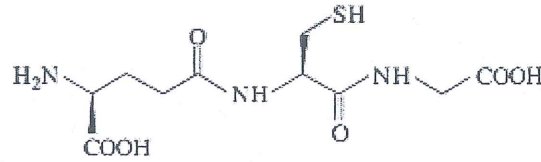


**Eritropoietin (Hemopoietik büyüme faktörü):** Hemopoietik büyüme faktörü eritropoietin (EPO), 165 amino asitten oluşan, molekül ağırlığı yaklaşık 34.000 dalton olan bir glikoproteindir. Eritropoietin, böbrek yetmezliğine bağlı anemi tedavisinde 1986 yılından beri tüm dünyada, yaygın olarak kullanılmaktadır ve son 10 yılda böbrek yetmezliği tedavisinde sağlanan en önemli gelişmedir.

## 2.5.1.2. Nonenzimatik endojen antioksidanlar

- Lipid fazda bulunanlar ( $\alpha$ - tokoferol,  $\beta$ -karoten)
- Sıvı fazda (hücre sitozolünde veya kan plazmasında) bulunanlar.  
(askorbikasıit, ürat, sistein, seruloplazmin, transferin, laktoferrin, miyoglobın, hemoglobın, ferritin, albumin, bilirubin, glutatyon)
- Hem sıvı hem de lipid fazda bulunanlar (melatonin)

**Redükte glutatyon (GSH):** Redükte glutatyon (GSH); glutamik asit, sistein ve glisin içeren bir tripeptit olup, aktif bir sülfidril (-SH) grubuna sahiptir. Vücutta enzimatik olmayan önemli bir antioksidan olan GSH, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur (Beutler ve Duron, 1963; Akkuş, 1995; Fırat, 1997; Dikici, 1999; Yanbeyi, 1999).



### Redükte Glutatyon

**Melatonin:** Hidroksil serbest radikalini ( $\text{HO}\cdot$ ) ortadan kaldırır. En zararlı radikal olan hidroksil radikalini ortadan kaldıran, günümüze kadar bilinen en güçlü antioksidandır. Lipofilik özelliğe sahiptir. DNA hasarını da çok etkili bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. Yaş artımı ile birlikte melatonin üretimi de azalmaktadır. Bu durumun yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı hastalıkların patogenezinde önemli olabileceği düşünülmüştür (Akkuş, 1995; Dikici, 1999). Melatonin epifiz bezinin pineolasit adı verilen hücrelerinden salgılanır. Melatonin, kişiden kişiye değişse de yaklaşık olarak 23:00 ile 05:00 saatleri arasında salgılanan bir hormondur. Hormonun temel görevi vücudun biyolojik saatini koruyup ritmini ayarlamaktır. Bunun haricinde melatoninin güçlü salgılanmasının kansere karşı koruyucu etkisi vardır. Bu nedenle lösemi ve diğer kansere yakalananların kesinlikle karanlık ortamlarda yatırımları istenmektedir.

**Seruloplazmin (CP):** Seruloplazmin total serum bakırının yaklaşık %95'ini içeren  $\alpha_2$  globulindir. Ferro demiri ( $\text{Fe}^{+2}$ ) ferri demire ( $\text{Fe}^{+3}$ ) yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu ve böylece hidroksil radikali oluşumunu inhibe eder.  $\text{Cu}^{+2}$  bağlayıcı bileşiktir.

**Transferrin ve Laktoferrin:** Dolaşımdaki serbest demiri bağlar (Akkuş, 1995; Rice-Evans ve ark., 1991; Dikici, 1999). Transferin kanda demir taşıyan bir  $\beta$ -globindir. Laktoferrin ise dolaşımdaki serbest demiri düşük pH'larda bağlar.



**Hemoglobin:** Hemoglobin eritrositlerin kırmızı rengini sağlayan ve oksijen taşıma yeteneği kazandıran bileşenidir. Protein yapısındaki hemoglobin oksijeni akciğerlerden dokulara, karbondioksiti ise dokulardan akciğerlere taşımaktadır.

**Bilirubin:** Hem proteinlerinin yıkım ürünü olan bilirubin aynı zamanda çok efektif bir lipid antioksidandır. Bilirubinin mikromolar konsantrasyonlarda dahi peroksil radikalini yakaladığı ve zincir kıran antioksidan olarak davrandığı gösterilmiştir (Gutteridge, 1995; Krinsky, 1988; Fırat, 1997) Bilirubin süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır.

**Metiyonin:** Serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur.

**Ürat:** Süperoksit, hidroksil, peroksi radikallerini ve singlet oksijeni temizler. Demir ve bakır iyonlarını bağlayarak etkisizleştirir fakat lipid radikalleri üzerine etkisi yoktur. C vitamini oksidasyonunu da engeller (Akkuş, 1995; Dikici, 1999).

**Albümin:** Plazmanın zincir kırıcı antioksidan aktivitesine yol açan plazma sülfidril gruplarının major komponentidir. Plazmada hipokloröz asitin güçlü bir temizleyicisidir (Halliwell ve Gutteridge, 1990; Avcı, 2001). Albümin LOOH ve HClO toplayıcısıdır. Aynı zamanda  $\text{Cu}^{+2}$  ve hem bağlayıcı bileşiktir.

**Tiyoredoksin sistem:** Tiyoredoksin sistem oksidoredüktaz enzim aktivitesi gösteren tiyoredoksin (Trx) ile tiyoredoksin redüktazı (TrxR) içeren iki antioksidan enzim sistemi içerir. Memeli ve prokaryotik hücrelerde bulunur.

**Ubikinon (Koenzim Q - Q10):** Ubikinon esas olarak mitokondride elektron transport zincirinin bir parçası olarak kullanılmaktadır, bunun yanında ubikinon düşük derişimlerde plazmada ve hücre zarlarında lipit peroksidasyonuna karşı koruyucu antioksidan olarak bulunur.

**Flavonoidler ve Fenolik Bileşikler:** Flavonoidler çeşitli sebze, meyve ve tahıllarda bulunan ve lipidlerde çözünen antioksidan olarak bitkilerdeki kırmızı, mavi ve sarı renk pigmentlerini oluşturan polifenollerdir. Başlıca besinsel kaynakları elma, portakal, limon gibi meyveler ile patates, karnabahar gibi sebzelerdir. Şarap, üzüm suyu ve çay gibi bitkisel kaynaklı içeceklerde de bulunurlar (Dikici, 1999). Doğal olarak bitkilerin gövdelerinde, yapraklarında, kabuklarında, çiçeklerinde ve köklerinde bulunurlar. Flavonoidler, önemli metal şelatörleri ve serbest radikal temizleyicisi gibi rol oynarlar. Flavonoidlerin insan sağlığına bir çok olumlu tesirleri olduğu ve kalp-damar hastalıklarını önleyerek kalp krizi riskini azalttığı yönde etkileri genellikle antioksidan özelliğiyle ilgilidir.

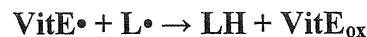
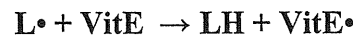
Doğada 400'den fazla flavonoid tanımlanmış olup, halka yapılarına göre; flavonoller, flavonlar, flavanonlar, kateşinler, antosiyanidinler, izoflavonoidler gibi isimler almaktadırlar.

**Selenyum:** İn vitro hayvan deneylerinde Se bileşiklerinin apoptozisi ve transforme hücrelerde hücre siklusunu indirdiği gösterilmiş ve bundan dolayı da kanser hücre gelişimini durduğu ileri sürülmüştür.

## 2.5.2. Eksojen Antioksidanlar

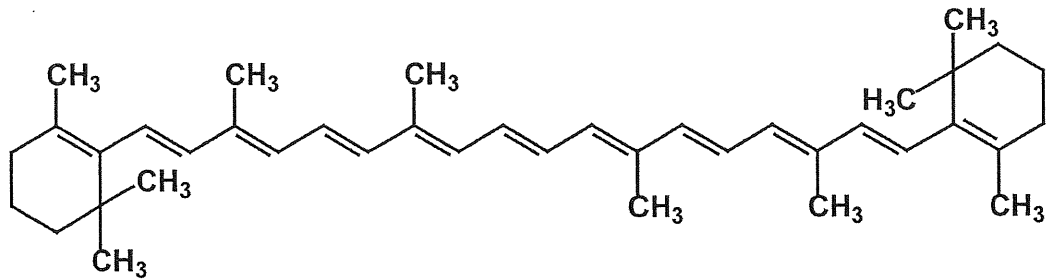
### 2.5.2.1. Vitamin Olarak Kullanılan Eksojen Antioksidanlar

**$\alpha$ -Tokoferol (E vitamini):**  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  olmak üzere dört farklı tokoferol formu bulunur. Tokoferoller, gerek hayvansal ve gerekse bitkisel dokularda yaygın olarak bulunurlar. Vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol) çok güçlü bir antioksidandır, hücre membran fosfolipidlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur. Vitamin E süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksit radikallerini ve diğer radikalleri indirger. Vitamin E zincir kırıcı antioksidan olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonu, vitamin E vasıtasıyla sonlandırılabilir.



Serbest radikallerin kanserin başlamasında rol aldığı ve vitamin E ile diğer antioksidanların antikanserojen etki göstererek kanserin yayılmasını ve tümörün büyümesini önlediği kaydedilmiştir.

**$\beta$ -Karoten (A vitamini):** Alkoller(retinoller), aldehitler(retinaller) ve retinoik asitler başta olmak üzere A vitamininin çeşitli türleri bulunur. A vitamininin en etkili ve en yaygın türü  $\beta$ - karoten'dir.



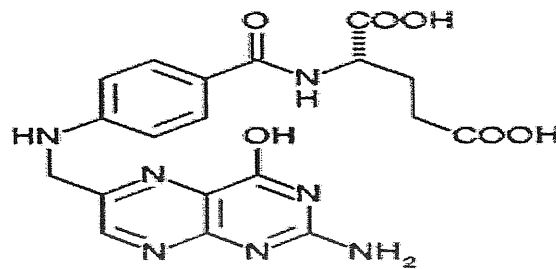
**Beta-Karoten**

Karotenoidler, bir çok meyve ve sebze de bulunan sarı, turuncu ve kırmızı renk veren pigmentlerdir.

**Askorbik asit (C vitamini):** Askorbik asit insan plazmasında ve hücre zarında bulunan, zarı geçebilen major antioksidanlardan biridir. Askorbik asitin antioksidan olarak esas görevi lipit hidroperoksitlerin oluşumunu engellemektir.

Askorbik asit antioksidan etkisinin yanında oksidan etki de gösterir. Askorbik asit proteine bağlı ferri demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan ferri demiri indirgeyerek Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit ile etkileşmeye ve sonunda hidroksil radikali (HO•) oluşturmaya uygun ferro demire dönüştürür.

**Folik asit (Folat):** Doğada en çok yeşil yapraklarda ve karaciğerde bulunur. Folik asit eksikliğinde DNA sentezi bozulur.



***α-Lipoik Asit:*** Bitkilerin çoğunda ve tiroid hariç bütün hayvansal dokularda bulunur. Kükürt içeren, endojen bir antioksidandır. HO● radikali ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i nötralize eder.

#### **2.5.2.2. İlaç Olarak Kullanılan Eksojen Antioksidanlar**

Ksantin oksidaz inhibitörleri, indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid (NADPH) oksidaz inhibitörleri, rekombinant süperoksit dismutaz, Trolox-C (vitamin E analogu), endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-P<sub>x</sub> aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein), nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin), soya fasülyesi inhibitörleri, demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin, seruloplazmin), nötrofil adezyon inhibitörleri, sitokinler (TNF ve IL-1), barbitüratlardır.

#### **2.5.2.3. Gıdalardaki Eksojen Antioksidanlar**

Bütillendirilmiş hidroksitoluen (BHT), bütillendirilmiş hidroksianisol (BHA), sodyum benzoat, etoxyquin, propilgallat, Fe-süperoksit dismutazdır.

### **2.8. ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİ TAYİN METODLARI**

Son zamanlarda toplam antioksidan kapasite veya toplam antioksidan aktiviteyi ölçmek için birkaç metod geliştirilmiştir. Trolox ekivalenti antioksidan kapasite (TEAC), toplam radikal tutma parametresi (TRAP), demir (III) iyonu indirgeme gücü (FRAP) ve oksijen radikalini absorblama kapasitesi (ORAC) bunlardan bazılarıdır. Bu metodlar substrat, prob, reaksiyon şartları ve antioksidan etkinin hesaplanma şekline göre birbirinden farklıdır. Bu yüzden farklı metodlardan alınan sonuçları karşılaştırmak son derece zordur (Frankel ve Meyer, 2000). Bu metodlar kimyasal reaksiyonlarına göre başlıca iki gruba ayrılırlar: Hidrojen atomu transferine (HAT) dayanan metodlar ve bir tek elektron transferine (ET) dayanan metodlar. HAT- ve ET-temelli metodlar örneğin koruyucu antioksidan kapasitesi yerine radikal veya oksidan giderici kapasitesini ölçmeyi hedefler.



### 2.8.1. HAT-temelli metodlar

ORAC, TRAP gibi HAT-temelli metodlarda peroksil radikali ( $\text{ROO}\bullet$ ) üretmek üzere bir radikal başlatıcı kullanılır. Eklenen antioksidan radikaller için ortamdaki substrat ile yarışır.  $\text{ROO}\bullet$  tercihen antioksidandan bir hidrojen atomu alır. Sonuçta  $\text{ROO}\bullet$  ve hedef molekül arasındaki reaksiyon inhibe edilir veya geciktirilir (Ou vd., 2002, Huang vd., 2005).

**ORAC (Oksijen Radikalini Absorblama Kapasitesi) metodu:** Çeşitli ekstraktlar ve fitokimyasalların antioksidan aktivitesini ölçmek için kullanılır. Metodun ilk halinde prob olarak fluoresan bir protein olan  $\beta$ -fikoeritrin ( $\beta$ -PE) ile ve peroksil radikal başlatıcısı olarak AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihidroklorit) bileşiği ile çalışılmıştır. Ancak  $\beta$ -PE'nin fotostabil olmaması, polifenolik maddelerle etkileşimi ve radikal başlatıcı eklenmediğinde bile fluoresansının azalması dezavantajlarıyla karşılaşılmış ve sonraları ORAC metodu, prob olarak  $\beta$ -PE yerine floressein kullanılarak geliştirilmiştir. Floressein (FL, 3',6'-dihidroksispiro [izobenzofuran-1[3H], 9'[9H]-ksanten]-3-on) protein olmayan sentetik bir probdur (Becker vd., 2004). Bu metotta radikal başlatıcı olan AAPH, floressein veya  $\beta$ -PE'nin fluoresansında azalmaya neden olur. Reaksiyon ilerledikçe floressein veya  $\beta$ -PE tüketilir. Antioksidan varlığında AAPH radikalleri giderilir ve fluoresans azalması inhibe edilir (Tomer vd., 2007).

**TRAP (Toplam Radikal Tuzaklayıcı Antioksidan Parametre) metodu:** Plazma ve serumun "total antioksidan kapasitesi"ni ölçmek için geliştirilmiştir. Bu metod plazma antioksidanlarını okside etmek için ABAP (2,2'-azobis(2-amidinopropan)hidroklorit) radikal başlatıcısı tarafından peroksil radikallerinin üretilmesi ve meydana gelen oksidasyon sırasında tüketilen oksijenin ölçülerek izlenmesine dayanır. Daha sonra metod, oksitlenebilir bir lipid substratı olan linoleik asidin eklenmesiyle modifiye edilmiştir (Frankel ve Meyer, 2000). Modifiye metotta  $\text{Cu}^{2+}$  ya da bir azo başlatıcısı ile linoleik asit oksidasyonu yapay olarak indüklenir, otooksidasyonun ilerleyişi linoleik asit oksidasyonundan oluşan konjuge dienperoksitlerin absorbansının takibi ile izlenir (Huang vd., 2005).

**Crocine ağartma metodu:** Crocin doğal bir karotenoid türevidir. Metod serbest radikal başlatıcı AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihidroklorit) tarafından, crocinin ağarmasını önlemede antioksidanların inhibisyon kapasitesini ölçer. Crocin safrandan

elde edilen doğal pigmentler karışımı olduğu için çok fazla çeşitliliğe sahiptir ve karotenoidler gibi diğer gıda pigmentleri aynı dalga boyunda ( $\lambda=450$  nm) ışık absorblar. Bu da crocinin endüstriyel uygulamasını sınırlar (Huang vd., 2005).

### 2.8.2. ET-temelli metodlar

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

**FCR ile toplam fenolik bileşik tayini:** Metod başlangıçta proteinlerde fenol grubu içeren tirozin kalıntısı ile Folin-Ciocalteu ayırıcının (FCR) etkileşiminden dolayı protein analizi için düşünülmüştür. Daha sonraları daha genişletilerek toplam fenol metodu olarak kullanımı artmıştır. FCR  $Cu^{+}$ , C vitamini gibi fenolik olmayan bileşikler tarafından da indirgenebildiği için fenolik bileşiklere spesifik değildir. Ancak fenolik bileşikler sadece bazik şartlar altında (metotta pH:10 için karbonat çözeltisi kullanılır) FCR ile reaksiyon verir. Fenolik antioksidanların varlığında ayıraçtaki Mo(VI)'nın indirgenmesiyle renk sarıdan maviye döner ve 760 nm'de absorbans ölçülür. FCR örneğin indirgeyici kapasitesini ölçen bir metod olduğu için "antioksidan kapasite" ve FCR ile toplam fenol metodu arasında korelasyon bulunur. Basit ve tekrarlanabilir bir metod olduğundan, fenolik antioksidan çalışmalarında rutin olarak kullanılmaktadır (Huang vd., 2005).

**TEAC (Trolox Ekvivalenti Antioksidan Kapasite) metodu:** İlk kez 1993 yılında bildirilen metod daha sonraları geliştirilmiştir. Bu metotta metmiyoglobin/ $H_2O_2$  sisteminin oluşturduğu ferrilmiyoglobin radikali ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzothiazolin-6-sülfonat)) ile etkileşerek  $ABTS^{\bullet+}$  katyonik radikalini üretir. Oluşan  $ABTS^{\bullet+}$  radikalinin antioksidan tarafından giderilmesi 734 nm'de absorbansın azalmasıyla takip edilir (Frankel ve Meyer, 2000). Modifiye metotta ise  $ABTS^{\bullet+}$  radikali, ABTS'nin potasyum persülfat oksidasyonu ile direkt üretilir. Antioksidan kapasite suda çözünen E vitamini analogu olan trolox konsantrasyonu (mM) olarak tayin edilir. TEAC, 1 mM troloxunkile aynı aktiviteyi göstermek için gerekli olan antioksidan konsantrasyonunu ifade eder. Artan kullanımına rağmen bazı sınırlamaları



vardır, en büyük dezavantajı sentetik ABTS $\bullet^+$  radikalinin biyolojik sistemlerde bulunmamasıdır (Becker vd., 2004, Huang vd., 2005).

**FRAP (Fe(III) İyonu İndirgeme Gücü) metodu:** Bu metotta düşük pH'da ferrik tripiridiltiazin kompleksi (Fe $^{3+}$ -TPTZ) antioksidanların etkisiyle ferröz kompleksine (Fe $^{2+}$ -TPTZ) indirgenir. Oluşan kompleksin 593 nm'de absorbanşı ölçülür. Böylece elektron vermenin antioksidanların toplam indirgeme kapasitesiyle lineer olduğu varsayılır. Bu yaklaşımın ana dezavantajı, metod okside olabilen bir substrat içermediğinden antioksidanların koruyucu özellikleri hakkında bilgi sağlamamasıdır (Benzie ve Strain, 1996, Huang vd., 2005).

**DPPH radikali giderme metodu:** 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikali ticari olarak mevcut, stabil radikallerden biridir. Fenolik antioksidanların aktiviteleri üzerinde yapı etkisini çalışmak için kullanılan ilk sentetik antioksidanlardan biridir. Etanoldeki çözeltisi mor renklidir ve 515 nm'de maksimum absorbanş verir. Antioksidan tarafından indirgenince rengi solduğu için reaksiyonun ilerleyişi spektrofotometre ile izlenir. DPPH'in renginin solması antioksidan konsantrasyonu ile orantılıdır. Başlangıçtaki ilk DPPH konsantrasyonunu % 50 azaltmak için gerekli antioksidan miktarı "antiradikal etkinlik"i ifade eder ve EC $_{50}$  (mg/ml) olarak isimlendirilir (Frankel ve Meyer, 2000). EC $_{50}$  değeri antioksidan aktiviteyi ölçmek için daha yaygın olarak kullanılan bir parametredir.

**Oksidan olarak Cu $^{2+}$  kullanan toplam antioksidan potansiyel metodu:** Bu metoda dair az sayıda yayınlanmış bilgi vardır. Örnekte bulunan indirgenler (antioksidanlar) tarafından Cu $^{2+}$  Cu $^+$ 'e indirgenir. Cu $^+$  kromojenik bir reaktif olan batokupronin (2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolin) ile kompleks oluşturur. 490 nm'de maksimum absorbanş ölçülür (Huang vd., 2005).

### 2.8.3. Lipid oksidasyon markerlerini ölçen metodlar

Lipid model sistemlerinde reaktanların kaybı (oksijen, yağ asitleri), serbest radikal oluşumu ve primer ve sekonder oksidasyon ürünlerinin (hidroperoksitler, aldehitler, ketonlar, asitler) oluşumunun tayin edilmesi lipid oksidasyonunda en yaygın kullanılan indikatörlerdir. Peroksit değeri (POV), tiyobarbütirik asit reaktif türlerin (TBARS) tayini ve kısa zincirli yağ asitlerinden kaynaklanan iletkenliğin (Ransimat metodu) ölçümü lipid oksidasyonunun tayininde en sık kullanılan metodlardır. POV tayininde iki farklı metodla lipid peroksitlerin oluşumu izlenir. Metodlardan biri olan

iyodometrik yöntem; oluşan peroksitlerin iyodür (I<sup>-</sup>) ile reaksiyona girerek iyot (I<sub>2</sub>) oluşturmaları ve oluşan iyodun titrimetrik yöntemle tayin edilmesi esasına dayanır. Ferrik tiyosiyanat metodunun esasları ise, oluşan peroksitlerin Fe<sup>2+</sup> iyonlarını Fe<sup>3+</sup>’e yükseltmesi ve ortama eklenen tiyosiyanat ile oluşturulan kompleksin spektrofotometrik olarak tayinine dayanır (Pan vd., 2007). TBARS tayini ile aldehytler, ketonlar, asitler ve hidrokarbonlar gibi sekonder oksidasyon ürünlerinin oluşumu tayin edilir. Sadece lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehite (MDA) spesifik olmayıp, diğer okso bileşiklerini de ölçer (Becker vd., 2004). Ransimat yönteminde antioksidan aktivite yağlarda bulunan doymamış yağ asitlerinin yüksek sıcaklıkta peroksidasyonu sonucu oluşan bozunma ürünlerinin su içine absorbe edilerek, Ransimat cihazı ile suyun iletkenliği tayin edilir (Barrera-Arellano ve Esteves, 1992).

#### 2.8.4. Diğer ROS giderici kapasiteleri ölçen metodlar

İnsan vücudunda oksidatif hasara neden olabilen O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, •OH, <sup>1</sup>O<sub>2</sub> ve ONOO<sup>-</sup> gibi reaktif oksijen türleri olduğu bilinmektedir. O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> SOD enzimi ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalaz enzimi ile zararsız türlere çevrilebilirken •OH, <sup>1</sup>O<sub>2</sub> ve ONOO<sup>-</sup>’i gidermek için enzimatik faaliyet bilinmemektedir. Bu yüzden örneklerin oksidan giderici kapasiteleri değerlendirilirken, metodlar bu reaktif oksijen türlerini de içerecek şekilde düzenlenmelidir. In vitro koşullarda çeşitli radikal üretici sistemler kullanılarak antioksidanların serbest radikal tuzaklama yeteneklerinin ölçümü için bazı metodlar kullanılmaktadır.

**O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> radikali giderme kapasitesi tayini:** NADH/PMS/O<sub>2</sub> sistemi ile (Franke vd., 2004, Gülçin vd., 2003) ve riboflavin/metiyonin sisteminde flavinin fotokimyasal indirgenmesi ile non-enzimatik olarak (Dasgupta ve De, 2007) veya hipoksantin/ksantin oksidaz sistemi ile enzimatik olarak (Wood vd., 2003) süperoksit radikali üretilir. giderme aktivitesi substrat olarak kullanılan NBT’nin indirgenmesiyle tayin edilir. Bu metotta oluşturulan O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> radikalleri sarı renkli NBT<sup>2+</sup>’yi mavi renkli formazan türevine indirger. Ortamda antioksidan bileşik varsa mavi-mor NBT oluşumu inhibe edilir. Ancak NBT’nin direk antioksidan tarafından indirgenmesi de sözkonusudur.

**•OH radikali giderme kapasitesi tayini:** Biyolojik olarak •OH radikali büyük ölçüde Fenton reaksiyonu ile oluştuğu için in vitro koşullarda da Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sistemiyle üretilir ve antioksidanın •OH radikalini giderebilme gücü ölçülür. Ancak pek çok antioksidan aynı zamanda metal şelatörü olduğu için Fe<sup>2+</sup>’nin aktivitesini değiştirebilir.

Bu yüzden değerlendirilen antioksidanın iyi bir metal şelatlayıcı mı veya •OH radikali giderici mi olduğunun kesin anlaşılamaması metodun dezavantajıdır (Becker vd., 2004).

***Peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>) giderici kapasitenin tayini:*** ONOO<sup>-</sup> güçlü bir antioksidan değildir, ancak fizyolojik pH'da protonlanmış hali olan peroksinitröz asit (ONOOH) çok güçlü bir oksidandır. Özellikle protein hasarından sorumlu olduğu düşünülür. ONOO<sup>-</sup> giderici ölçümler genellikle ONOO<sup>-</sup> tarafından tirozinin nitrolanmasının inhibisyonuna dayanır. Nitrozaminlerin HPLC ile ayırımına dayanan ve uzun süren bir metottur (Becker vd., 2004).

## 2.9. ÇALIŞMADA KULLANILAN BİTKİLER VE ÖZELLİKLERİ

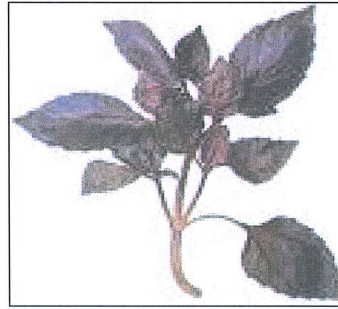
İnsanlığın ilk zamanlarında ortaya çıkan, bitkisel tedaviler gözlemler sonucunda deneyimlerin nesiller boyu kuşaktan kuşağa aktarılmasıyla günümüze kadar gelmiştir.

| TÜRKÇE ADI       | REYHAN                      | ÇİBRİKA                      |
|------------------|-----------------------------|------------------------------|
| LATİNCE ADI      | <i>Ocimum basilicum</i> L.  | <i>Satureja hortensis</i> L. |
| FAMILYASI        | Lamiaceae (Ballıbabagiller) | Lamiaceae (Ballıbabagiller)  |
| KULLANILAN KISIM | Yaprak, Çiçek, Kök          | Yaprak, Çiçek, Kök           |

Tablo 2.4. Çalışmada Kullanılan Bitkiler

*Lamiaceae* familyası; bir ya da çok yıllık, genellikle salgı tüylü ve kokulu, otsu veya çalimsı bitkileri içermektedir. Gövde genellikle dört köşeli, yapraklar stipulasız, basit veya parçalı, karşılıklı çaprazdır. Çiçekler braktelerin koltuğunda yalancı vertisiller halinde, brakteler yapraklara benzer veya onlardan farklıdır. (Davis, 1982).

### 2.9.1. Reyhan (*Ocimum basilicum* L.)



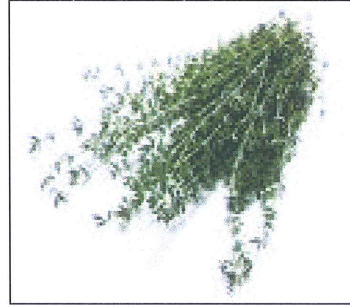
Şekil 2.3. Reyhan (*Ocimum basilicum* L.) Bitkisi

Reyhan (*Ocimum basilicum* L.) türünün yapraklı ve çiçekli dallarıdır. Bu tür 20-40 cm yükseklikte, beyaz veya pembe çiçekli, bir yıllık ve otsu bir bitkidir. Orijininin Hindistan, Afganistan, Pakistan olduğu düşünülmektedir. Günümüzde tüm dünyada kültürü yapılmakta olup, ülkemizde Güney Anadolu'da yetiştirilmektedir. Reyhan, çiçekli ve yapraklı dallardan oluşmaktadır. Yapraklar basit, saplı, 2-6 cm uzunlukta, oval biçiminde, kenarları seyrek dişli, özel kokulu ve baharlı lezzetlidir.



Reyhan öncelikle sindirim sistemini ve sinir sistemini olumlu etkiler; şişkinlik, mide krampı, kolikler ve sindirim problemlerin kullanım alanıdır. Mide bulantısını yatıştırır ve bağırsak parazitlerini öldürebilir. Yatıştırıcı etkisi sayesinde sinirlilik, depresyon, gerginlik ve uykusuzluk durumlarında yardımcı olur. Epilepsi, migren ve boğmacaya karşı da denenmelidir. Geleneksel olarak anne sütünü arttırmada kullanılır. Bitki özsuğu, sinek ve böcek ısırıklarının tedavisinde doğrudan ısırılan bölgeye sürülerek kullanılır. Reyhan ayrıca antibakteriyel özelliğe de sahiptir.

### 2.9.2. Çıbrıka (*Satureja hortensis* L.)



Şekil 2.4. Çıbrıka (*Satureja hortensis* L.) Bitkisi

Çıbrıka (*Satureja hortensis* L.), Lamiaceae (Ballıbabagiller) familyasında olup halk arasında sater, zater, geyik otu, çibriska, çıbrıka gibi isimler kullanılır. Çıbrıkanın kökleri hariç tamamı çay, baharat ve eterik yağ (yağ, esans) elde etmek için kullanılır. Çıbrıkanın 25 türü mevcuttur ve bizi ilgilendiren yazın bir yıllık çıbrıka (*Satureja hortensis* L.) ve kışın çok yıllık çıbrıka (*Satureja montana* L.) türevleridir.

Çıbrıka bitkisinin bileşimindeki maddeler; eterik yağ türevleri % 0.3-2 arasında olup en önemlileri carvacrol % 30, cymol (simol) % 20, cymen (simen), caryophyllen, cadinen, phenol (fenol), borneol, linalool, menton, thymol, dipenten, tanin, acı maddeler, sitosterin ve urolikasit içerir

Yaz çıbrıkası 20-40 cm boyunda çatallaşan gövdesi yeşil veya kırmızımsı yeşil renkte üzeri çok narin tüylerle örtülü ve çok küçük gözeneklere sahiptir. Yaprakları karşılıklı, mızrak şeklinde, kenarları bütün uçlara doğru sivrice, yeşil renkli ve kenarları hafif halkadır. Çiçekleri iki dudaklı, üst dudak iki loplulu migfer gibi, alt dudak üç loplulu, geri kısmı çan şeklinde, ortasından 4-6 adet dölleme tozluğı çıkar ve çiçekler yaprakların sap dibinde çıkar. Halk arasında sindirim rahatsızlıklarında, şişkinlik, ishal ve krampları önleyici, bağırsakları kuvvetlendirici, bronşit ve öksürüğü önleyici özelliklere sahiptir.



### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Bitki örnekleri

Deneylerde kullanılan bitkisel materyallerden; reyhan (*Ocimum basilicum* L.) ve Çıbrıka (*Satureja hortensis* L.) bitkileri Trakya bölgesinin Edirne şehrinde bahçelerde yetişen yerlerden toplanarak elde edildi. Toplanan örneklerin kullanılacak çiçek, yaprak kısımları kök ve saplarından ayıklandıktan sonra küçük parçalara ayırarak oda sıcaklığında ve gölgede kurutuldu. Kurutulan numuneler antioksidan ile ilgili analiz çalışmalarda kullanılmak üzere normal şartlar altında renkli poşetlerde ve karanlıkta saklanarak muhafaza edildi.

##### 3.1.2. Kimyasal maddeler ve cihazlar

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıkta olup, Sigma ve Aldrich'de satın alındı. Çalışmada rondo (Tefal 400W), çalkalamalı su banyosu (Clifton 100-400rpm; termostatl), spektrofotometre (Shimadzu UV-1601), pH-metre (WTW pH 330i), analitik terazi (Gec Avery), vortex (Fisons), evaporatör (Buchi R-200), santrifüj (Nüvefuge CN180), liyofilizatör (Edwards Freze Dryer Modulyo), ısıtıcı ve manyetik karıştırıcı (Chiltern HS31), mikro pipetler, eppendorflar kullanılan başlıca ekipmanlardır.

##### 3.1.3. Kullanılan kimyasal çözeltiler

**% 2'lik  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  Çözeltisi:** 2 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  tartılarak destile su ile balon jodede 100 mL'ye tamamlandı.

**% 5'lik Sodyum Nitrit Çözeltisi:** 2.5 g  $\text{NaNO}_2$  tartılarak balon jodede destile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

**% 10'luk  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  Çözeltisi:** 5 g  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  tartılarak balon jodede destile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

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

**0.2 M Fosfat Tamponu (pH:6.6):**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (24.218 g/L) ve  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( 35.598 g/L ) çözeltilerinin pH: 6.6 olacak şekilde karıştırılması ile hazırlandı.

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

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

**% 0.1'lik  $\text{FeCl}_3$  Çözeltisi:** 0.1 g  $\text{FeCl}_3$  tartılarak destile suda çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

**156  $\mu\text{M}$  NBT Çözeltisi (Nitrotetrazolium blue klorür):** 0.0255 g NBT tartılarak 0.1 M fosfat tamponunda (pH:7.4) çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

**468  $\mu\text{M}$  NADH Çözeltisi (Nikotin amid adenin di nükleotid):** 0.0694 g NADH tartılarak 0.1 M fosfat tamponunda (pH:7.4) çözüldü ve balon jojede 100mL'ye tamamlandı.

**60  $\mu\text{M}$  PMS Çözeltisi (Phenazine metha sülfat):** 0.0018 g PMS tartılarak 0.1 M fosfat tamponunda (pH:7.4) çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

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

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

**40 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  Çözeltisi:** 0.409 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  otomatik pipetle çekilerek balon jojede 100mM fosfat tamponu (pH:7.4) ile 100 mL'ye tamamlandı.

**0.1 M Fosfat Tamponu (pH:7.4):**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (13.609 g/L) ve  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (35.814 g/L) çözeltilerinin pH:7.4 olacak şekilde (yaklaşık 40/150 oranında) karıştırılması ile hazırlandı.

**Linoleik Asit Emülsiyonu:** 175 mg Tween-20 ve 155  $\mu\text{L}$  linoleik asidin fosfat tamponuyla 50 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.

**% 30'luk  $\text{NH}_4\text{SCN}$  Çözeltisi:** 30 g  $\text{NH}_4\text{SCN}$  tartılarak destile suda çözüldü, balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

**20 mM  $\text{FeCl}_2$  Çözeltisi:** 0.2535 g  $\text{FeCl}_2$  tartılarak % 3.5'luk HCl ile balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

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

**% 75'lik Etanol Çözeltisi:** 390.6 mL etil alkol alınarak destile su ile balon jojede 500 mL'ye tamamlandı.

**0.04 M Fosfat Tamponu ( pH:7 ):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( 5.44 g/L ) ve  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (7.12 g/L) çözeltileri pH:7 olacak şekilde karıştırıldı.**

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

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

### 3.2. Metod

#### 3.2.1. Ekstraktların hazırlanışı

Kurutulan bitki örnekleri ev tipi blenderde öğütülerek toz haline getirildikten sonra su, etanol ve aseton çözücülerini kullanılarak ekstraktlar hazırlandı.

Su infüzyonları için 25 gr bitki örneği 400 mL suda 30 dk boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılarak ekstrakte edildi. Elde edilen su ekstraktları süzgeç kağıdında süzüldü ve Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkez'inde liyofilize edildi.

Etanol ve aseton ekstraksiyonu için 25'şer gr bitki örneği 500 mL çözücü eklendikten sonra tekrar aynı çözücüde 200 mL daha eklenerek oda sıcaklığında çalkalamalı su banyosunda 300 rpm de 3 saat inkübe edildi. Süzgeç kağıdından süzüldü, süzüntülerin çözücülerini evaporatörde 40°C' de uçuruldu.

Bitkilerden ekstrakte edilebilen bileşiklerin miktar tayini için liyofilize ve evapore örneklerin tartımı alındı. Analiz edilinceye kadar renkli şişelerde +4 °C'de muhafaza edildi.

#### 3.2.2. Toplam fenolik madde tayini

Reyhan (*O.basilicum* L.) ve çibrika (*S. hortensis* L.) bitkilerinin su, etanol ve aseton ekstraktlarında bulunan toplam fenolik bileşik miktarı Folin-Ciocalteu Yöntemi (FCR) ile belirlendi (Singleton vd., 1999). Standart fenolik bileşik olarak kateşol ve gallik asit kullanıldı. Bunun için önce standart grafikler çizildi.

Bitkilerin 100 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan su, etanol ve aseton ekstraktlarından 1 mL alındı. Destile su ile hacimler 46 mL'ye tamamlandıktan sonra 1 mL folin belirteci eklendi. 3 dk sonra % 2'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisinden 3 mL katılarak oda şartlarında 2 saat çalkalamalı su banyosunda 250 rpm'de tutuldu. Örnek yerine destile su içeren şahit denemeye karşı, 760 nm'de Abs ölçüldü. ( 3 ölçüm alındı )

Standartlar içinde aynı deneme yapıldı. Okunan Abs ile konsantrasyon arasında çizilen grafiklerin denklemlerinden örneklerin toplam fenolik madde miktarları  $\mu\text{g}$  olarak hesaplandı. Standart olarak gallik asit ve kateşol kullanıldı. Standartlar (20-100  $\mu\text{g/ml}$ ) olacak şekilde hazırlandı. Bitkiler için 60  $\mu\text{g/mL}$  kullanıldı.

### 3.2.3. Toplam flavonoid içeriğinin tayini

Reyhan (*O.basilicum* L.) ve çibrika (*S. hortensis* L.) bitkilerinin su, etanol ve aseton ekstraktlarında bulunan toplam flavonoid miktarı Park ve arkadaşlarının yapmış olduğu metoda göre toplam olarak belirlendi (Park vd., 1997). Standart flavonoid bileşik olarak kateşol ve gallik asit kullanıldı. Bunun için önce standart grafikler çizildi.

Bitkilerin 100  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonlarında hazırlanan su, etanol ve aseton ekstraktlarından 10 mL alındı. Üzerine 1 mL % 5'lik sodyum nitrit ilave edilerek 6 dk bekletildi ve flavonoid-alüminyum kompleksi oluşturmak için 1 mL % 10'luk alüminyum nitrat eklendi. 6 dk sonra 10 mL % 4.3'lük NaOH ilave edildi ve toplam hacim destile su ile 25 mL'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında 15 dk sonra, son çözelti iyice karıştırıldı ve 510 nm de şahite karşı absorbans ölçüldü. Örneklerin toplam flavonoid içeriği mg kateşol/g ekstrakt ve mg gallik asit/g ekstrakt olarak tanımlandı.

### 3.2.4. Ferrik tiyosiyanat (FTC) metoduna göre toplam antioksidan aktivite tayini

Toplam antioksidan aktivite tayini ferrik tiyosiyanat metoduna göre belirlendi (Pan vd., 2007; Mitsuda vd., 1966). Bu metotta *in vitro* koşullarda linoleik asit oksidasyonu oluşturulur ve oksidasyon sırasında  $\text{Fe}^{2+}$  iyonları  $\text{Fe}^{3+}$  iyonlarına yükseltgenir. Belirli aralıklarla inkübasyondaki karışımdan örnek alınarak spektrofotometrik ölçüm ile peroksitlerin oluşumu takip edilir. Yüksek absorbans değeri yüksek peroksit konsantrasyonunu ifade eder.



Değişik konsantrasyonlardaki bitki ekstraktları ve standart çözeltilerin 1 mL'sine 1.5 mL fosfat tamponu (0.04 M, pH: 7) ve 2.5 mL linoleik asit emülsiyonu eklendi. Çözeltiler karıştırıldıktan sonra 37 °C'de karanlıkta inkübe edildi. 10 saat'te bir bu çözeltilerden 0.1 mL alınıp üzerine 3.7 mL % 75'lik etilalkol ve 0.1 mL % 30'luk  $\text{NH}_4\text{SCN}$  eklendi. 3 dk sonra reaksiyon karışımlarına 0.1 mL  $\text{FeCl}_2$  (20 mM) çözeltisi eklendi. 5 dk sonra oluşan rengin absorbansı 500 nm'de okundu. Kontrol; 2.5 mL fosfat tamponu (0.04 M, pH:7) ve 2.5 mL linoleik asit emülsiyonu içerir. Standart olarak  $\alpha$ - tokoferol ve askorbik asit kullandı. Linoleik asit peroksidasyonunun % inhibisyonu aşağıdaki formül ile hesaplandı :

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

$A_{\text{kontrol}}$ : Kontrolün absorbansı

$A_{\text{örnek}}$ : Örneğin yada standartların absorbansı

### 3.2.5. Toplam ferrik iyonlarını ( $\text{Fe}^{+3}$ ) indirgeme kapasitesinin tayini

Bitki ekstraktlarının toplam indirgeme kapasitesi tayini Oyaizu metoduna göre yapıldı (Yen ve Chen, 1995; Oyaizu, 1986). Ortamdaki indirgen madde  $\text{Fe}^{3+}$  iyonlarını  $\text{Fe}^{2+}$  iyonlarına indirger ve  $\text{FeCl}_3$  ilavesiyle oluşan Prusya mavisi rengindeki kompleksin absorbansı ölçülür. Yüksek absorbans değeri yüksek indirgeme kapasitesinin göstergesidir.

1 mL örneğe 2.5 mL fosfat tamponu (0.2 M, pH: 6.6) ve 2.5 mL % 1'lik  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  eklendi. Karışım 50 °C'de 20 dk inkübe edildikten sonra 2.5 mL % 10'luk TCA ilave edildi ve 2000 rpm'de 10 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası çözeltinin üst tabakasından 2.5 mL alınarak 2.5 mL destile su ve 0.5 mL % 0.1'lik  $\text{FeCl}_3$  çözeltisi ile karıştırıldı. 700 nm'de absorbans ölçüldü. Bitki örneği 20-100  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonlarında hazırlandı. Standart olarak  $\alpha$ -tokoferol, BHA, BHT ve askorbik asit kullanıldı.

### 3.2.6. Ferroz ( $\text{Fe}^{+2}$ ) metal iyonlarını şelatlama aktivitesinin tayini

Farklı konsantrasyonlardaki (20-100  $\mu\text{g/mL}$ ) bitki ekstraktlarının  $\text{Fe}^{+2}$  iyonlarını şelatlama aktivitesi Dinis ve ark. metoduna göre çalışıldı (Dinis vd., 1994). Metod  $\text{Fe}^{2+}$  iyonlarını bağlamak üzere, güçlü bir demir şelatlayıcı olan ferrozin reaktifi ile ortamda bulunan metal bağlayıcı bileşiklerin yarışmasına dayanır. Şelatlama gücü yüksekse kırmızı renkli  $\text{Fe}^{2+}$ /ferrozin kompleksinin oluşumu engellenir.

0.4 ml bitki örneğine 0.05 mL 2 mM  $\text{FeCl}_2$  çözeltisi eklendi. Reaksiyon 0.2 mL 5 mM ferrozin çözeltisi ilavesiyle başlatıldı. Toplam hacim etil alkolle 4 mL'ye ayarlandı. Sonra karışım vorteksle hızlıca karıştırılıp 10 dk oda sıcaklığında bekletildi. Bu süre sonunda absorbansları 562 nm'de okundu. Kontrol;  $\text{FeCl}_2$  ve ferrozin içeriyor. Standartlar olarak askorbik asit,  $\alpha$ -tokoferol, BHA ve BHT kullanıldı.

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

$A_{\text{kontrol}}$ : Kontrolün absorbansı

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

### 3.2.7. $\text{H}_2\text{O}_2$ giderme aktivitesinin tayini

Bitki ekstraktlarının hidrojen peroksit giderme aktivitesi Ruch ve arkadaşlarının belirledikleri metoda göre yapıldı (Ruch vd., 1989). Bu metodta, reaksiyon ortamına eklenen belirli miktardaki hidrojen peroksit çözeltisinin bitki ekstraktı tarafından yıkılması 230 nm'deki absorbans değişimiyle izlenir.

3.4 mL fosfat tamponu (100 mM, pH: 7.4) ve 0.6 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  çözeltisine (100 mM, pH: 7.4 fosfat tamponunda 40 mM) 1 mL bitki ekstraktı ilave edildi. Absorbans 10 dk sonra 230 nm'de okundu. Kontrol; sadece 4 mL fosfat tamponu (100 mM, pH: 7.4) içermektedir. Bitki örnekleri 20-100  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonlarında hazırlandı. Standartlar olarak aynı konsantrasyonda BHA, BHT ve  $\alpha$ -tokoferol kullanıldı.  $\text{H}_2\text{O}_2$  giderme etkisi (%) - Konsantrasyon ( $\mu\text{g/mL}$ ) arasında grafik çizildi.

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

$A_{\text{kontrol}}$ : Kontrolün absorbansı

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

### 3.2.8. DPPH• serbest radikalleri giderme aktivitesi tayini

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

1mL 0.1mM DPPH (2,2-difenil-1-pikril hidrazil) üzerine farklı konsantrasyonlardaki bitki ekstraktı ve standart çözeltilerden 3 ml eklendi. Vorteksle karıştırıldıktan sonra oda şartlarında karanlıkta 30 dk bekletildi. 517 nm de Abs okundu. Kontrol olarak doğrudan 3 mL etil alkol kullandı. Bitki örnekleri 20-100 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlandı. Standart olarak 20-100 µg/mL konsantrasyonlarında α-tokoferol, BHA, BHT ve askorbik asit kullandı.

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

$A_{\text{kontrol}}$ : Kontrolün absorbansı

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

### 3.2.9. Süperoksit anyon radikalini giderme aktivitesinin tayini

Bitki ekstraktlarının süperoksit anyon radikallerini giderme aktivitesi, nitroblue tetrazolium (NBT) ürünün spektrofotometrik ölçümüyle belirlendi. (Zhishen vd., 1999; Nishimiki vd., 1972). Deney koşullarında NADH/PMS/O<sub>2</sub> sistemi ile üretilen süperoksit radikali sarı renkli NBT'yi mavi-mor renkli formazon türevine indirger. Süperoksit radikali giderme aktivitesi olan bileşikler varlığında düşük absorbans değerleri elde edilir.

1 mL NBT çözeltisi ( 0.1M, pH: 7.4 fosfat tamponunda 156 µM ) ve 1 mL NADH çözeltisi ( 0.1M, pH: 7.4 fosfat tamponunda 468 µM ) ve 1 mL bitki ekstraktı karıştırıldı. Karışıma 100 µL PMS çözeltisi ( 0.1M, pH: 7.4 fosfat tamponunda 60 µM ) ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. Karışım 25 °C'de 5 dk inkübe edildi ve absorbansı 560 nm'de ölçüldü. Kontrol; 1 mL su ile ve 1 mL L-askorbik asit ile yapıldı. Bitki ekstraktları 20-100 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlandı. Standartlar olarak aynı konsantrasyonlarda BHA, BHT ve α-tokoferol kullandı.

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

$A_{\text{kontrol}}$ : Kontrolün absorbansı

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

### 3.2.10. İstatistik analizler

Tüm deneylerde üç paralel ölçüm yapıldı ve standart sapmalar hesaplandı.  
Grafikleri Windows 7 Excell programında yapıldı.



#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Reyhan (*Ocimum basilicum* L.) bitkisinin özüt verimi, su, etanol ve aseton çözücülerini ile yapılan ekstraksiyon verimleri sırasıyla % 185.832, % 48.988 ve % 3.614 olarak elde edildi. En yüksek verim Tablo 4.1'den görüldüğü gibi su çözücüsü ile yapılan ekstraksiyonda gözlemlendi.

| REYHAN               |         |        |        |
|----------------------|---------|--------|--------|
| EKSTRAKT             | SU      | ETANOL | ASETON |
| HAM MADDE (g)        | 25      | 25     | 25     |
| EKSTRAKT VERİMİ (mg) | 185.832 | 48.988 | 36.140 |

**Tablo 4.1. Reyhan (*O.basilicum* L.)'dan mg/g Ekstrakte Edilen Bileşiklerin Verimleri**

Çıbrıka (*Satureja hortensis* L.) bitkisinin özüt verimi, su, etanol ve aseton çözücülerini ile yapılan ekstraksiyon verimleri sırasıyla % 207.776, % 61.556 ve % 5.354 olarak elde edildi. En yüksek verim Tablo 4.2'den görüldüğü üzere su çözücüsü ile yapılan ekstraksiyonda gözlemlendi.

| ÇIBRIKA              |         |        |        |
|----------------------|---------|--------|--------|
| EKSTRAKT             | SU      | ETANOL | ASETON |
| HAM MADDE (g)        | 25      | 25     | 25     |
| EKSTRAKT VERİMİ (mg) | 207.776 | 61.556 | 53.54  |

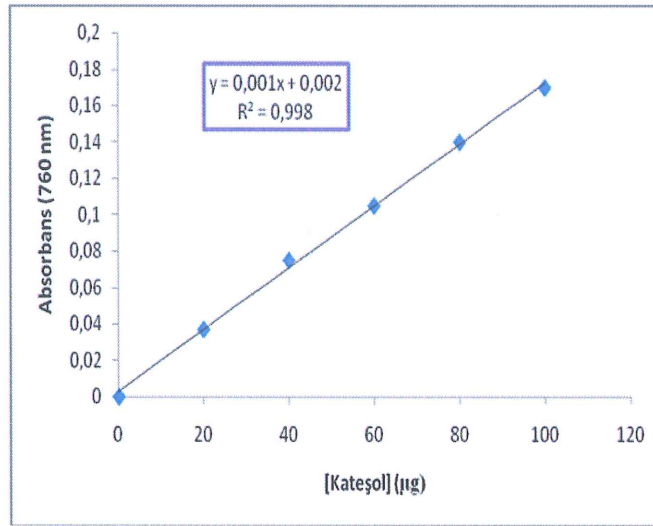
**Tablo 4.2. Çıbrıka (*S. hortensis* L.)'dan mg/g Ekstrakte Edilen Bileşiklerin Verimleri**

##### 4.1. Toplam fenolik maddeler

Reyhan (*Ocimum basilicum* L.) ve Çıbrıka (*Satureja hortensis* L.) bitkilerinin su, etanol ve aseton ekstraktlarındaki toplam çözünebilir fenolik bileşik miktarı Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile tayin edildi. Gallik asit ve kateşol kullanılarak standart grafikler hazırlandı. Bu standart grafikler kullanılarak örneklerin toplam fenolik madde miktarları mg gallik asit (mg GAE/g ekstrakt) ve mg kateşol (mg KE/ g ekstrakt) eşdeğeri şeklinde hesaplandı.

Kateşol standart grafikten elde edilen formülden su, etanol ve aseton ekstrelerde bulunan toplam fenolik bileşik miktarları kateşol ekivalent (KE) olarak hesaplandı ( $R^2$ : 0.998). Bu amaçla hazırlanan standart kateşol grafiği Şekil 4.1’de verilmiştir.

$$\text{Absorbans } (\lambda: 760 \text{ nm}) = 0.001 [\text{Kateşol}] + 0.002$$

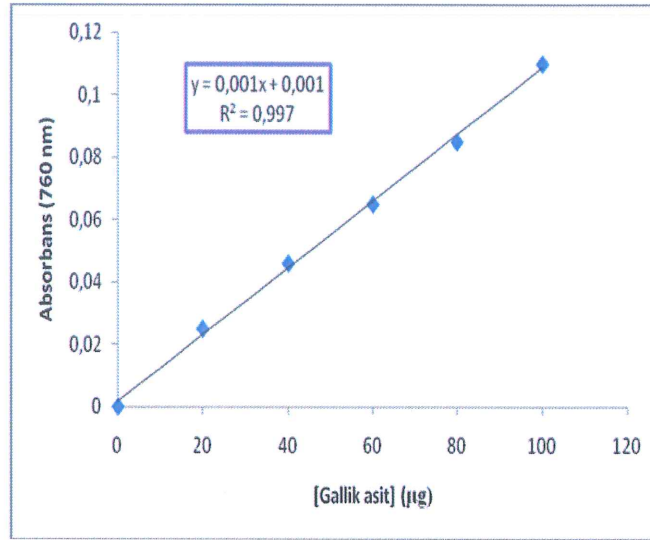


**Şekil 4.1. Toplam Fenolik Bileşik Miktarı Tayini İçin Kateşol İle Hazırlanan Standart grafiği**

Gallik asit standart grafikten elde edilen formülden su, etanol ve aseton ekstrelerde bulunan toplam fenolik bileşik miktarları gallik asit ekivalent (GAE) olarak hesaplandı ( $R^2$ : 0.997). Bu amaçla hazırlanan standart gallik asit grafiği Şekil 4.2’de verilmiştir.

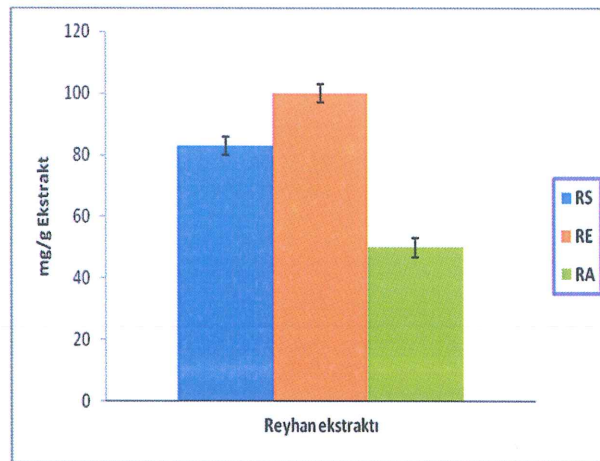
$$\text{Absorbans } (\lambda: 760 \text{ nm}) = 0.001 [\text{Gallik asit}] + 0.001$$





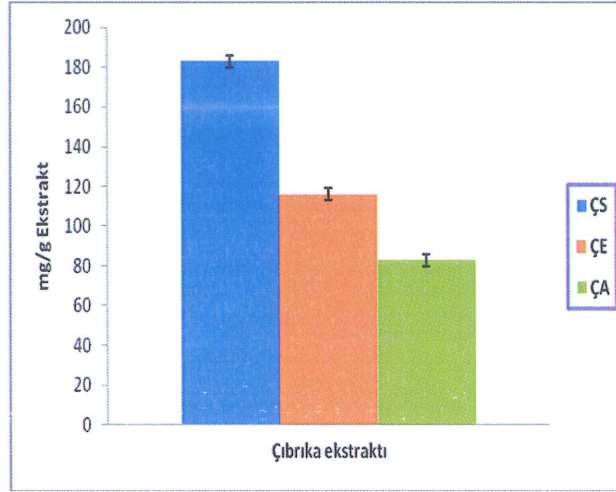
**Şekil 4.2. Toplam Fenolik Bileşik Miktarı Tayini İçin Gallik Asit İle Hazırlanan Standart Grafiği**

Reyhan (*Ocimum basilicum* L.) ve Çıbrıka (*Satureja hortensis* L.) bitkilerinin su, etanol ve aseton ekstraktlarının kateşol ve gallik asit eşdeğeri olan fenolik madde miktarlarına ait değerler Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de verilmiştir. Bu grafiklerden görüldüğü üzere, çalışılan bitkilerin ekstrakte edilebilen toplam fenolik bileşik içerikleri karşılaştırıldığında; çıbrıka (*Satureja hortensis* L.) bitkisinin daha yüksek fenolik madde içerdiği, reyhan (*Ocimum basilicum* L.) bitkisinin ise daha düşük değerlerde fenolik madde içerdiği belirlenmiştir (Şekil 4.3., Şekil 4.4., Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.).



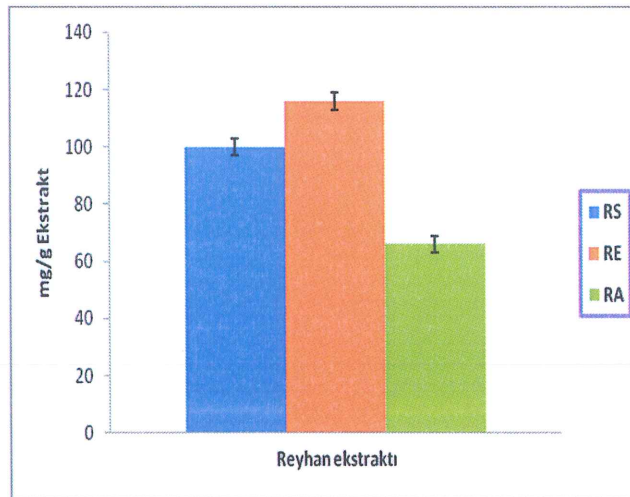
**Şekil 4.3. Reyhan (*O. basilicum* L.) Bitkisinin Kateşol Eşdeğeri Olan Fenolik Madde İçerikleri.**

Reyhan (*O.basilicum* L.)'in kateşol eşdeğeri olarak Şekil 4.3'de görüldüğü gibi su ekstraktının 83 mg/g, etanol ekstraktının 100 mg/g ve aseton ekstraktının 50 mg/g fenolik madde içerdiği belirlendi.



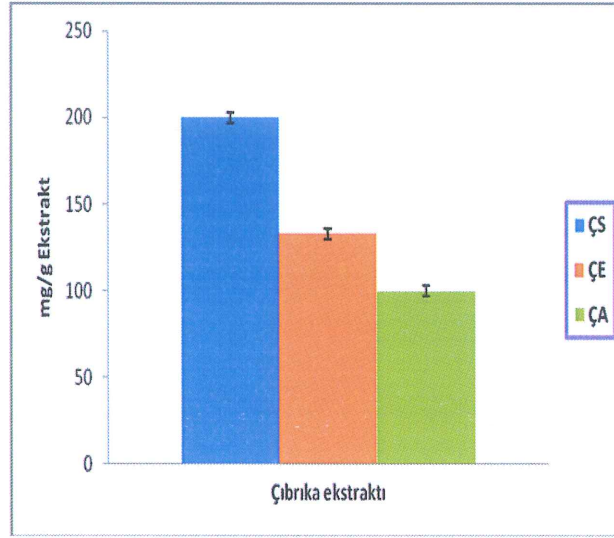
**Şekil 4.4. Çıbrıka (*S. hortensis* L.) Bitkisinin Kateşol Eşdeğeri Olan Fenolik Madde İçerikleri**

Çıbrıka (*S. hortensis* L.) kateşol eşdeğeri olarak Şekil 4.4'de görüldüğü gibi su ekstraktının 183 mg/g, etanol ekstraktının 116 mg/g ve aseton ekstraktının 83 mg/g fenolik madde içerdiği belirlendi.



**Şekil 4.5. Reyhan (*O. basilicum* L.) Bitkisinin Gallik Asit Eşdeğeri Olan Fenolik Madde İçerikleri.**

Reyhan (*O.basilicum* L.) gallik asit eşdeğeri olarak Şekil 4.5’de görüldüğü gibi su ekstraktının 100 mg/g, etanol ekstraktının 116 mg/g, aseton ekstraktının 66 mg/g fenolik madde içerdiği belirlendi.



**Şekil 4.6. Çıbrıka (*S. hortensis* L.) Bitkisinin Gallik Asit Eşdeğeri Olan Fenolik Madde İçerikleri**

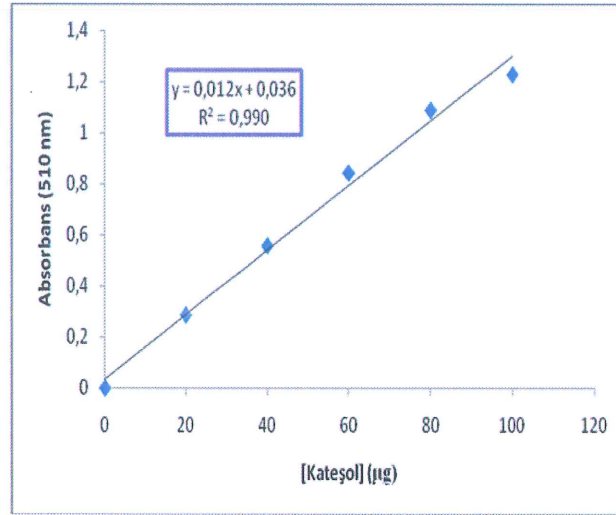
Çıbrıka (*S.hortensis* L.) gallik asit eşdeğeri olarak Şekil 4.6’da görüldüğü gibi su ekstraktının 200 mg/g, etanol ekstraktının 133 mg/g, aseton ekstraktının 100 mg/g fenolik madde içerdiği belirlendi.

#### 4.2.Toplam flavonoid içeriği

Reyhan (*Ocimum basilicum* L.) ve çıbrıka (*Satureja hortensis* L.) bitkilerin su, etanol ve aseton ekstraktlarındaki toplam çözünebilen flavonoid içeriği için kateşol ve gallik asit kullanılarak standart grafikler hazırlandı (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8). Bu standart grafikler kullanılarak örneklerin toplam fenolik madde miktarları mg kateşol (mg KE/g ekstrakt) ve mg gallik asit (mg GAE/ g ekstrakt) eşdeğeri şeklinde hesaplandı.

Kateşol standart grafikten elde edilen formülünden su, etanol ve aseton ekstrelerde bulunan toplam flavonoit bileşik miktarları kateşol ekivalent (KE) olarak hesaplandı ( $R^2$ : 0.990). Bu amaçla hazırlanan standart kateşol grafiği Şekil 4.7’de verilmiştir.

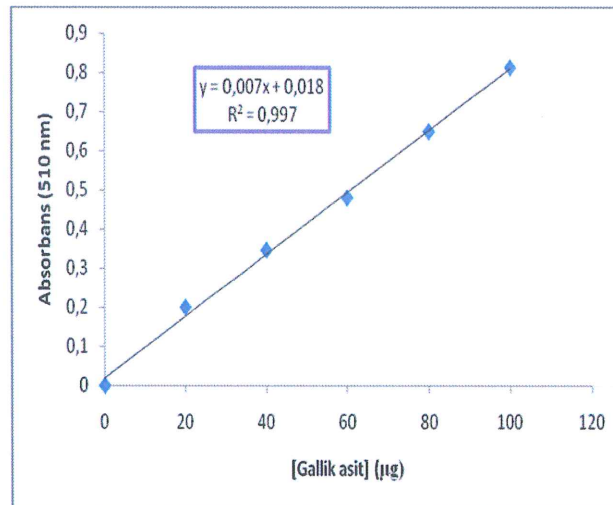
$$\text{Absorbans } (\lambda: 510 \text{ nm}) = 0.012 [\text{Kateşol}] + 0.036$$



**Şekil 4.7. Toplam Flavonoit İçeriğinin Tayini İçin Kateşol İle Hazırlanan Standart Grafiği**

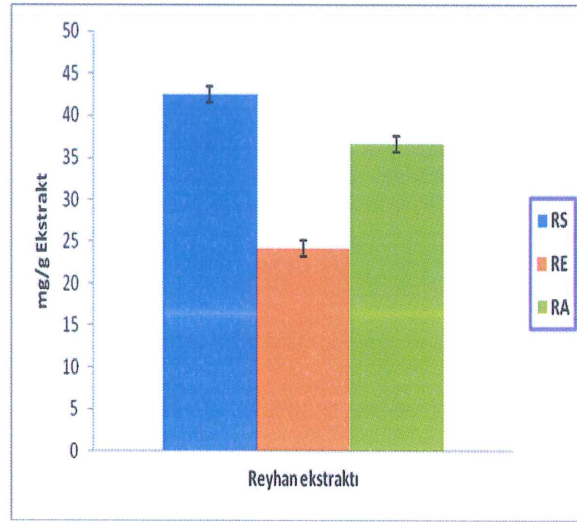
Gallik asit standart grafikten elde edilen formülden su, etanol ve aseton ekstraktlarda bulunan toplam fenolik bileşik miktarları gallik asit ekivalent (GAE) olarak hesaplandı ( $R^2$ : 0.997). Bu amaçla hazırlanan standart gallik asit grafiği Şekil 4.8’de verilmiştir.

$$\text{Absorbans } (\lambda: 510 \text{ nm}) = 0.007 [\text{Gallik asit}] + 0.018$$



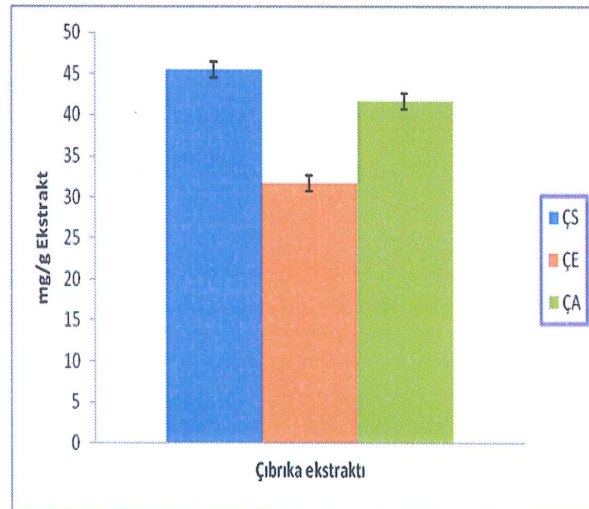
**Şekil 4.8. Toplam Flavonoit İçeriğinin Tayini İçin Gallik asit İle Hazırlanan Standart Grafiği**





**Şekil 4.9. Reyhan (*O. basilicum* L.) Bitkisinin Kateşol Eşdeğeri Olan Flavonoid Madde İçerikleri**

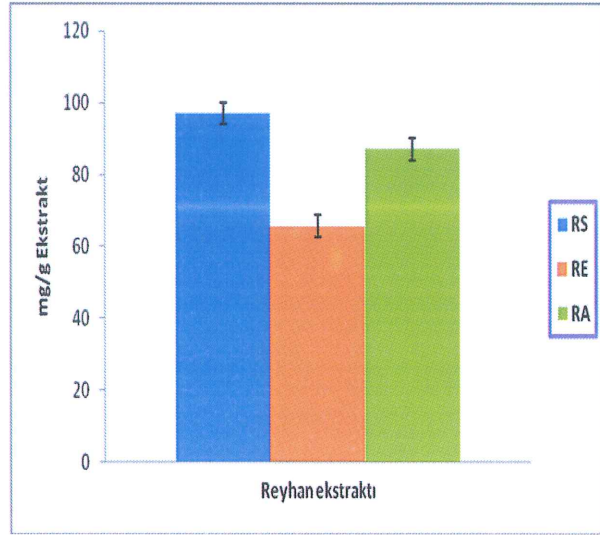
Reyhan (*O. basilicum* L.) kateşol eşdeğeri olarak Şekil 4.9’da görüldüğü gibi su ekstraktının 42.5 mg/g, etanol ekstraktının 24.2 mg/g ve aseton ekstraktının 36.6 mg/g flavonoit madde içerdiği belirlendi.



**Şekil 4.10. Çıbrıka (*S. hortensis* L.) Bitkisinin Kateşol Eşdeğeri Olan Flavonoid Madde İçerikleri**

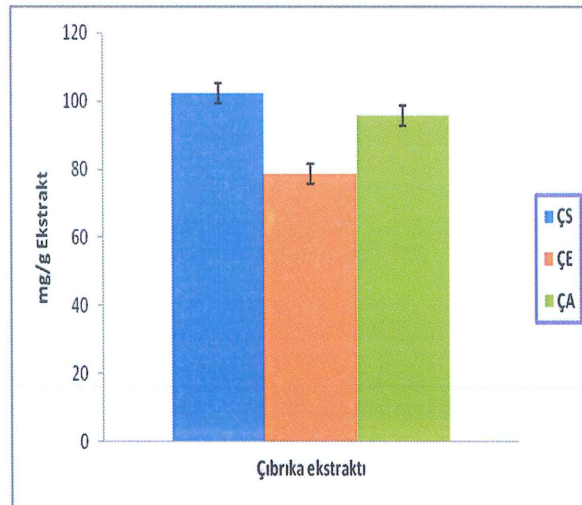
Çıbrıka (*S. hortensis* L.) kateşol eşdeğeri olarak Şekil 4.10’da görüldüğü gibi su ekstraktının 45.5 mg/g, etanol ekstraktının 31.7 mg/g ve aseton ekstraktının 41.7 mg/g flavonoit madde içerdiği belirlendi.





**Şekil 4.11. Reyhan (*O. basilicum* L.) Bitkisinin Gallik Asit Eşdeğeri Olan Flavonoid Madde İçerikleri**

Reyhan (*O. basilicum* L.) gallik asit eşdeğeri olarak Şekil 4.11’de görüldüğü gibi su ekstraktının 97.10 mg/g, etanol ekstraktının 65.70 mg/g ve aseton ekstraktının 87.10 mg/g flavonoit madde içerdiği belirlendi.



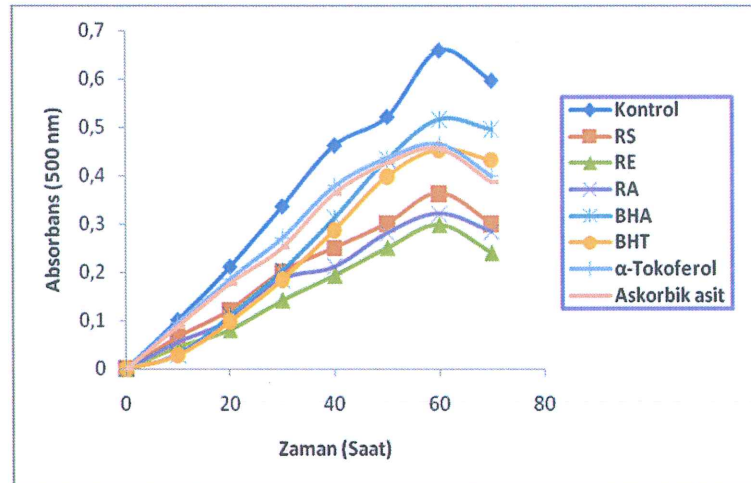
**Şekil 4.12. Çıbrıka (*S. hortensis* L.) Bitkisinin Gallik Asit Eşdeğeri Olan Flavonoid Madde İçerikleri**

Çıbrıka (*S. hortensis* L.) gallik asit eşdeğeri olarak Şekil 4.12’de görüldüğü gibi su ekstraktının 102.3 mg/g, etanol ekstraktının 78.6 mg/g ve aseton ekstraktının 95.7 mg/g flavonoit madde içerdiği belirlendi.

#### 4.3.Linoleik asit emülsiyonunda toplam antioksidan aktivitesi

Bitki ekstraktlarının linoleik asit peroksidasyonu üzerindeki inhibisyon etkileri, 0-100 µg/mL aralığındaki konsantrasyonlarda ferrik tiyosiyanat (FTC) metodu ile ölçüldü ve sonuçlar  $\alpha$ -tokoferol ve askorbik asit inhibisyon oranları ile karşılaştırıldı. İnkübasyon sırasında emülsiyonda oluşan peroksitlerin miktarı, oksidasyonun ilerleyişi sırasında 10 saatte bir ölçüm alınarak 120 saat boyunca takip edildi. Kontrolün absorbansının maksimum olduğu yani lipid peroksidasyonunun en fazla olduğu zaman kadar olan veriler kullanılarak, her bir ekstraktın farklı konsantrasyonları için ve standart maddeler için absorbans-zaman grafikleri çizildi. Grafikler yardımıyla kontrolün maksimum absorbansı ve her bir örneğin maksimum peroksit oksidasyonu anına karşılık gelen absorbansları belirlendi.

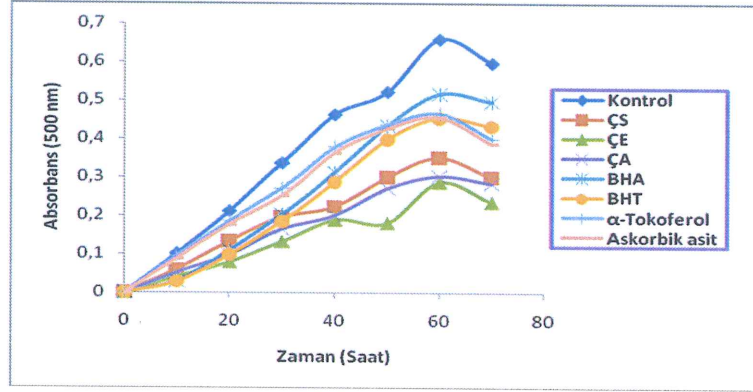
Reyhan (*Ocimum basilicum* L.) ve çıbrıka (*Satureja hortensis* L.) bitkilerinin su-etanol-aseton özütlerinin ve standartların 1 ml çözeltisi,  $\beta$ -karoten-linoleik asit model sistemiyle belirlenen toplam antioksidan aktiviteleri ve zamanla absorbansın değişim grafiği ise, Şekil 4.13 ve Şekil 4.14’de verilmiştir.



**Şekil 4.13. Linoleik Asit Peroksidasyonunda Reyhan (*O. basilicum* L.) Ekstraktlarının Etkisi**

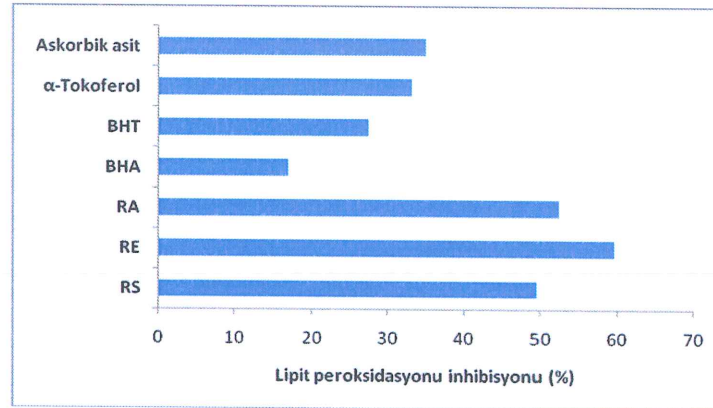
Çalışmada kullandığımız reyhan (*O. basilicum* L.) bitkisinden elde edilen su, etanol ve aseton ekstraktlarının antioksidan aktivitesi ferrik tiyosiyanat metoduna göre

belirlendi. Reyhan (*O. basilicum* L.) bitkisinden elde edilen su, etanol ve aseton ekstralarının toplam antioksidan aktivite tayini için 60 µg/mL konsantrasyonu kullanıldı (Şekil 4.13). Şekilde de görüldüğü gibi reyhan (*O. basilicum* L.) bitkisinden elde edilen su, etanol ve aseton ekstralarının toplam antioksidan aktivitesi, artan konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artmıştır.



**Şekil 4.14. Linoleik Asit Peroksidasyonunda Çıbrıka (*S. hortensis* L.) Ekstraktlarının Etkisi**

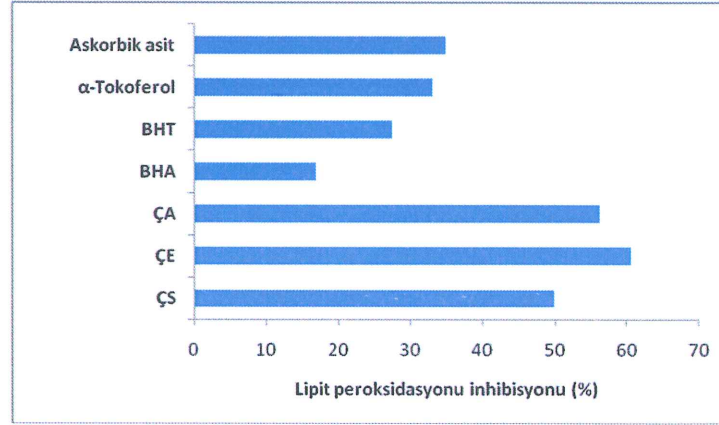
Çalışmada kullandığımız çıbrıka (*S. hortensis* L.) bitkisinden elde edilen su, etanol ve aseton ekstralarının antioksidan aktivitesi ferrik tiyosiyanat metoduna göre belirlendi. Çıbrıka (*S. hortensis* L.) bitkisinden elde edilen su, etanol ve aseton ekstralarının toplam antioksidan aktivite tayini için 60 µg/mL konsantrasyonu kullanıldı (Şekil 4.14). Şekilde de görüldüğü gibi çıbrıka (*S. hortensis* L.) bitkisinden elde edilen su, etanol ve aseton ekstralarının toplam antioksidan aktivitesi, artan konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artmıştır.



**Şekil 4.15. Reyhan (*O. basilicum* L.) Bitkisinin Su, Etanol ve Aseton Ekstrelerinin 60 µg/mL Konsantrasyonunda Lipit Peroksidasyonunu İnhibe Yüzdelерinin Standart Antioksidanlarla Karşılaştırılması**



Linoleik asit emülsiyonu lipid peroksidasyonu üzerine Reyhan (*O.basilicum* L.) bitkisinin su, etanol ve aseton ekstraktlarının 60 µg/mL konsantrasyonunun etkileri sırasıyla % 49.50, % 59.56 ve % 52.35 inhibe ederken aynı konsantrasyonda BHA, BHT, α-tokoferol ve askorbik asit peroksidasyonunu yine sırasıyla % 16.78, % 27.35, % 33.05 ve % 34.90 inhibe ettikleri gözlenmiştir.

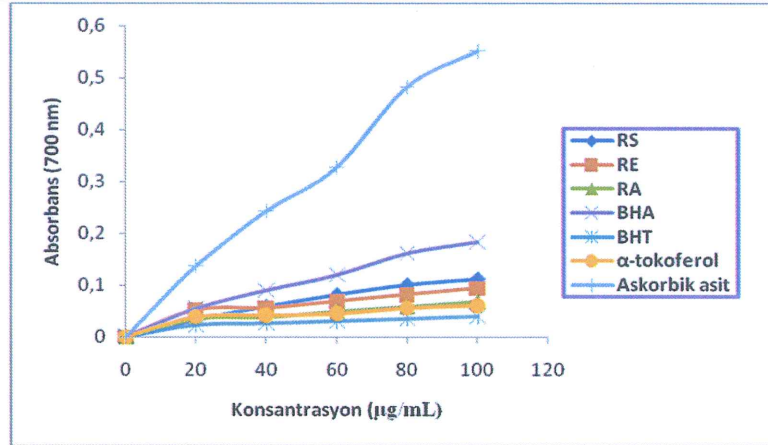


**Şekil 4.16. Çıbrıka (*S. hortensis* L.) Bitkisinin Su, Etanol ve Aseton Ekstrelerinin 60 µg/ml Konsantrasyonunda Lipit Peroksidasyonunu İnhibe Yüzdelерinin Standart Antioksidanlarla Karşılaştırılması**

Linoleik asit emülsiyonu lipid peroksidasyonu üzerine çıbrıka (*S. hortensis* L.) bitkisinin su, etanol ve aseton ekstraktlarının 60 µg/mL konsantrasyonunun etkileri sırasıyla % 49.83, % 60.57 ve % 56.21 inhibe ederken aynı konsantrasyonda BHA, BHT, α-tokoferol ve askorbik asit peroksidasyonunu yine sırasıyla % 16.78, % 27.35, % 33.05 ve % 34.90 inhibe ettikleri gözlenmiştir.

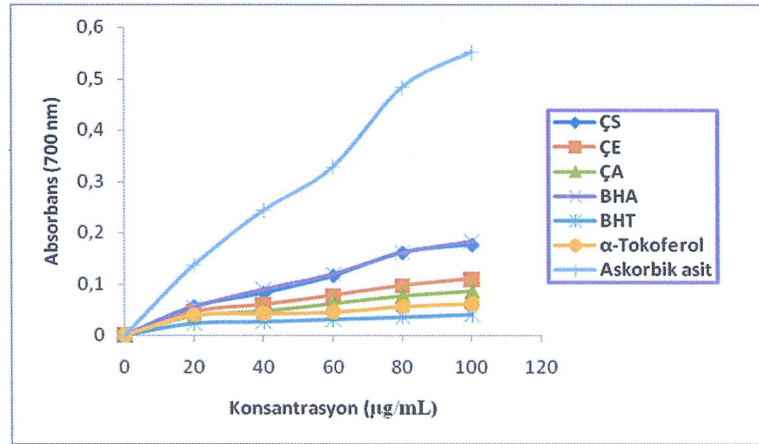
#### 4.4. İndirgeme potansiyeli

$Fe^{3+}$  iyonlarının indirgenmesi, bir bileşiğin antioksidan aktivite gösterebilmesi için önemli bir mekanizma olan elektron verebilme yeteneğinin göstergesidir ve diğer antioksidan özellikler ile de yakından ilişkilidir. Bitki ekstraktının ortamdaki  $Fe^{+3}$ 'ü indirgeme yeteneğini belirlemek üzere değişen ekstrakt ve standart konsantrasyonlarında çalışıldı ve oluşan komplekslerin absoransı 700 nm'de ölçüldü. BHA, BHT, α-tokoferol ve askorbik asit standartlarıyla karşılaştırılarak reyhan (*Ocimum basilicum* L.) ve çıbrıka (*Satureja hortensis* L.) ekstraktı için konsantrasyon-absorans grafikleri çizildi (Şekil 4.17 ve Şekil 4.18 ).



**Şekil 4.17. Reyhan (*O. basilicum* L.) Bitkisinin Su, Etanol ve Aseton Ekstraktlarının  $Fe^{+3}$ 'ü  $Fe^{+2}$ 'ye İndirgeme Kapasitesi.**

Reyhan (*O. basilicum* L.) bitkisinin su, etanol ve aseton ekstraktları ile BHA, BHT,  $\alpha$ -tokoferol ve askorbik asitin indirgeme gücü örneklerin konsantrasyonlarının artması ile arttı. Reyhan (*O. basilicum* L.) bitkisinin su ekstraktının indirgeme gücünü etanol ve aseton ekstraktından daha güçlü olduğu belirlendi (Şekil 4.17).



**Şekil 4.18. Çıbrıka (*S. hortensis* L.) Bitkisinin Su, Etanol ve Aseton Ekstraktlarının  $Fe^{+3}$ 'ü  $Fe^{+2}$ 'ye İndirgeme Kapasitesi.**

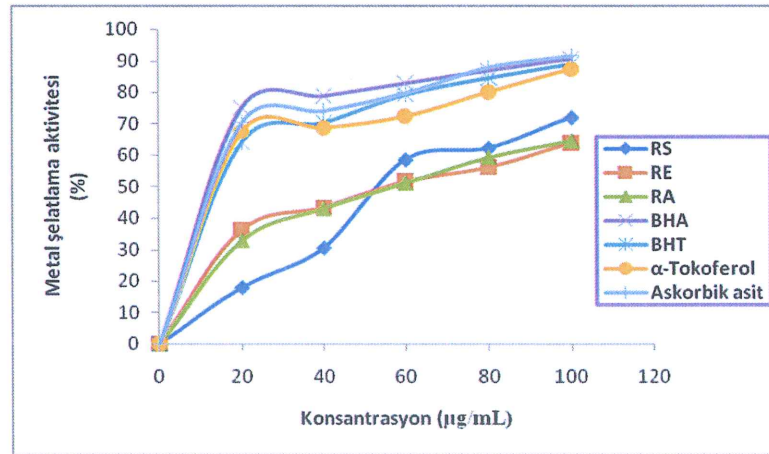
Çıbrıka (*S. hortensis* L.) bitkisinin su, etanol ve aseton ekstraktları ile BHA, BHT,  $\alpha$ -tokoferol ve askorbik asitin indirgeme gücü örneklerin konsantrasyonlarının artması ile arttı. Çıbrıka (*S. hortensis* L.) bitkisinin su ekstraktının indirgeme gücünü etanol ve aseton ekstraktından daha güçlü olduğu belirlendi (Şekil 4.18).



#### 4.5. Metal şelatlama aktivitesi

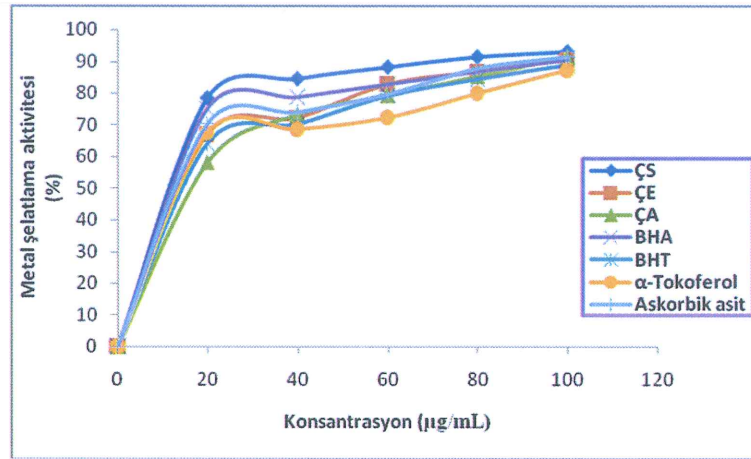
Metal iyonu şelatlama aktivitesi; bitki ekstraktlarının çözeltideki  $Fe^{+2}$  iyonlarını bağlayabilmek için ferrozin ile yarışmasına göre değerlendirildi. Metal şelatlama aktivitesinde azalan absorbans ferrozin bağlanmadan önce metal iyonlarının şelatlandığını gösterir. Çalışmada kullanılan reyhan (*O. basilicum* L.) ve çıbrıka (*S. hortensis* L.) bitkilerinin her bir ekstraktının metal şelatlama potansiyelini gösteren konsantrasyon-% inhibisyon grafikleri oluşturuldu (Şekil 4.19 ve Şekil 4.20).

Grafiklerden görüldüğü gibi; çalışmada kullanılan ekstraktların konsantrasyon arttıkça artan şelatlama aktivitesi gösterdiği belirlendi. Reyhan (*O. basilicum* L.) ekstraktlarının  $Fe^{+2}$  iyonlarını şelatlama aktivitelerinin daha düşük olduğu görülmektedir.



Şekil 4.19. Reyhan (*O. basilicum* L.) Ekstraktlarının Metal Şelatlama Kapasitesi

Daha düşük absorbans daha yüksek metal şelatlama aktivitesi gösterir. Şekil 4.19'dan görüldüğü gibi reyhan (*O. basilicum* L.) 100 µg/ml konsantrasyondaki su, etanol ve aseton ekstraktlarının  $Fe^{+3}$  aktivitesi sırasıyla % 71.95, % 63.82 ve % 64.63 olarak tespit edildi.

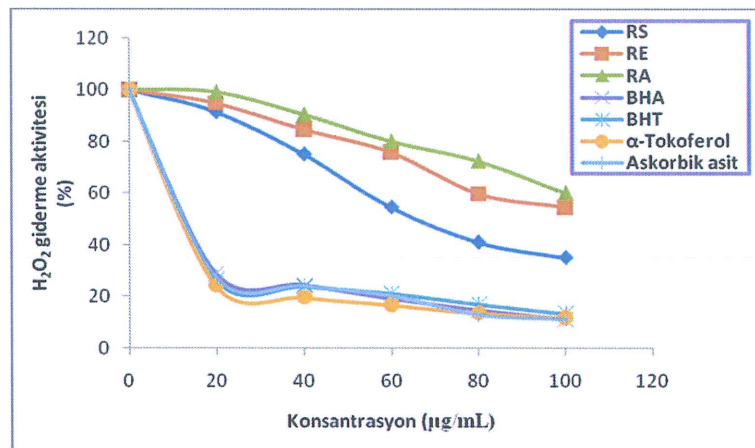


Şekil 4.20. Çıbrıka (*S. hortensis* L.) Ekstraktlarının Metal Şelatlama Kapasitesi.

Daha düşük absorbans daha yüksek metal şelatlama aktivitesi gösterir. Şekil 4.20'den görüldüğü gibi çıbrıka (*S. hortensis* L.) 100 µg/ml konsantrasyondaki su, etanol ve aseton ekstraktlarının  $Fe^{+3}$  aktivitesi sırasıyla % 93.09, % 90.65 ve % 91.46 olarak tespit edildi.

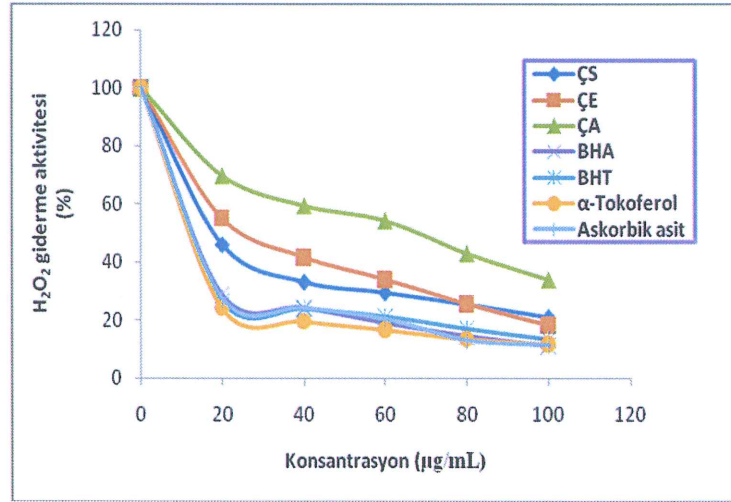
#### 4.6. $H_2O_2$ giderme aktivitesi

Bitki ekstraktlarının  $H_2O_2$  giderme aktivitesi Ruch metoduna göre tayin edildi (Rush vd., 1989). Reyhan (*O. basilicum* L.) ve çıbrıka (*S. hortensis* L.) bitkilerinin  $H_2O_2$  giderme aktiviteleri standartlardan daha yüksek bulundu. Reyhan (*O. basilicum* L.) ve çıbrıka (*S. hortensis* L.) bitkilerinin aseton ekstraktlarının diğer ekstraktlardan daha iyi giderme etkisine sahip oldukları tesbit edildi (Şekil 4.21 ve Şekil 4.22).



Şekil 4.21. Reyhan (*O. basilicum* L.) Ekstraktlarının  $H_2O_2$  Giderme Aktiviteleri

$H_2O_2$  süperoksid dismutaz gibi çoğu oksitleyici enzimler tarafından *in vivo* olarak oluşturulabilir. Hücre zarından geçebilir ve bazı bileşikler yavaş bir şekilde oksitleyebilir. Reyhan (*O. basilicum* L.) su, etanol ve aseton ekstraktlarının  $H_2O_2$  giderme yetenekleri Şekil 4.21’de verilmektedir. Reyhan (*O. basilicum* L.) bitkisinin 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  konsantrasyonda su, etanol ve aseton ekstraktlarının sırasıyla % 34.93, % 54.51 ve % 60.08  $H_2O_2$  giderme aktivitesi gösterdiği belirlendi (Şekil 4.21).



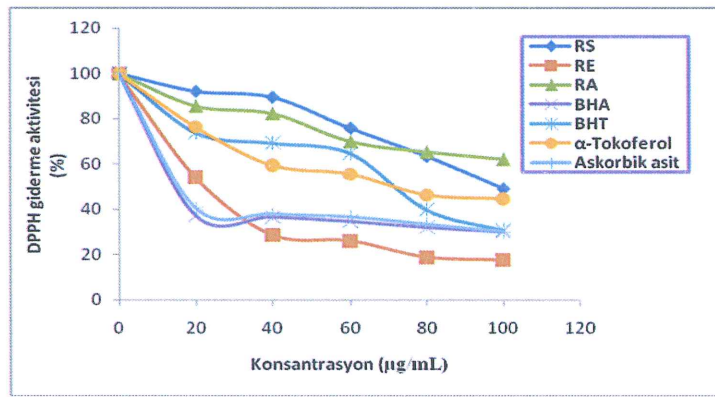
**Şekil 4.22. Çıbrıka (*S. hortensis* L.) Ekstraktlarının  $H_2O_2$  Giderme Aktiviteleri.**

$H_2O_2$  süperoksid dismutaz gibi çoğu oksitleyici enzimler tarafından *in vivo* olarak oluşturulabilir. Hücre zarından geçebilir ve bazı bileşikler yavaş bir şekilde oksitleyebilir. Çıbrıka (*S. hortensis* L.) bitkisinin su, etanol ve aseton ekstraktlarının  $H_2O_2$  giderme yetenekleri Şekil 4.22’de verilmektedir. Çıbrıka (*S. hortensis* L.) bitkisinin 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  konsantrasyonda su, etanol ve aseton ekstraktlarının sırasıyla % 34.93, % 54.51 ve % 60.08  $H_2O_2$  giderme aktivitesi gösterdiği belirlendi (Şekil 4.22).



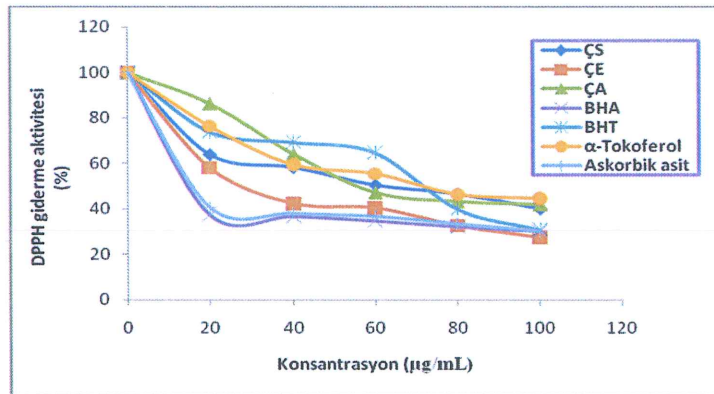
#### 4.7. Antiradikal aktivitesinin tayini

DPPH radikali doğal antioksidanların serbest radikal yakalama aktivitesini değerlendirmek için kullanılır. Çalışmada kullanılan reyhan (*O. basilicum* L.) ve çıbrıka (*S. hortensis* L.) ekstraktlarının serbest radikal giderici etkileri DPPH radikali üzerinden tayin edildi. Standart olarak BHA, BHT,  $\alpha$ -tokoferol ve askorbik asit kullanıldı. Ekstraktların DPPH serbest radikali giderme aktiviteleri konsantrasyon ( $\mu\text{g/mL}$ ) - % inhibisyon grafikleri ile belirlendi (Şekil 4.23 ve Şekil 4.24).



Şekil 4.23. Reyhan (*O. basilicum* L.) Ekstraktlarının DPPH Radikali Giderme Aktivitesi

Reyhan (*O. basilicum* L.) bitkisinin su, etanol ve aseton ekstraktının 100  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonda DPPH• radikali giderme etkileri sırasıyla % 49.02, % 17.65 ve % 62.09 olarak belirlendi (Şekil 4.23).

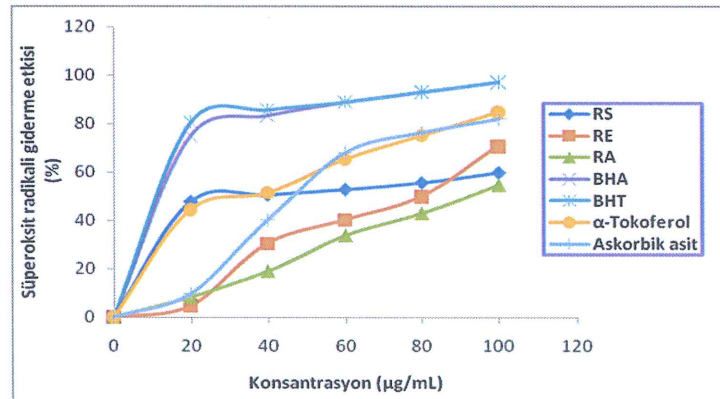


Şekil 4.24. Çıbrıka (*S. hortensis* L.) Ekstraktlarının DPPH Radikali Giderme Aktivitesi

Çıbrıka (*S. hortensis* L.) bitkisinin su, etanol ve aseton ekstraktının 100 µg/mL konsantrasyonlarının DPPH● radikalini giderme etkileri sırasıyla % 39.87, % 27.45 ve % 41.83 olarak belirlendi (Şekil 4.24).

#### 4.8. Süperoksit radikali giderme aktivitesi

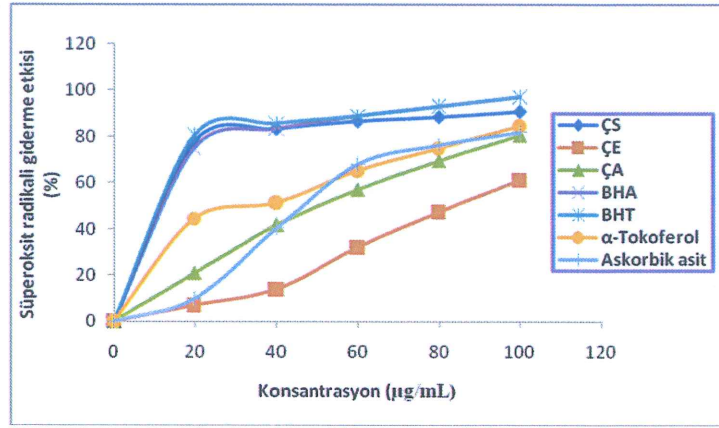
Çalışmada kullanılan bitki ekstraktlarının süperoksit radikali giderme aktivitesi *in vitro* koşullarda NBT/NADH/PMS çözelti sisteminde süperoksit radikali oluşturularak çalışıldı ve ekstraktların bu radikali etkisizleştirebilme kapasiteleri belirlendi. Çalışılan örneklerden reyhan (*O. basilicum* L.) ve Çıbrıka (*S. hortensis* L.) su-etanol-aseton ekstraktlarında süperoksit radikali giderme aktivitesi gözlemlendi. Bu nedenle sadece bitkilerin su-etanol-aseton ekstraktlarının ve standart olarak seçilen BHA, BHT, α-tokoferol ve askorbik asidin değişen konsantrasyonlarına karşılık süperoksit radikalini giderme aktiviteleri (% inhibisyon) grafiğe geçirildi (Şekil 4.25 ve Şekil 4.26).



Şekil 4.25. Reyhan (*O. basilicum* L.) Bitkisinin Su, Etanol ve Aseton Ekstraktlarının Süperoksit Radikalini Giderme Aktivitesi

Süperoksit anyonu diğer oksijen radikalleri ile karşılaştırıldığında daha uzun yaşam ömrüne sahiptir. Reyhan (*O. basilicum* L.) bitkisinin 100 µg/ml konsantrasyonda su, etanol ve aseton ekstraktlarının sırasıyla % 59.72, % 70.83 ve % 54.72 oranlarında süperoksit radikali oluşumu üzerine inhibisyon etkisi gösterdikleri bulundu (Şekil 4.25).





**Şekil 4.26. Çıbrıka (*S. hortensis* L.) Bitkisinin Su, Etanol ve Aseton Ekstraktlarının Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi**

Süperoksit anyonu diğer oksijen radikalleri ile karşılaştırıldığında daha uzun yaşam ömrüne sahiptir. Çıbrıka (*S. hortensis* L.) bitkisinin 100 µg/ml konsantrasyonda su, etanol ve aseton ekstraktlarının sırasıyla % 59.72, % 70.83 ve % 54.72 oranlarında süperoksit radikali oluşumu üzerine inhibisyon etkisi gösterdikleri bulundu (Şekil 4.26).

## 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

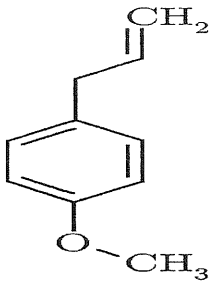
İnsanların doğal metabolizmasında enerji kaynağı olan karbonun oksijen ile yanması sonucunda bazı etmenlerin etkisi ile; superoksit ( $O_2^-$ ), hidroksil ( $HO^\cdot$ ), nitrikoksit ( $NO^\cdot$ ) ile hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi aktif oksijen formları olan serbest radikal olarak adlandırılan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

Reyhan (*Ocimum basilicum* L.) bitkisinin özüt verimi, su-etanol-aseton çözücülerini ile yapılan ekstraksiyon verimleri sırasıyla % 185.832, % 48.988 ve % 3.614'tür. Çıbrıka (*Satureja hortensis* L.) bitkisinin özüt verimi ise su-etanol-aseton çözücülerini ile yapılan ekstraksiyon verimleri sırasıyla % 207.776, % 61.556 ve % 5.354 olarak elde edildi. En yüksek verim Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'de görüldüğü gibi su çözücüsü ile yapılan ekstraksiyonlarda gözlemlendi.

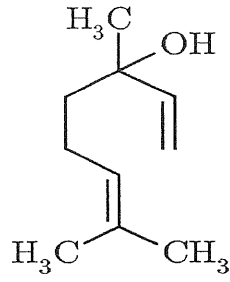
Liu ve arkadaşları kurutulmuş tropikal meyve çiçeklerinin aseton ekstraktlarından metanol ve su ekstraktları için olandan daha yüksek verim elde etmişler ve sırasıyla %  $12.9 \pm 1.12$ , %  $9.56 \pm 0.73$  ve %  $9.92 \pm 0.86$  bulmuşlardır.

Bu çalışmada reyhan (*O. basilicum* L.) ve çıbrıka (*S. hortensis* L.) bitkilerinin antioksidan kapasiteleri 8 farklı yöntem kullanılarak tayin edildi. Bu yöntemler;

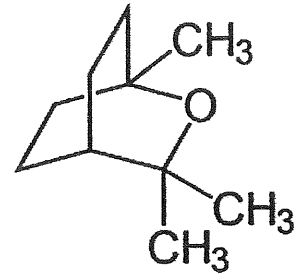
- Toplam fenolik bileşik miktarı tayini
- Toplam flavonoit miktarı tayini
- Ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivitesi tayini
- Toplam indirgeme kapasitesi tayini
- Metal iyonlarının şelatlama aktivitesi tayini
- Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) giderme aktivitesi tayini
- DPPH• serbest radikalleri giderme aktivitesi tayini
- Süperoksit anyon radikali giderme aktivitesi tayini



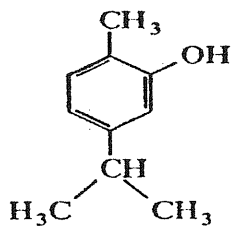
Linalool



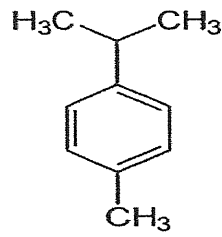
Estragol



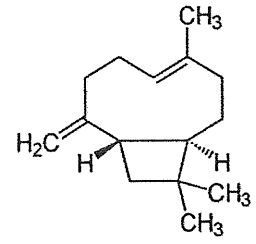
Cineol



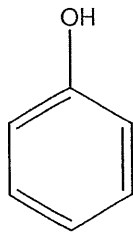
Carvacrol



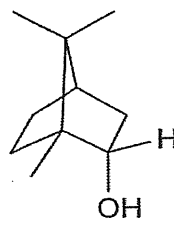
Cymol



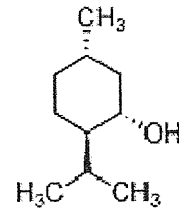
Caryophyllen



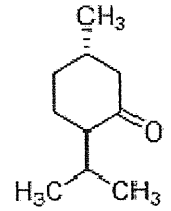
Fenol



Borneol

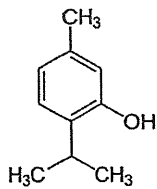


L-Mentol

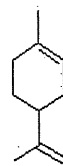


L-Menton

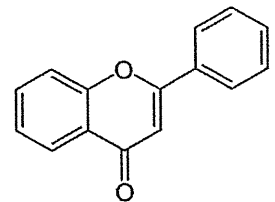
Menton



Timol



Dipenten



Flavon

Şekil 5.1. Reyhan (*O. Basilicum* L.) ve Çıbrıka (*S. hortensis* L.)'in İçerdiği Bileşikler

Aromatik bitkilerin kimyasal bileşimi, birçok etmene bağlı olarak farklılık gösterdiğinden, antioksidan etkileri de değişebilmektedir (Franke vd., 2007).

Fenolik bileşikler özellikle flavonoidler hidroksil gruplarında bulunan hidrojenlerini kolaylıkla verebilirler. Çünkü fenolik bileşiklerdeki oksijen ile hidrojen arasındaki bağ, oluşacak fenol radikalının rezonans kararlılığından dolayı kolaylıkla homolitik olarak parçalanabilir ve böylece üzerinde bir tane elektron bulunduran hidrojen kolaylıkla verilebilir. Flavonoidler antioksidan özelliğe sahip olup, koroner kalp hastalıkları gibi birçok hastalığı önleyen önemli bir doğal bileşik grubudur. Bitkilerden elde edilen flavonoidlerin UV ışınlarını absorblayan özellikleri ve antioksidan aktivitelerinden dolayı kanser tedavisinde kemoprotektif etkiye sahip olduğu bildirilmektedir. Ayrıca flavonoidlerin lösemi ve yumurtalık kanseri gibi kanserli hücreler üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Gülçin vd., 2007).

Fenoller hidroksil gruplarından dolayı serbest radikalleri yakalama özellikleri olduğundan çok önemli bitki bileşenleridir. Fenolik bileşiklerin antioksidan etkileri vardır. Çalışmamızda reyhan (*O. basilicum* L.) bitkisinin kateşol ve gallik asit eşdeğeri olarak içerdiği fenolik bileşikler belirlendi. Kateşol eşdeğeri olarak Şekil 4.3'de görüldüğü gibi reyhan (*O. basilicum* L.) bitkisinin su, etanol ve aseton ekstraktlarının toplam fenolik madde içerikleri sırasıyla 83 mg/g, 100 mg/g ve 50 mg/g fenolik madde içerdiği ve kateşol eşdeğeri olarak Şekil 4.4'de görüldüğü gibi çibrika (*S. hortensis* L.) bitkisinin su, etanol ve aseton ekstraktlarının toplam fenolik madde içerikleri sırasıyla 183 mg/g, 116 mg/g ve 83 mg/g fenolik madde içerdiği belirlendi. Reyhan (*O. basilicum* L.) için toplam fenolik madde miktarları RE>RS>RA sırasında azalma gösterirken çibrika (*S. hortensis* L.) için ise toplam fenolik madde miktarları ÇS>ÇE>ÇA sırasında azalma gösterdi.

Reyhan (*O. basilicum* L.) bitkisi gallik asit eşdeğeri olarak Şekil 4.5'de görüldüğü gibi su, etanol ve aseton ekstraktlarının toplam fenolik madde içerikleri sırasıyla 100 mg/g, 116 mg/g ve 66 mg/g fenolik madde içerdiği ve çibrika (*S. hortensis* L.) bitkisi gallik asit eşdeğeri olarak Şekil 4.6'da görüldüğü gibi su, etanol ve aseton ekstraktlarının toplam fenolik madde içerikleri sırasıyla 200 mg/g, 133 mg/g ve 100 mg/g fenolik madde içerdiği belirlendi. Reyhan (*O. basilicum* L.) için toplam fenolik madde miktarları RE>RS>RA sırasında azalma gösterirken çibrika (*S. hortensis* L.) için ise toplam fenolik madde miktarları ÇS>ÇE>ÇA sırasında azalma gösterdi.

Flavonoidler büyük çoğunluğu bitkiler tarafından üretilen 4000'den fazla bileşiği içeren geniş bir ailedir. Flavonoid bileşikleri bitkinin büyüme ve gelişmesini etkiledikleri gibi, hastalık etmenlerine karşı savunma sisteminin de bir parçasını oluştururlar. Reyhan (*O. basilicum* L.) bitkisi kateşol eşdeğeri olarak Şekil 4.9'da görüldüğü gibi su, etanol ve aseton ekstraktlarının toplam flavonoit madde içeriği sırasıyla 42.5 mg/g, 24.2 mg/g ve 36.6 mg/g flavonoit madde içerdiği ve çıbrıka (*S. hortensis* L.) bitkisi kateşol eşdeğeri olarak Şekil 4.10'da görüldüğü gibi su, etanol ve aseton ekstraktlarının toplam flavonoit madde içeriği sırasıyla 45.5 mg/g, 31.7 mg/g ve 41.7 mg/g flavonoit madde içerdiği belirlendi. Reyhan (*O. basilicum* L.) için toplam flavonoit madde miktarları RS>RA>RE sırasında azalma gösterirken çıbrıka (*S. hortensis* L.) için ise toplam flavonoit madde miktarları ÇS>ÇA>ÇE sırasında azalma gösterdi.

Reyhan (*O. basilicum* L.) gallik asit eşdeğeri olarak Şekil 4.11'de görüldüğü gibi su, etanol ve aseton ekstraktlarının toplam flavonoit madde içeriği sırasıyla 97.10 mg/g, 65.70 mg/g ve 87.10 mg/g flavonoit madde içerdiği ve çıbrıka (*S. hortensis* L.) gallik asit eşdeğeri olarak Şekil 4.12'de görüldüğü gibi su, etanol ve aseton ekstraktlarının toplam flavonoit madde içeriği sırasıyla 102.3 mg/g, 78.6 mg/g ve 95.7 mg/g flavonoit madde içerdiği belirlendi. Reyhan (*O. basilicum* L.) için toplam flavonoit madde miktarları RS>RA>RE sırasında azalma gösterirken çıbrıka (*S. hortensis* L.) için ise toplam flavonoit madde miktarları ÇS>ÇA>ÇE sırasında azalma gösterdi.



Ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan kapasite biyoaktif bileşenleri için en çok kullanılan parametrelerden biridir. Ferrik tiyosiyanat metodu, lipid peroksidasyonu boyunca meydana gelen peroksitin miktarını ölçer. Bu analizde, hava oksijeni tarafından oksitlenen ve emülsiyonda linoleik asidin peroksidasyonu sonucu oluşan hidroperoksitler dolaylı olarak ölçülür. Bu metodun esası, linoleik asit emülsiyonunun oksidasyonu sonucu oluşan hidroperoksidin spektrofotometrik olarak 500 nm’de ölçülmesine dayanır. Yüksek absorbans, peroksidasyon sonucu oluşan peroksit miktarının fazlalığını gösterir. Oluşan hidroperoksit ise  $Fe^{2+}$ ’yi  $Fe^{3+}$ ’e yükseltir. Daha sonra  $Fe^{3+}$ , ilave edilen amonyum tiyosiyanat ile kompleks oluşturarak 500 nm’de maksimum absorbans verir. Linoleik asit emülsiyonu lipid peroksidasyonu üzerine Reyhan (*O.basilicum* L.) bitkisinin su, etanol ve aseton ekstraktlarının 60 µg/mL konsantrasyonunun etkileri sırasıyla % 49.50, % 59.56 ve % 52.35 inhibe ederken aynı konsantrasyonda BHA, BHT,  $\alpha$ -tokoferol ve askorbik asit peroksidasyonunu yine sırasıyla % 16.78, % 27.35, % 33.05 ve % 34.90 inhibe ettikleri ve çibrika (*S. hortensis* L.) bitkisinin ise su, etanol ve aseton ekstraktlarının 60 µg/mL konsantrasyonunun etkileri sırasıyla % 49.83, % 60.57 ve % 56.21 inhibe ederken aynı konsantrasyonda BHA, BHT,  $\alpha$ -tokoferol ve askorbik asit peroksidasyonunu yine sırasıyla % 16.78, % 27.35, % 33.05 ve % 34.90 inhibe ettikleri gözlenmiştir.

Bioaktif bileşiklerin indirgeme gücünü yansıtan, elektron verme kapasitesinin antioksidan aktivite ile ilgili olduğu bildirilmiştir. Antioksidanlar indirgeyici olabilir ve bir maddenin başka bir maddeyi yükseltgeyerek indirgenmesi reaksiyonu olarak tanımlanan redoks reaksiyonlarında, redüktantlarla oksidanların stabilizasyonu şeklinde olabilir. Bir bileşiğin ya da ham ekstraktın indirgeme kapasitesi  $Fe[(CN)_6]^{+3}$ ’nin  $Fe[(CN)_6]^{+2}$ ’ye indirgenmesiyle ölçülebilir. İndirgenmiş ürüne  $Fe^{+3}$ ’ün ilavesi, 700 nm’de güçlü absorbansa sahip olan Prussian mavisi renginde bir kompleks olan  $Fe_4[Fe(CN)_6]$  oluşumuna yol açar. Absorbansdaki artış, kompleksin oluşumundan kaynaklanan artışı ve dolayısıyla artan indirgeme kapasitesini göstermektedir. Reyhan (*O. basilicum* L.) ve çibrika (*S. hortensis* L.) bitkilerinin su, etanol ve aseton ekstraktları ile BHA, BHT,  $\alpha$ -tokoferol ve askorbik asitinin indirgeme gücü örneklerin konsantrasyonlarının artması ile arttı. Reyhan (*O. basilicum* L.) ve çibrika (*S. hortensis* L.) bitkilerinin su ekstraktının indirgeme gücünü etanol ve aseton ekstraktından daha güçlü olduğu belirlendi (Şekil 4.17 ve Şekil 4.18).

Ferröz iyonları ( $\text{Fe}^{+2}$ ) şelatlama kapasitesi ferröz iyonları ( $\text{Fe}^{+2}$ ) konsantrasyonlarını minimuma indirme ve dolayısıyla oksidatif hasara sebep olan serbest radikal oluşumu inhibisyonu ile yakından ilgilidir (Gülçin vd., 2007). Ferrozin, ferröz iyonları ( $\text{Fe}^{+2}$ ) gibi iki değerlikli metal iyonları ile kantitatif miktarda bile kompleks oluşturmaktadır. Oluşan renkli ferrozin-metal kompleksi ise 562 nm'de maksimum absorbanstır. Metal şelatlayıcı ajanların varlığında ferrozin-metal kompleksi oluşumu bloke olur. Dolayısıyla metal şelatlama aktivitesinde 562 nm'de absorbansta meydana gelen azalma metal şelasyonunun bir göstergesidir. Daha düşük absorbanstaki daha yüksek metal şelatlama aktivitesi gösterir. Reyhan (*O. basilicum* L.) ve çibrika (*S. hortensis* L.) bitkilerinin 100 µg/ml konsantrasyondaki su, etanol ve aseton ekstraktlarının  $\text{Fe}^{+3}$  aktivitesi sırasıyla % 71.95, % 63.82 ve % 64.63 ve % 93.09, % 90.65 ve % 91.46 olarak tespit edildi (Şekil 4.19 ve Şekil 4.20). Canlı organizmalarda hidrojen peroksit, süperoksit dismutaz gibi birçok enzim tarafından oluşturulabilir. Hidrojen peroksit hücre membranında bir uçtan diğer uca difüze olarak birçok bileşiği oksitleyebilir. Hidrojen peroksit çok reaktif değildir, fakat hücrede serbest radikallerin artmasına sebep olduğundan dolayı zamanla hücre için toksik olabilir. Hücre kültüründe hidrojen peroksit ilavesiyle geçiş metal iyonları varlığında oksidatif DNA hasarlarına sebep olan hidroksi iyonlarının oluşmasına sebep olur. Bundan dolayı farmasötik ve gıda sistemlerini oksidatif hasardan korumak için bu sistemlerden hidrojen peroksit uzaklaştırmak oldukça önemlidir. Reyhan (*O. basilicum* L.) ve çibrika (*S. hortensis* L.) bitkilerinin 100 µg/ml konsantrasyonda su, etanol ve aseton ekstraktlarının sırasıyla % 34.93, % 54.51, % 60.08 ve % 34.93, % 54.51, % 60.08  $\text{H}_2\text{O}_2$  giderme aktivitesi gösterdiği belirlendi (Şekil 4.21 ve Şekil 4.22).

DPPH radikali uzun ömürlü ve azot merkezli bir radikaldır. Antioksidan maddelerin radikal giderme aktivitelerini belirlemek için en sık kullanılan metotlardan biridir. Bu metotta antioksidan maddeler DPPH radikallerini, sarı renkli difenil pikrilhidrazine indirger. Bu metodun esası hidrojen veren gruplara sahip antioksidan maddelerin varlığında, alkolde çözünen DPPH radikallerinin redüksiyonuna dayanmaktadır. Redüksiyon sonucu oluşan, 517 nm’de herhangi bir absorbans vermeyen ve radikal olmayan bir DPPH-H molekülü oluşmaktadır. Dolayısıyla DPPH radikali miktarındaki azalma 517 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülerek aktivite tayini yapılabilmektedir. Ortamda bulunan radikal giderici antioksidan veya antiradikal (AH)n varlığında DPPH radikali indirgenmiş DPPH-H formuna dönüşmektedir (Gülçin, 2008).

Reyhan (*O. basilicum* L.) ve çibrika (*S. hortensis* L.) bitkilerinin su, etanol ve aseton ekstraktının 100 µg/mL konsantrasyon da DPPH● radikalini giderme etkileri sırasıyla % 49.02, % 17.65, % 62.09 ve % 39.87, % 27.45, % 41.83 olarak belirlendi (Şekil 4.23 ve Şeki 4.24).

Reyhan (*Ocimum basilicum* L.) ve çibrika (*Satureja hortensis* L.) bitkilerinin su, etanol ve aseton ekstrelerinin çalışılan konsantrasyonlarda (20-100 µg/ml), artan konsantrasyon ile beraber toplam antioksidan aktivitede, indirgeme kapasitelerinde, metal şelatlamada, DPPH radikal giderme aktivitelerinde de artış görülmüştür. Bunun yanı sıra süperoksit anyon radikallerini giderme, serbest olmayan bir reaktif oksijen türü olan hidrojen peroksit giderme aktivitelerinde ise konsantrasyona bağlı olarak herhangi bir artış gözlenmedi. Antioksidan ve antiradikal çalışmaların mukayesesinde α-tokoferol, BHA, BHT ve Aspartik asit gibi standart maddeler kullanıldı. Bazı antioksidan analizlerde Reyhan (*Ocimum basilicum* L.) ve çibrika (*Satureja hortensis* L.) bitkilerinin su, etanol ve aseton ekstrelerinin aktivitesinin kullanılan standartların aynı konsantrasyonlardaki aktivitelerinden daha yüksek olduğu gözlendi.

Radikal giderme kapsamında yapılan çalışmalarda süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitesi de araştırıldı. Süperoksit anyon radikalleri lipit peroksidasyonunu direk başlatan oksijen merkezli radikallerdir. Bu radikaller biyolojik makro moleküller

ile direk etkileşip doku hasarlarına sebep olan reaktif radikallerden biridir (Halliwell and Gutteridge, 1984). Süperoksit anyonu diğer oksijen radikalleri ile karşılaştırıldığında daha uzun yaşam ömrüne sahiptir. Reyhan (*O. basilicum* L.) ve çıbrıka (*S. hortensis* L.) bitkilerinin 100 µg/ml konsantrasyonda su, etanol ve aseton ekstraktlarının sırasıyla % 59.72, % 70.83, % 54.72 ve % 59.72, % 70.83, % 54.72 oranlarında süperoksit radikali oluşumu üzerine inhibisyon etkisi gösterdikleri bulundu (Şekil 4.25 ve Şekil 4.26).

Misk adaçayının antioksidan aktivitelerini değerlendiren bir çalışmada 0.25 mg ekstraktlarda kloroform ekstresi linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonunu % 93 inhibe ederken, aseton ekstresi linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonunu % 68 inhibe ettiği ve  $\alpha$ - tokoferol % 46 inhibe ettiği gözlemlendi. Kloroform ekstresinin aseton ekstresinden daha fazla total antioksidan aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi. Misk adaçayı kloroform ekstraktı>Misk adaçayı aseton ekstraktı> $\alpha$ - tokoferol şeklinde izlendi. Standartlar ve misk adaçayının kloroform ve aseton ekstraktlarının indirgeme gücü; BHA> $\alpha$ - tokoferol>Quersetin>Misk adaçayı kloroform ekstraktı>Misk adaçayı aseton ekstraktı, süperoksit anyon radikal yakalama aktivitesi; BHT>Misk adaçayı aseton ekstraktı>BHA>Misk adaçayı kloroform ekstraktı>Quersetin, serbest radikal yakalama aktivitesi; Quersetin>BHT>BHA>Misk adaçayı kloroform ekstraktı>Misk adaçayı aseton ekstraktı şeklinde izlendi. Ayrıca, misk adaçayı kloroform ve aseton ekstraktlarının 250 mg'da demir bağlayıcı kapasitesi sırasıyla % 31.6 ve % 37.7 sergilendi ve öte yandan aynı konsantrasyonda  $\alpha$ - tokoferol, BHT ve BHA'nın demir şelatlama aktivitesi sırasıyla % 43.0, % 40.6 ve % 74.8 gösterdi. Misk adaçayının kloroform ve aseton ekstraktları hidrojen peroksit yakalama aktivitesi sırasıyla % 42.5 ve % 55.0 sergilendi. Öte yandan aynı konsantrasyonda BHA, BHT ve  $\alpha$ - tokoferol hidrojen peroksit yakalama aktivitesi sırasıyla % 37.3, % 86.0 ve % 57.0 gösterdi. Misk adaçayının kloroform ve aseton ekstraktlarının pirokateşol eşdeğeri olarak toplam fenolik içeriği sırasıyla 28.91 mg ve 35.24 mg gözlemlendi (Gülçin vd., 2004).

Karnabahardan (*B. oleracea* L.) elde edilen su ve etanol ekstraktları 30 µg/mL konsantrasyonunda linoleik asit emülsiyonu peroksidasyonunu sırasıyla % 63,1 ve % 77,4 inhibe ederken aynı konsantrasyonda  $\alpha$ - tokoferol ve troloks linoleik asit peroksidasyonunu sırasıyla % 81,3 ve % 68,1 inhibe ettikleri gözlemlenmiştir. Karnabahar



(*B. oleracea* L.) bitkisinin su ve etanol ekstreleri etkili bir şekilde ferröz ( $\text{Fe}^{2+}$ ) iyonlarını şelatlama aktivitesine sahiptir. Her iki ekstre 20  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonda ferröz iyonlarını ( $\text{Fe}^{2+}$ ) sırasıyla % 89,5 ve % 88,6 şelatladığı gözlemlendi. EDTA, kuvvetli bir metal şelatlayıcıdır ve mevcut çalışmada standart metal şelatör olarak kullanıldı. Elde edilen verilere bakıldığında her iki ekstre kayda değer bir şekilde ferröz iyonlarını ( $\text{Fe}^{2+}$ ) bağladığı ve bir peroksidasyon inhibitörü olarak rol oynadığı görülmektedir. Karnabahardan (*B. oleracea* L.) elde edilen her iki ekstre de, kullanılan konsantrasyonda 30  $\mu\text{g/mL}$  hidrojen peroksiti sırasıyla % 39,4 ve % 38,9 giderdiği gözlemlendi. Aynı konsantrasyonda kullanılan  $\alpha$ -tokoferol ve troloks ise % 37,7 ve % 39,1 benzer aktivite sergiledikleri gözlemlendi (Gülçin, 2007).



## 6. KAYNAKLAR

1. **Akkuş, İ.** (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza yayınları, Kuzucular ofset, Konya.
2. **Al-Mamary, M., Al-Meer, A., Al-Habori, M.** (2002). Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research* 22 (2002) 1041-1047.
3. **Altan, N., Dingel, A.S., Koca, C.,** (2006). Diabetes mellitus and oxidative stres. *Turkish Journal of Biochemistry-Turk J Biochem*, 31(2); 51-56.
4. **Ames, B. N., Shigenaga, M. K., Hagen, T. M.** (1993). Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 1; 90(17): 7915-22.
5. **Apak, R.,** (2007). Elektron transfer esaslı antioksidan tayin yöntemleri. *21. Ulusal Kimya Kongresi 23-27 Ağustos 2007*
6. **Avcı, A.** (2001). Diyabet oluşturulmuş ratlarda böbrek antioksidan savunma sistemi ve E vitaminin etkileri. Ankara Üni. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 56s.
7. **Bannister, W.H., Bannister, J.V.** (1980). Biological and clinical aspects of superoxide and superoxide dismutase., (Proceedings of the Federation of European Biochemical Societies Symposium No:62) Elsevier / North- Holland Biomedical Pres.
8. **Barrera-Arellano, D., Esteves, W.** (1992). Oxidative stability of potato chips determined by Rancimat. *JAOCs*, 69(4), 335-337.
9. **Basage, H.S.** (1990). Biochemical aspects of free radicals. *Biochem. Cell Biol.* 68: 989-998.

10. **Bast, A.**, Haenen, G. R. M. M., Cees, J. A. D. (1997). Oxidants and antioxidants: State of the art. *The American Journal of Medicine*, 91, (Suppl 3C), 30, 3C-2S\_3C-13S.
11. **Becker E. M.**, Nissen L. S., Skibsted L. H. (2004). Antioxidant evaluation
12. **Bedoux, G.**, Mainguy, C., Bedoux, M.F., Marculescu, A., Ionescu, D. (2010). Biological activities of the essential oils from selected aromatic plants. *Proceeding of the International Conference, Transilvania University of Brasov, Romania*
13. **Beloqui, O.**, Cederbaum, A. I. (1986). Prevention of microsomal production of hydroxyl radicals, but not lipid peroxidation, by the glutathione-glutathione peroxidase system. *Biochem Pharmacol.* Aug 15; 35(16): 2663-9.
14. **Bensmira, M.**, Jiang, B., Nsabimana, C., Jian, T. (2007). Effect of Lavender and Thyme incorporation in sunflower seed oil on its resistance to frying temperatures. *Food Research International* 40 ( 2007 ) 341-346.
15. **Benzie I. F. F.**, Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) assay a measure of "Antioxidant Power". The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70 76.
16. **Beric, T.**, Nikolic, B., Stanojevic, J., Vukovic-Gacic, B., Knezevic-Vukcevic, J. (2008). Protective effect of basil (*Ocimum basilicum* L.). *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 724-732.
17. **Beutler, E.**, Duron, O., Kelly, B. M. (1963). Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med.* May; 61: 882-8.
18. **Blois, M.S.** (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 26, 1199 – 1200.
19. **Bonanni, A.**, Campanella, L., Gatta, T., Gregori, E., Tomassetti, M. (2007). Evaluation of the antioxidant and prooxidant properties of several commercial dry spices by different analytical methods. *Food Chemistry* 102 ( 2007 ) 751-758.

20. **Bursal, E., Köksal, E.** (2010). Evaluation of reducing power and radical scavenging activities of water and ethanol extracts from sumac (*Rhus coriaria* L.). *Food Research International*
21. **Cerutti, A. P., Mc Cord, J. M., Fridovich, I.** (1988). Oxy-radicals in molecular biology and pathology. Alan R. Liss. Inc. Pages 183-193. New York.
22. **Cheeseman, K. H., Slater, T. F.** (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull. Jul*; 49(3): 481-93.
23. **Chuah, A.M., Lee, Y.C., Yamaguchi, T., Takamura, H., Yin, L.J., Matoba, T.** (2008). Effect of cooking on the antioxidant properties of coloured peppers. *Food Chemistry* 111 (2008) 20-28.
24. **Ciz, M., Cizova, H., Denev, P., Kratchanova, M., Slavov, A., Lojek, A.** (2010). Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. *Food Control*, 21(2010), 518-523.
25. **Craig ve Aust, E.T., Aust, S. D.** (1986). Free radicals and environmental toxins. *Annals of Emergency Medicine*, 15, 9.
26. **Cross, C. E., Halliwell, B., Borish, E. T., Pryor, W. A., Ames, B. N., Saul, R. L., Mccord, J. M., Harman, D.** (1987). Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med.* Oct;107(4): 526-45.
27. **Çakır, M.** (1997). Aspirin ve vitamin E ( $\alpha$ -Tokoferol)'nin farelerde (*Mus musculus*) karaciğer total süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerine etkileri. Ondokuz Mayıs Üni. Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Samsun, 50s.
28. **Çavdar, C., Sifil, A., Çamsarı, T.,** (1997). Reactive oxygen particles and antioxidant defence. *Office Journal of the Turkish Nephrology, Association*, 3-4: 92-95
29. **Dasgupta, N., De, B.** (2007). Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A comparative study. *Food Chemistry*, 101, 471-474.



30. **Deng, J.**, Cheng, W., Yang, G. (2011). A novel antioxidant activity index (AAV) for natural products using the DPPH assay. *Food Chemistry*, 125, 1430-1435.
31. **Deniz, B.O.**, Şermet,A., Tümer,C., Koçyiğit,Y., Taşdemir, N., Atmaca, M., Kelle, M., (2004). The changes in status of antioxidant defence system on temporary cerebral ischemia and the protective effect of vitamin E and C. *Dicle Tıp Dergisi*, cilt:31, sayı:3, (29-36).
32. **Dikici, İ.** (1999). Akut viral hepatitlerle interferon tedavisi görmüş kronik viral hepatitlerde oksidatif stresin araştırılması. Selçuk Üni. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Konya, 73s.
33. **Dinis, T. C. P.**, Madeira, V. M. C, Almeida, L. M., (1994). Action of phenolic derivates as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315, 161–169.
34. **Fecka, I.**, Turek, S. (2008). Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. *Food Chemistry*, 108 ( 2008 ) 1039-1053.
35. **Fırat, S.** (1997). Kobaylarda radyasyonla oluşan akciğer hasarında doku glutatyon , glutatyon peroksidaz, glutatyon- S-transferaz düzeyleri ve N-asetil sistein'in bu sistem üzerindeki etkisi. Gazi Üni. Tıp Fak. Biyokimya A.B.Dalı, Uzm.Tezi, Ankara, 95s.
36. **Flohe, L.** (1988). Glutathione peroxidase. *Basic Life Sci*, 49: 663-8.
37. **Flohe, L.**, Otting, F. (1984). Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol*, 105: 93-104.
38. **Franke, S. I. R.**, Ckless, K., Silveira, J. D., Rubensam, G., Brendel, M., Erdtmann, B., Henriques, J. A. P. (2004). Study of antioxidant and mutagenic activity of different orange juices. *Food Chemistry*, 88(1), 45-55.
39. **Frankel, E. N.**, Meyer, A. S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1925-1941.

40. **Freeman, B. A.**, Crapo, J. D. (1982). Free radicals and tissue injury. *Lab Invest*, 47:412-425.
41. **Frei, B.** (1994). Reactive oxgen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of Action., *The American Journal of Medicine*, 97(Suppl 3A), 26, 3A-5S-3A-12S.
42. **Fridovich, I.** (1975). Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*, 44: 147-59.
43. **Fridovich, I.** (1975). Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*, 44: 147-59.
44. **Fujise, H.** (1982). Enzyme induction in liver microsomes and alteration of benzo (a) pyrene metabolism in isolated liver cells from rats administered food addivites, *Nagoya Med, J.*, 26, 151-171.
45. **Gonzales, R.**, Auclair, C., Voisin, E., Gautero, H., Dhermy, D., Boivin, P. (1984). Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in red blood cells from patients with malignant diseases. *Cancer Res. Sep*; 44(9): 4137-9.
46. **Gökpınar, Ş.**, Koray, T., Ayçiçek, E., Göksan, T., Durmaz, Y., (2006). The algal antioxidants." E.Ü. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences. Volume 23, Suppl.(1/1) : 85-89
47. **Grisham, M. B.**, Granger, D. N. (1989). Metabolic sources of reactive oxygen metabolites during oxidant stress and ischemia with reperfusion. *Clin Chest Med. Mar*; 10(1):71-81.
48. **Grisham, M. B.**, Granger, D. N. (1989). Metabolic sources of reactive oxygen metabolites during oxidant stress and ischemia with reperfusion. *Clin Chest Med. Mar*; 10(1): 71-81.
49. **Guemouri, L.**, Artur, Y., Herbeth, B., Jeandel, C., Cuny, G., Siest, G. (1991). Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clin Chem. Nov*; 37(11): 1932-7.
50. **Gutteridge, J. M.** (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem. Dec*; 41(12 Pt 2): 1819-28.



51. **Gutteridge, J. M.** (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem. Dec*; 41(12 Pt 2): 1819-28.
52. **Güder, H.**, Karaca, Ş., (2009). Antioxidant system in dermatology. *Turkish Journal of Dermatology*, 3: 32-9.
53. **Gülçin, İ.** (2007). Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa. *Amino Acids*, 32; 431-438.
54. **Gülçin, İ.**, Elmastaş, M., Aboul-Enein, H. Y. (2010). Antioxidant activity of clove oil-A powerful antioxidant source. *Arabian Journal of Chemistry*
55. **Gülçin, İ.**, Huyut, Z., Elmastaş, M., Aboul-Enein, H.Y. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 3(2010), 43-53.
56. **Gülçin, İ.**, Köksal, E. (2008). Antioxidant Activity of Cauliflower (*Brassica oleracea* L.) *Turkish Journal Agriculture For*, 32 (2008) 65-78.
57. **Gülçin, İ.**, Oktay, M., Kireççi, E., Küfrevioğlu, Ö. İ. (2003). Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry*, 83, 371-382.
58. **Gülçin, İ.**, Uguz, M.T., Oktay, M., Beydemir, Ş., Küfrevioğlu, Ö.İ. (2004). Evaluation of the Antioxidant and Antimicrobial activities of Clary Sage ( *Salvia sclarea* L.). *Turkish Journal Agriculture For*, 28 (2004) 25-33.
59. **Halliwell, B.** (1987). Free radicals and metal ions in health and disease. *Proc Nutr Soc. Feb*; 46(1): 13-26.
60. **Halliwell, B.** (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence. *Lancet. Sep 10*; 344(8924): 721-4.
61. **Halliwell, B.**, Gutteridge, J. M. (1984). Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet. Jun 23*; 1(8391): 1396-7.

62. **Henry, L. E. A., Halliwell, B., Hall, D. O.** (1976). The superoxide dismutase activity of various photosynthetic organisms measured by a new and rapid assay technique. *Febs Letters*, 66, 2.
63. **Hinneburg, I., Dorman, H.J.D., Hiltunen, R.** (2006). Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry*, 97 (2006) 122-129.
64. **Hossain, M. B., Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A. B., Brunton, N. P.** (2010). Effect of drying method on the antioxidant capacity of six Lamiaceae herbs. *Food Chemistry*, 123(1), 85-91.
65. **Huang, D., Ou, B., Prior, R.** (2005). The chemistry behind antioxidant capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
66. **Hussain, A. L., Anwar, F., Sherazi, S. T. H., Przybylski, R.** (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*, 108(3), 986-995.
67. **Huysal, K.** (1999). Tip II Diabetlilerde eritrosit glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz aktiviteleri, hemoglobin glikozilasyonu ve lipid peroksidasyonunun incelenmesi. Atatürk Üni. Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Erzurum, 81s.
68. **Inglet, G. E., Chen, D., Berhow, M., Lee, S.** (2011). Antioxidant activity of commercial buck wheat flours and their free and bound phenolic compositions. *Food Chemistry*, 125, 923-929.
69. **Jialal, I., Fuller, C. J.** (1993). Oxidized LDL and antioxidants. *Clin. Cardiol. Apr*; 16(4 Suppl 1): I6-9.
70. **Ju, Z., Bramlage, W.J.** (1999). Phenolics and lipid-soluble antioxidants in fruit cuticle of apples and their antioxidant activities in model systems. *Postharvest Biology and Technology*, 16 ( 1999 ) 107-118.

71. **Juntachote, T.**, Berghofer, E., Siebenhandl, S., Bauer, F. (2006). The antioxidative properties of Holy basil and Galangal in cooked ground pork. *Meat Science*, 72(3), 446-456.
72. **Karataş, F.**, Aşkın, U., Halifeoğlu, İ., Dönder, E., (2006). An investigation of the levels of antioxidants vitamins (A, E and C), selenium in serum and glutathione peroxidase (GSH-Px) in erythrocytes of goitre patient's. 20(4): 277-280.
73. **Karataş, F.**, Tuğ, T., Konar, V., (2008). Serum antioxidant vitamins (A, E, C), selenium and melondialdehyde levels in workers exposed to aerosol. *Environmental and Occupational Lung Diseases Toraks Dergisi*, 9(1): 13-6.
74. **Lee, C. J.**, Chen, L. G., Chang, T. L., Ke, W. M., Lo, Y. F., Wang, C. C. (2011). The correlation between skin-care effects and phytochemical contents in Lamiaceae plants. *Food Chemistry*, 124(3), 833-841.
75. **Lee, J.**, Scagel, C.F. (2009). Chicoric acid found in basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. *Food Chemistry*, 115 (2009) 650-656.
76. **Liu, F.**, Wang, F., Yu, F., Fang, Y., Xin, Z., Yang, F., Xu, J., Zhao, L., Hu, Q. (2008). In vitro antioxidant and anticancer activities of ethanolic extract of selenium-enriched green tea. *Food Chemistry*, 111 (2008) 165-170.
77. **Lohachoompol, V.**, Mulholland, M., Srzednicki, G., Craske, J. (2008). Determination of anthocyanins in various cultivars of highbush and rabbiteye blueberries. *Food Chemistry*, 111 (2008) 249-254.
78. **Malencic, D.**, Maksimovic, Z., Popovic, M., Miladinovic. (2008). Polyphenol contents and antioxidant activity of soybean seed extracts. *Bioresource Technology*, 99 (2008) 6688-6691.
79. **Mannervik, B.** (1985). Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, 113: 490-5.
80. **Marsden, Hall, Brenner**, (1996). Reactive nitrogen and oxygen intermediaten and the kidney. In: Brenner B., Editor, *The Kidney*, fifth edition, Philadelphia, W.B Saunders, 735-753.

81. **Mata, A.T.**, Proença, C., Ferreira, A.R., Serralheiro, M.L.M., Nogueira, J.M.F., Araujo, M.E.M. (2007). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry*, 103 (2007) 778-786.
82. **Matkowski, A.** (2008). Plant in vitro culture for the production of antioxidants-A review. *Biotechnology Advances*, 26 (2008) 548-560.
83. **Maxwell, S. R.**, (1995). Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs. Mar*; 49(3):345-61.
84. **Mc Cord, J. M.**, Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* Nov 25; 244(22): 6049-55.
85. **Mc Cray, P. B.**, Gibson, D. D., Fong, K. L., Hornbrook, K. R. (1976). Effect of glutathione peroxidase activity on lipid peroxidation in biological membranes. *Biochim Biophys Acta.* Jun 22; 431(3): 459-68.
86. **Memişoğulları, R.**, (2005). The role of free radicals and the effect of antioxidants in diabetes. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 3: 30-39
87. **Michiels, C.**, Raes, M., Toussaint, O., Remacle, J. (1994). Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* Sep; 17(3): 235-48.
88. **Mitsuda, H.**, Yasumoto, K., Iwami K. (1966). Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Eiyoto Shokuryo*, 19, 210–214.
89. **Murray, R.K.**, Granner, D.K., Mayes, R.A., Rodwell, V.W. (1996). Fizyolojik öneme sahip lipidler. N. DİKMEN, T. ÖZGÜNEN. Harper'ın Biyokimyası, Yirmidördüncü baskı, Barış Kitabevi, İstanbul.
90. **Mutlu, M. M.**, Erdoğan, G., (2007). Kare dalga voltametri ile çeşitli vitamin tabletlerinde ve meyve sularında askorbik asit tayini için optimizasyon çalışmaları. *21.Ulusal Kimya Kongresi*, 23-27 Ağustos 2007
91. **Nadaroğlu, H.**, Demir, Y., Demir, N., (2008). Kapari (*Capparis spinosa* L.) bitkisinin antioksidan ve antiradikal özelliklerinin incelenmesi. *Türkiye 10.Gıda Kongresi*; 21-23 Mayıs 2008, Erzurum



92. **Necheles, T. F.**, Boles, T. A., Allen, D. M. (1968). Erythrocyte glutathione peroxidase deficiency and hemolytic disease of the newborn infant. *The Journal of Pediatrics*, 72, 3, 319-324. March.
93. **Nguye, P.M.**, Kwee, E.M., Niemeyer, E.D. (2010). Potassium rate alters the antioxidant capacity and phenolic concentration of basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. *Food Chemistry*, 123(4), 1235-1241.
94. **Nishimiki, M.**, Rao, N. A., Yagi, K. (1972). The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 46(2), 849-854.
95. **Oğuz, M.** (1990). Oksijen radikalleri. *C.Ü.Tıp Fak.Der.*, 12,2.
96. **Ou, B.**, Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., Deemer, E. K., (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3122- 3128.
97. **Oyaizu, M.**, (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japan Journal of Nutrition*, 44, 307-315.
98. **Paglia, D. E.**, Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med. Jul; 70(1): 158-69.*
99. **Pan, Y.**, Zhang, X., Wang, H., Liang, Y., Zhu, J., Li, H., Zhang, Z., Wu, Q., (2007). Antioxidant potential of ethanolic extract of *Polygonum cuspidatum* and application in peanut oil. *Food Chemistry*, 105(4), 1518-1524.
100. **Palmer, T.** (1990). Understanding Enzymes.
101. **Pekiner, B.D.**, (2003). Vitamin E as an antioxidant. *J. Fac. Pharm, Ankara* 32(4) 243-267.
102. **Politeo, O.**, Jukic, M., Milos, M. (2007). Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. *Food Chemistry*, 101 (2007) 379-385.



103. **Rachmilewitz, D.**, Karmeli, F., Okan, E., Samuni, A. (1994). A novel antiulserogenic stable radical prevents gastric mucosal lesions in rats. *Gut*, 35: 1181-1188.
104. **Rice-Evans, C. A.**, Diplock, A. T., Symons, M. C. R. (1991). *Techniques in free radicals research*. Elsevier, Amsterdam, vol 22.
105. **Rodriguez Vaquero, M. J.**, Tomassini Serravalle, L. R., Manca de Nadra, M. C., Strasser de Saad, A.M. (2010). Antioxidant capacity and antibacterial activity of phenolic compounds from argentinean herbs infusions. *Food Control*, 21(2010), 779-785.
106. **Rouatbi, M.**, Duquenoy, A., Giampaoli, P. (2007). Extraction of the essential oil of thyme and black pepper by superheated steam. *Journal of Food Engineering*, 78 (2007) 708-714.
107. **Ruch, R. J.**, Cheng, S. J, Klaunig, J. E., (1989). Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, 10, 1003–1008.
108. **Rusak, G.**, Komes, D., Likic, S., Horzic, D., Kovac, M. (2008). Phenolic content and antioxidant capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chemistry*, 110 (2008) 852-858.
109. **Shati, A.A.**, Elsaid, F.G. (2009). Effect of water extracts of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and ginger (*Zingiber officinale* Roscoe L.) on alcohol abuse. *Food and Chemical Toxicology*, 47 (2009) 1945-1949.
110. **Singleton, V.L.**, Orthofer, R.; Lamuela-Raventös, R.M., (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods of Enzymology*, 299, 152–178.
111. **Slater, T. F.** (1984). Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J.*, 222:1-15.
112. **Smirnoff, N.**, Pallanca, J. E. (1995). Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 24,16.

113. **Southorn, P. A.**, Powis, G. (1988). Free radicals in medicine. II. Involvement in human disease. *Mayo Clin Proc*, 63: 390-408.
114. **Strazzer, P.**, Guzzo, F., Levi, M. (2011). Correlated accumulation of anthocyanins and rosmarinic acid in mechanically stressed red cell suspensions of basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Plant Physiology*, 168(3), 288-293.
115. **Suhaj, M.** (2006). Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19 (2006) 531-537.
116. **Taşdemir, B.** (1997). Behçet hastalığında lipit peroksidasyonu, antioksidan durum ve nitrik oksit düzeylerinin değerlendirilmesi. O. M. Ü. Tıp Fak. Dermatoloji A. B. Dalı Uzm.Tezi, 53s.
117. **Telli, R.**, Kayacier, A. Gök, V., (2006). Hayvansal ve mikrobiyal kaynaklı doğal antioksidanlar. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, (2) 35-40.
118. **Tomer, D.**, Mc-Leman, L., Ohmine, S., Scherer, P. M., Murray, B. K., Oneill, K.L.(2007). Comparision of the total oxyradical scavenging capacity and oxygen radical absorbance capacity antioxidant assays. *Journal of Medicinal Food*, 10(2) ,337- 344.
119. **Toplan, S.**, Darıyerli, N., Özçelik, D., Akyolcu,M.C., (2003). Effects of experimental copper application on oxidant and antioxidant systems. *Cerrahpaşa J Med*, 34: 185-187.
120. **Tsai<sup>a</sup>, T.H.**, Tsai<sup>b</sup>, T.H., Chien<sup>a</sup>, Y.C., Lee<sup>c</sup>, C.W., Tsai<sup>d</sup>, P.J. (2008). In vitro antimicrobial activities against cariogenic streptococci and their antioxidant capacities: A comparative study of green tea versus different herbs. *Food Chemistry*, 110 (2008) 859-864.
121. **Ünal, D.** (1999). Serbest radikaller. Sendrom, Mart: 68-80.
122. **Vaquero, M.J.R.**, Serravalle, L.R.T., Nadra, M.C.M., Saad, A.M.S. (2010). Antioxidant capacity and antibacterial activity of phenolic compounds from argentinean herbs infusions. *Food Control*, 21 (2010) 779-785.

123. **Velioğlu, S.** (2006). The effect of extraction conditions on total polyphenol, antioxidant and antimicrobial activities of black and mate tea. *Ankara University Scientific Researches Projects*, 2005-0745-004-HPD
124. **Velioğlu, S.** (2007). Determination of antioxidant and antibacterial activities and phenolic compounds distribution of different tea extracts by HPLC. *Ankara University Scientific Researches Projects*, 2006-07-45-016-HPD
125. **Wheeler, C.R., Salzman, J.A.** (1990). Automated assays for superoxide dismutase, catalase, Glutathione peroxidase and Glutathione reductase activity. *Analytical Biochemistry*, 184, 193-199.
126. **Wojdyło, A., Oszmianski, J., Czemerys, R.** (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105 (2007) 940-949.
127. **Wood, J. E., Senthilmohan, S. T., Peskın, A. V.** (2003). Antioxidant activity of procyanidin-containing plant extract at different pHs. *Food Chemistry*, 77, 115-161.
128. **Yanbeyi, S.** (1999). Aspirin ve antioksidant butylated hydroxyanisole'ün tavşanlarda eritrosit total katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine etkileri. Ondokuz Mayıs Üni. Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Samsun, 88s.
129. **Yen, G.C., Chen, H.Y.** (1995). Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 27-32.
130. **Yoo, K.M., Lee, C.H., Lee, H., Moon, B.K., Lee, C.Y.** (2008). Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food Chemistry*, 106 (2008) 929-936.
131. **Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W.** (1999). The determination of flavonoid contents on mulberry and their scavenging effects on superoxide radical. *Food Chemistry*, 64, 555-559.

## TEŞEKKÜR

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

Yüksek lisans eğitimim süresince desteğini gördüğüm Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ayten SAĞIROĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Yrd. Doç. Dr. Yüksel BAYRAK, Yrd. Doç. Dr. Taliha SİDİM, Araş.Gör. Dr. Aytaç GÜLTEKİN, Araş. Gör. Murat BATIGÖÇ, Araş. Gör. Dr. Çiğdem BATIGÖÇ hocalarıma da teknik desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Aynı laboratuarda ve derslerde birlikte zaman geçirdiğimiz ve aynı ortamda mutluluk duyduğumuz yüksek lisans öğrencisi Hatice AYDIN'a ve kimya bölüm hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Beni yetiştiren ve her konuda yanımda olduklarını hep hissettiren ve yüksek lisans eğitimim boyunca manevi desteklerini esirgemeyen aileme ve çalışmamın değişik aşamalarında bana moral ve güç veren arkadaşlarımda sonsuz teşekkür ederim.

Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi (BİBAM)'nde yaptığım bitki su ekstraktların liyofilize işlemi için teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından desteklenen "Çeşitli Bitkilerin Antioksidan Özelliklerinin İncelenmesi" başlıklı TÜBAP 113- no'lu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

## ÖZGEÇMİŞ

**Latifşah ŞİT**

[ltfshkmy@hotmail.com](mailto:ltfshkmy@hotmail.com)

(0536) 859 64 62



1981 Ardahan doğumluyum. İlk, orta ve lise öğrenimimi sırasıyla Ardahan Hoçvan Bayramoğlu Köyü İlköğretim Okulu, Ardahan Hoçvan Binbaşar Ortaokulu ve İstanbul Maltepe Ertuğrul Gazi Lisesi'nde tamamladıktan sonra öğrenimime 2002-2007 yılları arasında Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde devam ettim. 2007 yılında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladım. Lisans öğrenimi sırasında zorunlu stajyerimi Edirne Olin Entegre Yağ Sanayi A.Ş. ve Edirne Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı AR-GE Laboratuvarlarında tamamladım. 2010 yılında Matsan İlaç Sanayi Ltd. Şti.'de kalite kontrol sorumlusu olarak çalışıyorum.