

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

***DAPHNE SERİCEA* VE *DAPHNE GNİDİOİDES* BİTKİ EKSTRAKTLARININ  
BİLEŞİMLERİNİN VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

**Timur TONGUR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**2014**



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

***DAPHNE SERİCEA* VE *DAPHNE GNİDİOİDES* BİTKİ EKSTRAKTLARININ  
BİLEŞİMLERİNİN VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

**Timur TONGUR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi  
tarafından 2012.02.0121.033 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**2014**



T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

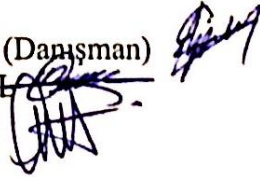
***DAPHNE SERİCEA* VE *DAPHNE GNİDİOİDES* BİTKİ EKSTRAKTLARININ  
BİLEŞİMLERİNİN VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

**Timur TONGUR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

Bu tez 17.06/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Erol AYRANCI (Danışman)  
Doç. Dr. Birsen Ş. OKSAL  
Yrd. Doç. Dr. Bülent ŞİK





## ÖZET

### ***DAPHNE SERİCEA* VE *DAPHNE GNİDİOIDES* BİTKİ EKSTRAKTLARININ BİLEŞİMLERİNİN VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

**Timur TONGUR**

**Yüksek lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Erol AYRANCI**

**Mayıs 2014, 123 Sayfa**

Bu çalışmada, *Thymelaeaceae* familyasına ait *Daphne sericea* L. ve *Daphne gnidioides* L. bitkilerinin ekstraktları elde edilerek bileşimlerinin incelenmesi ve antioksidan aktivitelerinin çeşitli metotlarla saptanması amaçlanmıştır. Her iki bitki toplanıp kurutulduktan sonra aseton, metanol ve n-hekzan ile oda sıcaklığında üç gün boyunca çalkalanma sonucu bu çözücülerde çözünen ham ekstraktlar elde edilmiştir.

Bitki ekstraktlarının kimyasal içeriği, HPLC-DAD ile fenolik bileşen profilinin çıkarılması ile, klorofil a, klorofil b, toplam karotenoid, flavonoid ve fenolik bileşen içeriği analizleri ile aydınlatılmaya çalışılmıştır. *In vitro* antioksidan (radikal sönmüleme) aktivitelerini belirlemek için DPPH, ABTS<sup>+</sup>, hidroksil (·OH) ve süperoksit anyon radikali (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) yakalama testleri ile oksijen radikali absorpsiyon (ORAC) testleri uygulanmıştır. Bitki ekstraktlarının lipid oksidasyon reaksiyonunu inhibe etme yeteneğini ölçen antioksidan aktivite testleri ise tiyobarbitürik asitle reaksiyona giren maddelerin (TBARS) takip edilmesi ile düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve büyükbaş hayvan beyni lipozomlarında (BBE) lipid peroksidasyon inhibisyonunun ölçülmesi testleri ile gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen sonuçlar, önemli düzeyde fenolik bileşenler içeren metanol ve aseton ekstraktlarının genel olarak göz ardı edilemeyecek bir düzeyde radikal yakalama aktivitesi gösterdiklerini ortaya koymuştur. Çoğu durumda da bu ekstraktların pozitif kontrol antioksidanlar olarak alınan BHT, α-tokoferol, ferulik asit ve kersetin bileşiklerinden bazıları ile kıyaslanabilecek derecede lipid oksidasyon inhibitörü olarak etkileri olduğunu net bir şekilde görülmüştür. Özellikle *D. gnidioides* bitkisinin metanolik ham ekstraktının pek çok durumda pozitif kontrollerin bir ya da birkaçına çok yakın *in vitro* antioksidan aktivitesi ve lipid oksidasyonunu inhibe edici özellikler gösterdiği belirlenmiştir.

**ANAHTAR KELİMELER:** Antioksidan, antioksidan aktivite, bitki ekstraktı, *D. gnidioides*, *D. sericea*, fenolik bileşik.

**JÜRİ:** Prof. Dr. Erol AYRANCI (Danışman)

Doç. Dr. Birsen Ş. OKSAL

Yrd. Doç. Dr. Bülent ŞİK

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF THE COMPOSITION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF DAPHNE SERICEA AND DAPHNE GNIDIODES

Timur TONGUR

MSc in Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Erol AYRANCI

May 2014, 123 Pages

The aim of the study is to investigate the composition of the extracts obtained from *Daphne sericea* L. ve *Daphne gnidioides* L, belonging to *Thymelaeaceae* family, and their antioxidant activities by various methods. Crude extracts were isolated using acetone, methanol and n-hexane by shaking for three days at room temperature after being harvested and dried.

Chemical composition of the plant extracts was investigated by performing phenolic composition profile analysis using HPLC-DAD, chlorophyll a, chlorophyll b, total carotenoid, flavanoid and phenolic content analyses. DPPH<sup>·</sup>, ABTS<sup>·+</sup>, hydroxyl (<sup>·</sup>OH) and superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) scavenging and oxygen radical absorption (ORAC) assays were performed to determine *in vitro* antioxidant (radical scavenging) activities. Antioxidant activity tests measuring lipid oxidation inhibiting capacity were carried using follow up of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and measuring lipid oxidation inhibition capacity in low density lipoprotein (LDL) and bovine brain liposomes (BBE).

The results obtained showed that methanol and acetone extracts containing phenolic compounds at important levels generally exhibited radical scavenging activities at levels not to be underestimated. They were found to have effects as lipid oxidation inhibitors comparable with some of the positive control antioxidants, BHT,  $\alpha$ -tocopherol, ferulic acid and quercetin, used to compare with them under the same conditions. Methanolic crude extract of *D. gnidioides*, especially, was found to exhibit *in vitro* antioxidant activity and lipid oxidation inhibiting properties similar to one or more of the positive controls in most cases.

**KEYWORDS:** Antioxidant, antioxidant activity, plant extract, *D. gnidioides*, *D. sericea*, phenolic compound.

**COMMITTEE:** Prof.Dr. Erol AYRANCI (Supervisor)  
Assoc. Prof. Dr. Birsen Ş. OKSAL  
Asst. Prof. Dr. Bülent ŞIK



## ÖNSÖZ

Günümüzde insan hayatının sağlıklı bir şekilde devam edememesinin en büyük nedenlerinden biri olan kanser hastalığı, pek çok çevresel ve biyolojik etmene bağlıdır. Kansere neden olan radikalik bileşenlerin oluşmasının önlenmesi ve etkilerinin azaltılması için antioksidan özellikli formulasyonların kullanımı gerekmektedir. Bunlara sonradan eklenen sentetik antioksidan maddelerin bazı kanserojenik problemlere neden olduğu şüphesi mevcuttur. Bu nedenle doğal kaynaklı ve antioksidan aktivite özelliklerine sahip ürünlerden sadece gıda sektöründe değil, tıp, biyokimya ve eczacılık alanında da yararlanılması ve çeşitli ilaç ve karışımlarda katkı maddesi olarak yer alması tercih edilir bir durum haline gelmiştir.

Bu çalışmada *Daphne Gnidioides* ve *Daphne Sericea* bitki ekstraktlarının fenolik bileşen içerikleri ve antioksidan aktiviteleri farklı metotlarla ölçülmüştür.

Bana bu konuda çalışma fırsatı yaratan, tez konumun belirlenmesinden yazımına kadar destek olan, bilgisi ve tecrübesi ile bana yol gösteren değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Erol AYRANCI'ya,

Laboratuvar çalışmalarında bilgisi ve tecrübesi ile bana her zaman destek olan, görüş ve önerileri ile yol gösteren hocam Sayın Dr. Naciye ERKAN'a,

Tezimin çalışma konusu olan bitki türlerinin bulunmasında ve taksonomisinde yardımcı olan hocam Sayın Dr. İlker Çinbilgel'e,

Projeye mali destek veren Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar ve Projeler Yönetim Birimi'ne, araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Son olarak varlıkları ve destekleri ile her zaman yanımda olan aileme, eşime ve sevgili oğluma sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

## İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMASI	3
2.1. Doğal Antioksidan Özellikli Bitkiler	3
2.2. Tıbbi Bitkilerin Prooksidan ve Toksik Özellikleri	4
2.3. Daphne Gnidioides ve Daphne Sericea	5
2.3.1. Daphne gnidioides	5
2.3.2. Daphne sericea	5
2.4. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar	6
2.4.1. Engelleyici antioksidanlar	8
2.4.1.1. Geçiş metalleri ile şelatlama	8
2.4.1.2. Singlet oksijen yakalayıcıları	8
2.4.2. Zincir kıran antioksidanlar	10
2.4.3. Enzimatik antioksidanlar	11
2.4.3.1. Superoksit dismutaz (SOD)	11
2.4.3.2. Katalaz	11
2.4.3.3. Glutatyon peroksidaz (GPx)	11
2.4.3.4. Glutatyon redüktaz (GR)	11
2.4.3.5. Glutatyon-S-transferaz (GST)	12
2.4.4. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	12
2.4.4.1. C vitamini	12
2.4.4.2. E vitamini	12
2.4.4.3. Karotenoidler	13
2.4.4.4. Polifenolik bileşenler	14
2.4.4.5. Bütillenmiş hidroksianisol (BHA) ve bütillenmiş hidroksitoluen (BHT)	20
2.4.4.6. Nordihidroguareyetik asit (NDGA)	21
2.4.4.7. Gallatlar	21
2.4.4.8. Tersiyer butilhidrokinon (TBHQ)	22
2.5. Antioksidantların Aktivitesini Ölçmek İçin Kullanılan Bazı Metotlar	22
2.5.1. DPPH radikali yakalama aktivitesi	23
2.5.2. ABTS <sup>+</sup> radikal katyon yakalama aktivitesi	23
2.5.3. Hidroksil radikali ( <sup>•</sup> OH) yakalama aktivitesi (deoksiriboz degradasyon) testi	23
2.5.4. Oksijen radikali absorban kapasitesi (ORAC) testi	24
2.5.5. Süperoksit radikali (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) yakalama aktivitesi	24
2.5.6. Lipid oksidasyon inhibisyonunun gıda lipidlerinde ölçümü; Tiyobarbitürik asitle reaksiyona giren maddeler (TBARS) testi	24
2.5.7. Lipid oksidasyon inhibisyonunun biyolojik olarak önemli lipidlerde ölçümü	24

2.5.7.1. LDL oksidasyonu inhibisyonunun ölçülmesi	25
2.5.7.2. Büyükbaş hayvan beyni lipozomları (BBE)'nda lipid peroksidasyon inhibisyonunun ölçülmesi	25
2.5.8. Demir tiyosiyanat metodu (FTC) ile lipid peroksidasyonun ölçülmesi	25
3. MATERYAL VE METOT	26
3.1. Kullanılan Cihazlar	26
3.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	26
3.3. Daphne Gnidioides ve Daphne Sericea Bitkilerinin Toplanması ve Analize Hazırlanması	26
3.4. Daphne Gnidioides ve Daphne Sericea Bitki Ekstraktlarının Eldesi	27
3.5. Fenolik Bileşenlerin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) Cihazı ile Belirlenmesi	28
3.6. Klorofil A, Klorofil B ve Toplam Karotenoid İçeriğinin Belirlenmesi	29
3.7. Toplam Flavonoid İçeriği (TFC)'nin Belirlenmesi	30
3.8. Toplam Fenolik İçeriği (TPC)'nin Belirlenmesi	30
3.9. DPPH· Radikali Yakalama Testi	30
3.10. ABTS <sup>+</sup> Radikali Yakalama Testi	31
3.11. Hidroksil (·OH) Radikali Yakalama Testi (deoksiriboz degradasyon)	32
3.12. Süperoksit Anyon Radikali (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) Yakalama Testi	32
3.13. Oksijen Radikali Absorpsiyon Kapasitesi (ORAC)	32
3.14. Tiyobarbitürik Asitle Tepkimeye Giren Maddeler (TBARS) Testi	33
3.15. LDL Oksidasyonu İnhibisyonunun Ölçülmesi Testi	34
3.16. Büyükbaş hayvan beyni lipozomlarında lipid peroksidasyon inhibisyonunun ölçülmesi	34
3.17. Ferrik tiyosiyanat (FTC) lipid peroksidasyon inhibisyonunun ölçülmesi	34
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	35
4.1. Bitki Ekstraktlarında HPLC Cihazı ile Belirlenen Fenolik Bileşenler	35
4.2. DPPH· Radikali Yakalama Aktivitesi Sonuçları	49
4.3. ABTS <sup>+</sup> Radikali Yakalama Aktivitesi Sonuçları	54
4.4. Klorofil a, Klorofil b ve Toplam Karotenoid İçeriği Sonuçları	60
4.5. Toplam Fenolik İçeriği Sonuçları	63
4.6. Toplam Flavonoid İçeriği Sonuçları	65
4.7. Büyükbaş Hayvan Beyni (BBE) Lipozomlarında Lipid Peroksidasyon İnhibisyonunun Ölçümü Sonuçları	67
4.8. Süperoksit Anyon Radikali (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) Yakalama Aktivitesi Sonuçları	71
4.9. Tiyobarbitürik Asitle Tepkimeye Giren Maddeler (TBARS) Testinin Sonuçları	75
4.10. LDL Oksidasyonu İnhibisyonunun Test Sonuçları	79
4.11. Oksijen Radikali Absorpsiyon Kapasitesi (ORAC) Testi Sonuçları	80
4.12. Uygulanan Diğer Antioksidan Aktivite Testleri	86
5. SONUÇ	87
6. KAYNAKLAR	88
7. EKLER	95
EK_1. DPPH· Radikali Yakalama Testi Verileri	95
EK_2. ABTS <sup>+</sup> Radikali Yakalama Testi Verileri	98
EK_3. Klorofil a, Klorofil b ve Toplam Karotenoid İçeriği Testi Verileri	102
EK_4. Toplam Fenolik İçeriği (TPC) Verileri	103
EK_5. Toplam Flavonoid İçeriği (TFC) Verileri	104

EK_6. Büyükbaş Hayvan Beyni Lipozomları (BBE)'nda Lipid Peroksidasyon İnhibisyonunun Ölçümü Verileri.....	105
EK_7. Süperoksit Anyon Radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) Yakalama Aktivitesi Verileri.....	112
EK_8. Tiyobarbitürik Asitle Tepkimeye Giren Maddeler Testinin Verileri.....	114
EK_9. LDL Oksidasyonu İnhibisyonunun Test Verileri.....	122

ÖZGEÇMİŞ

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

g	Gram
R <sup>2</sup>	Korelasyon katsayısı
L	Litre
µM	Mikromolar
mg	Miligram
mM	Milimolar
µg/mL	Mikrogram / Mililitre
nm	Nanometre
nM	Nanomolar
°C	Santigrat derece
%	Yüzde

### Kısaltmalar

AAPH	2,2'-azobis (2-amidino-propan) dihidroklorür)
ABTS	2,2'-azinobis (3-etil-benzothiazolin-6-sulfonoik asit)
BBE	Büyükbaş hayvan beyni ekstraktı
BHA	Bütillenmiş hidroksi anisol
BHT	Bütillenmiş hidroksi toluen
CAT	Katalaz
DAD	Diyot array dedektör
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EKST	Ekstrakt
FCR	Folin-Ciocalteu reaktifi
FTC	Demir tiyosiyanat metodu
G.A.	Gallik asit
GAE	Gallik asit eşdeğeri
GPx	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	İndirgenmiş glutasyon
GST	Glutasyon-S-transferaz
HAT	Hidrojen atomu transferi
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IC <sub>50</sub>	Yarı maksimal inhibisyon konsantrasyonu
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
MDA	Malondialdehit
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid
NBT	Nitrobluetetrazolium
NDGA	Nordihidroguayaretik asit
ORAC	Oksijen radikali absorban kapasitesi
PBS	Fosfat tamponu tuzu
PMS	Fenazin metosülfat

RNS	Reaktif azot türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
SD	Standart sapma
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SOD	Süperoksit dismutaz
TBA	Tiyobarbitürik asit
TBARS	Tiyobarbitürik asitle tepkimeye giren maddeler
TCA	Trikloroasetik asit
TEAC	Troloks eşdeğeri antioksidant kapasite
TET	Tek elektron transferi
THBQ	Tersiyer butilhidrokinon
TPC	Toplam fenolik içerik
UA	Ürik asit

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Flavonoide (a) ve flavonollere (b,c) geçiş metallerinin şelatlanması.....	9
Şekil 2.2. (a) $\beta$ -karotenin, (b) luteinin, (c) astaksantin yapıları.....	9
Şekil 2.3. Tokoferol ve tokotrienolün kimyasal yapıları.....	10
Şekil 2.4. C vitaminin (L-askorbik asit) yapısı .....	12
Şekil 2.5. $\alpha$ -tokoferolün yapısı.....	13
Şekil 2.6. $\alpha$ -tokoferolün lipid peroksil radikali ile reaksiyonu.....	13
Şekil 2.7. Likopenin yapısı.....	14
Şekil 2.8. Flavonoidlerin genel yapısı.....	14
Şekil 2.9. (a) Apigenin, (b) luteolin, (c) krisin ve (d) orientinin yapıları.....	16
Şekil 2.10. (a) Kamferol, (b) kersetin, (c) miricetin, (d) ramnetin, (e) rutin, (f) kuersitrin ve (g) fisetin yapıları .....	16
Şekil 2.11. (a) Kateşin, (b) epikateşin, (c) epikateşingallat, (d) epigallokateşingallatın yapıları.....	17
Şekil 2.12. (a) Genistin ve (b) daidzeinin yapıları .....	18
Şekil 2.13. (a) Taksifolin ve (b) silibinin yapıları.....	18
Şekil 2.14. (a) Malvidin, (b) siyanidin, (c) apigenidin, (d) delfinidin, (e) pelargonidin, (f) peonidin yapıları.....	18
Şekil 2.15. Temel fenolik asit, hidrokşisinamik ve hidrokşibenzoik asit yapıları.....	19
Şekil 2.16. (a) p-kumarik asit, (b) kafeik asit ve (c) ferulik asit yapıları.....	19
Şekil 2.17. (a) Salisilik asit, (b) gallik asit ve (c) vanilik asit yapıları.....	20
Şekil 2.18. BHA izomerik yapılar (a) 2-tert-butil-4- hidrokşianisol, (b) 3-tert-butil-4- hidrokşianisol.....	20
Şekil 2.19. BHT'nin yapısı.....	20
Şekil 2.20. Nordihidroguareyetik asit (NDGA) yapısı.....	21
Şekil 2.21. Propil gallat yapısı.....	21

Şekil 2.22. Tersiyer butilhidrokinon (TBHQ) yapısı.....	22
Şekil 3.1. <i>Daphne Gnidioides</i> .....	27
Şekil 3.2. <i>Daphne Sericea</i> .....	27
Şekil 3.3. Klorofilin yapısı.....	30
Şekil 3.4. DPPH' sönümlenme mekanizması.....	31
Şekil 3.5. ABTS <sup>+</sup> yapısı.....	32
Şekil 3.6. MDA-TBA kompleksinin oluşumu.....	33
Şekil 4.1. Fenolik bileşik standartları karışımının 310 nm'de gözlenen kromatogramı.....	36
Şekil 4.2. Fenolik bileşik standartları karışımının 330 nm'de gözlenen kromatogramı.....	36
Şekil 4.3. Fenolik bileşik standartları karışımının 250 nm'de gözlenen kromatogramı.....	36
Şekil 4.4. Fenolik bileşen standart karışımının 280 nm'de gözlenen kromatogramı.....	37
Şekil 4.5. Fenolik bileşen standart karışımının 370 nm'de gözlenen kromatogramı.....	37
Şekil 4.6. Apigenin için 330 nm'de gözlenen kromatogram.....	38
Şekil 4.7. Ramnetin için 370 nm'de gözlenen kromatogram.....	38
Şekil 4.8. Fenolik bileşen standartlarının kalibrasyon eğrileri.....	39
Şekil 4.9. ESA'ye ait 330 nm'deki kromatogram. a) 12.-30. Dakikalar arası kromatogram görüntüsü. b) 46.-62. Dakikalar arası kromatogram görüntüsü. Mavi kromatogram: İşlem görmemiş ekstrakt. Kırmızı kromatogram: İşlem görmüş kromatogram.....	42
Şekil 4.10. ESM'ye ait 330 nm'deki kromatogram. a) 10.-26. Dakikalar arası kromatogram görüntüsü. b) 44.-54. Dakikalar arası kromatogram görüntüsü. Mavi kromatogram: İşlem görmemiş ekstrakt. Kırmızı kromatogram: İşlem görmüş ekstrakt.....	43
Şekil 4.11. EGA'ya ait 330 nm'deki (a,b) ve 370 nm'deki (c) kromatogramlar. a) 6.-24. Dakikalar arası kromatogram görüntüsü. b) 44.-56. Dakikalar arası kromatogram görüntüsü. c) 40.-52. Dakikalar arası kromatogram görüntüsü Mavi kromatogram: İşlem görmemiş ekstrakt. Kırmızı kromatogram: İşlem görmüş ekstrakt.....	44
Şekil 4.12. EGM'ye ait 330 nm'deki (a,b) ve 370 nm'deki (c) kromatogramlar. a) 8.-24. Dakikalar arası kromatogram görüntüsü. b) 32.-52. Dakikalar	



arası kromatogram görüntüsü. c) 40.-52. Dakikalar arası kromatogram görüntüsü Mavi kromatogram: İşlem görmemiş ekstrakt. Kırmızı kromatogram: İşlem görmüş ekstrakt.....	45
Şekil 4.13. EGA 'e ait 330 nm'deki kromatogram .....	46
Şekil 4.14. DPPH testi sonucu ESA için elde edilen konsantrasyon-% inhibisyon grafiği.....	51
Şekil 4.15. DPPH testi sonucu ESM için elde edilen konsantrasyon-% inhibisyon grafiği.....	51
Şekil 4.16. DPPH testi sonucu EGA için elde edilen konsantrasyon-% inhibisyon grafiği.....	52
Şekil 4.17. DPPH testi sonucu EGM için elde edilen konsantrasyon-% inhibisyon grafiği.....	52
Şekil 4.18. DPPH testi sonucu EGH için elde edilen konsantrasyon-% inhibisyon grafiği.....	52
Şekil 4.19. DPPH testi sonucu ESH için elde edilen konsantrasyon-% inhibisyon grafiği.....	53
Şekil 4.20. ABTS <sup>+</sup> testi sonucu ESA için elde edilen konsantrasyon-% inhibisyon grafiği.....	57
Şekil 4.21. ABTS <sup>+</sup> testi sonucu ESM için elde edilen konsantrasyon-% inhibisyon grafiği.....	57
Şekil 4.22. ABTS <sup>+</sup> testi sonucu EGA için elde edilen konsantrasyon-% inhibisyon grafiği.....	57
Şekil 4.23. ABTS <sup>+</sup> testi sonucu EGM için elde edilen konsantrasyon-% inhibisyon grafiği.....	58
Şekil 4.24. ABTS <sup>+</sup> testi sonucu EGH için elde edilen konsantrasyon-% inhibisyon grafiği.....	58
Şekil 4.25. ABTS <sup>+</sup> testi sonucu ESH için elde edilen konsantrasyon-% inhibisyon grafiği.....	58
Şekil 4.26. ABTS <sup>+</sup> testi sonucu Troloks için elde edilen konsantrasyon-% inhibisyon grafiği.....	59
Şekil 4.27. Klorofil a ve klorofil b standart çözeltileri için elde edilen kalibrasyon eğrileri. a) Klorofil a metanol çözeltisi b) Klorofil b metanol çözeltisi c) Klorofil a dietileter çözeltisi d) Klorofil b dietileter çözeltisi.....	61

Şekil 4.28. TPC testi sonucu gallik asit için 760 nm de elde edilen konsantrasyon-absorbans eğrisi.....	64
Şekil 4.29. TFC testi sonucu rutin için 430 nm’de elde edilen konsantrasyon-absorbans eğrisi.....	66
Şekil 4.30. BBE’de meydana gelen lipid peroksidasyonunun bitki ekstraktları ve saf antioksidanlarca % inhibisyonu.....	70
Şekil 4.31. Süperoksit anyon radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ) oluşumunun farklı konsantrasyonlardaki bitki ekstraktları ve pozitif kontrol antioksidanlarınca %inhibisyonu.....	74
Şekil 4.32. TBARS testi sonucu, bitki ekstraktları ve pozitif kontrol antioksidanları için farklı konsantrasyonlar ve inkübasyon sürelerinde elde edilen % inhibisyon değerleri.....	78
Şekil 4.33. LDL lipid peroksidasyonunun bitki ekstraktları ve saf antioksidanlarca % inhibisyonunun çubuk grafikler halinde gösterimi.....	80
Şekil 4.34. ORAC testi sonucu troloks için elde edilen konsantrasyon-absorbans eğrisi.....	85
Şekil 4.35. ORAC testi sonucu troloksa ve pozitif kontrollere ait saniye-relatif floresans eğrileri.....	85

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Reaktif azot türleri (RNS) ve reaktif oksijen türleri (ROS).....	7
Çizelge 2.2. Metil grupları ile tokoferol ve tokotrienollar arasındaki ilişki .....	10
Çizelge 2.3. Flavonoidlerin yapılarına göre grupları.....	15
Çizelge 3.1. HPLC mobil faz akış programı.....	28
Çizelge 4.1. Bitki ekstraktları çözgen tablosu.....	35
Çizelge 4.2. Fenolik bileşenlerin alıkonma süreleri ve dalga boyları.....	35
Çizelge 4.3. Fenolik bileşiklerin kalibrasyon bulguları; verilerin temsil ettiği en iyi doğru denklemleri ve korelasyon katsayılarının kareleri ( $R^2$ ). Denklemlerdeki “x” mg/kg olarak konsantrasyonu, y ise pik alanını göstermektedir.....	40
Çizelge 4.4. HPLC-DAD cihazında analiz edilen bitki ekstraktı çözeltilerinin konsantrasyon değerleri.....	41
Çizelge 4.5. İşlem görmemiş ekstraktlarda tespit edilen fenolik bileşik konsantrasyonlarının mg/100 g ekst olarak değeri .....	47
Çizelge 4.6. Asit hidrolizlenmiş ekstraktlarda tespit edilen fenolik bileşik konsantrasyonlarının mg/100 g ekst olarak değeri.....	47
Çizelge 4.7. Fenolik bileşen genel sonuçlar (mg / 100g ekstrakt).....	48
Çizelge 4.8. ESA için DPPH testi sonucu elde edilen ortalama absorbands ve % inhibisyon değerleri.....	49
Çizelge 4.9. ESM için DPPH testi sonucu elde edilen ortalama absorbands ve % inhibisyon değerleri.....	49
Çizelge 4.10. EGA için DPPH testi sonucu elde edilen ortalama absorbands ve % inhibisyon değerleri.....	50
Çizelge 4.11. EGM için DPPH testi sonucu elde edilen ortalama absorbands ve % inhibisyon değerleri.....	50
Çizelge 4.12. EGH için DPPH testi sonucu elde edilen ortalama absorbands ve % inhibisyon değerleri.....	50
Çizelge 4.13. ESH için DPPH testi sonucu elde edilen ortalama absorbands ve % inhibisyon değerleri .....	51

Çizelge 4.14. Bitki ekstraktları için DPPH testi sonucunda hesaplanan IC <sub>50</sub> değerleri	53
Çizelge 4.15. ESA için ABTS <sup>+</sup> testi sonucu elde edilen ortalama absorbans ve % inhibisyon değerleri	54
Çizelge 4.16. ESM için ABTS <sup>+</sup> testi sonucu elde edilen ortalama absorbans ve % inhibisyon değerleri	55
Çizelge 4.17. EGA için ABTS <sup>+</sup> testi sonucu elde edilen ortalama absorbans ve % inhibisyon değerleri	55
Çizelge 4.18. EGM için ABTS <sup>+</sup> testi sonucu elde edilen ortalama absorbans ve % inhibisyon değerleri	55
Çizelge 4.19. EGH için ABTS <sup>+</sup> testi sonucu elde edilen ortalama absorbans ve % inhibisyon değerleri	56
Çizelge 4.20. ESH için ABTS <sup>+</sup> testi sonucu elde edilen ortalama absorbans ve % inhibisyon değerleri	56
Çizelge 4.21. Troloks için ABTS <sup>+</sup> testi sonucu elde edilen ortalama absorbans ve % inhibisyon değerleri	56
Çizelge 4.22. Bitki ekstraktları için ABTS <sup>+</sup> testi sonucunda hesaplanan IC <sub>50</sub> değerleri	59
Çizelge 4.23. Bitki ekstraktları için ABTS <sup>+</sup> testi sonucunda hesaplanan TEAC değerleri	59
Çizelge 4.24. Klorofil içeriğini belirlemek için uygulanan yöntemde ekstrakt çözeltilerinin hazırlanması ile ilgili bilgiler	60
Çizelge 4.25. Metanol ve dietil eter içinde farklı konsantrasyonlarda hazırlanan klorofil standartları için farklı dalga boylarında elde edilen ortalama absorbans değerleri	61
Çizelge 4.26. Klorofil a ve klorofil b içeriği testi sonucu, bitki ekstraktları için elde edilen ortalama absorbans değerleri	62
Çizelge 4.27. Absorbanstan elde edilen ortalama C <sub>a</sub> , C <sub>b</sub> ve C <sub>x+c</sub> değerleri (µg/mL)	62
Çizelge 4.28. Bitki ekstraktlarının klorofil a (C <sub>a</sub> ), klorofil b (C <sub>b</sub> ) ve toplam karotenoid (C <sub>x+c</sub> ) içeriği için mg/100 g ekstrakt cinsinden sonuç tablosu	63
Çizelge 4.29. Toplam fenolik bileşen içeriği testinde standart olarak kullanılan gallik asit (GA) için 760 nm'de elde edilen ortalama absorbans değerleri	64
Çizelge 4.30. Toplam fenolik bileşen testi sonucu bitki ekstraktları için 760 nm'de	

elde edilen absorbans değerleri.....	65
Çizelge 4.31. Bitki ekstraktlarına ait toplam fenolik bileşen içeriği (TPC, mg GAE/g ekst) değerleri.....	65
Çizelge 4.32. TFC testi sonucu rutin standardı için 430 nm de elde edilen ortalama absorbans değerleri.....	66
Çizelge 4.33. TFC testi sonucu bitki ekstraktları için elde edilen ortalama absorbans değerleri.....	67
Çizelge 4.34. Bitki ekstraktlarına ait toplam flavanoid bileşen içeriği (TFC, mg rutin/g ekstrakt) değerleri.....	67
Çizelge 4.35. BBE testinde ekstrakt absorbanlarının ortalamaları.....	68
Çizelge 4.36. BBE testi sonucu, pozitif kontrol antioksidanların kullanıldığı durumlarda elde edilen ortalama absorbans değerleri.....	68
Çizelge 4.37. BBE testi sonucu, ekstraktlarda elde edilen ortalama %inhibisyon değerleri.....	68
Çizelge 4.38. BBE testi sonucu, pozitif kontrollerde elde edilen ortalama %inhibisyon değerleri.....	69
Çizelge 4.39. Süperoksit anyon radikali yakalama aktivite testi sonucu ESA için elde edilen ortalama absorbans ve hesaplanan % inhibisyon değerleri.....	71
Çizelge 4.40. Süperoksit anyon radikali yakalama aktivite testi sonucu ESM için elde edilen ortalama absorbans ve hesaplanan % inhibisyon değerleri.....	71
Çizelge 4.41. Süperoksit anyon radikali yakalama aktivite testi sonucu EGA için elde edilen ortalama absorbans ve hesaplanan % inhibisyon değerleri.....	72
Çizelge 4.42. Süperoksit anyon radikali yakalama aktivite testi sonucu EGM için elde edilen ortalama absorbans ve hesaplanan % inhibisyon değerleri.....	72
Çizelge 4.43. Süperoksit anyon radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) yakalama aktivite testi sonucu Ferulik asit için elde edilen ortalama absorbans ve hesaplanan % inhibisyon değerleri.....	72
Çizelge 4.44. Süperoksit anyon radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) yakalama aktivite testi sonucu Kersetin için elde edilen ortalama absorbans ve hesaplanan % inhibisyon değerleri.....	73
Çizelge 4.45. Süperoksit anyon radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) yakalama aktivite testi sonucu BHT için elde edilen ortalama absorbans ve hesaplanan % inhibisyon değerleri.....	73

Çizelge 4.46. Süperoksit anyon radikali ( $O_2^{\cdot -}$ ) yakalama aktivite testi sonucu $\alpha$ -tokoferol için elde edilen ortalama absorbans ve hesaplanan % inhibisyon değerleri.....	73
Çizelge 4.47. 8 günlük inkübasyon sonunda, bitki ekstraktları için TBARS testi sonucu ölçülen ortalama absorbans (abs) ve ortalama % inhibisyon (ort % inh) değerleri.....	75
Çizelge 4.48. 8 günlük inkübasyon sonunda pozitif kontroller için TBARS testi sonucu ölçülen ortalama absorbans (abs) ve ortalama % inhibisyon (ort % inh) değerleri.....	76
Çizelge 4.49. LDL testi sonucu, 4, 12 ve 36 saatlik inkübasyondan sonra elde edilen ortalama absorbans (ort abs) ve ortalama % inhibisyon (ort % inh) değerleri.....	79
Çizelge 4.50. ORAC testi sonucu Troloksun ve kontrolün alan değerleri.....	81
Çizelge 4.51. ORAC testi sonucu ekstraktların ve pozitif kontrollerin alan değerleri.....	82
Çizelge 4.52. ORAC testi sonucu Troloksun ve kontrolün toplam alan değerleri.....	83
Çizelge 4.53. ORAC testi sonucu ekstraktların ve pozitif kontrollerin alan değerleri.....	84
Çizelge 4.54. ORAC testinin $\mu$ M troloks / g ekstrakt cinsinden sonuçları.....	85
Çizelge 7.1. ESA için DPPH testi sonucu elde edilen absorbans ve % inhibisyon değerleri.....	95
Çizelge 7.2. ESM için DPPH testi sonucu elde edilen absorbans ve % inhibisyon değerleri.....	96
Çizelge 7.3. EGA için DPPH testi sonucu elde edilen absorbans ve % inhibisyon değerleri.....	96
Çizelge 7.4. EGM için DPPH testi sonucu elde edilen absorbans ve % inhibisyon değerleri.....	97
Çizelge 7.5. EGH için DPPH testi sonucu elde edilen absorbans ve % inhibisyon değerleri.....	97
Çizelge 7.6. ESH için DPPH testi sonucu elde edilen absorbans ve % inhibisyon değerleri.....	98
Çizelge 7.7. ESA için ABTS <sup>+</sup> testi sonucu elde edilen absorbans değerleri.....	98

Çizelge 7.8. ESA için ABTS <sup>+</sup> testi sonucu hesaplanan % inhibisyon ve standart sapma (SD) değerleri.....	98
Çizelge 7.9. ESM için ABTS <sup>+</sup> testi sonucu elde edilen absorbans değerleri .....	99
Çizelge 7.10. ESM için ABTS <sup>+</sup> testi sonucu hesaplanan % inhibisyon ve standart sapma (SD) değerleri.....	99
Çizelge 7.11. EGA için ABTS <sup>+</sup> testi sonucu elde edilen absorbans değerleri.....	99
Çizelge 7.12. EGA için ABTS <sup>+</sup> testi sonucu hesaplanan % inhibisyon ve standart sapma (SD) değerleri.....	99
Çizelge 7.13. EGM için ABTS <sup>+</sup> testi sonucu elde edilen absorbans değerleri.....	100
Çizelge 7.14. EGM için ABTS <sup>+</sup> testi sonucu hesaplanan % inhibisyon ve standart sapma (SD) değerleri.....	100
Çizelge 7.15. EGH için ABTS <sup>+</sup> testi sonucu elde edilen absorbans değerleri.....	100
Çizelge 7.16. EGH için ABTS <sup>+</sup> testi sonucu hesaplanan % inhibisyon ve standart sapma (SD) değerleri.....	100
Çizelge 7.17. EGH için ABTS <sup>+</sup> testi sonucu elde edilen absorbans değerleri.....	101
Çizelge 7.18. EGH için ABTS <sup>+</sup> testi sonucu hesaplanan % inhibisyon ve standart sapma (SD) değerleri.....	101
Çizelge 7.19. ABTS <sup>+</sup> testi için Trolox absorbansları ve % inhibisyon değerleri.....	101
Çizelge 7.20. Metanol ve dietileter içinde farklı konsantrasyonlarda hazırlanan klorofil standartları için farklı dalga boylarında elde edilen absorbans değerleri.....	102
Çizelge 7.21. Absorbanstan elde edilen C <sub>a</sub> , C <sub>b</sub> ve C <sub>x+c</sub> değerleri (µg/mL).....	103
Çizelge 7.22. Bitki ekstraktlarının mg/100g ekstrakt cinsinden C <sub>a</sub> , C <sub>b</sub> ve C <sub>x+c</sub> değerleri.....	103
Çizelge 7.23. Toplam fenolik bileşen içeriği testinde standart olarak kullanılan gallik asit (GA) için 760 nm'de elde edilen absorbans değerleri.....	103
Çizelge 7.24. Toplam fenolik bileşen testi sonucu bitki ekstraktları için 760 nm'de elde edilen absorbans değerleri.....	104
Çizelge 7.25. Bitki ekstraktlarına ait toplam fenolik bileşen içeriği (mg GAE/g ekstrakt) verileri.....	104

Çizelge 7.26. TFC testi sonucu rutin standardı için 430 nm’de elde edilen absorbans değerleri.....	104
Çizelge 7.27. TFC testi sonucu bitki ekstraktları için 430 nm’de elde edilen absorbans değerleri.....	105
Çizelge 7.28. Bitki ekstraktlarına ait toplam flavanoid bileşen içeriği (TFC, mg rutin/g ekstrakt) değerleri.....	105
Çizelge 7.29. ESA için BBE testi absorbans değerleri.....	105
Çizelge 7.30. ESM için BBE testi absorbans değerleri.....	106
Çizelge 7.31. EGA için BBE testi absorbans değerleri.....	106
Çizelge 7.32. EGM için BBE testi absorbans değerleri.....	106
Çizelge 7.33. EGH için BBE testi absorbans değerleri.....	107
Çizelge 7.34. ESH için BBE testi absorbans değerleri.....	107
Çizelge 7.35. Kersetin için BBE testi absorbans değerleri.....	107
Çizelge 7.36. BHT için BBE testi absorbans değerleri.....	108
Çizelge 7.37. $\alpha$ - tokoferol için BBE testi absorbans değerleri.....	108
Çizelge 7.38. Ferulik asit için BBE testi absorbans değerleri.....	108
Çizelge 7.39. ESA için BBE testi % inhibisyon değerleri.....	109
Çizelge 7.40. ESM için BBE testi % inhibisyon değerleri.....	109
Çizelge 7.41. EGA için BBE testi % inhibisyon değerleri.....	109
Çizelge 7.42. EGM için BBE testi % inhibisyon değerleri.....	110
Çizelge 7.43. EGH için BBE testi % inhibisyon değerleri.....	110
Çizelge 7.44. ESH için BBE testi % inhibisyon değerleri.....	110
Çizelge 7.45. Kersetin için BBE testi % inhibisyon değerleri.....	111
Çizelge 7.46. BHT için BBE testi % inhibisyon değerleri.....	111
Çizelge 7.47. $\alpha$ - tokoferol için BBE testi % inhibisyon değerleri.....	111
Çizelge 7.48. BHT için BBE testi % inhibisyon değerleri.....	112



Çizelge 7.49. Süperoksit anyon radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) yakalama aktivite testi sonucu ESA için elde edilen absorbans ve hesaplanan % inhibisyon değerleri.....	112
Çizelge 7.50. Süperoksit anyon radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) yakalama aktivite testi sonucu ESM için elde edilen absorbans ve hesaplanan % inhibisyon değerleri.....	112
Çizelge 7.51. Süperoksit anyon radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) yakalama aktivite testi sonucu EGA için elde edilen absorbans ve hesaplanan % inhibisyon değerleri.....	112
Çizelge 7.52. Süperoksit anyon radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) yakalama aktivite testi sonucu EGM için elde edilen absorbans ve hesaplanan % inhibisyon değerleri.....	113
Çizelge 7.53. Süperoksit anyon radikali yakalama aktivite testi sonucu Ferulik asit için elde edilen absorbans ve hesaplanan % inhibisyon değerleri....	113
Çizelge 7.54. Süperoksit anyon radikali yakalama aktivite testi sonucu Kersetin için elde edilen absorbans ve hesaplanan % inhibisyon değerleri.....	113
Çizelge 7.55. Süperoksit anyon radikali yakalama aktivite testi sonucu BHT için elde edilen absorbans ve hesaplanan % inhibisyon değerleri.....	113
Çizelge 7.56. Süperoksit anyon radikali yakalama aktivite testi sonucu $\alpha$ -tokoferol için elde edilen absorbans ve hesaplanan % inhibisyon değerleri.....	114
Çizelge 7.57. 1 günlük inkübasyon sonunda, bitki ekstraktları ve saf antioksidanlar için TBARS testi sonucu ölçülen absorbans değerleri.....	114
Çizelge 7.58. 1 günlük inkübasyon sonunda, bitki ekstraktları ve saf antioksidanlar için TBARS testi sonucu hesaplanan %inhibisyon değerleri.....	114
Çizelge 7.59. 2 günlük inkübasyon sonunda, bitki ekstraktları ve saf antioksidanlar için TBARS testi sonucu ölçülen absorbans değerleri.....	115
Çizelge 7.60. 2 günlük inkübasyon sonunda, bitki ekstraktları ve saf antioksidanlar için TBARS testi sonucu hesaplanan %inhibisyon değerleri.....	115
Çizelge 7.61. 3 günlük inkübasyon sonunda, bitki ekstraktları ve saf antioksidanlar için TBARS testi sonucu ölçülen absorbans değerleri.....	116
Çizelge 7.62. 3 günlük inkübasyon sonunda, bitki ekstraktları ve saf antioksidanlar için TBARS testi sonucu hesaplanan %inhibisyon değerleri.....	116
Çizelge 7.63. 4 günlük inkübasyon sonunda, bitki ekstraktları ve saf antioksidanlar için TBARS testi sonucu ölçülen absorbans değerleri.....	117
Çizelge 7.64. 4 günlük inkübasyon sonunda, bitki ekstraktları ve saf antioksidanlar için TBARS testi sonucu hesaplanan %inhibisyon değerleri.....	117

Çizelge 7.65. 5 günlük inkübasyon sonunda, bitki ekstraktları ve saf antioksidanlar için TBARS testi sonucu ölçülen absorbans değerleri.....	118
Çizelge 7.66. 5 günlük inkübasyon sonunda, bitki ekstraktları ve saf antioksidanlar için TBARS testi sonucu hesaplanan %inhibisyon değerleri.....	118
Çizelge 7.67. 6 günlük inkübasyon sonunda, bitki ekstraktları ve saf antioksidanlar için TBARS testi sonucu ölçülen absorbans değerleri.....	119
Çizelge 7.68. 6 günlük inkübasyon sonunda, bitki ekstraktları ve saf antioksidanlar için TBARS testi sonucu hesaplanan %inhibisyon değerleri.....	119
Çizelge 7.69. 7 günlük inkübasyon sonunda, bitki ekstraktları ve saf antioksidanlar için TBARS testi sonucu ölçülen absorbans değerleri.....	120
Çizelge 7.70. 7 günlük inkübasyon sonunda, bitki ekstraktları ve saf antioksidanlar için TBARS testi sonucu hesaplanan %inhibisyon değerleri.....	120
Çizelge 7.71. 8 günlük inkübasyon sonunda, bitki ekstraktları ve saf antioksidanlar için TBARS testi sonucu ölçülen absorbans değerleri.....	121
Çizelge 7.72. 8 günlük inkübasyon sonunda, bitki ekstraktları ve saf antioksidanlar için TBARS testi sonucu hesaplanan %inhibisyon değerleri.....	121
Çizelge 7.73. LDL testi sonucu, 4 saatlik inkübasyondan sonra elde edilen absorbans değerleri.....	122
Çizelge 7.74. LDL testi sonucu, 4 saatlik inkübasyondan sonra elde edilen absorbans değerleri.....	122
Çizelge 7.75. LDL testi sonucu, 12 saatlik inkübasyondan sonra elde edilen absorbans değerleri.....	122
Çizelge 7.76. LDL testi sonucu, 12 saatlik inkübasyondan sonra elde edilen absorbans değerleri.....	123
Çizelge 7.77. LDL testi sonucu, 36 saatlik inkübasyondan sonra elde edilen absorbans değerleri.....	123
Çizelge 7.78. LDL testi sonucu, 36 saatlik inkübasyondan sonra elde edilen absorbans değerleri.....	123

## 1. GİRİŞ

Beslenme, hastalıkların meydana gelmesinde ve önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Nichenametla vd 2006). Son yıllarda başta kanser olmak üzere pek çok hastalıkta gözlemlenen artış, beslenmede yapılacak değişikliklerle azaltılabilmektedir. UV ışını, sigara dumanı ve hava kirliliği gibi çevresel kaynaklar ile enzimler ve solunum prosesi gibi yaşamsal kaynaklı süreçler sırasında oluşan serbest radikaller vücutta yıkıcı aktivite göstermektedir ve başta kanser olmak üzere pek çok hastalığa neden olmaktadır (Young ve Woodside 2001, Sroka 2005).

Oksidatif baskı, vücut içinde çeşitli reaktif oksijen türlerinin (ROS) normalden fazla miktarda açığa çıkması durumunda meydana gelen bir olaydır. ROS, radikalik yapıda olanlar ve olmayanlar şeklinde iki gruba sınıflandırılabilen oksijenden türemiş prooksidanlardır. Radikal grup hidroksil ( $\cdot\text{OH}$ ), nitrik oksit ( $\text{NO}\cdot$ ), süperoksit anyon ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), peroksil ( $\text{ROO}\cdot$ ) ve alkoksil ( $\text{RO}\cdot$ ) radikalleri ile singlet oksijen ( $^1\text{O}_2$ ) in bir formu gibi türleri içermektedir. Radikalik grup bir ya da daha fazla çiftleşmemiş elektron içeren kimyasal türlerdir. Bundan dolayı, oldukça kararsız olup stabilite sağlamak amacıyla diğer moleküllerden elektronları koparıp onları degradasyona uğrattırılar. Radikal olmayan grup ise, bazıları oldukça reaktif olan çeşitli türleri içerir. Bunlar arasında yaşayan hücrelerde yüksek konsantrasyonlarda üretilen hipokloröz asit ( $\text{HOCl}$ ), hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), organik peroksitler, peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), aldehitler, ozon ( $\text{O}_3$ ) ve singlet oksijen ( $^1\text{O}_2$ ) yer almaktadır (Dröge 2002, Nyska ve Kohen 2002). Hava kirliliği, UV radyasyonu, mikroorganizmalar, virüsler ve ksenobiyotikler ekzojen ROS kaynağı olarak görev yaparken endojen ROS normal hücrel metabolizma, immün reaksiyonları ve bazı patolojik durumlar sırasında açığa çıkar. ROS kanser, nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer hastalığı, demans başlangıcı ve Parkinson hastalığı), kardiovasküler hastalıklar, ateroskleroz, kataraktlar ve inflamasyon gibi çeşitli sayıda ciddi hastalığın patogeneğinde önemli rol oynamaktadır (Aruoma 1998, Kris-Etherton vd 2004). Artan ROS seviyesinin sonucu meydana gelen biyolojik hasar lipid peroksidasyonu, DNA mutasyonu/kırılması ve protein oksidasyonu/degradasyonu şeklinde ortaya konur. Lipid peroksidasyonu, çeşitli serbest radikalleri içeren, çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikaller ile başlatılan oksitlenmesidir. Bu kompleks mekanizma enzimatik yollarla veya antioksidanlar tarafından serbest radikallerin sönmüyle sonlandırılır (Korkina ve Afans'ev 1997). ROS DNA'nın yanında, fosfolipidlerin çoklu doymamış yağ asidi kalıntıları (Siems vd 1995) ve özellikle sistein ve metionin kalıntıları olmak üzere proteinlerin tüm amino asit kalıntılarının yan zincirleri (Stadtman 2004) gibi diğer hücrel bileşenlere de saldırır. Özellikle  $\text{O}_2^{\cdot-}$  anyon radikali ve  $\cdot\text{OH}$  radikali ile  $\text{H}_2\text{O}_2$  gibi canlı ortamda oluşturulan ROS, diğerlerine oranla daha yıkıcıdır.  $\cdot\text{OH}$  radikalinin, pürin ve pirimidin bazlarının her ikisine ve aynı zamanda deoksiriboz iskelet yapısına zarar vererek DNA molekülünün tüm bileşenleriyle reaksiyona girdiği bilinmektedir (Halliwell ve Gutteridge 1999).

Bir antioksidan, hedef moleküle karşı oksidatif hasarı önleyen, geciktiren ya da uzaklaştıran bir madde olarak tanımlanır (Halliwell ve Gutteridge 2007). Bu sebeple, antioksidanlar, oksidatif hasarı minimuma indirmek için serbest radikallerin ve diğer reaktif türlerin seviyelerini kontrol etmek amacıyla yönelik olarak hizmet eden bileşiklerdir. Normal koşullarda vücut içinde prooksidanlar ve antioksidanlar arasındaki denge olarak ifade edilen redoks durumu sıkı bir şekilde regüle edilir ve önemli hücrel

ve biyokimyasal fonksiyonların sağlanması için çok önemlidir. Bu dengeye yapılacak herhangi bir müdahale, hangi yönde olursa olsun, hücre ve organizma için zarar verici olabilir (Nyska ve Kohen 2002). Dengenin prooksidanlar yönüne kayması oksidatif stres olarak tanımlanır ve oksidatif hasara yol açabilir. Normal koşullar altında, organizma temel olarak antioksidanlara dayalı olan, oksidasyona karşı savunma mekanizmalarıyla donanmıştır. Bu sistem iki temel gruptan oluşur; antioksidan enzimler ve düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar. Antioksidan enzimler süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi sınırlı sayıda proteinleri içerir. Düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar, oksitlenmiş antioksidanların geri dönüşümünü sağlayan indirgenmiş glutatyon (GSH), ürik asit (UA), askorbik asit (Vitamin C), lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu önleyen yağda çözünür  $\alpha$ -tokoferol (Vitamin E), karotenoidler, flavonoidler vb. den oluşmaktadır. Düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar grubu enzimler grubundan çok daha baskındır ve oksidatif baskının yer aldığı hücredeki spesifik lokasyonlara ulaşım nüfuz etme gibi çeşitli özelliklere sahiptir. Düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar ROS ile doğrudan ve doğrudan olmayan etkileşimlerle oksidatif hasarı önleme yeteneğine sahiptir. Bunlar indirgeme aktivitesi, serbest radikal yakalama, prooksidan metallerin kompleksleştirilmesi ve singlet oksijenin sönmülmesi gibi mekanizmalardan biri veya daha fazlasını kullanarak etkide bulunurlar.

Bu çalışmada, *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitkilerinden elde edilen ekstraktların başta fenolik yapıdaki bileşenler olmak üzere diğer bazı bileşenlerinin ve antioksidan aktivitesinin çeşitli *in vitro* testlerle aydınlatılması planlanmıştır. Ekstraktların, fenolik bileşiklerinin HPLC-DAD ile karakterizasyonu ile klorofil a, klorofil b, toplam karetonoid, fenolik ve flavonoid içeriklerinin tayini testleri uygulanarak kimyasal kompozisyonları aydınlatılmaya çalışılmıştır. *In vitro* antioksidan (radikal sönmülme) aktivitelerini belirlemek için DPPH, ABTS<sup>+</sup>, hidroksil (.OH), (deoksiriboz degradasyon testi) ve süperoksit anyon radikali (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) yakalama testleri ile oksijen radikali absorpsiyon (ORAC) testleri uygulanmıştır. Bitki ekstraktlarının lipid oksidasyon reaksiyonunu inhibe etme yeteneğini ölçen antioksidan aktivite testleri ise tiyobarbitürik asitle reaksiyona giren maddelerin (TBARS) takip edilmesi ile düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve büyükbaş hayvan beyni lipozomlarında (BBE) lipid peroksidasyon inhibisyonunun ölçülmesi testleri ile gerçekleştirilmiştir.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMASI

### 2.1. Doğal Antioksidan Özellikli Bitkiler

Kanser ABD’de ve diğer pek çok ülkede en önde gelen ölüm nedenlerinden ikincisidir. Akciğer, kolon, prostat ve göğüs kanseri, kanser ölümlerinin yarısından fazlasını oluşturmaktadır. Kimyasal olarak önleme veya kemoterapinin doğal kaynaklı ajanlar üzerinden yapılması, bu kanser türlerinin tekrar oranını düşürmek için kullanılabilir. Doğal olarak bulunan pek çok ajan, biyolojik kaynaklı materyallerin kullanıldığı testlerde ve hayvan modellerinde antikanser potansiyel göstermiştir. Kanser gibi pek çok kronik hastalığın risklerini azaltmak ve ilerleyişini önlemek, vücudun doğal antioksidan savunma sistemlerinin artırılması veya etkisi kanıtlanmış besinsel antioksidanlarca takviye alma ile mümkün olabilir (Stanner vd 2004). İşte bunlardan dolayı potansiyel antioksidanların keşfi ve sentezi aktif araştırma alanlarından biridir.

Gıda üreticileri pazarladıkları gıdaların besin değerini kaybetmesini engellemek ve raf ömrünü uzatmak için sentetik antioksidanlar kullanmışlardır. Bütillenmiş hidroksi toluen (BHT) ve bütillenmiş hidroksi anisol (BHA) gibi işlenmiş gıdalarda yaygın olarak kullanılan sentetik antioksidanların yan etkileri olup kanserojen oldukları belirlenmiştir (Ito vd 1983). Son yıllarda, gıdalarda ve diğer biyolojik materyallerde bulunan doğal antioksidanların kullanımı, güvenilirlikleri ve gıda olarak tüketildiğinde tedavi edici niteliklerinden dolayı büyük ilgi çekmiştir (Ajila vd 2007). Yaklaşan gelecekte fonksiyonel gıdaların sağlıklı bir topluma ulaşmak için anahtar görevi görecekleri tahmin edilmektedir. Meyveler, sebzeler, baharatlar ve tahıllardan elde edilen antioksidanlar oldukça etkilidir ve vücudun savunma mekanizmaları ile beraber serbest radikallerin girişimini azaltır (Kahkonen vd 1999, Wolfe vd 2003). Doğal antioksidanlar temel olarak fenolik bileşikler (flavonoidler, fenolik asitler ve alkoller, stilbenler, tokoferoller, tokotrienoller), karotenoidler ve askorbik asit formundadır. Son 20 yıldan daha uzun bir sürede, diyetel, kozmetik ve farmasötik kullanımlar için doğal antioksidanların arayışı temel endüstriyel ve bilimsel araştırma alanı oluşturmuştur. Özellikle ekonominin bozuk olduğu, fakirlik ve açlık gibi durumların yoğun yaşandığı gelişen ülkelerde bitki kaynaklı antioksidanların değerlendirilmesi, sağlık bakımı ile ilgili masrafları düşürebilir.

Bitkiler fotonlar ve ROS (reaktif oksijen türleri) tarafından yaratılan oksidatif baskının önlenmesi amacıyla önemli miktarlarda antioksidanlar içerdiği için, antioksidan aktiviteye sahip yeni bileşikler bakımından potansiyel birer kaynaktır. Tüm modern ilaçlar orijinal olarak geleneksel bitkisel kaynaklardan türetilmişlerdir. Bunların hepsi, hem sentetik ilaçlar hem de izole edilmiş doğal bileşikleri kullanan geleneksel tıbbın oluşturulması için ortaya çıkmıştır. Daha önce yapılmış fitokimyasal çalışmalar, bitkilerin temel kimyasal bileşenleri arasında esansiyel yağlar, flavonoidler, terpenoidler ve mono- ve seskiterpenlerin yer aldığını göstermiştir (Ohira vd 1998, Kilani vd 2005). Tıbbi bitkilerin iyileştirici özellikleri tipik olarak fenolik içeriklerine, en çok da flavonoidler ve fenolik asitlere bağlanmaktadır (Amaral vd 2009). Bitkisel kaynaklı antioksidanlar veya ilaçlar gibi ürünlerin tercih edilmesinin nedenleri arasında sentetik karşıtlarına karşı daha güvenli olarak algılanmaları, kısmen daha ucuz olmaları, yüksek

derecede tolere edilebilmeleri ve pek çok hasta için oldukça uygun olmaları gelmektedir (Cai vd 2007).

ABD’de yapılan araştırmalar çeşitli hastalıkları tedavi etmek için bitkileri kullanan yetişkin oranınının 1990’da %3’den 1997’de %12’ye ve 2001’de %21’e çıktığını göstermiştir (Bent ve Ko 2004). Diğer çalışmalar 2002’de Amerika’daki yetişkinlerin %19’unun bitkisel terapi uyguladığını, bunun da toplam 38 milyon kişiye tekabül ettiğini ortaya çıkarmıştır (Tindle vd 2005). Yine bir araştırmaya göre 2009’da Avrupa’da tüm kişisel bakım ürünlerinin %3 ünü doğal ve organik ürünlerin oluşturduğu belirlenmiştir. Bu, kısmen küçük bir oran iken %20 lik bir büyüme göstermiştir. Almanya gibi bazı ülkelerde doğal ve organik kişisel bakım ürünlerinin 2012’de %10 a ulaşacağı beklenmektedir. Bu doğal ve/veya organik katkı pazarının temel itici faktörü, tüketicinin daha sağlıklı olan organik ve ekolojik ürünlere talebidir. Kişisel bakım ürünlerinde kullanılan botanik içerikler; bitki ekstraktları, tentürler, vakslar, bitkisel yağlar, lipidler, bitki karbohidratları ve esansiyel yağlar gibi çeşitli preparatlar veya biyolojik aktiviteye sahip vitaminler; antioksidanlar ya da diğer maddeler gibi saflaştırılmış bitki bileşenleri içerebilir. Bu içerikleri sağlayan bitkilerin çeşitliliği başlıca gıdasal bitkiler (bakliyatlar, meyveler, bitkiler, kökler, baharatlar vb.) den geleneksel ilaçlar ve formülasyonlarda kullanılan şıfalı otlara ve çaylara kadar dağılabildiği gibi ekzotik bitkiler ve onların içeriklerine kadar uzanabilir.

## 2.2. Tıbbi Bitkilerin Prooksidan ve Toksik Özellikleri

Bitki preparatlarının güvenilirlik değerlendirmesi bitkinin coğrafi orijini, büyüme şartları ve üretim proseslerinin etkisinden dolayı komplike hale getirilir (Harrigan vd 2010, Batista ve Oliveira 2010). Ekstraksiyon gibi prosesler güvenilirliği ve bitki kaynaklı içeriklerin kompozisyonunu değiştirebilir. Bu yüzden bitkisel içeriklerin fitokimyasal karakterizasyonu, güvenilirliğin değerlendirilmesi için kritiktir.

Bitkilerin insanlarca kullanımı ve insanlara teması; böcekler, otçul hayvanlar ya da hastalıklara karşı bitkilerin doğal savunması olan bir dizi sekonder bitki metabolitlerine maruz kalmaya neden olabilir. Karotenoidler, askorbik asit ve diğer vitaminler gibi bitki bileşenlerinin besinsel değere sahip olmasına karşın, izotiyosiyanatlar, indoller, alkaloidler, siyanidler ya da fenoller gibi bileşenlerin potansiyel toksisiteyi olabilir (Essers vd 1998). Tıbbi bitkiler genellikle antioksidan aktivitelerinden dolayı övgü görmesine rağmen, prooksidan etkilerini işaret eden bulgular da mevcuttur (Tang vd 2004, Halliwell 2007). Tıbbi bitkilerin ve bunlardan elde edilen ürünlerin kullanımına bağlanan toksisite zaman zaman rapor edilmiştir (Sardesai V.M. 2002, Chan K. 2003). Bunun sebeplerinden bazıları, kültürlenme, hasat sonrası prosesleme, depolama, katkılama ya da yanlış kullanımdan dolayı toksik kimyasallarla kontaminasyondan olabilir (Chan K. 2003). Cu ve Fe gibi geçiş metallerinin varlığında belirli koşullarda bitki fenolikleri prooksidan özellik gösterme gibi bir potansiyele sahip olabilir. Bu metal iyonlarının varlığında fenolik bileşiklerden türeyen kararlı fenoksil radikallerinin lipid peroksidasyonunu başlatıcı etkileri rapor edilmiştir (Sakihama vd 2002). Yüksek antioksidan kapasiteye sahip olup aynı zamanda toksisite testlerinde oldukça toksik olduğu bulunan bitki türleri de mevcuttur (Müller-Waldeck 2010). Yukarıda bahsedilen durumların varlığı gerçek olsa da genel olarak

bitkilerin sentetik eşdeğerlerine kıyasla daha güvenli kaynaklar olduğu kabul edilmektedir.

### 2.3. *Daphne Gnidioides* ve *Daphne Sericea*

Türkiye zengin bitki örtüsü ile bitkisel ilaçlar konusunda çalışma şansına sahip bir ülkedir. Yıllık türleri içeren, dünyanın tropikal ve ılıman bölgelerinde yayılış gösteren *Thymelaeaceae* familyasının üyelerinden biri olan *Daphne* cinsi, Davis'in Türkiye florasında 7 türü ile kayıtlıdır. Bu 7 tür Anadolu'da doğal olarak yetişmektedir (Heywood 1979, Tan ve Davis 1982,). Bugüne kadar yapılan pek çok araştırmada, *Daphne* türlerinde başlıca flavonoid, kumarin, steroid ve terpenik yapıda maddelerin varlığından söz edilmiştir (Doğanca ve Apak 1986, Ulubelen vd 1990). Özellikle bitkinin terpenik yapıdaki bileşikler bakımından zengin oldukları bilinmektedir.

*Daphne* türleri pek çok biyolojik ve farmakolojik özelliğe sahiptir. Bu özelliklere balgam söktürme, terletme, eklem ağrılarını azaltma ve tenya öldürme gibi olumlu etkileri sayılabilir. Hatta total hayvanların tedavisinde de kullandıkları bilinmektedir. Bunların yanında diş ağrılarında, kan kanserinde, mide ülseri tedavisinde ve deri hastalıklarında kullanımları da literatürde bulunmaktadır (Grieve ve Leyel 1967, Ulubelen vd 1986, 1990, Murakami vd 1992). *Daphne* türleri zehirli bitkiler olarak bilinmektedir. Meyvenin birkaç tanesinin ve kabuğun birkaç gramının insan, köpek ve atlarda öldürücü olduğu rapor edilmiştir (Stout vd 1970). Bu türün tüm kısımları ekşi, acı ve tahriş edici reçine sebebiyle tehlikelidir. Bu nedenle bu bitkilerin dahilen kullanımlarından kaçınılmalıdır.

#### 2.3.1. *Daphne gnidioides*

*Daphne* türlerinden *D. gnidioides* L. Jaub & Spach, 0,5-2 m boyunda erekt bir çalıktır. Dalları kahverengi veya grimsi olup yapraklıdır. Yaprakları neredeyse sapsız, dar elips ya da ters mızraksıdır. Çiçekler uçta 3-12 adet küme şeklindedir. Oval şeklinde, 5-7 mm, turuncu-kırmızı meyveleri bulunmaktadır. Çiçeklenme zamanı mayıstan ağustos kadar olup doğal ortamı kireçtaşı uçurumları, kumtaşı kayalıklar ve volkanik topraklardır. Çok yıllık bir bitkidir ve endemik değildir. Türkiye'de dağılımı Güney ve Güneybatı Anadolu'dur (Tan ve Davis 1982). Bulunduğu yükseklik 0-1150 m dir. İstilacı bir bitki türüdür. *D. gnidioides*'in içinde karakterize edilen fenolik yapıdaki bileşikler arasında apigenin-7-glukozit, luteolin-7-glukozit, luteolin-4-glukozit, izoviteksin ve kersetin-3-glukozit bulunmaktadır. İzole edilen kumarinler ise dafnin, dafnetin, dafnetin-8-glukozit, dafnoretin ve eskulindir.  $\beta$ -amirin,  $\beta$ -sitosterol ve sitositeril-3- $\beta$ -glukozit de bitkide tanımlanmış terpenik yapıdaki bileşiklerdir (Ulubelen vd 1986).

#### 2.3.2. *Daphne sericea*

Diğer bir *Daphne* türü olan *D. sericea* L. Vahl 30-100 cm boyunda dik çalıardan oluşmaktadır. Genç sürgünler ve dallar kırmızımsı-kahverengi renkli, tüylü; yaşlı dallar tüysüz, kabuk ise gri renklidir. Yapraklar saplı veya kısa saplı, eliptik veya eliptik ters mızraksı olup, küt veya geniş keskin sivri uçludur. Çiçekler 5-10'lu kümeler halinde olup, kokuludur. Meyvesi yumurtamsı, 5-6 mm çaplı ve portakal kırmızısı

renklidir. Bu tür kuzeybatı, batı ve Güney Anadolu'da yayılış gösterir. Yetiştirme ortamı olarak deniz seviyesi ile 1500 m arasındaki kireçtaşı kayalıklarını, kızılçam ormanı açıklıklarını ve makilik alanları tercih eder. Çiçeklenme zamanı şubat ve mayıs ayları arasındadır. Doğu Akdeniz kökenli olup Kuzeybatı, Batı ve Güney Anadolu ile İtalya, Sicilya, Girit, Latakya ve Lübnan yayılışlıdır.

Yukarıda bahsedilen türlerin hem dahilen hem de haricen kullanımına dair bilgiler bulunmaktadır. Ancak dahilen kullanımlarının toksik etki yaratmasına dikkat çekilmiştir. Bunun yanında, *Daphne*'nin bazı türleri kanser tedavisi için kullanılmıştır (Kupchan ve Baxter 1970, Stout vd 1970, Ulubelen vd 1986). Bitkinin pek çok çeşitli farmakolojik özelliğinin yanında antikanser özelliği ile ilişkili antioksidan aktivite gösterip göstermediği konusunda yapılmış detaylı bir çalışma bulunmadığı literatür taraması sonucu anlaşılmıştır. Antioksidan aktivitesi incelenmesi planlanan *D. gnidioides* ve *D. sericea* türlerinin bu etkiyi gösterdiğinin belirlenmesi durumunda, bu türün rapor edilmiş toksik etkileri bulunmasına rağmen, diyetel olmayan harici kullanımını güçlendirici bilgiler edinilebilir. Yukarıda sayılan çeşitli biyolojik aktiviteler yanında bu türlerin antioksidan aktivite derecesi aydınlatıldığı takdirde bitki ekstraktlarının çeşitli preparatlarda haricen kullanılabilirliğine yönelik yararlı bilgiler elde edilebilir. Ayrıca aşağıda sayılan ve antioksidan aktiviteden sorumlu olabilecek bazı fenolik bileşiklerin varlığı rapor edilmiş olsa da *D. gnidioides* ve *D. sericea* türlerinde detaylı fenolik bileşen içeriğinin rapor edildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

#### 2.4. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

Antioksidan maddeler oksidasyon sonucu oluşabilen serbest radikallerin oluşmasını engelleyen veya onları etkisiz hale getirebilen moleküller olarak tanımlanabilir. Serbest oksijen radikalleri (Çizelge 2.1.) kolayca reaksiyona giren, hidroksil (OH<sup>-</sup>), peroksil (ROO<sup>·</sup>), süperoksit (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>), hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gibi oksijen içeren kararsız yapıdaki bileşiklerdir. Radikalik bileşenlerin insan hücre yapısında deformasyona, gen bozulmalarına sebep olduğu yaşlanmaya ve kansere karşı vücudun direncini düşürdüğü pek çok kaynak tarafından dile getirilmektedir.

Oksidasyon ajanları nedeniyle hidrojen veya elektron transferinin gözlemlendiği kimyasal reaksiyonlar oksidasyon olarak adlandırılır. Proteinlerin, lipidlerin, karbonhidratların oksidasyonu sonucu oluşan, dış orbitalinde eşleşmemiş elektron içeren serbest radikaller, birbirini takip eden bir zincir reaksiyon başlatırlar ve bu reaksiyonlar prooksidan-antioksidan dengesizliğinden dolayı oksidatif strese yol açarlar. Reaktif azot ve oksijen türlerinin indüklediği oksidatif reaksiyonlar, hava kirliliği, radyasyon gibi çevresel kaynaklı veya solunum prosesi gibi doğal metabolizmik etmenlerle meydana gelerek istenmeyen ürünleri oluştururlar (Aruoma ve Cuppett 1997).

Doğal ve yapay olarak bulunan antioksidan maddelerin oksidasyonla savaşırken temel iki görevi vardır;

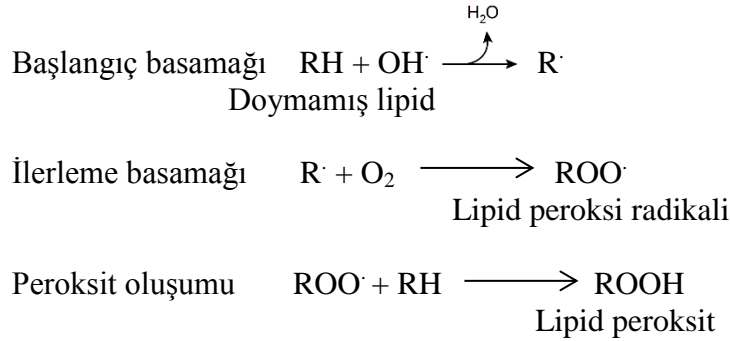
- Hedef alınan serbest radikalın oluşumunu engelleme
- Oluşan serbest radikalleri kararlı hale getirme.



Çizelge 2.1. Reaktif azot türleri (RNS) ve reaktif oksijen türleri (ROS)

Radikalik olmayanlar		Radikalikler
Diazot tetraoksit (N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> )	Reaktif Azot Türleri	Nitrik dioksit (NO <sup>•</sup> ) Azot dioksit (NO <sub>2</sub> <sup>•</sup> )
Diazot trioksit (N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )		
Nitroksil anyon (NO <sup>-</sup> )		
Nitroksil katyon (NO <sup>+</sup> )		
Nitröz asit (HNO <sub>2</sub> )		
Peroksi nitrit (ONOO)		
Peroksi nitröz asit (ONOOH)		
Nitronyum katyonu (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )		
Alkil peroksinitritler (ROONO)		
Ozon (O <sub>3</sub> )	Reaktif Oksijen Türleri	Superoksit (O <sub>2</sub> <sup>-•</sup> ) Hidroksil (OH <sup>•</sup> ) Peroksil (RO <sub>2</sub> <sup>•</sup> ) Alkoksil (RO <sup>•</sup> ) Hidroperoksil (HO <sub>2</sub> <sup>•</sup> )
Hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )		
Hipokloröz asit (HOCl)		
Hipobromoz asit (HOBr)		
Singlet oksijen		

Birincisinde “engelleyici” olarak isimlendirilen antioksidanlar ROS nin oluşumunu önlerler veya oksidasyonun başlamasından sorumlu olan türleri (O<sub>2</sub><sup>-•</sup>, <sup>1</sup>O<sub>2</sub> vb.) yakalarlar. İkinci durumda, zincir kıran olarak bilinen antioksidanlar radikalik oksidasyon ileticileriyle (ROO<sup>•</sup>) etkileşime girerek zincir ilerlemesinin durdurulmasında rol oynarlar. Antioksidanların lipidlerin peroksidasyonunda da rol aldığı bilinmektedir. Lipidlere ait reaksiyon zinciri aşağıdaki gibidir;



Antioksidanların oksidasyonu engellerken ve oluşan radikalleri etkisiz hale getirirken izledikleri yöntemler aşağıdaki gibidir;

1. Süpürme etkisi (Scavenging): Antioksidan enzimlerin uyguladığı bir yöntem olup mevcut oksidanlar etkisizleştirilirken daha zayıf moleküle dönüştürülür.
2. Söndürme etkisi (Quenching): Vitaminler ve flavonoidlerin uyguladığı bir yöntem olup mevcut oksidanlar bir hidrojen bağlanarak inaktive edilir.
3. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi (Chain Breaking): İnaktivasyon ağır metallerin, serüloplazminin ve hemoglobinin oksidanları kendilerine bağlaması ile meydana gelir.

4. Onarma etkisi (Repair): Oksidasyon sonucu zarar görmüş biyomolekül antioksidanlar tarafından onarılır (Gökpınar vd 2006).

Bir antioksidan maddenin aktivitesinin değerini belirleyen özellikler ise;

1. Serbest radikal oluşumunu engellenme yeteneği,
2. Oluşan serbest radikalleri etkisiz hale getirme yeteneği,
3. Hidrojen veya elektron verici ajan olarak reaktivitesi,
4. Antioksidandan türemiş radikalın etkinliği,
5. Diğer antioksidanlarla birlikte reaktivitesi,
6. Geçiş metali şelatlama potansiyeli

#### **2.4.1. Engelleyici antioksidanlar**

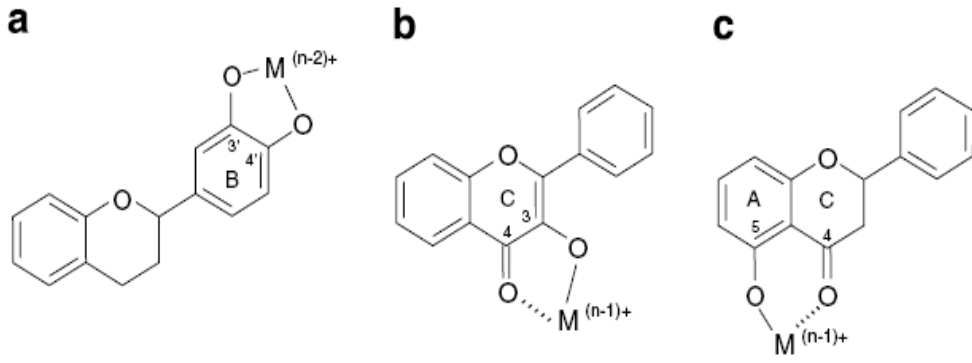
Farklı oksidasyon başlatıcılarının bulunmasından dolayı pek çok farklı engelleyici antioksidan etki mekanizması mevcuttur. Bunlar arasında geçiş metallerinin şelatlanması, singlet oksijen deaktivasyonu, ROS nin enzimatik detoksifikasyonu, UV filtrasyonu ve prooksidan enzimlerin inhibisyonu yer almaktadır

##### **2.4.1.1. Geçiş metalleri ile şelatlama**

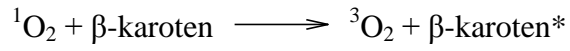
İyon kompleks yapıların kararlılığını arttıran şelatlamada, metal iyonları ile birden fazla bağ yapma yeteneğine sahip moleküller görev almaktadır. Geçiş metali şelatlayıcıları bakır, demir gibi metaller ile yeni kompleks yapılar oluşturur ve oksidasyonu engellerler. Örnek olarak ferritin ve transferrin demiri, albümin ve seruplazmin ise bakır şelatlamaktadır. Etilendiamintetraasetikasit (EDTA), sitrik asit, flavonoidler, fenolik asitler ve polifosfatlar da şelatlama yeteneğiyle bilinirler. Geçiş metalleri flavonoidlere iki noktadan bağlanırlar. Flavonoidlerin bağlanmasına örnek olarak Şekil 2.1a'da B halkasındaki 3',4'-dihidroksi pozisyonlarındaki o-difenolik gruplar; flavonollarin bağlanmasına örnek olarak ise Şekil 2.1b'deki flavonollerin C olarak adlandırılmış halkadaki ketol yapıları olan 4-keto, 3-hidroksi veya Şekil 2.1c'deki A ve C olarak adlandırılmış halkalara bağlı olan 4-keto ve 5-hidroksi yapıları verilebilir (Rice-Evans vd 1997).

##### **2.4.1.2. Singlet oksijen yakalayıcıları**

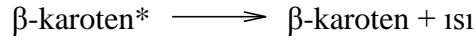
Doğadaki bilinen karotenoid sayısı 600 civarındadır. Yapılan araştırmalar göstermiştir ki karotenoidler singlet oksijen ( $^1O_2$ ) yakalamada en etkin moleküllerdir. Singlet oksijen yakalayıcılarını iki gruba ayırabiliriz. Birincisi lutein, astaksantin (Şekil 2.2., b,c) gibi oksitlenmiş fonksiyonel grup içerenler ksantofillerdir. Diğerisi ise saf hidrokarbon yapıdaki likopen ve  $\beta$ -karoten (Şekil 2.2a) gibi karotenlerdir. Örnek olarak  $\beta$ -karotenin singlet oksijeni yakalama (söndürme) prosesi verilebilir. Bu süreçte  $\beta$ -karoten  $^1O_2$ 'nin enerjisini alır ve triplet oksijen  $^3O_2$ 'e çevrilir (Foote ve Denny 1968).



Şekil 2.1. Flavoide (a) ve flavonollere (b,c) geçiş metallerinin şelatlanması

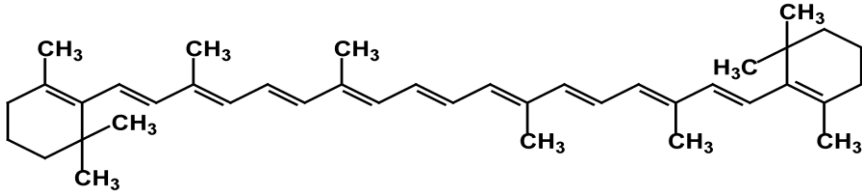


$\beta$ -karetene geçen enerji çevresel etkileşimler nedeniyle ısı olarak dağılır.

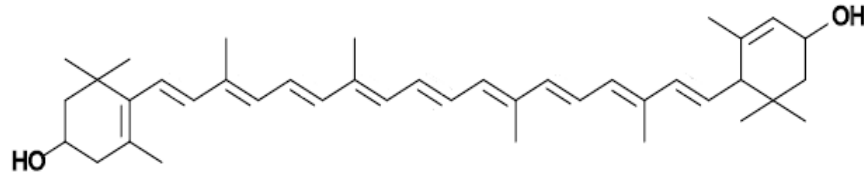


Enerji transferi sonucunda bozunmuş  $\beta$ -karoten molekülü, dışarı ısı vererek yeni bir  ${}^1\text{O}_2$  molekülünü yakalama döngüsünü başlatabilir.

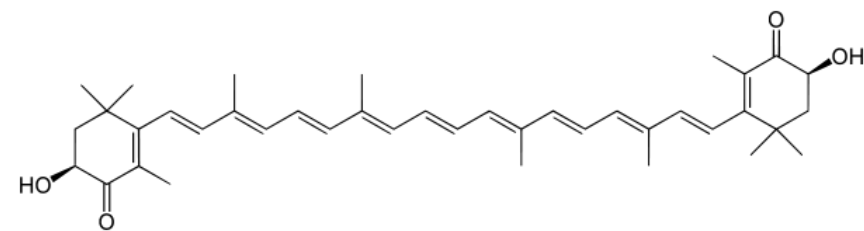
(a)  $\beta$ -karoten



(b) Lutein



(c) Astaksantin

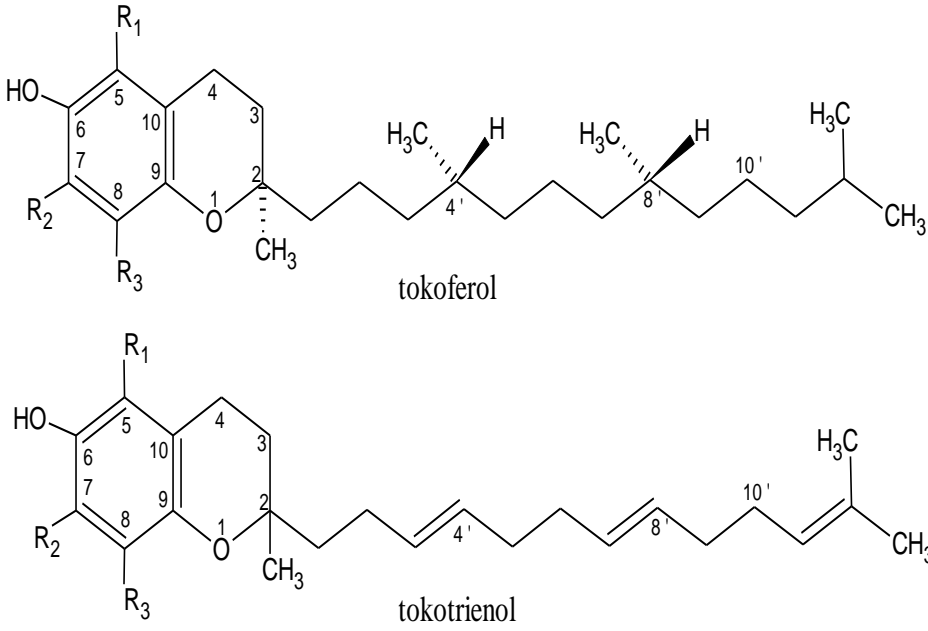


Şekil 2.2. (a)  $\beta$ -karotenin, (b) luteinin, (c) astaksantin yapıları

## 2.4.2. Zincir kıran antioksidanlar

Engelleyici antioksidanlar gibi zincir kıran antioksidanlar da oksidasyon sonucu meydana gelen hasarı önlerler. Lipid peroksidasyonunda da etkindirler ve ROO<sup>·</sup> radikaline hidrojen atomu vererek zincir reaksiyonunu durdururlar. Fenolik bileşenler olan zincir kıran antioksidanlar yapılarında bir veya daha fazla sayıda fenolik halka içerirler. Yapılarındaki hidrojen atomu verme kabiliyeti O-H bağ enerjisi ile ters orantılıdır. Ayrıca hedefe, yani ROO<sup>·</sup> radikalinin bulunduğu yere doğru hareket etkinliği de bağ enerjisinde olduğu gibi zincir kıran antioksidanların etkinliğini belirler.

$\alpha$ -tokoferol en güçlü doğal zincir kıran antioksidandır. Bu antioksidanın 2 adet peroksil radikalini yakalayabildiği de araştırmalar sonucunda bulunmuştur (Burton ve Ingold 1981, Niki vd 1984). Şekil 2.3'te tokoferol ve tokotrienollerin yapılarını ve Çizelge 2.2'de metil gruplarının pozisyonları ile tokoferol ve tokotrienoller arasındaki ilişki gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Tokoferol ve tokotrienolün kimyasal yapıları

Çizelge 2.2. Metil grupları ile tokoferol ve tokotrienoller arasındaki ilişki

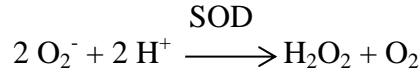
Metil gruplarının pozisyonu	Tokoferoller	Tokotrienoller
5,7,8-trimetil	$\alpha$	$\alpha$
5,8-dimetil	$\beta$	$\beta$
7,8-dimetil	$\gamma$	$\gamma$
8-monometil	$\delta$	$\delta$

### 2.4.3. Enzimatik antioksidanlar

Antioksidanlar sınıflandırılırken savunma şekillerinin enzimatik olup olmadıkları da dikkate alınır. Enzimatik antioksidanlara örnek olarak superoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon-s-transferaz (GST) verilebilir.

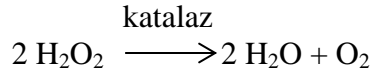
#### 2.4.3.1. Superoksit dismutaz (SOD)

Superoksit dismutaz enzimi, superoksit anyonunun ( $O_2^-$ ) oksijen ve perokside çeviriminde kataliz görevini görmektedir. Bu enzim hemen hemen tüm aerobik solunum yapan hücrelerde ve hücre dışı sıvılarda bulunmaktadır. Üstün superoksit radikali yakalama gücüne sahiptir (Scandalios 1993). Oksidatif strese karşı gözlemlenen ilk savunma mekanizması olarak bilinir.



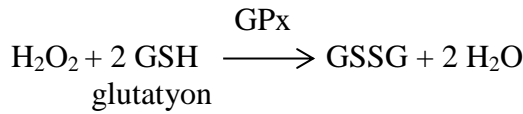
#### 2.4.3.2. Katalaz

Katalaz enzimi hidrojen peroksiti su ve oksijene çeviren bir enzimdir. SOD katalizörlüğünde oluşan hidrojen peroksit,  $HO^\cdot$  radikaline dönüşerek oksidatif hasara neden olmadan katalaz enzimi ile aşağıdaki reaksiyona göre parçalanmalıdır.



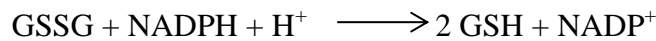
#### 2.4.3.3. Glutatyon peroksidaz (GPx)

Glutatyon; glisin, glutamate ve sistein gibi amino asitlerin sentezlediği suda çözünür bir antioksidandır. Lipid peroksit gibi reaktif oksijen türlerini doğrudan nötralize edebilir. Ortamdaki hidrojen peroksitin glutatyon yardımı ile okside glutatyona ve suya çevirimini sağlar. Reaksiyon aşağıdaki gibidir.



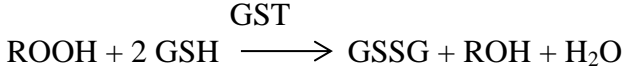
#### 2.4.3.4. Glutatyon redüktaz (GR)

GPx tarafından katalizlenen reaksiyon sonucu oluşan okside glutatyon, NADPH varlığında indirgenerek tekrar glutatyon haline çevrilmelidir. Reaksiyon aşağıdaki gibi gerçekleşir.



#### 2.4.3.5. Glutasyon-S-transferaz (GST)

Lipid peroksitlere karşı yüksek aktivite gösteren glutasyon-s-transferaz, lipid peroksitlerin aşağıdaki reaksiyona göre okside glutatyona çevrimini katalizler.

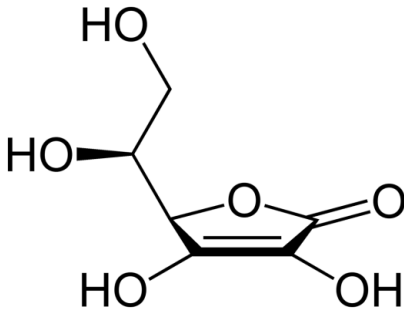


#### 2.4.4. Enzimatik olmayan antioksidanlar

Enzimatik olmayan antioksidanlar E vitamini, C vitamini ve polifenolik bileşikler, karotenoidler gibi doğal antioksidanlar ile BHT (butillenmiş hidroksitoluen), BHA (butillenmiş hidroksianisol), NDGA (nordihidroguayaretik asit) ve alkil gallatlar gibi sentetik antioksidanlar olarak kendi içinde iki gruba ayrılmaktadır. Enzimatik olmayan antioksidanlar için gıdalar asıl kaynaktır. Yaşlanmayı geciktirme, alerjik hastalıkları iyileştirme, kalp-damar hastaları ile mücadele gibi çeşitli tedavi yöntemlerinde fenolik yapıdaki antioksidanların oldukça etkili olduğu pek çok kaynakta rapor edilmiştir.

##### 2.4.4.1. C vitamini

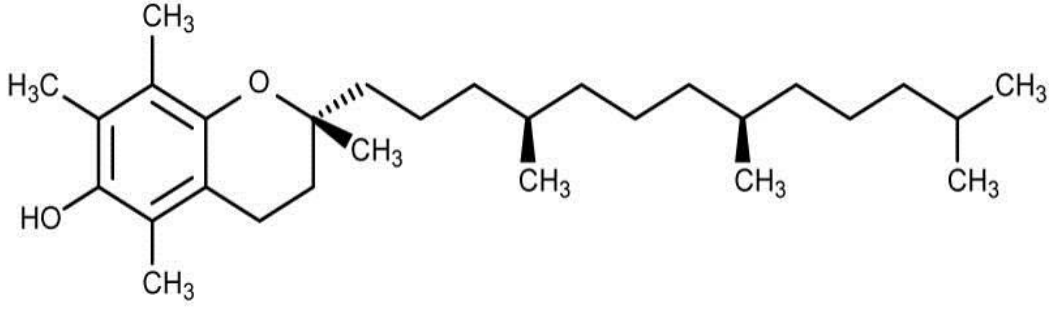
C vitamini, yani L-askorbik asit, 6 karbonlu, 2. ve 3. karbonlarına enediol grupları bağlı olan ve basit yapılı bir vitamindir (Şekil 2.4). Doğal antioksidanlar arasında önemli bir yere sahiptir. İnsan vücudunda sentezlenemediği için dışarıdan besin yoluyla alınması gerekmektedir. Turunçgiller, yeşil renkli sebzeler ile meyveler ve tropik meyvelerde milimolar düzeyinde bol miktarda bulunur. Organizmada enzim, kofaktör ve serbest radikallerin yakalanması gibi fonksiyonları vardır. Zarar görmüş hücrelerin ve dokuların onarılmasında ve lipid peroksidasyonunun önlenmesinde, kısacası oksidatif hasarı önlemek adına olumlu etkileri vardır (Conklin vd 1996).



Şekil 2.4. C vitaminin (L-askorbik asit) yapısı

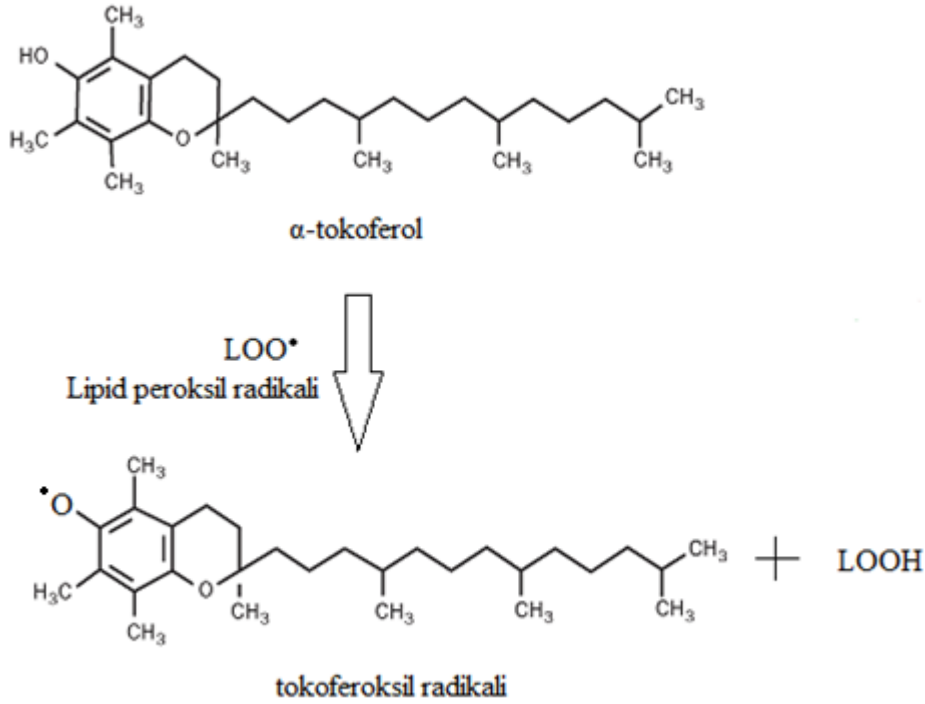
##### 2.4.4.2. E vitamini

E vitamini, tokoferol ve tokotrienolleri de içeren en temel yağda çözünür doğal antioksidandır. 8 farklı izomerik yapıda olup en yaygın bulunanı  $\alpha$ -tokoferoldür (Şekil 2.5). Radikal yakalama yeteneğinden dolayı kansere karşı koruyucudur (Brigelius-Flohe ve Traber 1999).



Şekil 2.5.  $\alpha$ -tokoferolün yapısı

İyi bir zincir kıran antioksidan olarak bilinen  $\alpha$ -tokoferol,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $^1O_2$ ,  $LOO^{\cdot}$  gibi radikalik türleri oldukça başarılı bir şekilde etkisiz hale getirir. Şekil.2.6.'da  $\alpha$ -tokoferolün lipid peroksidasyon mekanizması gösterilmiştir. Oluşan tokoferoksil radikali reaksiyon başlatacak kadar etkin değildir.

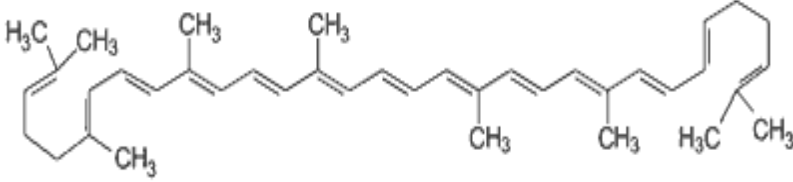


Şekil 2.6.  $\alpha$ -tokoferolün lipid peroksil radikali ile reaksiyonu

#### 2.4.4.3. Karotenoidler

Doğal bir pigment olan karotenoidler fotooksidatif bitkiler tarafından sentezlenmektedir. İyi bir oksijen radikali yakalayıcısı olan karotenoidler pek çok gıdada yüzlerce çeşit bulunmaktadır (Paiva ve Russell 1999). Karotenoidler bitkilerin, meyve ve sebzelerin kırmızı, sarı ve turuncu renklerinden sorumludurlar. Sadece bakteriler, algler ve mantarlar karotenoidleri sentezlerler (Stahl ve Sies 2003). Singlet oksijeni ve peroksil radikalini yakalayıp etkisiz hale getiren karotenoidler, molekül yapısında konjuge çifte bağlar bulunduran 40 karbonlu yapılardan meydana gelirler.

Yapısındaki konjuge çifte bağlar karotenoidlerin radikalleri yakalamadaki etki düzeyini belirler.  $\beta$ -karotenin triplet enerji düzeyi  $^1O_2$ 'ni yakalamak için gereken enerji ile yakın seviyededir. Likopen de bilenen bir karotenoiddir (Şekil 2.7)

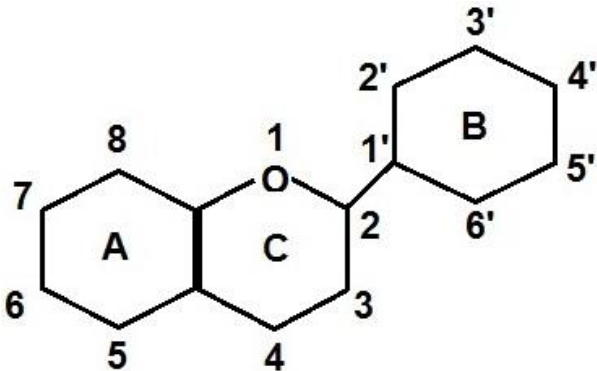


Şekil 2.7. Likopenin yapısı

#### 2.4.4.4. Polifenolik bileşenler

Polifenolik bileşikler adından da anlaşılacağı gibi yapısında birden çok fenol halkası bulundurulur. Meyve, meyve suyu, çay, kahve ve kırmızı şarap gibi bitkisel veya bitkisel orijinli gıdalarda bol miktarda bulunan polifenolik bileşenler, diğer antioksidan bileşenlere göre günlük beslenmemizde daha çok yer alırlar (Scalbert vd 2005). Onbine yakın farklı fenolik bileşik olduğu tahmin edilmektedir. Polifenolik bileşiklerin en büyük alt grubu flavonoidler olarak bilinir ve bitkilerde glikozitler olarak bulunurlar. Lipid peroksidasyonunun etkisini azaltıcı bir fonksiyona sahip olan polifenolikler singlet oksijeni süpürücü, indirgeyici, proton verici veya metal iyonu şelatlayıcı olarak görev alırlar (Cadenas ve Packer 2002).  $C_6C_3C_6$  iskeletine sahiptirler. A ve C halkaları aromatik iken C halkası heterosiklidir (Şekil 2.8).

Flavonoidlerin sınıflandırılması iki şekilde olur, antosiyaninler ve antoksaninler. Antoksanin grubunun alt grupları ise flavonol, flavanol, flavon, izoflavon, flavanonoldur. Antoksaninler hemen hemen renksiz iken antosiyaninler mor, mavi, kırmızı renktedirler (Cadenas ve Packer 2002). Flavonoidlerin aktiviteleri farklıdır. Bu farklılığın nedeni hidroksil gruplarının farklı bağlanma şekilleridir (Rice-Evans vd 1997). Çizelge 2.3'de flavonoidlerin yapılarına göre sınıflandırılması görülmektedir.

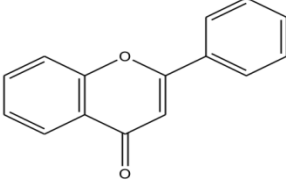
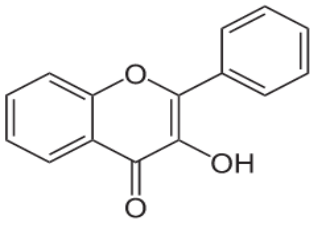
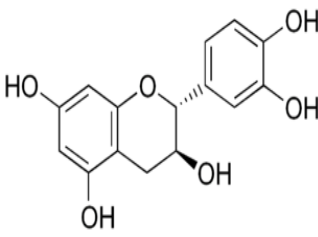
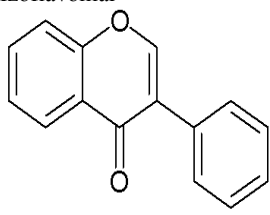
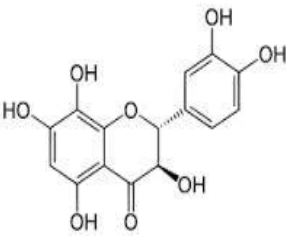
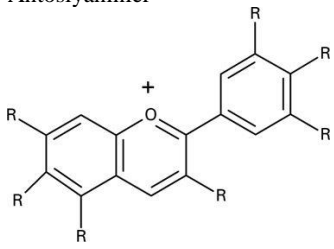


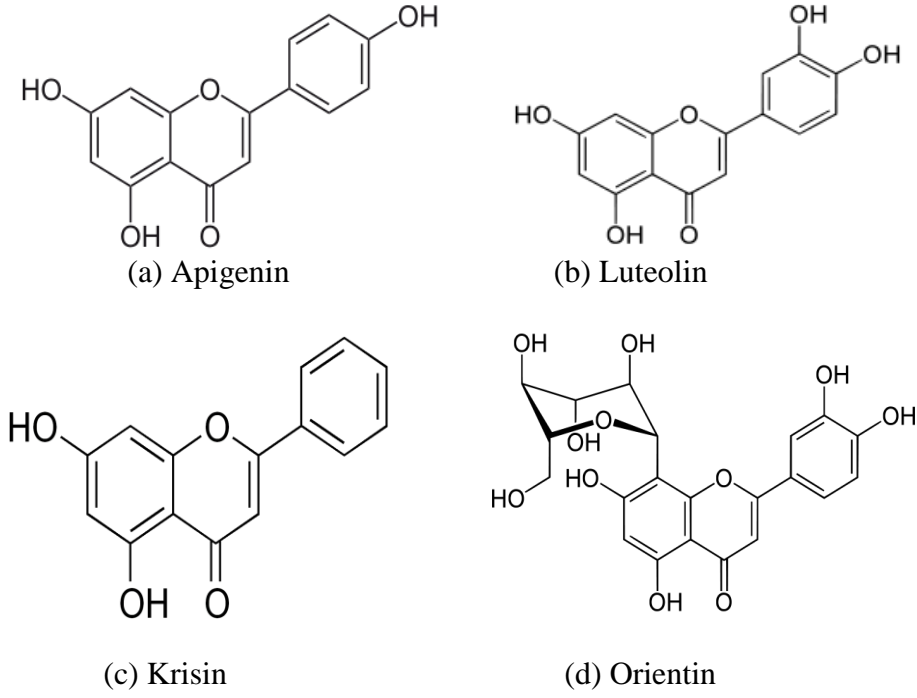
Şekil 2.8. Flavonoidlerin genel yapısı

Flavonlar kereviz, soğan, turunç kabuklarında bol miktarda bulunurlar. Apigenin, luteolin, krisin, orientin bu grubun üyeleridir.



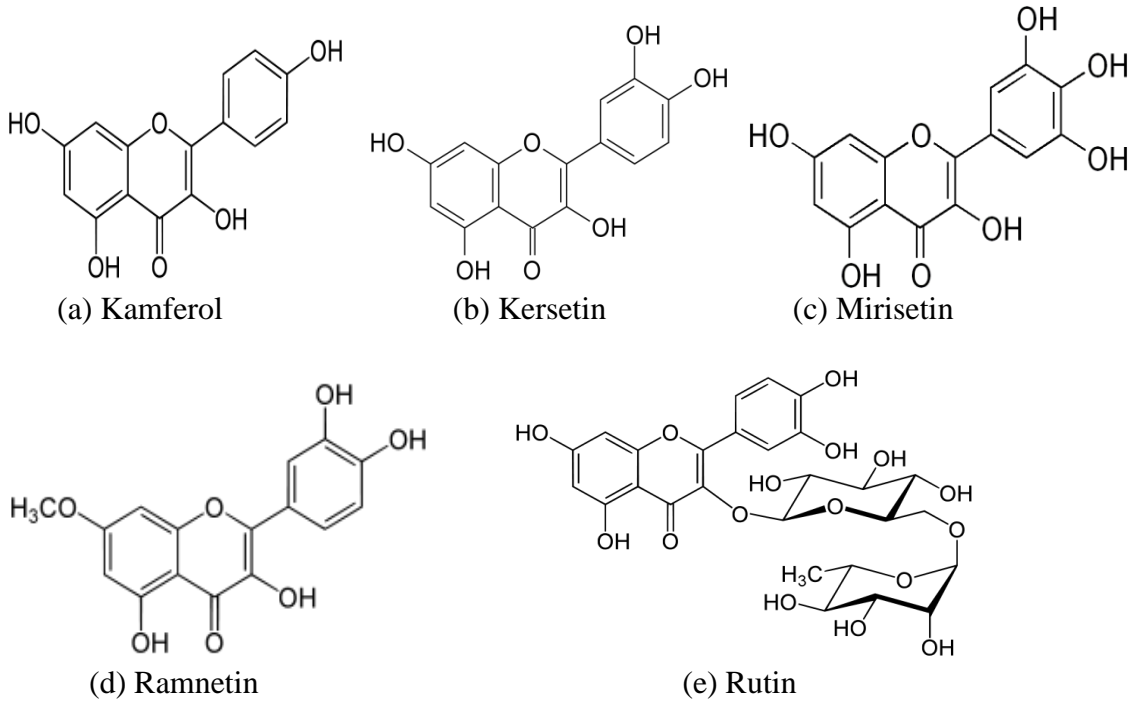
Çizelge 2.3. Flavonoidlerin yapılarına göre grupları

Yapısı	Genel adı	Süstitüsyon
<p>Flavon</p> 	Krisin	5,7-dihidroksiflavon
	Apigenin	5,7,4'-trihidroksiflavon
	Luteolin	5,7,3',4'-tetrahidroksiflavon
	Luteolin-4'-glukosit	5,7,3'-trihidroksi-4'-O-glukosit
	Luteolin-7'-glukosit	5,3',4'-trihidroksi-7-O-glukosit
	Orientin	5,7,3',4'-tetrahidroksi-8-C-glukosit
<p>Flavonol</p> 	Kamferol	5,7,4'-trihidroksiflavonol
	Kersetin	5,7,3',4'-tetrahidroksiflavonol
	Miricetin	5,7,2',3',4'-pentahidroksiflavonol
	Ramnetin	7-metoksi-5,3',4'-trihidroksiflavonol
	Rutin	5,7,3',4'-tetrahidroksi-3-O-rutinosit
	Kuersitrin	5,7,3',4'-tetrahidroksi-3-O-rhamnosit
	Tamariksetin	4'-metoksi-5,7,3'-trihidroksiflavonol
	Fisetin	7,3',4'-trihidroksiflavonol
<p>Flavan-3-Ol</p> 	(+)-Kateşin	5,7,3',4'-tetrahidroksiflavan-3-ol
	(-)-Epikateşin	5,7,3',4'-tetrahidroksiflavan-3-ol
	(-)-Epikateşingallat	5,7,3',4'-tetrahidroksiflavan(-3-O-) gallat
	(-)-Epigallokateşingallat	5,7,3',4',5'-tetrahidroksiflavan(-3-O-) gallat
<p>İzoflavonlar</p> 	Genistein	5,7,4'-trihidroksiizoflavon
	Daidzein	4',7-dihidroksiizoflavon
<p>Flavanonol</p> 	(+)-Taksifolin	5,7,3',4'-tetrahidroksiflavanonol
	Silibinin	
<p>Antosiyaninler</p> 	Malvidin	o-metillenmiş
	Siyanidin	3-hidroksiantosiyanidin
	Delfinidin	3-hidroksiantosiyanidin
	Pelargonidin	3-hidroksiantosiyanidin
	Peonidin	o-metillenmiş
	Petunidin	o-metillenmiş

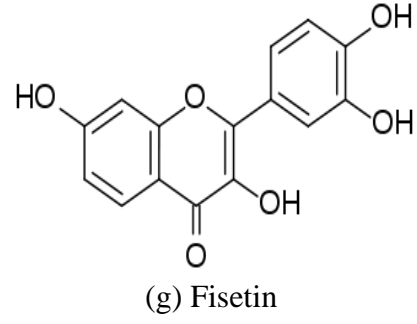
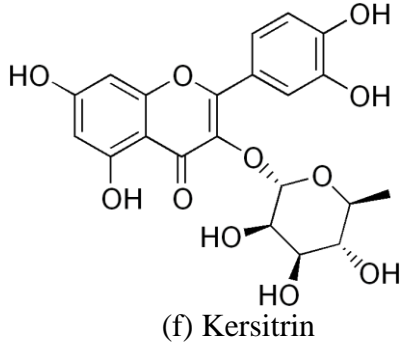


Şekil 2.9. (a) Apigenin, (b) luteolin, (c) krisin ve (d) orientinin yapıları

Flavonoller lahana, elma ve özellikler çayda bol miktarda bulunurlar. Kamferol, kersetin, mirisetin, ramnetin, rutin, tamariksetin ve fisetin bu grubun üyeleridir (Şekil 2.10).

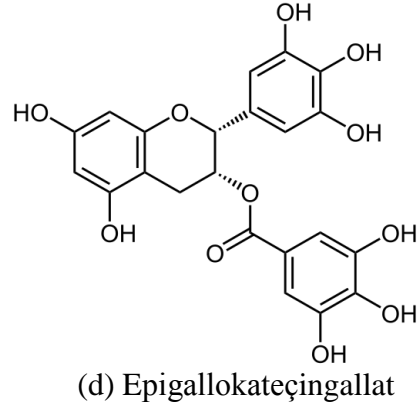
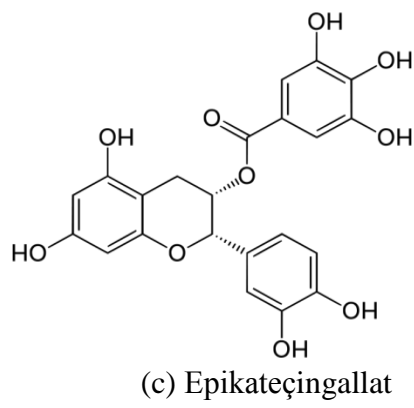
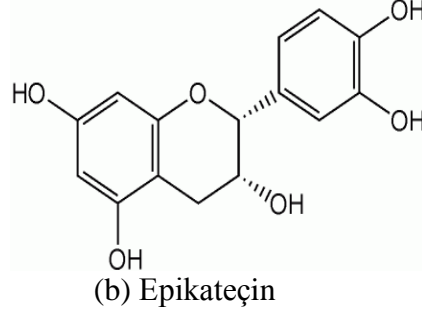
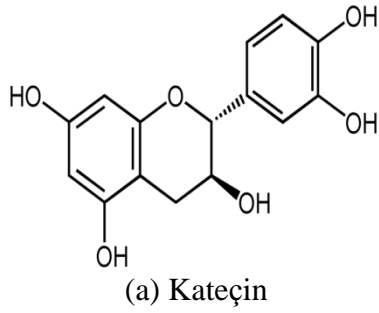


Şekil 2.10. (a) Kamferol, (b) kersetin, (c) mirisetin, (d) ramnetin, (e) rutin yapıları.



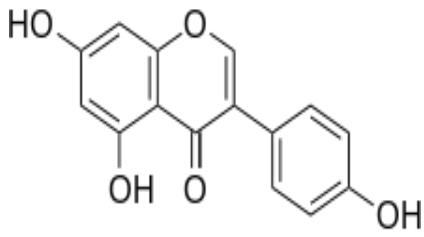
Şekil 2.10'nun Devamı. (f) kersitrin ve (g) fisetin yapıları.

Flavan-3-ol çayda ve şarapta bol miktarda bulunur. Bu grup üyeleri kateçin, epikateçin, epikateçingallat, epigallokateçingallatlardır (Şekil 2.11). Flavonların indirgenmiş türevleridirler.

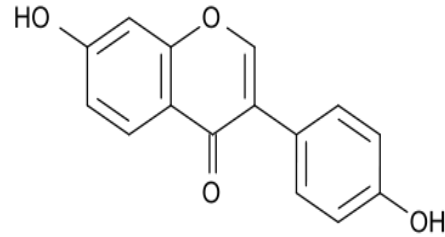


Şekil 2.11. (a) Kateçin, (b) epikateçin, (c) epikateçingallat, (d) epigallokateçingallatın yapıları

İzoflavonlar soya fasulyesinde bol miktarda bulunur. Genistin ve daidzein bu grubun üyeleridir (Şekil 2.12).



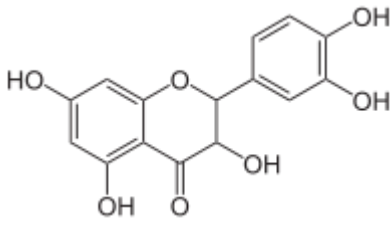
(a) Genistin



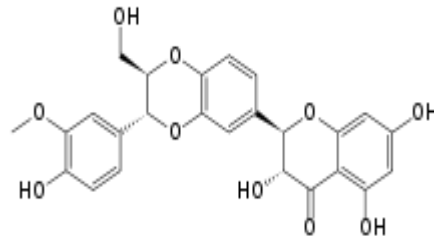
(b) Daidzein

Şekil 2.12. (a) Genistin ve (b) daidzeinin yapıları

Flavanonoller grubunu en önemli üyeleri taksifolin ve silibininidir (Şekil 2.13). Portakal, limon, turunç gibi meyvelerin kabuklarında bol miktarda bulunurlar.



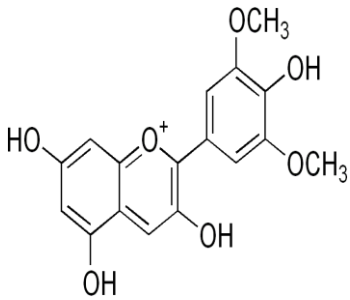
(a) Taksifolin



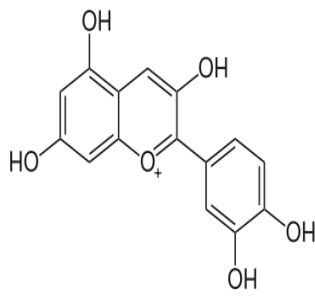
(b) Silibinin

Şekil 2.13. (a) Taksifolin ve (b) silibinin yapıları

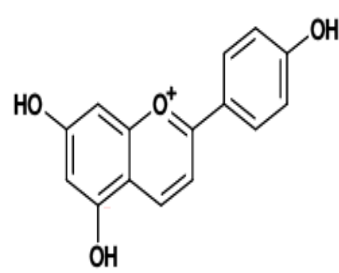
Antosiyaninler bitkilerde kırmızı ve mavi rengi veren en büyük gruptur. Malvidin, siyanidin, apigenidin, delfinidin, pelargonidin, peonidin, petunidin bu grubun üyeleridir (Şekil 2.14).



(a) Malvidin

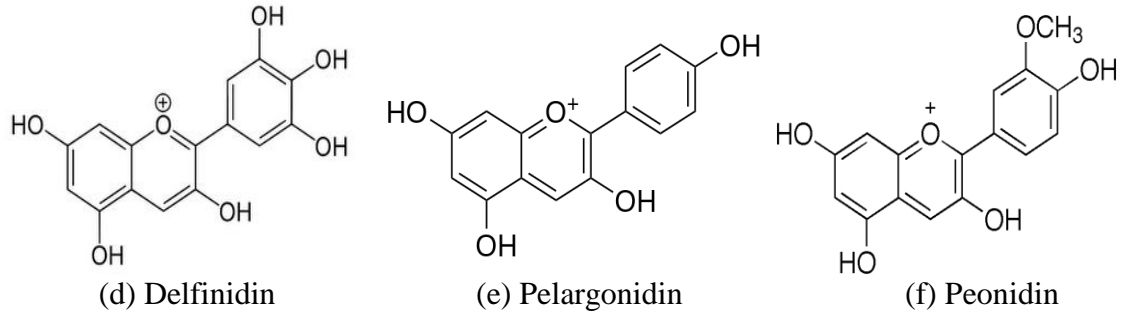


(b) Siyanidin



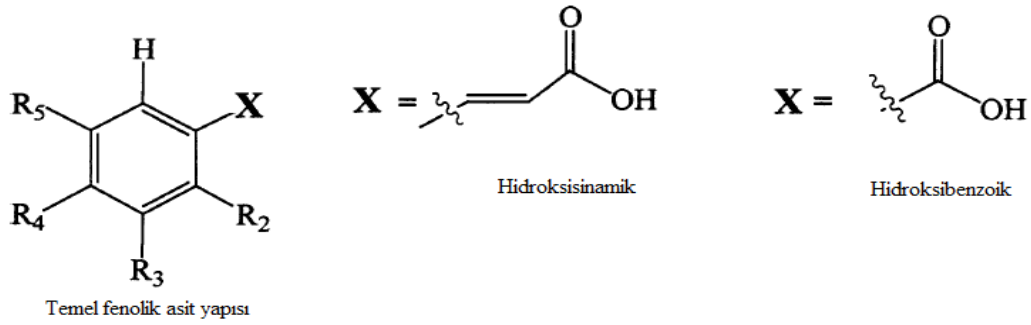
(c) Apigenidin

Şekil 2.14. (a) Malvidin, (b) siyanidin, (c) apigenidin yapıları



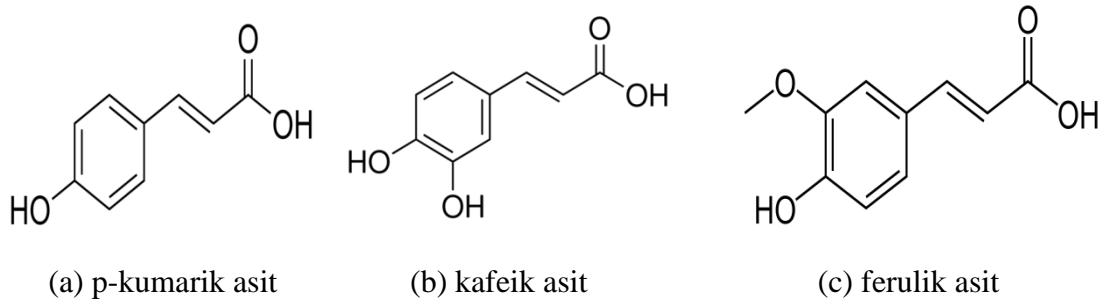
Şekil 2.14'ün Devamı. (d) delfinidin, (e) pelargonidin, (f) peonidin yapıları

Fenolik asitler fenolik bileşiklerin bir alt sınıfı olarak değerlendirilebilir. Fenolik asitlerin yapısında adından da anlaşılacağı gibi karboksilik asit grubu bulunmaktadır. Kendi içinde hidrosisinamik ve hidrosibenzoik yapılar olarak 2 gruba ayrılırlar. Bu iki yapıda temel iskelet aynı iken bağlı olan hidroksil gruplarının yeri ve sayısı değişmektedir (Şekil 2.15. Robbins R.J. 2003). Fenolik asitler gıdalarda flavonoidler ve antosiyaninlerden daha fazla bulunur ve tüketilirler (Rice-Evans vd 1997).



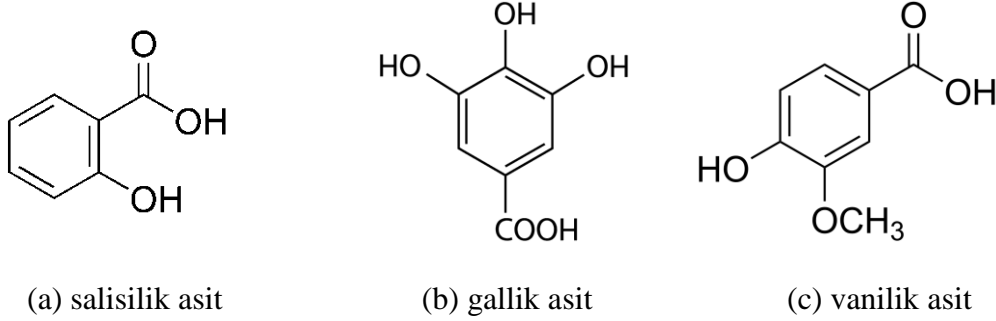
Şekil 2.15. Temel fenolik asit, hidrosisinamik ve hidrosibenzoik asit yapıları

Genellikle serbest halde bulunan hidrosisinamik asitler, meyve ve sebzelerde düşük miktarlarda bulunurlar. Bu düşük miktarları da alkollerle etkileşerek oluşturduğu ester formatındadır (Spanos ve Wrolstad 1992). Bu asit türü bitkilerin hücre duvarına katılırlar (Heller ve Forkmann 1993). p-kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit (Şekil 2.16), izoferulik asit ve sinapik asit başlıca hidrosisinamik asitlerdendir.



Şekil 2.16. (a) p-kumarik asit, (b) kafeik asit ve (c) ferulik asit yapıları

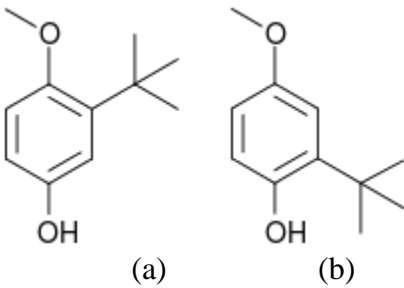
Salisilik asit (Şekil 2.17 a), m-hidroksibenzoik asit, p-hidroksibenzoik asit, gallik asit (Şekil 2.17 b), protokateçi asit, vanilik asit (Şekil 2.17 c), sirincik asit ise hidroksibenzoik asit grubunun başlıca üyeleridir.



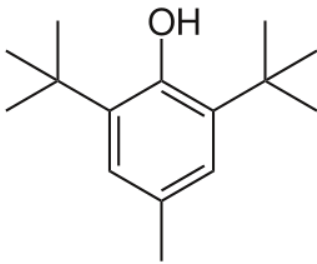
Şekil 2.17. (a) Salisilik asit, (b) gallik asit ve (c) vanilik asit yapıları.

#### 2.4.4.5. Bütilenmiş hidroksianisol (BHA) ve bütilenmiş hidroksitoluen (BHT)

Bütilenmiş hidroksi toluen (BHT) ve bütilenmiş hidroksi anisol (BHA) işlenmiş gıdalarda yağların, kokuların ve renklerin bozulmasını engellemek amacıyla eklenen, yaygın bir şekilde kullanılan sentetik antioksidanlardır (Ito vd 1983). Yağda çözünen bu iki sentetik antioksidan bazı kullanıcılarda alerjik etki gösterebilmektedir. BHA iki izomerik yapının karışımıdır (Şekil 2.18). Bu yapılar 2-tert-butil-4-hidroksianisol ve 3-tert-butil-4-hidroksianisol dür. Aromatik halka serbest asitleri yakalayabilme yeteneğine sahiptir. BHT'nin yapısı da Şekil 2.19'da görülmektedir.



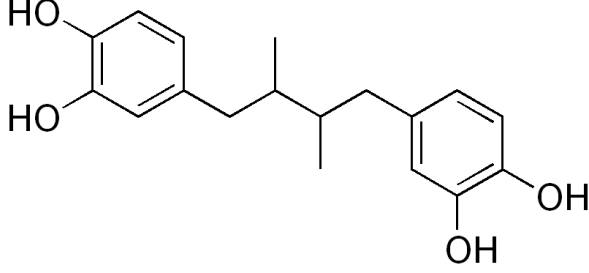
Şekil 2.18. BHA izomerik yapılar (a) 2-tert-butil-4- hidroksianisol, (b) 3-tert-butil-4- hidroksianisol



Şekil 2.19. BHT'nin yapısı

#### 2.4.4.6. Nordihidroguareyetik asit (NDGA)

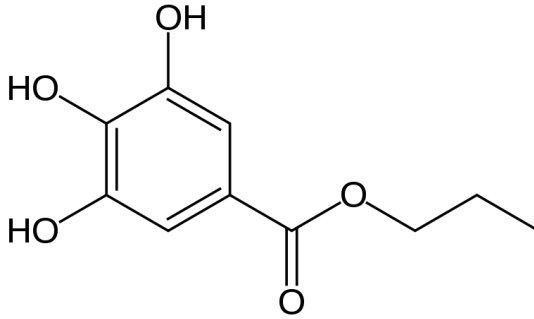
NDGA'nın (Şekil 2.20), peroksinitrit, singlet oksijen, hidroksi radikali gibi bazı reaktif oksijen türlerini yakalayarak hücre duvarında bozulmayı önlediği düşünülmektedir. Diğer yapay antioksidanlar gibi gıdalara koruyucu madde olarak eklenir. Toksisitesi konusunda çalışmalar yapılmaktadır (Lu vd 2010).



Şekil 2.20. Nordihidroguareyetik asit (NDGA) yapısı

#### 2.4.4.7. Gallatlar

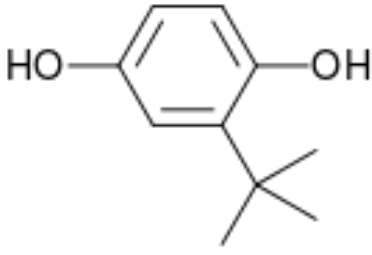
Yağların oksidasyonunu engellemek için kullanılan gallatlar, gallik asitin esterleşmesi ile oluşmaktadır. En yaygın kullanılanı propil galattır (Şekil 2.21). Suda çözünürlüğü düşük ve ısıya dayanımı azdır. Yapısındaki 3 hidroksil grubu onu oldukça reaktif yapmaktadır.



Şekil 2.21. Propil gallat yapısı

#### 2.4.4.8. Tersiyer butilhidrokinon (TBHQ)

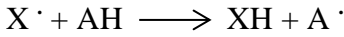
TBHQ (Şekil 2.22) genellikle doymamış bitkisel yağların raf ömrünün uzatılmasında kullanılmaktadır. BHA ile birlikte uygulanabilmektedir.



Şekil 2.22. Tersiyer butilhidrokinon (TBHQ) yapısı

## 2.5. Antioksidantların Aktivitesini Ölçmek İçin Kullanılan Bazı Metotlar

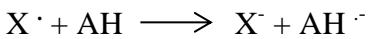
Antioksidanların radikallerin aktivitesini gidermek için kullandığı mekanizma iki türdür. Bu mekanizmalar hidrojen atomu transferi (HAT) ve tek elektron transferidir (TET). Bu yöntemlerin kinetiği farklı olsa da reaksiyonun sonucu aynı olmaktadır. HAT bazlı metotlar tipik olarak ortama hidrojen vererek serbest radikalleri bastırmak yöntemiyle çalışırlar.



X: radikal, AH: antioksidan

HAT metotları pH ve çözücü bağımsız olarak oldukça hızlı bir şekilde gerçekleşir (Prior vd 2005).

TET bazlı metotlarda ise metal, karbonil ve radikal içeren bileşenlere bir elektron gönderilerek indirgenmesi sağlanır ve antioksidan yeteneğinin varlığı ölçülür. Yavaş gerçekleşen TET metotlarında antioksidan kapasite ölçümleri, peroksidasyon sonucu ürün rengindeki yüzde azalmanın kontroldeki değişime göre kıyaslanmasıyla hesaplanır (Prior vd 2005).

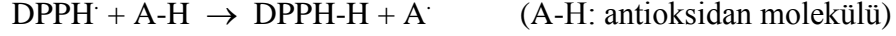


X: radikal; AH: antioksidan

### 2.5.1. DPPH<sup>·</sup> radikali yakalama aktivitesi

Bitki örnekleri için en çok kullanılan antioksidan aktivite test yöntemlerinden biridir. Bu metodun temeli, DPPH<sup>·</sup> (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazylstabil) radikalinin antioksidan bileşiklerce sönmelenmesine, dolayısıyla 515-525 nm arasındaki DPPH<sup>·</sup> radikalindeki absorpsiyonun düşürülmesine dayanmaktadır (DPPH<sup>·</sup>ın yapısı ve antioksidan tarafından sönmelme mekanizması Bölüm 3.9'da verilecektir). Belli bir konsantrasyonda hazırlanan DPPH<sup>·</sup> çözeltisi hidrojen atomu verebilecek bir maddeyle karıştırıldığında radikalın indirgenmiş formu açığa çıkar ve bunun sonucu olarak DPPH<sup>·</sup> radikalinin koyu mor olan renginde bir açılma görülür. Başlangıçtaki DPPH<sup>·</sup> radikal absorpsiyonunda %50'lik bir azalma olması için gerekli antioksidan konsantrasyonu ile materyalin antioksidan aktivitesi belirlenir ve IC<sub>50</sub> ile ifade edilir. Aşağıda bununla ilgili olarak temsili bir reaksiyon verilmiştir.



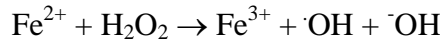


### 2.5.2. ABTS<sup>·+</sup> radikal katyon yakalama aktivitesi

Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) testi Re vd (1999) tarafından rapor edilmiştir. Bu test, 660, 734 ve 820 nm de maksimum absorpsiyon gösteren 2,2'-azinobis (3-etil-benzothiazoline-6-sulfonate) radikal katyonunun absorbansının antioksidanlarca inhibisyonuna dayanmaktadır. Deneyle, ABTS nin potasyum persülfatla oksidasyonu sonucu ortaya çıkan ABTS<sup>·+</sup> renkli kromoforundaki renk kaybı takip edilerek yürütülür. Test hem hidrofilik hem de lipofilik bileşiklere uygulanabilir. ABTS<sup>·+</sup> çözeltisi seyreltilir ve bitki ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının, 1 mL ABTS<sup>·+</sup> çözeltisi ile karıştırılmasından hemen sonraki 10 dakika içinde absorbans ölçülür. Vitamin E'nin suda çözünür analogu olan troloks bu testte referans standart olarak kullanılmaktadır.

### 2.5.3. Hidroksil radikali (<sup>·</sup>OH) yakalama aktivitesi (deoksiriboz degradasyon) testi

<sup>·</sup>OH radikali, yüksek oksitleme gücü ve pek çok biyoorganik substratla verdiği çok yüksek oksidasyon hızı sebebiyle oksidatif baskıya sebep olan en yıkıcı türdür. Bu nedenle bu radikallerin işlevlerinin engellendiği bir canlı içi sistem geliştirmek imkansızdır. Literatürde hidroksil oluşumuna yol açan farklı sistemler olduğu rapor edilmiştir (Moore vd 2006). Bunlardan biri tamponlanmış ortamda (pH 7,4) gerçekleştirilen standart Fenton reaksiyonudur. Bu reaksiyonda Fe<sup>3+</sup>/EDTA/askorbik asit/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rol almaktadır.



Bu reaksiyon sonucu açığa çıkan <sup>·</sup>OH radikalleri için antioksidan moleküllerinin yarışması beklenir. Reaksiyon karışımında bulunan antioksidan moleküllerinin aktivitesi ve konsantrasyonuna karşı yine ortamda bulunan 2-deoksi-D-riboz un degradasyonu sonucu oluşan parçalanma ürünlerinin konsantrasyonu spektrofotometrik yollarla takip edilir. Oluşan ürünlerin reaksiyon karışımına ilave edilen 2-tiyobarbitürik asit (TBA) ile 90-100<sup>0</sup>C'de ısıtılması 532 nm de takip edilebilen pembe renkli kromojen grubun oluşumuna neden olur (Mangalhaes vd 2008).

### 2.5.4. Oksijen radikali absorbans kapasitesi (ORAC) testi

Test, AAPH (2,2'-azobis (2-amidino-propan) dihidroklorür)'nin termal ayrışması ile oluşturulan peroksil radikali ile indüklenen oksidasyonun inhibisyonuna dayanır. Testte oluşan peroksil radikali floresan olmayan bir ürün oluşturmak üzere floresan bir prob (örneğin fluorescein) ile reaksiyona sokulmaktadır. Bir antioksidanın aktivitesinin hesaplanması, floresanın bozulma eğrilerinin altında kalan net integre edilmiş alanlardan yapılır. Testin avantajları arasında antioksidan aktivitenin değerlendirilmesine inhibisyon süresi ve inhibisyon derecesinin katılması yer almaktadır. Bu testle ilgili son güncellemeler prob olarak fluoresceinin kullanılması ve bir maddenin lipofilik, hidrofilik ve toplam antioksidan kapasitesini ölçebilme

olasılığıdır. Bu test genelde spektrofotometrik olarak uygulanmasına rağmen testin kromatografik sisteme adapte edildiği bir çalışma da mevcuttur (Bentayeb vd 2009).

### **2.5.5. Süperoksit radikali ( $O_2^-$ ) yakalama aktivitesi**

Süperoksit radikal anyonu ( $O_2^-$ ) oksijen molekülüne bir elektronun verilmesi ile oluşur. Bu radikal çeşitli metabolik prosesler ya da radyasyonlanma ile oksijenin aktivasyonu sonucu oluşur (Vinson vd 1995).  $O_2^-$  yakalama kapasitesinin belirlenmesi için kullanılan analitik metotlardan biri enzimatik olmayan yolla gerçekleştirilen fenazin metosülfat (PMS)'in nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) ile olan reaksiyonunu esas alır. Bu reaksiyon sonucu açığa çıkan  $O_2^-$  nitrobluetetrazolium (NBT)'u, formazana indirgemektedir ve bu da spektrofotometrik olarak 560 nm de izlenmektedir (Handelman vd 1999). Antioksidan bileşikler  $O_2^-$  için NBT ile yarışır ve reaksiyon hızını düşürürler.

### **2.5.6. Lipid oksidasyon inhibisyonunun gıda lipidlerinde ölçümü; Tiyobarbitürik asitle reaksiyona giren maddeler (TBARS) testi**

Bu test, lipid hidroperoksitlerinin ayrışmasıyla açığa çıkan ikincil ürünlerin yani malondialdehit (MDA) ile tiyobarbitürik asit (TBA) in reaksiyonuna dayanır. Bu reaksiyon sonunda 532 nm'de maksimum absorbansa sahip kırmızı kromofor açığa çıkar. Serbest yağ asitleri, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), hücreler veya dokulardan alınan sıvılar (idrar, serum) gibi pek çok oksitlenebilir substrat TBARS testinde kullanılmıştır. MDA özellikle linolenik asit gibi en az üç tane çift bağ içeren yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu açığa çıkmaktadır. Ancak bu bileşik linoleik ve oleik asidin ayrışma ürünlerinin daha ileri oksidasyonu sırasında da oluşabilmektedir (Laguerre vd 2007).

### **2.5.7. Lipid oksidasyon inhibisyonunun biyolojik olarak önemli lipitlerde ölçümü**

Tez çalışmasının amaçlarından biri, çalışılması planlanan bitki ekstraktlarının lipid peroksidasyonunu inhibe etme yeteneğinin, gıda lipidleri yanında, organizmadaki biyolojik çevreyi yansıtan önemli lipitlerde de ölçülmesi olduğundan, bu ekstraktların LDL ve büyükbaş hayvan beyni ekstraktından (BBE) hazırlanan lipozomlarda oksidasyonu önleme yeteneğinin incelenmesi planlanmıştır. LDL ve mikrozomlar gibi doğal membran yapılar (biyolojik ortamların özütleri) veya lipozomlar gibi model yapılar bu amaçla en çok kullanılan substratlardır (Laguerre vd 2007).

#### **2.5.7.1. LDL oksidasyonu inhibisyonunun ölçülmesi**

Hem lipid hem de protein fraksiyonlarından meydana gelen serbest radikallerce oluşan oksidatif reaksiyonlar başta olmak üzere farklı mekanizmalarla meydana gelen LDL oksidasyonu, aterosklerozun erken oluşumunda önemli bir adımdır (Pearson vd 1997). Antioksidanların LDL oksidasyonunu inhibe edebileceği yaygın olarak kabul edilmektedir. Dolayısıyla bu bileşikler kardiovasküler hastalıkların riskini azaltabilir (Meyer vd, Pearson vd 1997). LDL oksidasyonunun takibinin önerilmesinin nedenlerinden biri de LDL nin 4 farklı oksitlenebilir hedef içermesidir. Bunlar;

- Serbest ya da esterleşmiş kolesterol
- Yüzey fosfolipidlerine bağlanmış çoklu doymamış yağ asitleri
- Doymamış yağ asitlerini içeren triaçilgliseroller
- Apolipoprotein B

Bu çalışmada LDL oksidasyonunun derecesi MDA gibi oksidasyon ürünleri arasında yer alan TBA ile reaksiyona giren maddelerin oluşumunun takip edilmesiyle belirlenmiştir (Yu vd 2005). Metodun detayları materyal ve metot bölümünde verilecektir (Bölüm 3.15).

#### **2.5.7.2. Büyükbaş hayvan beyni lipozomlarında (BBE) lipid peroksidasyon inhibisyonunun ölçülmesi**

Lipozomlar, iki sulu kompartman arasında organize edilmiş bir ya da birkaç fosfolipid ikili tabakasıyla çevrelenmiş küresel yapılardır. Küçük, büyük ve devasa multilamellar ve unilamellar lipozomlar olarak ayrılırlar (Laguerre vd 2007). Porter vd (1980) membran fosfolipidlerinin serbest radikal oksidasyonunu gösteren ilk araştırmacılarıdır. Pek çok araştırmacı, biyolojik ortamlarda veya et ürünlerinde fosfolipidlerin oksidasyona karşı verdikleri yanıtı ve bu oksitlenebilir substratın korunması amacıyla endojen ve ekzojen antioksidanların kapasitesini belirlemek için hayvan dokularından elde edilen membran yapıları modellemiştir. Bazı araştırmacılar mono- ya da multi-lamellar lipozom sistemleri oluştururken (Yamaoka vd 1991) diğerleri tavşan karaciğeri (Aruoma vd 1990) ya da beyinden ekstrakte edilen mikrozomları çalışmışlardır. Bu çalışmada büyükbaş hayvan beyni lipozomlarında  $Fe^{2+}$ /askorbat ile indüklenmiş lipid peroksidasyonunun incelenmesi planlanmıştır (Galvez vd 2005). Lipozomlarda meydana gelen oksidasyonun seviyesi LDL oksidasyonunun takibinde olduğu gibi TBARS ın ölçümüyle belirlenmiştir. Metodun detayları Bölüm 3.16'da verilecektir.

#### **2.5.8. Demir tiyosiyanat metodu (FTC) ile lipid peroksidasyonun ölçülmesi**

Bu test TBA metodundan farklı olarak lipid peroksidasyonunun başlangıcındaki peroksit miktarının tespitine dayanır. Demir (II) klorür ile reaksiyona giren peroksit demir (III) klorürü oluşturur. TBARS oluşumuna dayalı absorbans ölçümleri yine 532 nm'de yapılır. Antioksidan aktivitenin peroksit oluşumu ile ters orantılı olmasından dolayı peroksit miktarı azaldıkça antioksidan aktivite de artmaktadır (Rahmat vd 2007). Bu metodun detayları Bölüm 3.17'de görülebilir.

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Kullanılan Cihazlar

Bu tez çalışmasında fenolik bileşenlerin tayininde kullanılan sıvı kromatografi sistemi, DAD detektöre sahip Agilent 1100 serisi HPLC'dir. HPLC sisteminde kullanılan kolon ise Agilent marka yüksek polariteli 5µm partikül boyutlu 4.6 x 250mm Hypersil ODS C18'dir.

Spektrofotometrik ölçümlerde mikro plaka okuyuculu Thermo Multiskan FC Microplate Photometer ve Varian Cary 100 Bio serisi spektrofotometre kullanılmıştır. Floresans ölçümü için ise Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer kullanılmıştır.

Standartların ve ekstraktların tartımında ±0,1mg hassasiyetli Scaltec SPB31 terazi, bitki ekstraktlarının elde edilmesinde IKA RV10 dönerli buharlaştırıcı, karıştırma ve temizleme işlemlerinde ultrasonik banyo olarak Digital Ultrasonic Cleaner, inkübasyon işlemlerinde Heidolph Unimax 1010 inkübatör kullanılmıştır.

#### 3.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler ve tedarikçi firmaları şu şekildedir. Etanol, metanol, aseton, n-hekzan, asetonitril, asetik asit, Folin-Ciocalteu reaktifi, sodyum hidroksit, demir (III) klorür heksahidrat, o-fosforik asit ve demir (II) klorür Merck Millipore'dan; dietileter, klorofil a&b, gallik asit, fluorescein, PBS, DPPH, ABTS, troloks, askorbik asit, NADH, PMS, AAPH, linoleik asit, lipoprotein, büyükbaş hayvan beyni ekstraktı (BBE), %95'lik klorojenik asit, %98'lik kafeik asit, %95'lik şirincik asit, %98'lik p-kumarik asit, %99'luk ferulik asit, %96'lık rosmarinik asit, %98'lik kuarsetin, %98'lik luteolin, %97'lik apigenin, %96'lık mirisetin ve (±)-α-tokoferol Sigma Aldrich'ten, %97'lik rutin trihidrat, alüminyum klorür heksahidrat ve sodyum n-dodesil sülfat Alfa Aesar'dan; EDTA, 2-TBA, demir (II) klorür, vitamin-C, 2-deoksi-D-riboz Fluka'dan; ramnetin, NBT ve phenazine methosulfate AppliChem'den; TCA ve petrol eteri ise Reidel-de Haen firmasında temin edilmiştir.

#### 3.3. *Daphne Gnidioides* ve *Daphne Sericea* Bitkilerinin Toplanması ve Analize Hazırlanması

Çalışmada incelenen *Daphne* türlerinden *D. gnidioides* (eğircik çalısı)'in çiçeklenme zamanı Mayıs-Haziran, *D. sericea* (develik, gökçe, tavuk çiçeği)'nin çiçeklenme zamanı ise Şubat-Mayıs ayları arasına rastlamaktadır. Bu bitkiler gelişimleri de yerinde gözlenerek Akdeniz Üniversitesi kampüs alanı içinde doğal ortamında yetişen makilik alandan toplanmıştır.

Toplanan bitkiler, etiketlenmiş ayrı plastik poşetlerde laboratuvara taşınmıştır. Laboratuvarda oda şartlarında kurutma kağıtları üzerine yayılarak 10 gün süre ile kurumaya bırakılmışlardır. Kuruma süreci tamamlandıktan sonra yaprakları öğütücü ile öğütülüp toz haline getirilmişlerdir. Bitkilere ait resimler Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de gösterilmektedir.



Şekil 3.1. *Daphne Gnidoides*



Şekil 3.2. *Daphne Sericea*

#### **3.4. *Daphne Gnidoides* ve *Daphne Sericea* Bitki Ekstraktlarının Eldesi**

Her iki bitkinin kurutulmuş ve öğütülmüş kısımları, ekstraktlarının elde edilmesi için oda sıcaklığında belirlenen çözenler ile yaklaşık 3 gün boyunca bir çalkalayıcı üzerinde çalkalanmıştır. İzole edilmeye çalışılan bitki kısımları genel olarak bitkilerin polar karakterde olan ve fenolik bileşenleri içeren fraksiyonlarıdır. Ancak farklı polaritedeki çözücüler kullanılarak her iki bitkiye ait kısımlar izole edilmiştir. Çalışmada polar çözücü olarak metanol, orta polaritedeki çözücü olarak aseton ve apolar çözücü olarak n-hekzan kullanılmıştır. Her bir bitkiden behere 10,50 g tartılıp üzerine 200 mL seçilen çözücüler ayrı ayrı eklenmiş ve bu işlem yeterli ekstrakt eldesi için toplamda 3 paralel tekrar halinde yapılmıştır. Çalkalama sonucu ele geçen ve fenolik antioksidan grupları içeren çözelti vakum filtrasyon ile çözücüde çözünmeyen kısımdan ayrılmıştır. Bu çözeltinin çözücüsü bir döner buharlaştırıcı yardımıyla indirgenmiş basınç ve 40 °C sıcaklıkta uzaklaştırılmıştır. Geriye kalan fraksiyon, antioksidan aktiviteyi olumsuz yönde etkileyeceği düşünülen klorofil içeriğini mümkün olduğunca uzaklaştırmak için defalarca hekzan ile yıkanıp süzülmüştür. Ele geçen

ekstraktlar olası bir çözücü kalıntısını uzaklaştırmak için vakumlu etüvde 1 gün düşük sıcaklıkta (30-35°C gibi) bekletilmiştir. Elde edilen ekstraktlar analiz edilene kadar derin dondurucuda (-20°C) saklanmıştır.

Bitki ekstraktlarının kimyasal içerik testleri 3.5, 3.6, 3.7 ve 3.8 numaralı başlıklarda anlatılmıştır.

### 3.5. Fenolik Bileşenlerin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) Cihazı ile Belirlenmesi

Bitki ekstraktlarının antioksidan aktivitelerinden sorumlu bileşikler genelde fenolik yapıdaki bileşikler olduğu için, onların flavonoidler, fenolik asitler ve terpenoidler gibi farklı sınıflardaki fenolik bileşenleri sıvı kromatografisi ile tayin edilmiştir. Bunun için Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde bulunan Agilent 1100 HPLC-DAD cihazı kullanılmıştır. Çalışmada kolon olarak Agilent marka yüksek polariteli 5µm partikül boyutlu 4.6 x 250mm Hypersil ODS C18 kullanılmış ve sıcaklığı 28°C olarak ayarlanmıştır. DAD dedektörde ölçümler 5 ayrı dalga boyunda aynı anda yapılmıştır. Dalga boyları kaynak taramalarından ve denemelerden sonra 310 nm, 330 nm, 250 nm, 280 nm ve 370 nm olarak seçilmiştir. Her bir enjeksiyon, post enjeksiyon süresi dahil toplamda 70 dakika sürmüştür. Mobil fazın akış hızı 0.9 mL/dk dır. Mobil faz olarak %5 asetik asit içeren ultra saf su (A fazı) ve metanol (B mobil fazı) kullanılmıştır. Uygulanan gradiyen akış programı aşağıdaki şekildedir;

Çizelge 3.1. HPLC mobil faz akış programı

Süre (dakika)	% Mobil Faz A	% Mobil Faz B
0	95	5
3	90	10
5	85	15
10	80	20
13	75	25
25	70	30
35	65	35
39	58	42
42	55	45
44	60	50
47	45	55
50	30	70
56	25	75
60	0	100

Enjeksiyon boyunca mobil fazın polaritesi değiştiği için de farklı polaritedeki fenolik bileşenler farklı zamanlarda kolondan çıkıp detektöre ulaşmıştır.

Ekstraktlarda analizi yapılan fenolik bileşenler sirincik asit, kersetin, p-kumarik asit, rosmarinik asit, apigenin, kafeik asit, ramnetin, klorojenik asit, ferulik asit,

mirisetin, rutin ve luteolindir. İncelenen fenolik bileşenlerin standartları Çizelge 3.1’de verilen akış programı ile HPLC’ye tek tek enjekte edilmiş, alıkonma süreleri tespit edilmiştir. Kullanılan akış programı sayesinde fenolik bileşenler farklı sürelerde gözlemlenmiş ve aynı alıkonma süresinde kolondan çıkma durumu, dolayısıyla pik çakışması durumu ortadan kaldırılmıştır. Ekstraktların her bir bileşeninin absorpsiyonu, standartının farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerinden elde edilen verilerle çizilen kalibrasyon eğrisinde değerlendirilmiştir. Ekstraktlar içinde diğer bileşiklerle bağlı halde bulunan fenolik bileşenleri serbest hale getirip belirtilen koşullarda analizlerini ve pik çözülmesini mümkün kılmak için asit hidrolizi işlemi uygulanmıştır (Huang vd 2007). Asit hidrolizi yönteminde yaklaşık 0.1 g ekstrakt üzerine 4 mL %80’lik metanol ve 1 mL 4M HCl eklenmiştir. Bu çözelti daha sonra 30 saniye azot gazı altında bekletilmiştir. Ardından 1 saat boyunca 90°C’de su banyosunda tutulmuştur. Metanol ile 5 mL’ye tamamlanan örnekler 7 dakika boyunca ultrasonik banyoda tutulmuştur. 3000 devir/dakikada santrifüj edilen ekstraktların supernatan kısımları 50 mL’lik falkon tüplere aktarılmıştır. Çözeltinin çözücüsü azot gazı altında uçurulmuştur. Elde edilen katı kısım yaklaşık 1000 µg/mL olacak şekilde metanolde çözülmüş ve 0,2 mikron şırınga ucu filtre yardımıyla filtre edildikten sonra HPLC’de analiz edilmiştir.

### 3.6. Klorofil A, Klorofil B ve Toplam Karotenoid İçeriğinin Belirlenmesi

Elde edilen bitki ekstraktlarından tartılan kısımlar dietil eter ve metanol içinde homojenize edilip belli bir süre santrifüj edilmiştir. Çökelti kısmından ayrılan süzütünün absorpsiyonu klorofil a, klorofil b (Şekil 3.3) ve toplam karotenoid miktarı için sırası ile 662, 646 ve 470 nm’de ölçülmüştür. Bu pigmentlerin ekstraktlar içindeki miktarları Lichtenthaler ve Wellburn’nün (1983) belirttiği aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır;

Dietileterde çözünen ekstraktlar için;

$$C_a (\mu\text{g/ml}) = 10.05 A_{662} - 0.766 A_{644} \quad (3.1)$$

$$C_b (\mu\text{g/ml}) = 16.37 A_{644} - 3.14 A_{662} \quad (3.2)$$

$$C_{x+c} (\mu\text{g/ml}) = (1000 A_{470} - 1.28 C_a - 56.7 C_b) / 230 \quad (3.3)$$

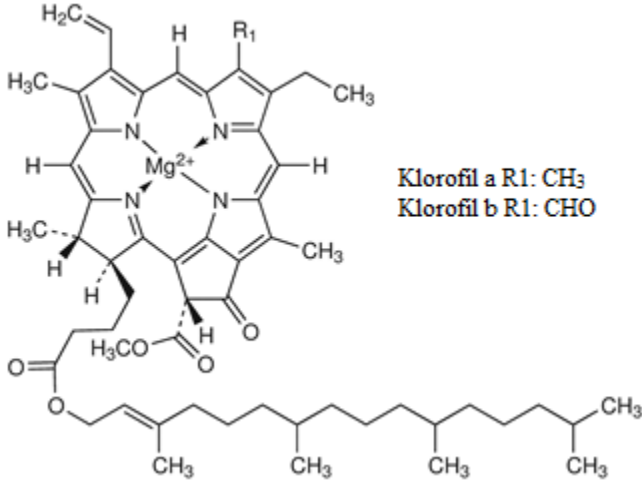
$C_a$  : klorofil a nin miktarı,  $C_b$  : klorofil b nin miktarı,  $C_{x+c}$  : toplam karotenoid miktarı

Metanolde çözünen ekstraktlar için;

$$C_a (\mu\text{g/ml}) = 15.65 A_{666} - 7.34 A_{653} \quad (3.4)$$

$$C_b (\mu\text{g/ml}) = 27.05 A_{653} - 11.21 A_{666} \quad (3.5)$$

$$C_{x+c} (\mu\text{g/ml}) = (1000 A_{470} - 2.86 C_a - 129.2 C_b) / 245 \quad (3.6)$$



Şekil 3.3. Klorofilin yapısı

### 3.7. Toplam Flavonoid İçeriği (TFC)'nin Belirlenmesi

Toplam flavonoid içeriği Quettier-Deleu vd (2000) tarafından rapor edilen yöntemle belirlenmiştir. Bu amaçla, bitki ekstraktının metanolde hazırlanmış 1 mL çözeltisi, 1 mL %2 lik metanolik AlCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O ile karıştırılmıştır. Böylece şelat kompleks yapı meydana getirilmiştir. Tam olarak 10 dakika sonra 430 nm'de bu yapının absorbansı ölçülmüştür. Sonuçlar rutin standart eşdeğeri (mg rutin / g ekstrakt) olarak rapor edilmiştir.

### 3.8. Toplam Fenolik İçeriği (TPC)'nin Belirlenmesi

Toplam fenolik bileşen içeriği Singleton vd (1999) tarafından rapor edilen yöntem esas alınarak Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) kullanılarak belirlenmiştir. Bu test, bitki ekstraktının, FCR de meydana gelen oksidasyonu inhibe etmesi için gereken miktarın ölçümünü belirlemeyi amaçlar. Bu amaçla, bitki ekstraktları etanolde 500 µg/mL konsantrasyona sahip olacak şekilde çözülür. Santrifüj tüpüne 0,5 mL ekstrakt çözeltisi veya kör (etanol) ile 0,5 mL FCR eklenir ve 10-15 saniye elle çalkalanarak karıştırılır. 3 dakika sonra, 0,5 mL doymuş Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi eklenir ve çözelti deiyonize su ile 5 mL'ye seyreltilir. Reaksiyon karışımı karanlıkta 2 saat bekletilir ve 760 nm de absorbans kaydedilir. Sonuçlar gallik asit için ayrı olarak hazırlanan bir kalibrasyon grafiği kullanılarak gallik asit eşdeğeri (mg GAE/g ekstrakt) olarak ifade edilir.

Bitki ekstraktlarının radikal sönmülme yeteneğini ölçen antioksidan testleri 3.9, 3.10, 3.11, 3.12 ve 3.13 numaralı alt bölümlerde anlatılmıştır.

### 3.9. DPPH· Radikali Yakalama Testi

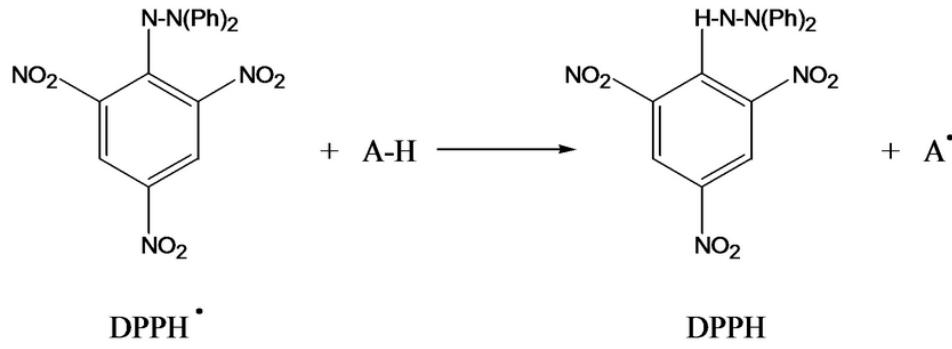
Bu test Blois (1958) tarafından rapor edilen yöntem temel alınarak çeşitli modifikasyonlarla yapılmıştır. Buna göre bitki ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarda etanolde hazırlanmış çözeltilerinden alınan 1,5 mL'lik kısım, 1,5 mL 0,2 mM etanolik DPPH· ile karıştırılır. 25 °C'de 30 dakikalık inkübasyon süresinin sonunda UV/VIS



spektrofotometre yardımıyla 515 nm'de çözeltinin absorpsansı ( $A_{\text{örnek}}$ ) ölçülür. Böylelikle indirgenmiş DPPH'nin (DPPH-H) absorpsansında zamanla meydana gelen azalma ölçülerek reaksiyon izlenir. Bitki ekstraktı içermeyen bir kontrol örneğine de aynı işlemler uygulanarak bir şahit deneme yapılır ve 515 nm'deki absorpsans ( $A_{\text{kontrol}}$ ) kaydedilir. Her bir çözeltinin serbest radikal yakalama aktivitesi % inhibisyon olarak aşağıdaki şekilde hesaplanır:

$$\% \text{inhibisyon} = 100 (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \quad (3.7)$$

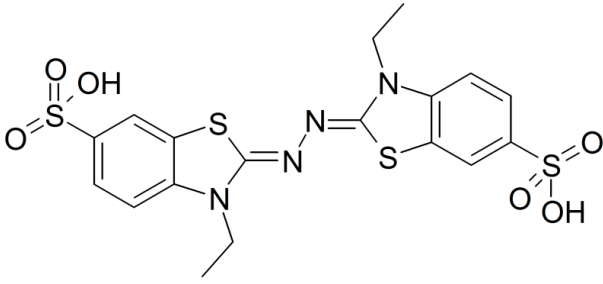
Test edilen materyallerin antioksidan aktiviteleri  $IC_{50}$  değeri olarak verilmiştir. Bu değer bitki ekstraktı içermeyen kontrol örneğinin absorpsansında %50 lik bir azalmaya neden olan ekstrakt konsantrasyonunu ifade etmektedir. DPPH radikalinin yapısı ve A-H ile gösterilen bir antioksidan tarafından sönmleme mekanizması Şekil 3.4'de verilmiştir.



Şekil 3.4. DPPH' sönmleme mekanizması

### 3.10. ABTS<sup>•+</sup> Radikali Yakalama Testi

Bu test Re vd (1999) tarafından tanımlanan yöntem esas alınarak yapılmıştır. Sulu çözeltisi başlangıçta 7mM olan ABTS<sup>•+</sup> radikal katyonu (Şekil 3.5), son konsantrasyonu 2,45 mM olacak şekilde potasyum persülfatla ( $K_2S_2O_8$ ) karıştırılmıştır. Karışım oda sıcaklığında ve karanlıkta 16 saat bekletilmiştir. Bekleme süresinin sonunda mavi-yeşil renkli ABTS<sup>•+</sup> radikal katyonu oluşmuştur. Oluşan ABTS<sup>•+</sup> radikal katyonu çözeltisi, etanol ile 734 nm'de  $0,70 \pm 0,02$  lik bir absorpsansa sahip olacak şekilde seyreltilmiştir. Test çözeltisinin 100  $\mu\text{l}$ 'sini 3,5 mL ABTS<sup>•+</sup> çözeltisine ( $A_{734} = 0,70 \pm 0,02$ ) ilave ettikten sonra absorpsans ölçülmüştür. Sonuçlar 6. dakikanın sonunda troloks eşdeğeri antioksidant kapasite (TEAC) olarak ifade edilmiştir. TEAC değerlerini bulmak üzere aynı şartlar altında standart troloks çözeltileri için ayrı bir kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır. Ekstraktlar için TEAC, antioksidan aktivitesi 1 mg/mL ekstrakt çözeltisinin aktivitesine eşit olan troloks konsantrasyonu olarak tanımlanmıştır.



Şekil 3.5. ABTS<sup>+</sup> yapısı

Test edilen maddelerin ABTS<sup>+</sup> radikalini süpürme etkisi Bölüm 3.9.'da DPPH yönteminde verilen formüle göre hesaplanmıştır.

### 3.11. Hidroksil (·OH) Radikali Yakalama Testi (deoksiriboz degradasyon)

Bu işlem Halliwell vd (1987) tarafından rapor edildiği şekilde uygulanmıştır. Buna göre 17,28 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 33,6 mM 2-deoksi-D-riboz, 1,2 mM askorbik asit ve fosfat konsantrasyonu 120 mM olacak şekilde KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-KOH (pH 7,4) tamponu hazırlanmıştır. Aynı bir yerde 0,1 mM FeCl<sub>3</sub> ve 0,104 mM EDTA eş hacimlerde birleştirilmiştir. 0,1 mL 2-deoksi-D-riboz, 0,7 mL su veya ekstrakt çözeltisi, 0,1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,1 mL FeCl<sub>2</sub>-EDTA çözeltisi ve 0,1 mL tampon çözeltisi karıştırılmıştır. Ardından deoksiriboz degradasyonunu başlatmak için 0,1 mL askorbat bu karışıma eklenmiştir. Toplam karışım çalkalamalı bir su banyosunda 37°C de 60 dakika inkübe edilmiş ve bu sürenin sonunda 0,05 M NaOH içinde hazırlanmış 1 mL %1 (w/v) TBA (tiyobarbitürik asit) ve 1 mL %2,8 (w/v) TCA (trikloro asetik asit) ilave edilmesi ve 80°C'de 20 dakika ısıtılması ile kırmızı renkli kromojen oluşturulmuştur. Karışım soğutulduktan sonra 532 nm'de absorban okunmuştur. Sonuçlar DPPH· radikali yakalama aktivitesinde olduğu gibi IC<sub>50</sub> değeri olarak verilmiştir.

### 3.12. Süperoksit Anyon Radikali (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) Yakalama Testi

Ekstraktların O<sub>2</sub><sup>·-</sup> radikalini sönmüleme yeteneği Valentao vd (2001) tarafından rapor edilen yöntem temel alınarak belirlenmiştir. Buna göre NBT, EDTA ve NADH çözeltileri fosfat tamponu (pH 7,4) nda hazırlanmıştır. Karışım içerisindeki son konsantrasyonlar ise NBT, EDTA ve NADH için sırasıyla 50 µM, 0,1 mM ve 78 µM'dır. Bitki ekstraktların DMSO içindeki çözeltileri, karışımdaki son konsantrasyonları 25µg/mL, 50µg/mL, 100µg/mL, 250µg/mL ve 500µg/mL'lik olacak şekilde hazırlanmıştır. Reaksiyon, yine fosfat tamponunda (pH 7,4) hazırlanmış PMS'nin eklenmesiyle başlatılmıştır. Reaksiyon karşımı 25 °C'de belli bir süre inkübe edilmiş ve karışımın absorbanı kontrol örneğine karşı 560 nm'de ölçülmüştür. Sonuçlar IC<sub>50</sub> değeri olarak verilmiştir.

### 3.13. Oksijen Radikali Absorpsiyon Kapasitesi (ORAC)

ORAC testi, Chirinos vd (2013) tarafından Ou vd (2001) ve Bentayeb vd (2009)'nin çalışması temel alınarak modifiye edilmiş yöntemle göre yapılmıştır. ORAC reaksiyonu, florimetre içerisinde 37 °C de termostatlı bir ortamda gerçekleştirilmiştir. Bunun için reaktif çözeltileri önceden belli bir süre bu sıcaklıkta inkübe edilmiştir.

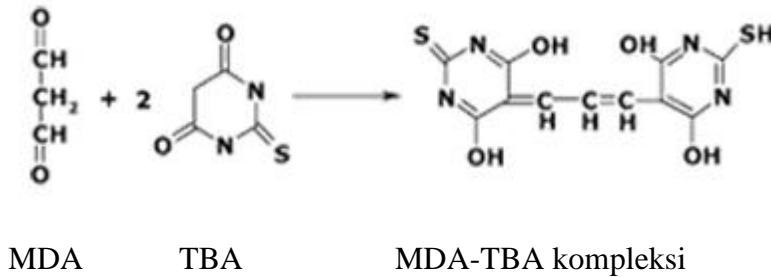
Öncelikle 67 µl örnek çözeltisi 17 µl PBS ile 37 °C’de karıştırılmıştır. Üzerine 833 µl 55 nM fluorescent çözeltisi (fluorocein) eklenmiş ve 0,5 saniye sonra ölçüm alınmıştır. 10 dakika geçtikten sonra ortama 20 µl 153 nM AAPH eklenerek başlatılan reaksiyon 30 dakika boyunca izlenmiştir. 40 dakikalık bu süreç boyunca her bir dakikada bir ölçüm alınmıştır. Floresans dedektörün kullanılacağı yöntemde uyarma ve emisyon dalga boyları sırası ile 485 ve 520 nm’ye ayarlanmıştır.

Bu testte troloks standart olarak kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda troloks çözeltileri hazırlanmış ve bitki ekstraktı örnekleri ile aynı şekilde analiz edilmiştir. Ekstraktların, troloksun ve kör örneğin pik alanları herbir dakikanın kendisinden önceki alan ile toplanması ile hesaplanmıştır. Daha sonra bu toplam değerden körün toplam değeri çıkarılarak net troloks, ekstrakt ve kör için değerleri bulunmuştur. Troloksa ait kalibrasyon eğrisi de bu şekilde elde edilmiştir. Ekstraktlarda tespit edilen alan troloksun eğri denklemi ile değerlendirilmiştir. Örnekler için tespit edilen sonuçlar Trolox eşdeğeri olarak verilmiştir.

Bitki ekstraktlarının lipid peroksidasyonunu inhibe etme yeteneğini ölçen antioksidan testleri 3.14, 3.15, 3.16 ve 3.17 numaralı alt bölümlerde anlatılmıştır.

### 3.14. Tiyobarbitürik Asitle Tepkimeye Giren Maddeler (TBARS) Testi

TBARS testi Laguerre vd (2007) tarafından rapor edilen yöntem esas alınarak yürütülmüştür. Bu yöntem lipid peroksidasyonunun ikinci aşamasında lipid hidroksiperoksitler tarafından meydana getirilen malondialdehit miktarı ölçümü üzerine kuruludur. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ekstrakt çözeltisi, pozitif kontrol veya etanol (kontrol), etanolde hazırlanmış %2,52’lik linoleik asit, 0,05 M fosfat tamponu (pH 7,0) veya deionize su ile karıştırılır. Karışım 40 °C de bir su banyosunda belli bir süre inkübe edilir. Bu sürenin sonunda karışımdan alınan 1 mL örnek, 1 mL %1’lik TBA çözeltisi ve 1mL %10’luk TCA çözeltisi ile karıştırılıp kaynayan bir su banyosunda 30 dakika tutulmuştur. Bunun ardından karışım soğutulup, n-butanol içine ekstrakte edilmiş ve bir vorteks karıştırıcı ile karıştırılarak santrifüj edilmiştir. Bunun sonunda n-butanol fazları ayrılmış ve 532 nm’de absorbans ölçülmüştür. Sonuçlar kontrol örneğine göre TBARS oluşumunun % inhibisyonu olarak ifade edilmiştir. Absorbansı ölçülen kompleksin oluşum reaksiyonu Şekil 3.6’da verilmiştir.



Şekil 3.6. MDA-TBA kompleksinin oluşumu

### 3.15. LDL Oksidasyonu İnhibisyonunun Ölçülmesi Testi

İnsan LDL'sinin EDTA (etilendiamintetraasetikasit) içeren çözeltisi NaCl içeren fosfat tamponunda (PBS, pH 7,4) dialize edilmiştir. Tampon içinde hazırlanmış LDL (200 µg/mL), SDS (100 g/L) ve DMSO içinde hazırlanmış bitki ekstraktı (1000 µg/mL) veya pozitif kontrol (100 µg/mL) ile CuCl<sub>2</sub> (100 µmol/L) stok çözeltileri kullanım öncesi taze olarak hazırlanmıştır. 500 µL LDL, 100 µL SDS, 20 µL ekstrakt veya pozitif kontrol, 230 µL PBS ve 100 µL CuCl<sub>2</sub> bu sırada birleştirilerek bir reaksiyon karışımı hazırlanır ve hemen vorteks karıştırıcı ile karıştırılır. Karışım 37 °C de 4, 12 ve 36 saat çalkalamalı su banyosunda inkübasyona tabi tutulur. Süreler sonunda 1 mL reaksiyon karışımına 1 mL TBA çözeltisi (0,1 M 100 mL HCl içinde çözünmüş 0,67 g TBA ve 15 g TCA) eklenerek 90 °C de 20 dk bekletilir. Süre sonunda tüpler hemen soğutulur ve 532 nm de absorbans ölçülür. Sonuçlar test edilen ekstrakt veya saf antioksidanlar için LDL oksidasyonunun % inhibisyonu olarak rapor edilir.

### 3.16. Büyükbaş hayvan beyni lipozomları (BBE)'nda lipid peroksidasyon inhibisyonunun ölçülmesi

Büyükbaş hayvan beyninin peroksidasyonu, Tang vd (2004)' nin çalışmasında verilen yöntemle göre izlenmiştir. Büyükbaş hayvan beyni lipozomları (ekstraktı) (BBE) PBS (pH 7,4) içine konsantrasyonu 5 µg/mL olacak şekilde ilave edilip buz banyosu içinde sonikasyona tabi tutularak çözülmüştür. 0.2 mL beyin ekstraktı, lipid peroksidasyonu başlatılmadan önce PBS varlığındaki 0.5 mL bitki ekstraktı ve 0.1 mL 1mM'lık FeCl<sub>3</sub> çözeltisi ile inkübe edilmiştir. Lipid peroksidasyonu, ortama 0.1 mL 1mM askorbat eklenmesiyle başlatılmış ve karışım sonra 37 °C de 3 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Hemen ardından 1'er mL %2'lik TCA ve % 1'lik TBA eklenmiştir. Karışım, bir su banyosunda 80 °C de 30 dakika ısıtılmış ve soğuduktan sonra 532 nm'de absorbansı ölçülmüştür. Sonuçlar, kontrol örneğine göre lipid peroksidasyonunun % inhibisyonu şeklinde rapor edilmiştir.

### 3.17. Ferrik tiyosiyanat (FTC) lipid peroksidasyon inhibisyonunun ölçülmesi

Rahmat vd (2006) tarafından rapor edilen yöntem esas alınarak yapılan çalışmada, lipid peroksidasyonunun ilk aşamasındaki peroksit miktarı tespit edilmiştir. İçerdiği peroksit, demir klorür ile reaksiyona girerek kırmızı demir klorür pigmenti oluşturmaktadır. 1000 µg/mL olarak hazırlanan 4'er mL bitki ekstraktların üzerine 6 mL %2,52'lik linoleik asit ve 8 mL 0,05 M pH 7 fosfat tamponu eklenmiştir. Karışım 40°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon süreci 7-10 gün boyunca devam etmiştir ve her 24 saatte bir bu karışımdan 0.1 mL alınmıştır. Alınan bu hacmin üzerine 9.7 mL %75'lik etanol çözeltisi, 0.1 mL amonyumtiyosiyanat ve %3,5'lük HCl ile hazırlanmış 0.1 mL 0.02 M demir klorür çözeltisi eklenmiştir. Demir klorür çözeltisi eklendikten tam 3 dakika sonra 500nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır. Kontrol olarak etanol kullanılmıştır.

Yukarıda çalışılan tüm antioksan aktivite testlerinde pozitif kontrol olarak ise ferulik asit, alfa-tokoferol, BHT ve kersetin kullanılmıştır.

#### 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Materyal ve Metot bölümünde belirtilen tüm deneysel yöntemler analiz edilen her örnek için (bitki ekstraktları veya pozitif kontrol antioksidanları) üç paralel deneme halinde uygulanmıştır. Sonuçlar bu üç paralel denemeden elde edilen değerlerin ortalaması olarak rapor edilmiştir. Deneysel sonuçların yapılan değerlendirilmesi ve yorumları, bu ortalama değerler üzerinden yapılmıştır

##### 4.1. Bitki Ekstraktlarında HPLC Cihazı ile Belirlenen Fenolik Bileşenler

*D. gnidioides* ve *D. sericea* bitkilerinin ekstraktları, Bölüm 3.4’de tarif edilen prosedür takip edilerek elde edilmiştir. Metanol, aseton ve hekzan kullanılarak yapılan ekstraksiyonu işlemleri sonucunda elde edilen ekstraktlar Çizelge 4.1’de gösterilmiştir. Çalışma boyunca ekstraktların adlandırılmaları aşağıdaki tabloda olduğu yapılmıştır.

Çizelge 4.1. Bitki ekstraktları çözgen tablosu

Ekstrakt kodu	Bitki	Çözgen
ESA	<i>D. sericea</i>	Aseton
ESM	<i>D. sericea</i>	Metanol
EGA	<i>D. gnidioides</i>	Aseton
EGM	<i>D. gnidioides</i>	Metanol
EGH	<i>D. gnidioides</i>	Hekzan
ESH	<i>D. sericea</i>	Hekzan

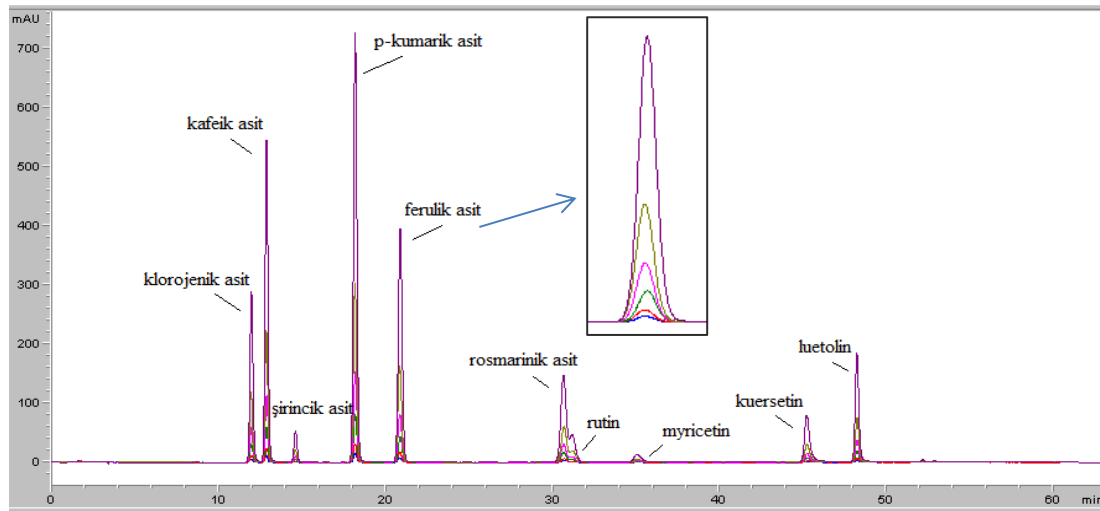
Çizelge 4.1.’de yer alan ilk dört ekstrakt (ESA, ESM, EGA, EGM) için çözücülerin uzaklaştırmasından sonra kalan kısımlar, klorofili uzaklaştırmak amacıyla defalarca hekzan ile yıkanmıştır.

Fenolik bileşen standartları metanolik çözeltiler halinde ayrı ayrı HPLC’ye enjekte edilmiştir. Böylelikle alıkonma süreleri ve uygun çalışma dalga boyları tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). Sirincik asit, kersetin, p-kumarik asit, rosmarinik asit, kafeik asit, klorojenik asit, ferulik asit, luteolin, rutin ve mirisetinin farklı konsantrasyonlardaki fenolik bileşen standart karışımı oluşturularak farklı dalga boylarındaki kromatogramları alınmıştır (Şekil 4.1. 310 nm’deki, Şekil 4.2. 330 nm’deki, Şekil 4.3. 250 nm’deki, Şekil 4.4. 280 nm’deki, Şekil 4.5. 370 nm’deki kromatogramları göstermektedir.). Kromatogramlarda bazı seçilmiş piklerin konsantrasyonla değişiminin büyütülmüş hali şekil içinde gösterilmiştir. Karışımlardaki her bir bileşenin pik alanına karşı konsantrasyon verilerinden kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrileri mirisetin hariç 5 µg/mL ile 250 µg/mL aralığında hazırlanmıştır. Mirisetinin kalibrasyon eğrisi ise 1,5 µg/mL ile 75 µg/mL aralığında hazırlanmıştır. Apigenin ve ramnetin karışımından ayrı bir şekilde 5 µg/mL ile 250 µg/mL aralığındaki konsantrasyonlarda HPLC’ye verilerek kalibrasyon verileri elde edilmiştir. Şekil 4.6 apigenin için 330 nm’de elde edilen kromatogramları, Şekil 4.7 ise ramnetin için 370 nm’de elde edilen kromatogramları göstermektedir. Kalibrasyon grafikleri Şekil 4.8’de, doğrusal regresyon analizi ile elde edilen korelasyon

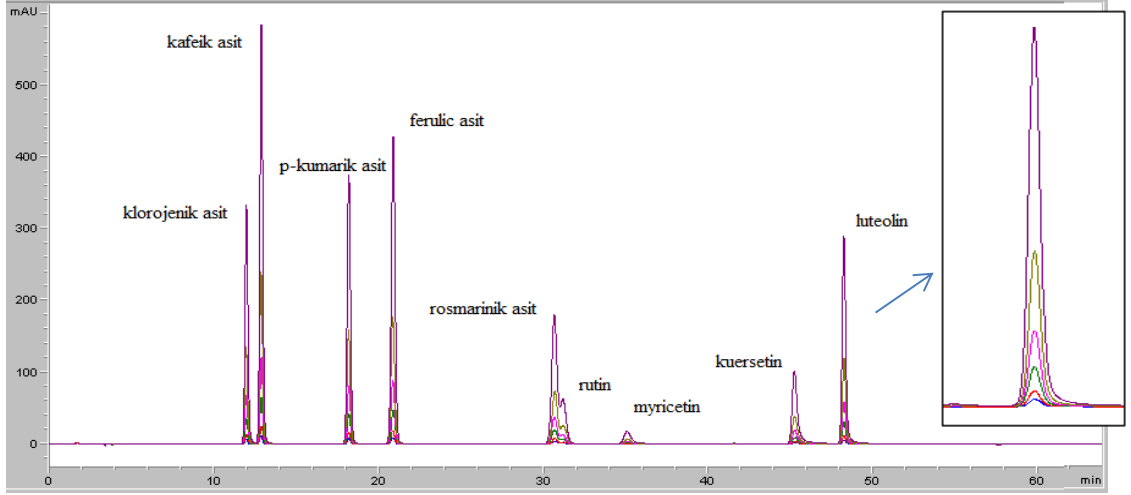
katsayılarının kareleri ( $R^2$ ) ve verilerin temsil ettiği en iyi doğru denklemleri de Çizelge 4.3'te verilmiştir. Bu bulgular HPLC-DAD cihazına bağlı bilgisayara yüklü program yardımıyla elde edilmiştir.

Çizelge 4.2. Fenolik bileşenlerin alıkonma süreleri ve dalga boyları

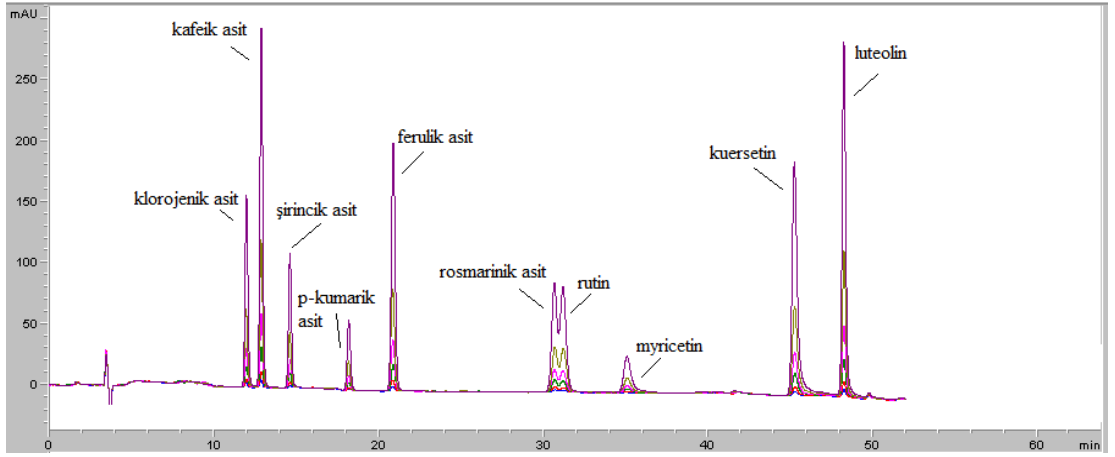
Fenolik bileşen	Alıkonma Süresi (dakika)	Dalga Boyu (nm)
Klorojenik asit	11,93	330
Kafeik asit	12,82	330
Şirincik asit	14,54	280
P-kumarik asit	18,15	330
Ferulik asit	20,81	330
Rosmarinik asit	30,63	330
Rutin	31,14	370
Mirisetin	34,99	370
Kersetin	45,19	370
Luteolin	48,16	330
Apigenin	52,11	330
Ramnetin	53,72	370



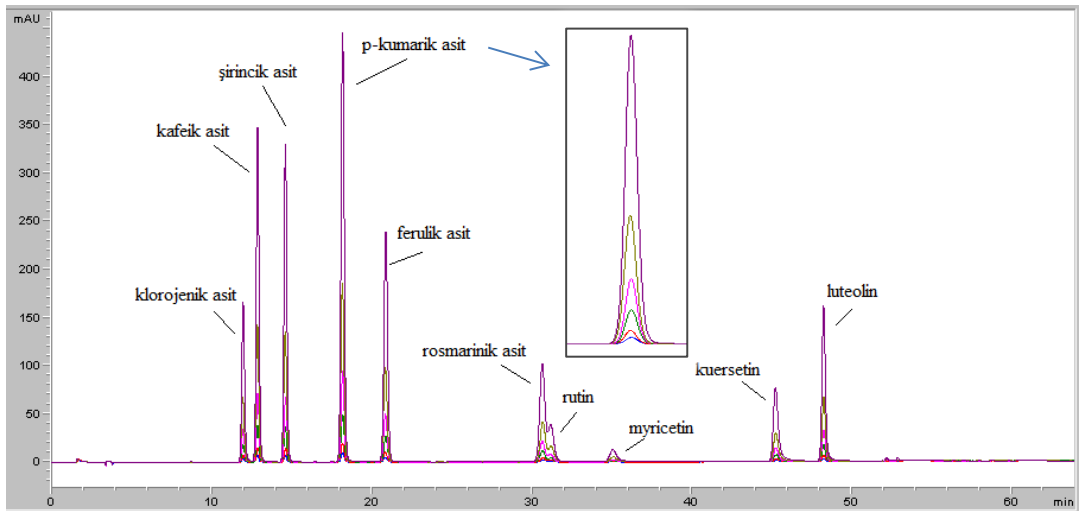
Şekil 4.1. Fenolik bileşen standartları karışımının 310 nm'de gözlenen kromatogramı



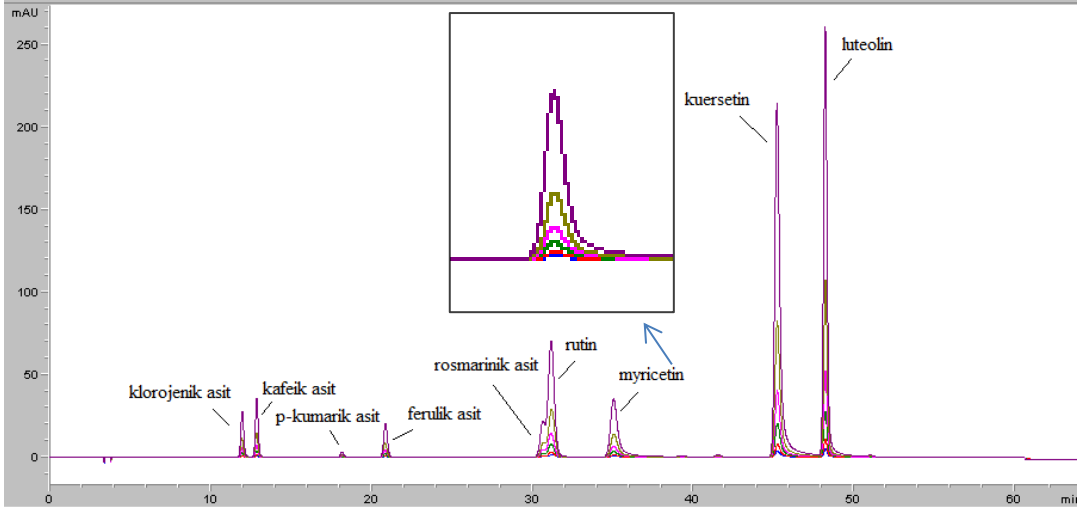
Şekil 4.2. Fenolik bileşen standartları karışımının 330 nm’de gözlenen kromatogramı



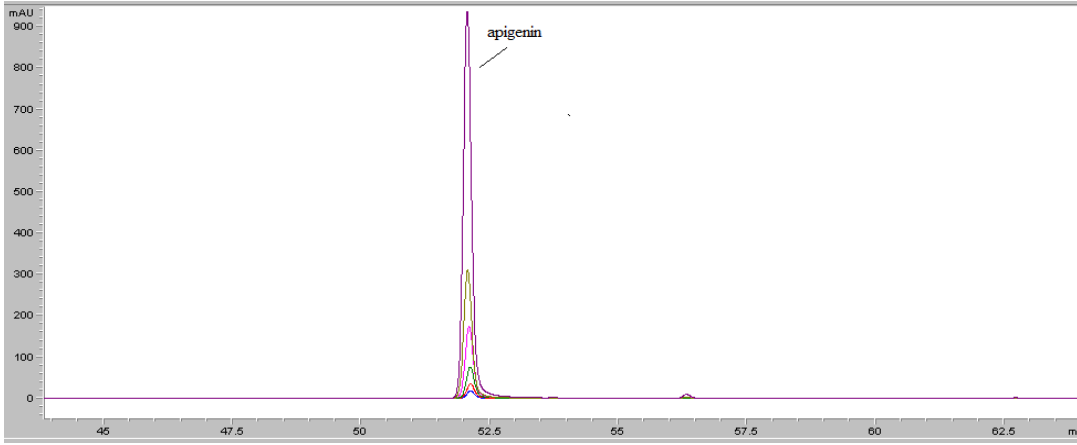
Şekil 4.3. Fenolik bileşen standartları karışımının 250 nm’de gözlenen kromatogramı



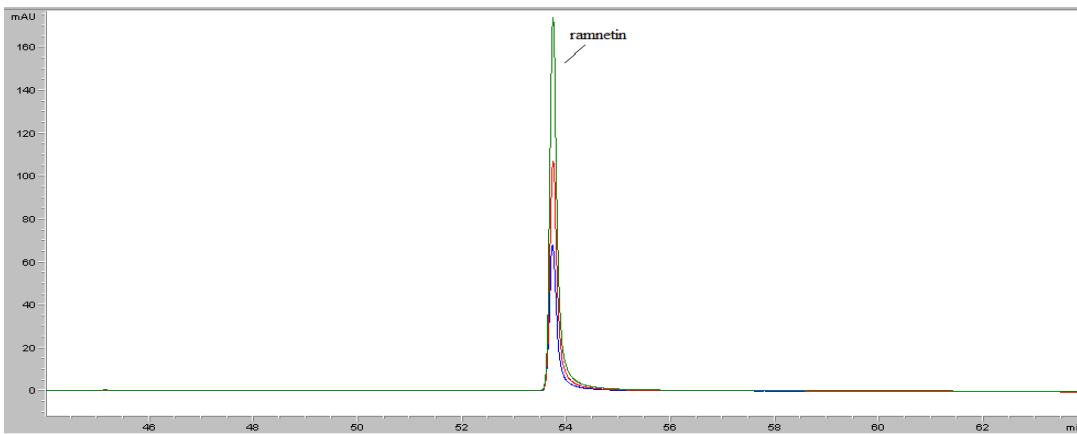
Şekil 4.4. Fenolik bileşen standart karışımının 280 nm’de gözlenen kromatogramı



Şekil 4.5. Fenolik bileşen standart karışımının 370 nm’de gözlenen kromatogramı

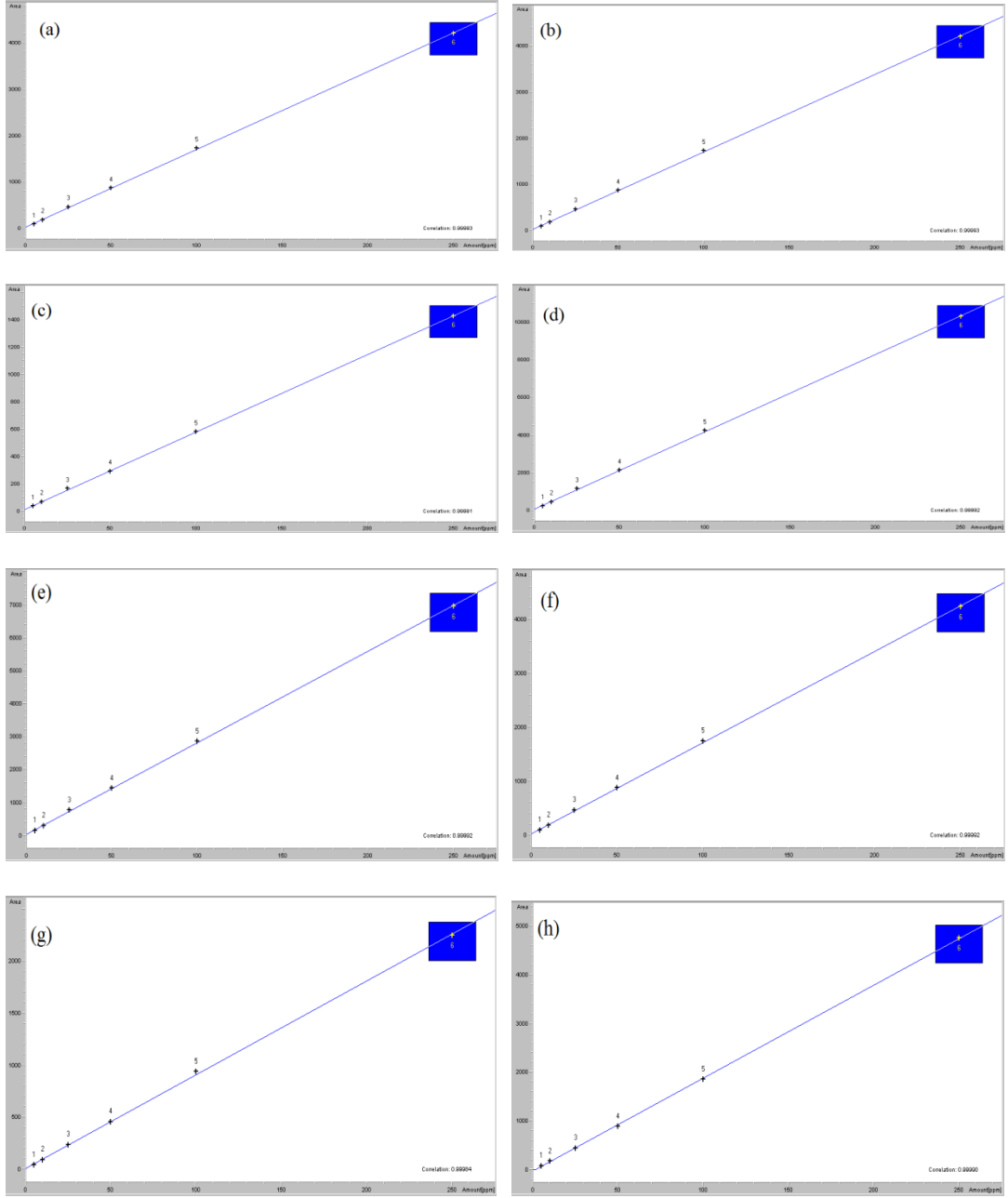


Şekil 4.6. Apigenin için 330 nm’de gözlenen kromatogram

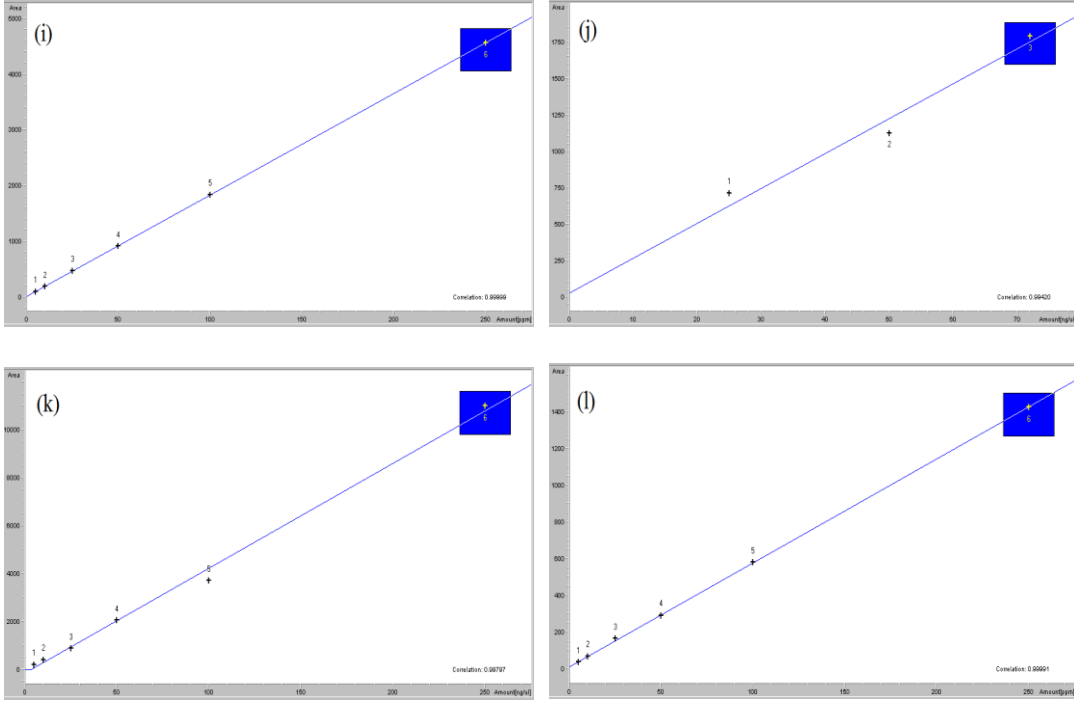


Şekil 4.7. Ramnetin için 370 nm’de gözlenen kromatogram





Şekil 4.8. Fenolik bileşen standartlarının kalibrasyon grafikleri (a) klorojenik asit, (b) kafeik asit, (c) şirincik asit, (d) p-kumarik asit, (e) ferulik asit, (f) rosmarinik asit, (g) rutin, (h) kersetin, (i) luteolin, (j) ramnetin, (k) apigenin, (l) mirisetin



Şekil 4.8.'in Devamı. Fenolik bileşen standartlarının kalibrasyon grafikleri  
 (a) klorojenik asit, (b) kafeik asit, (c) şirincik asit, (d) p-kumarik asit, (e) ferulik asit, (f) rosmarinik asit, (g) rutin, (h) kersetin, (i) luteolin, (j) ramnetin, (k) apigenin, (l) mirisetin.

Çizelge 4.3. Fenolik bileşiklerin kalibrasyon bulguları; verilerin temsil ettiği en iyi doğru denklemleri ve korelasyon katsayılarının kareleri (R<sup>2</sup>).  
 Denklemlerdeki “x” mg/kg olarak konsantrasyonu, y ise pik alanını göstermektedir.

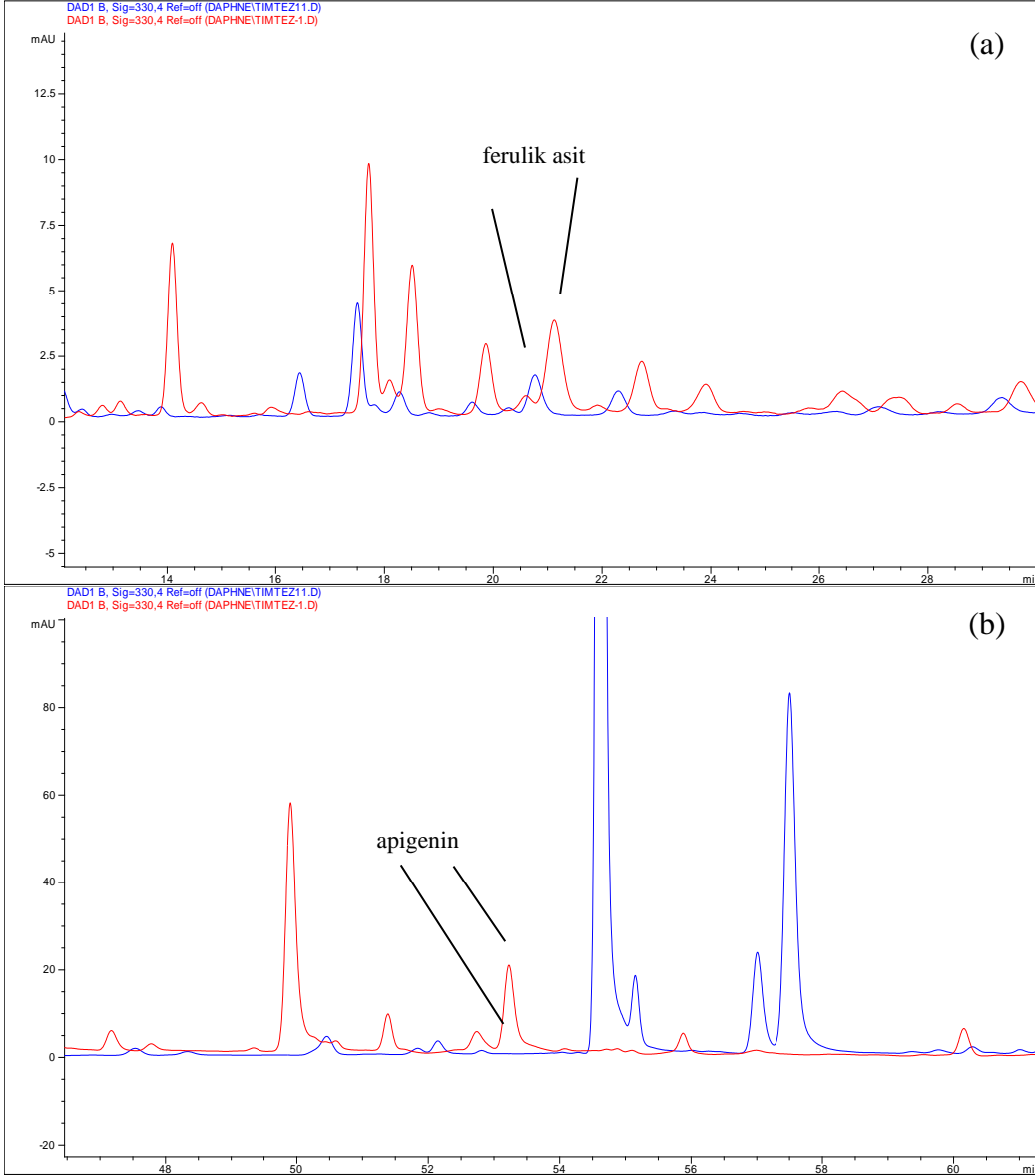
Fenolik bileşen	Denklem	Korelasyon katsayısının karesi (R <sup>2</sup> )
Klorojenik asit	$y = 16,804x + 17,107$	0,999
Kafeik asit	$y = 29,121x + 33,404$	0,999
Şirincik asit	$y = 16,669x + 19,525$	0,999
P-kumarik asit	$y = 21,576x + 26,014$	0,999
Ferulik asit	$y = 27,771x + 33,170$	0,999
Rosmarinik asit	$y = 16,923x + 19,988$	0,999
Rutin	$y = 9,017x + 4,603$	0,999
Mirisetin	$y = 14,021x + 11,581$	0,999
Kersetin	$y = 19,068x - 30,616$	0,999
Luteolin	$y = 18,042x + 8,887$	0,999
Apigenin	$y = 43,729x - 144,581$	0,998
Ramnetin	$y = 8,966x + 9,880$	0,994

Bitki ekstraktları HPLC cihazına işlem görmüş (asit hidrolizi uygulanmış) ve işlem görmemiş (asit hidrolizi uygulanmamış) çözeltiler olarak enjekte edilmiştir. İşlem görmemiş bitki ekstraktları metanolde çözülerek hazırlanmıştır. Asit hidrolizi işlemi ile serbest halde olmayan fenolik bileşiklerin açığa çıkarılması hedeflenmiştir. Enjekte edilen bitki ekstraktı çözeltilerinin konsantrasyon değerleri Çizelge 4.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. HPLC-DAD cihazında analiz edilen bitki ekstraktı çözeltilerinin konsantrasyon değerleri

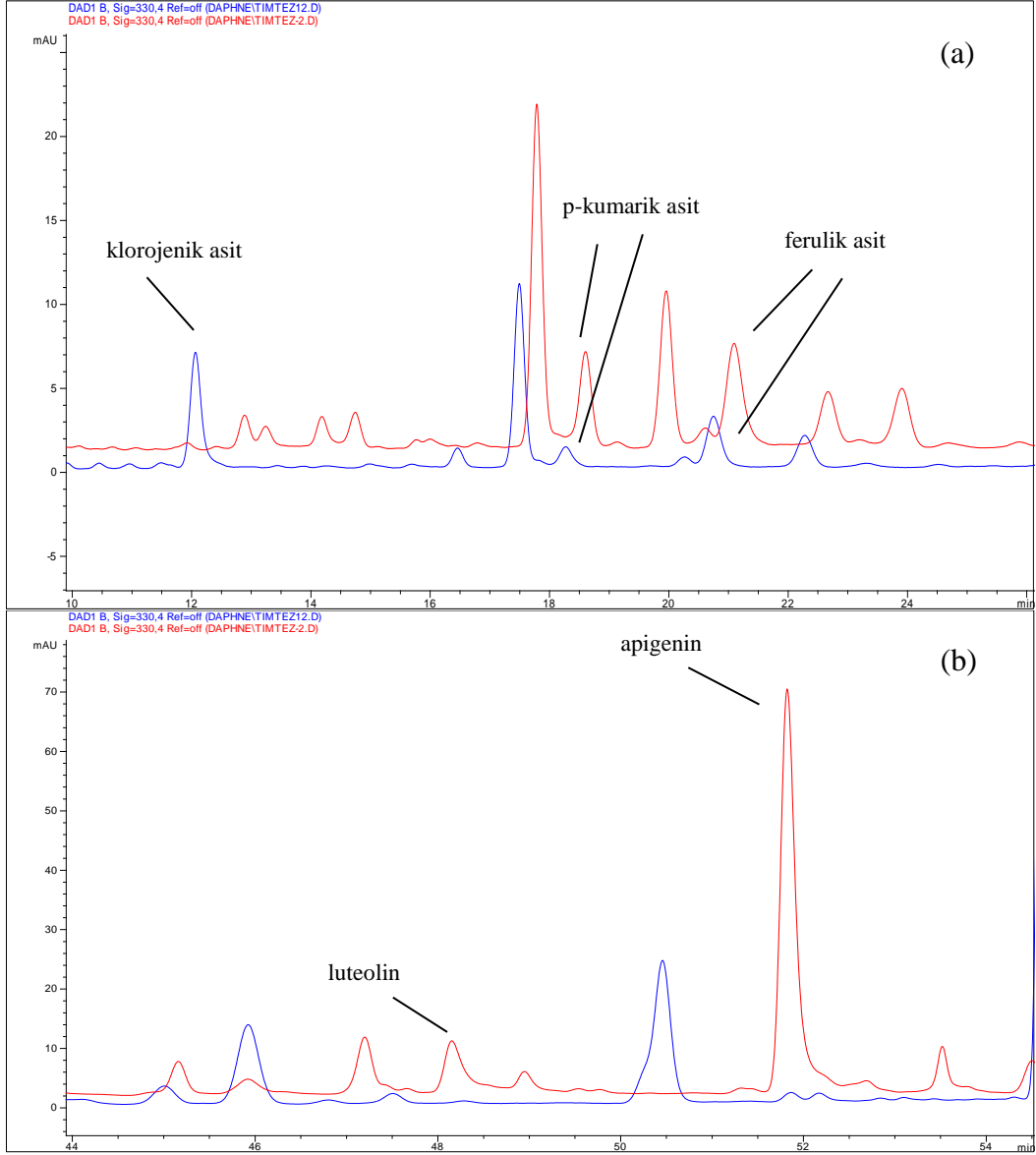
Fenolik bileşen	İşlem görmemiş ( $\mu\text{g/mL}$ )	Asit hidrolize ( $\mu\text{g/mL}$ )
ESA	2040	3285
ESM	2620	3384
EGA	2400	4812
EGM	3540	5304
EGH	2440	3039
ESH	2160	2760

Bitki ekstraktının işlem görmüş ve görmemiş hallerinin teker teker üst üste çakıştırılarak oluşturulan kromatogramları aynı pencerelerde olacak şekilde aşağıda (Şekil 4.9 - 4.19) verilmiştir. Bu şekilde daha sağlıklı karşılaştırma yapılabilecektir. Asit hidrolizine uğratılmış (kırmızı renkli kromatogramlar) olan örneklerdeki fenolik bileşenler, işlem görmemiş (mavi renkli kromatogramlar) örneklerdeki fenolik bileşenlere göre kolonu daha sonra (0,05-0,2 dakika) terk etmişlerdir. 5 dalga boyunda yapılan çalışmaların sonucunda fenolik bileşiklerde en yüksek pik şiddetleri 330 nm, 280 nm ve 370 nm'de gözlenmiştir.



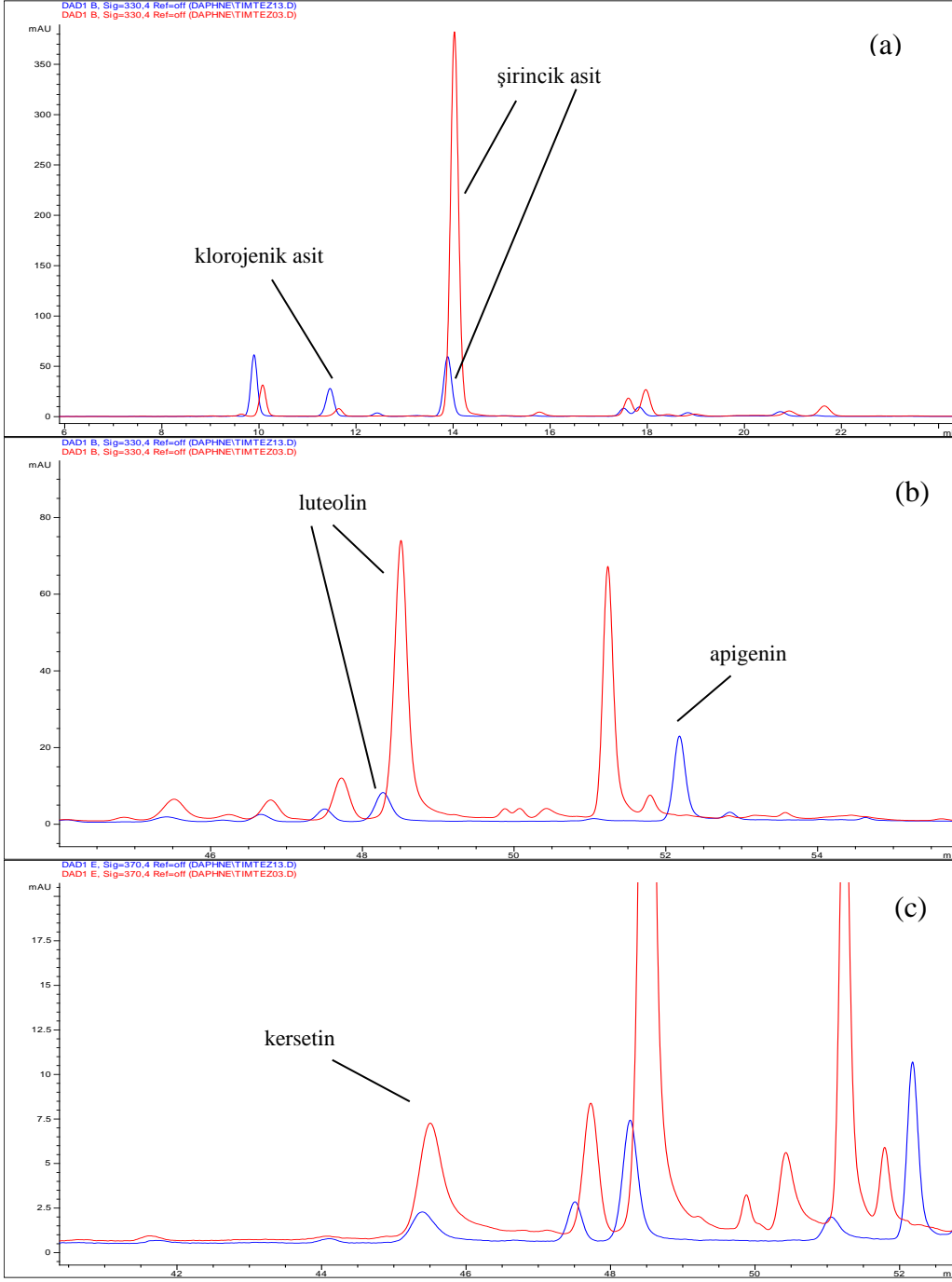
Şekil 4.9. ESA'ye ait 330 nm'deki kromatogram. a) 12.-30. Dakikalar arası kromatogram görüntüsü. b) 46.-62. Dakikalar arası kromatogram görüntüsü. Mavi kromatogram: İşlem görmemiş ekstrakt. Kırmızı kromatogram: İşlem görmüş kromatogram.

ESA'ye ait olan kromatograma (Şekil 4.9) göre tespit edilen ferulik asit ve apigenin, asit hidrolizi ile daha başarılı olarak bağlı bulunduğu bileşiklerden serbest hale getirilmiş ve pik şiddeti artmıştır.



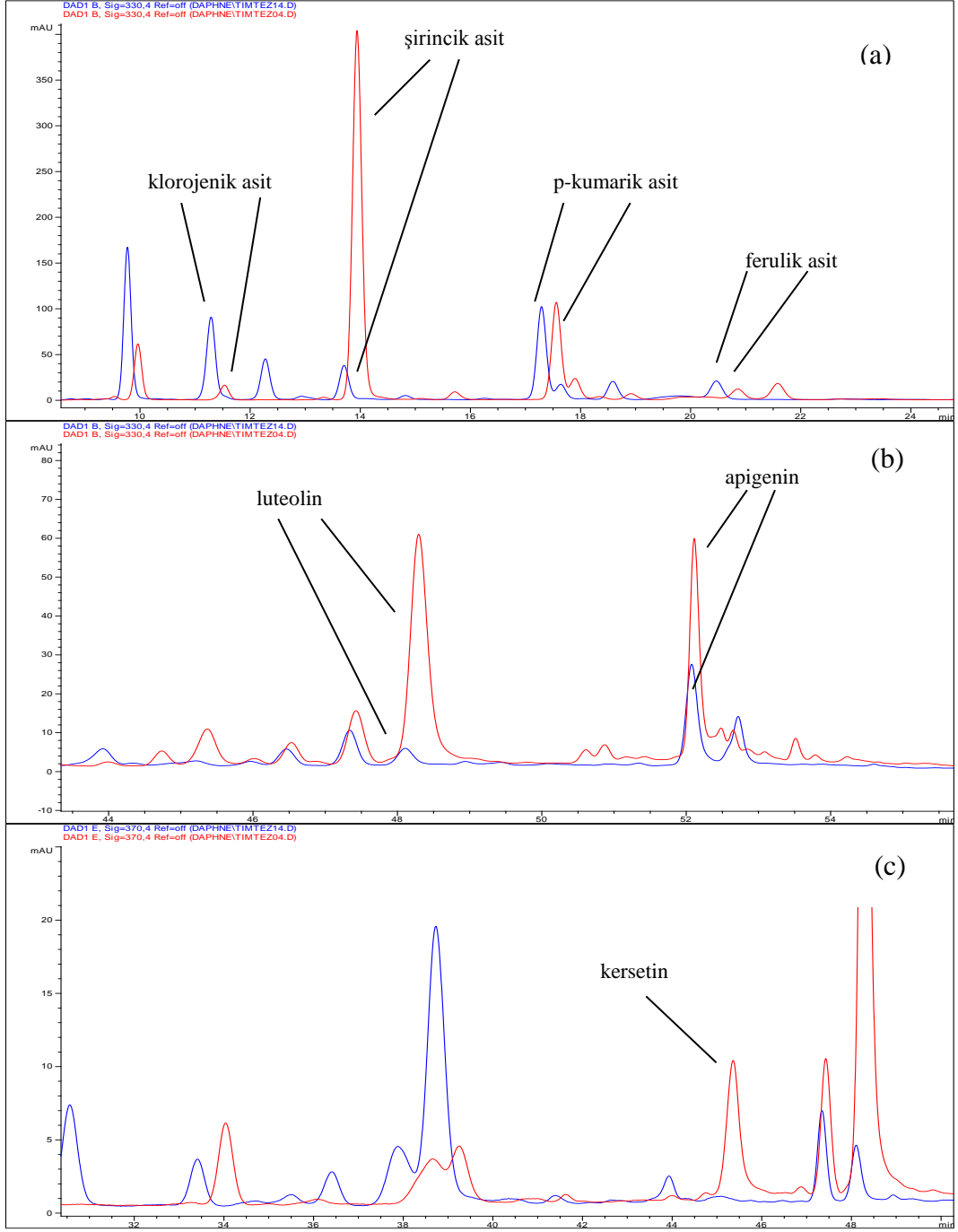
Şekil 4.10. ESM'ye ait 330 nm'deki kromatogram. a) 10.-26. Dakikalar arası kromatogram görüntüsü. b) 44.-54. Dakikalar arası kromatogram görüntüsü. Mavi kromatogram: İşlem görmemiş ekstrakt. Kırmızı kromatogram: İşlem görmüş ekstrakt.

ESM ye ait olan kromatograma (Şekil 4.10) göre tespit edilen ferulik asit, p-kumarik asit, luteolin ve apigenin asit hidrolizi ile daha başarılı olarak bağlı bulunduğu bileşiklerden serbest hale getirilmiş ve pik şiddeti artmıştır. Klorojenik asitin ise asit hidrolizi uygulandıktan sonra pik şiddetinde azalma gözlenmiştir.



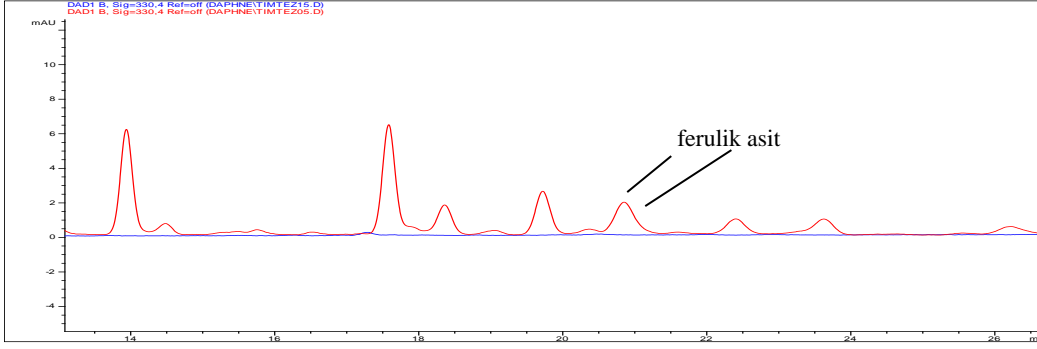
Şekil 4.11. EGA'ya ait 330 nm'deki (a,b) ve 370 nm'deki (c) kromatogramlar. a) 6.-24. Dakikalar arası kromatogram görüntüsü. b) 44.-56. Dakikalar arası kromatogram görüntüsü. c) 40.-52. Dakikalar arası kromatogram görüntüsü Mavi kromatogram: İşlem görmemiş ekstrakt. Kırmızı kromatogram: İşlem görmüş ekstrakt.

EGA'e ait olan kromatograma (Şekil 4.11) göre tespit edilen şirincik asit, kersetin ve luteolin, asit hidrolizi ile daha yüksek oranda bağlı bulunduğu bileşiklerden serbest hale getirilmiş ve pik şiddeti artmıştır. Klorojenik asit ve apigeninin ise asit hidrolizi uygulandıktan sonra pik şiddetinde azalma gözlenmiştir.



Şekil 4.12. EGM'ye ait 330 nm'deki (a,b) ve 370 nm'deki (c) kromatogramlar. a) 8.-24. Dakikalar arası kromatogram görüntüsü. b) 32.-52. Dakikalar arası kromatogram görüntüsü. c) 40.-52. Dakikalar arası kromatogram görüntüsü. Mavi kromatogram: İşlem görmemiş ekstrakt. Kırmızı kromatogram: İşlem görmüş ekstrakt.

EGM'e ait olan kromatograma (Şekil 4.12) göre tespit edilen şirincik asit, kersetin, luteolin, p-kumarik asit ve apigenin, asit hidrolizi ile daha yüksek oranda bağlı bulunduğu bileşiklerden serbest hale getirilmiş ve pik şiddeti artmıştır. Klorojenik ve ferulik asitin ise asit hidrolizi uygulandıktan sonra pik şiddetinde azalma gözlenmiştir.



Şekil 4.13. EGH'e ait 330 nm'deki kromatogram

EGH'e ait olan kromatograma (Şekil 4.13) göre tespit edilen ferulik asit, sadece asit hidrolizi uygulandıktan belirli bir sinyal oluşturup analiz edilebilir hale gelmiştir.

Ekstraktlara uygulanan asit hidroliz işlemi sonucunda kuantifiye edilen sirincik asit, p-kumarik asit, ferulik asit (EGM hariç), kersetin ve luteolin konsantrasyonlarında artış gözlemlenmiştir. Asit hidrolizinin apigenine etkisi ise bazı ekstraktlarda artış bazılarında ise azalma olarak gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, asit hidroliz işleminin, doğal ortamında şekerlerle glikozitler veya alkollerle esterleşmiş olarak bulunan fenolik bileşiklerin serbest hale getirilmesini, dolayısıyla HPLC-DAD cihazında gözlenen pik siddetlerinin ve pik çözünürlüklerinin yükseltilmesini sağladığını göstermiştir.

HPLC'de enjekte edilen ekstraktlarda tespit edilen bileşenlerin alanları, fenolik bileşiklerin standartları ile hazırlanan kalibrasyon eğrileri temel alınarak değerlendirilmiştir. Tespit edilen fenolik bileşenlerin neden olduğu absorbansa karşılık gelen konsantrasyon değerleri dikkate alınmıştır. Kalibrasyon eğrilerinden çıkarılan konsantrasyon değerleri mg/100 mg kuru ekstrakt cinsinden rapor edilmiştir.

Bitki ekstraktlarında karakterize edilen fenolik bileşenlere ait konsantrasyon değerleri Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6'da verilmiştir. Çizelge 4.5 ve 4.6'dan da anlaşıldığı gibi hekzan ile elde edilen ekstraktların (EGH ve ESH), asit hidroliz işlemi uygulanmamış örneklerinde herhangi bir fenolik bileşen izole edilememiştir. Sadece asit hidrolizi uygulanması sonunda EGH'de ferulik asit analiz edilebilmiştir.

Çizelge 4.5'te *D.sericea*'nın aseton (ESA) ve metanol (ESM) ekstraktları incelendiğinde, aseton ekstraktından elde edilen ferulik asitten farklı olarak metanol ekstraktında klorojenik asit ve luteolin gözlemlendiği ve aseton ekstraktında bulunan değerlerin daha yüksek olduğu görülür. *D. gnidioides*'in aseton (EGA) ve metanol (EGM) ekstraktları incelendiğinde ise, metanoldeki ekstrakta asetondakinden farklı olarak p-kumarik ve ferulik asit bulunduğu. Kersetinin de sadece aseton ekstraktında tespit edildiği görülebilir. Metanol ekstraktında klorojenik asit ve apigenin aseton ekstraktına göre daha fazla elde edilirken şirincik asit ve luteolin daha düşük miktarda bulunmuştur. Bitkilerin hekzan ekstraktlarında (EGH ve ESH) ise herhangi bir fenolik bileşen tespit edilememiştir.



Çizelge 4.5. İşlem görmemiş ekstraktlarda tespit edilen fenolik bileşik konsantrasyonlarının mg/100 g ekstrakt olarak değeri

Fenolik bileşen	ESA	ESM	EGA	EGM	EGH	ESH
klorojenik asit	--	177,38	57,01	884,58	--	--
kafeik asit	--	--	--	--	--	--
şirincik asit	--	--	363,89	170,61	--	--
p-kumarik asit	--	--	--	19,36	--	--
ferulik asit	3,23	27,94	--	308,13	--	--
rosmarinik asit	--	--	--	--	--	--
rutin	--	--	--	--	--	--
mirisetin	--	--	--	--	--	--
kersetin	--	--	144,47	--	--	--
luteolin	--	2,73	265,45	120,76	--	--
apigenin	--	--	155,58	299,92	--	--
ramnetin	--	--	--	--	--	--

Çizelge 4.6'da *D.sericea*'nın aseton (ESA) ve metanol (ESM) ekstraktları incelendiğinde, metanol ekstraktında asetondakinden farklı olarak klorojenik asit, p-kumarik asit ve luteolin tespit edildiği görülür. Metanol ekstraktında ferulik asit yüksek bulunurken apigenin daha düşük değerde bulunmuştur. *D. gnidioides*'in aseton (EGA) ve metanol (EGM) ekstraktları incelendiğinde de klorojenik asit, p-kumarik asit, ferulik asit ve apigeninin sadece metanol ekstraktlarında tespit edildiği görülebilir. Metanol ekstraktında tüm değerler daha yüksek gözlemlenmiştir. Hekzan ile elde edilen ekstraktlarda ise sadece EGH'da ferulik asit tespit edilmiştir.

Çizelge 4.6. Asit hidrolizlenmiş ekstraktlarda tespit edilen fenolik bileşik konsantrasyonlarının mg/100 g ekstrakt olarak değeri

Fenolik bileşen	ESA	ESM	EGA	EGM	EGH	ESH
klorojenik asit	--	14,25	--	195,37	--	--
kafeik asit	--	--	--	--	--	--
şirincik asit	--	--	1292,78	1446,91	--	--
p-kumarik asit	--	87,19	--	26,66	--	--
ferulik asit	42,19	96,98	--	122,11	16,02	--
rosmarinik asit	--	--	--	--	--	--
rutin	--	--	--	--	--	--
mirisetin	--	--	--	--	--	--
kersetin	--	--	193,14	211,47	--	--
luteolin	--	244,33	1203,52	1216,89	--	--
apigenin	169,47	129,01	--	64,97	--	--
ramnetin	--	--	--	--	--	--

Çizelge 4.7. Fenolik bileşen genel sonuçlar (mg / 100g ekstrakt)

Fenolik bileşen	ESA	ESM	EGA	EGM	EGH	ESH
klorojenik asit	--	177,38	57,01	884,58	--	--
kafeik asit	--	--	--	--	--	--
şirincik asit	--	--	1292,78*	1446,91*	--	--
p-kumarik asit	--	87,19*	--	26,66*	--	--
ferulik asit	42,19*	96,98*	--	122,11*	16,02*	--
rosmarinik asit	--	--	--	--	--	--
rutin	--	--	--	--	--	--
mirisetin	--	--	--	--	--	--
kersetin	--	--	193,14*	211,47*	--	--
luteolin	--	244,33*	1203,52*	1216,89*	--	--
apigenin	169,47*	129,01*	155,58	64,97*	--	--
ramnetin	--	--	--	--	--	--

\* Asit hidrolize örnekler

HPLC-DAD ile yapılan çalışmaya ait elde edilen fenolik bileşenlerin en yüksek değerleri Çizelge 4.7’de gösterilmiştir. Genel olarak incelendiğinde polar çözücülerde (metanol ve aseton) elde edilen ekstraktlardaki fenolik bileşen konsantrasyonlarının apolar karakterdeki fraksiyonlara göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Ekstraktlarda varlığı belirlenen bileşikler klorojenik, ferulik, p-kumarik ve şirincik asit ile luteolin, apigenin ve kersetindir. Polar ekstraktlar içinde EGA ve EGM fenolik bileşikler bakımından en zengin olup ESA en düşük düzeyde bu bileşikleri içermektedir. Özellikle EGM, güçlü antioksidan bileşikler olduğu bilenen (Shaidi vd 1992) kersetin, ferulik asit ve klorojenik asit içeriği bakımından oldukça zengindir. Bu ekstrakta şirincik asit, luteolin ve apigenin miktarlarının da yüksek olduğu söylenebilir. Diğer yandan EGA apigenin ve çok güçlü antioksidan aktiviteye sahip kersetin bakımından zengindir. Bu ekstrakta da şirincik asit ve luteolin miktarları oldukça yüksektir. Güçlü antioksidan bileşiklerden biri olan klorojenik asit de EGA içinde belirlenen bileşikler arasındadır (57,0 mg/100 g ekst). Bunun yanında ESM’nin güçlü antioksidan bileşikler olan klorojenik ve ferulik asit ile luteolin, apigenin ve p-kumarik asiti önemli miktarlarda içerdiği görülmektedir. Çizelge 4.7’ye bakıldığı zaman *D. sericea*’nın aseton ham ekstraktı olan ESA’nın güçlü antioksidan ferulik asiti orta düzeylerde (42,2 mg/100 g ekstrakt), apigenin bileşimini ise göz ardı edilmeyecek düzeylerde (169,5 mg/100 g ekstrakt) içerdiği anlaşılmaktadır. Bitkilerin hekzan ham ekstraktları olan EGH ve ESH’nin, analizi yapılan fenolik bileşikleri hemen hemen hiç içermediği belirlenmiştir (Çizelge 4.7). İncelenen ekstraktlarda aranan bileşenler dışında pek çok serbest fenolik bileşimin doğada bulunduğu bilinmektedir. Bu ekstraktlara ait HPLC-DAD kromatogramlarına (Şekil 4.9 – Şekil 4.13) bakıldığı zaman, karakterize edilemeyen pikler olduğu görülmektedir. Bu sinyallere neden olan bileşiklerin de fenolik karakterli olduğu muhtemeldir. Dolayısıyla, incelenen ekstraktlarda tanımlanamayan daha pek çok bileşimin olabileceği bir gerçektir

## 4.2. DPPH Radikalı Yakalama Testi Sonuçları

Bölüm 3.9.'da bahsedildiği gibi DPPH radikalının absorpsiyonundaki azalma bu radikalın antioksidan bileşiklerce sönmüldüğünü ifade etmektedir. DPPH konsantrasyonunun %50'sinin azalması için gerekli ekstrakt/antioksidan miktarı ile antioksidan aktivite belirlenmiş ve IC<sub>50</sub> ile ifade edilmiştir.

10, 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 µg/mL olarak hazırlanan bitki ekstraktları ve kontrol (metanol), 1:1 oranında 0,2 mM DPPH ile 25 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 515 nm'de UV-VIS spektrofotometre ile örneklerin absorbansı kaydedilmiştir. Test edilen ekstrakt/antioksidan için % inhibisyon değeri, eşitlik 3.1 kullanılarak, kontrol örneği için elde edilen değere göre hesaplanmıştır.

Çeşitli konsantrasyonlardaki bitki ekstraktları ve kontroller için ölçülen absorbans ve hesaplanan % inhibisyon değerleri ESA, ESM, EGA, EGM, EGH ve ESH için sırasıyla Çizelge 4.8, Çizelge 4.9, Çizelge 4.10, Çizelge 4.11, Çizelge 4.12 ve Çizelge 4.13'te verilmiştir. Veriler üç paralel ölçümün ortalaması olarak standart sapmalarıyla birlikte çizelgelerde yer almaktadır. Paralel ölçüm sonuçlarının tamamı EK\_1'de görülebilir.

Çizelge 4.8. ESA için DPPH testi sonucu elde edilen ortalama absorbans ve % inhibisyon değerleri

Konsantrasyon µg/ml	Ortalama Absorbans	Kontrol Absorbans	Ortalama % inhibisyon
25	1,037 ± 0,005	1,301	20,3 ± 0,4
50	1,01 ± 0,004	1,301	22,3 ± 0,3
100	0,756 ± 0,004	1,301	41,9 ± 0,3
250	0,355 ± 0,023	1,301	74,6 ± 1,5
500	0,282 ± 0,003	1,253	77,5 ± 0,2
1000	0,18 ± 0,001	1,253	85,7 ± 0,1

Çizelge 4.9. ESM için DPPH testi sonucu elde edilen absorbans ve % inhibisyon değerleri

Konsantrasyon µg/ml	Ortalama Absorbans	Kontrol Absorbans	Ortalama % inhibisyon
10	1,130 ± 0,002	1,245	9,2 ± 0,1
25	0,980 ± 0,004	1,245	21,3 ± 0,3
50	0,699 ± 0,008	1,238	43,6 ± 0,6
100	0,266 ± 0,016	1,238	78,5 ± 1,3
250	0,057 ± 0,002	1,251	95,4 ± 0,2
500	0,072 ± 0,006	1,251	94,2 ± 0,5
1140	0,102 ± 0,006	1,238	91,8 ± 0,5

Çizelge 4.10. EGA için DPPH testi sonucu elde edilen ortalama absorbans ve % inhibisyon değerleri

Konsantrasyon µg/ml	Ortalama Absorbans	Kontrol Absorbans	Ortalama % inhibisyon
25	1,019 ± 0,005	1,203	4,5 ± 0,5
50	0,877 ± 0,004	1,202	15,2 ± 0,3
100	0,583 ± 0,007	1,202	27 ± 0,6
25	0,282 ± 0,003	1,195	51,2 ± 0,3
500	0,108 ± 0,004	1,195	76,4 ± 0,3
1230	1,15 ± 0,005	1,170	90,8 ± 0,4

Çizelge 4.11. EGM için DPPH testi sonucu elde edilen ortalama absorbans ve % inhibisyon değerleri

Konsantrasyon µg/ml	Ortalama Absorbans	Kontrol Absorbans	Ortalama % inhibisyon
10	1,129 ± 0,012	1,169	3,4 ± 1,0
25	1,081 ± 0,011	1,169	7,6 ± 0,9
50	0,963 ± 0,009	1,169	17,7 ± 0,8
100	0,816 ± 0,004	1,169	30,3 ± 0,3
250	0,489 ± 0,004	1,169	58,2 ± 0,4
500	0,102 ± 0,021	1,169	91,2 ± 1,8

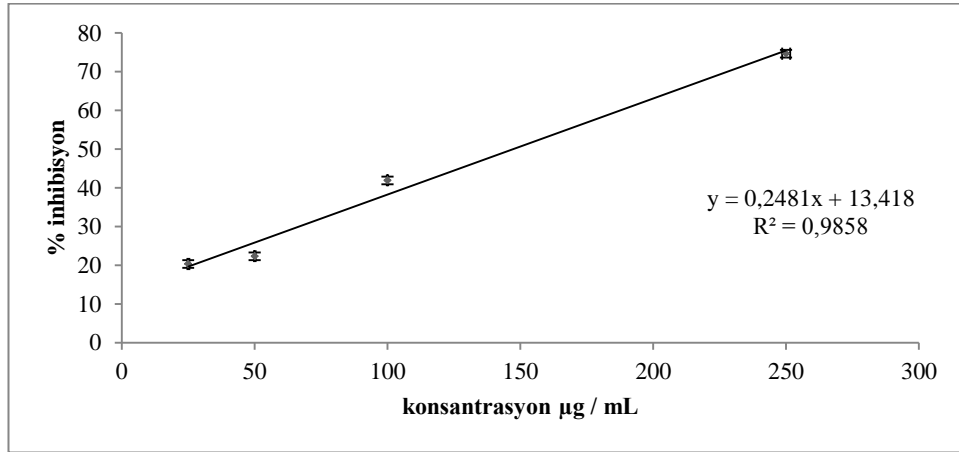
Çizelge 4.12. EGH için DPPH testi sonucu elde edilen ortalama absorbans ve % inhibisyon değerleri

Konsantrasyon µg/ml	Ortalama Absorbans	Kontrol Absorbans	Ortalama % inhibisyon
25	1,14 ± 0,001	1,182	3,6 ± 0,1
50	1,134 ± 0,002	1,182	4,1 ± 0,1
100	1,116 ± 0,010	1,186	5,8 ± 0,8
250	1,026 ± 0,009	1,186	13,4 ± 0,7
660	0,859 ± 0,003	1,202	28,5 ± 0,2

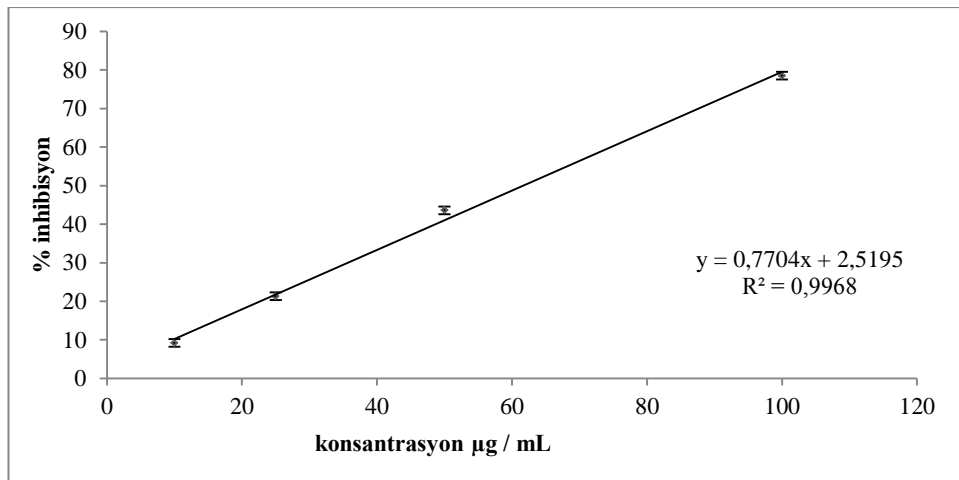
Çizelge 4.13. ESH için DPPH testi sonucu elde edilen ortalama absorbans ve % inhibisyon değerleri

Konsantrasyon µg/ml	Ortalama Absorbans	Kontrol Absorbans	Ortalama % inhibisyon
50	1,148 ± 0,016	1,166	1,6 ± 1,3
100	1,131 ± 0,002	1,185	4,5 ± 0,1
250	1,094 ± 0,007	1,185	7,7 ± 0,6
570	1,022 ± 0,002	1,181	13,5 ± 0,2

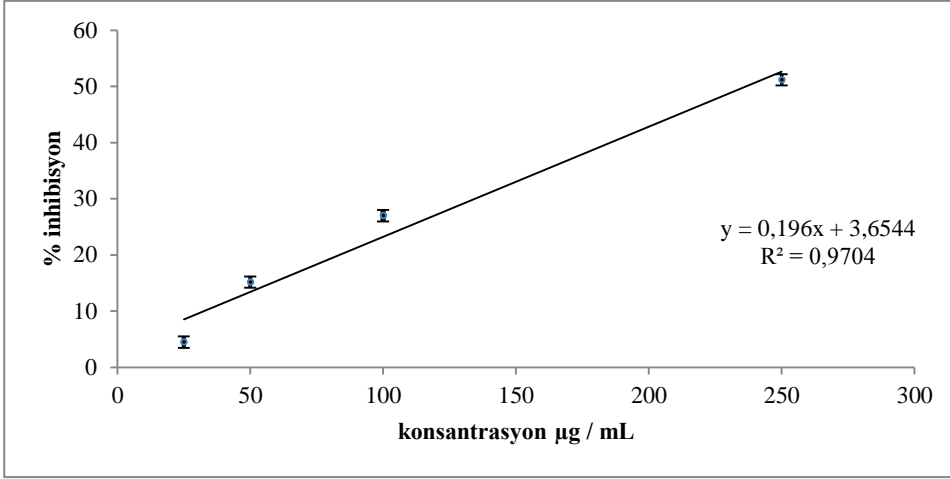
Çizelgelerdeki % inhibisyon değerlerinin konsantrasyona karşı grafikleri çizilmiş, doğrusal regresyon analizi ile elde edilen en iyi doğru denklemi ve korelasyon katsayısının kareleri ile birlikte ESA, ESM, EGA, EGM, EGH ve ESH için sırasıyla Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18 ve Şekil 4.19’da verilmiştir.



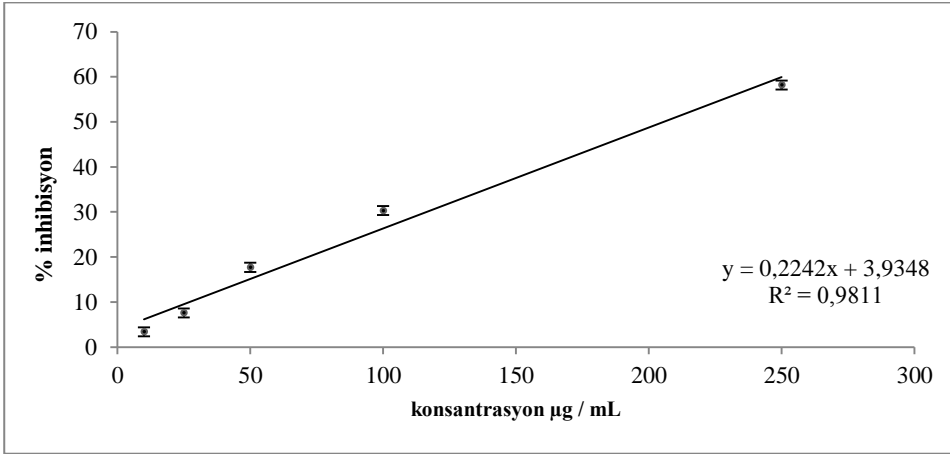
Şekil 4.14. DPPH testi sonucu ESA için elde edilen konsantrasyon-% inhibisyon grafiği



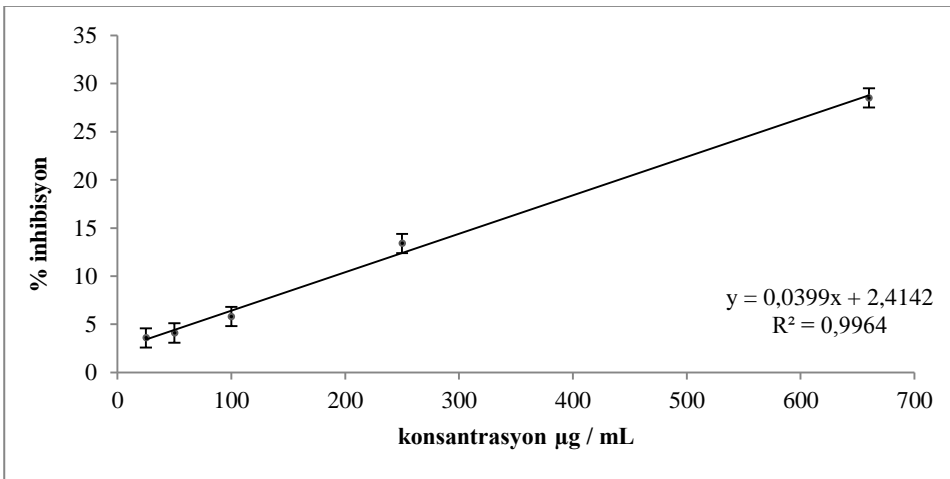
Şekil 4.15. DPPH testi sonucu ESM için elde edilen konsantrasyon-% inhibisyon grafiği



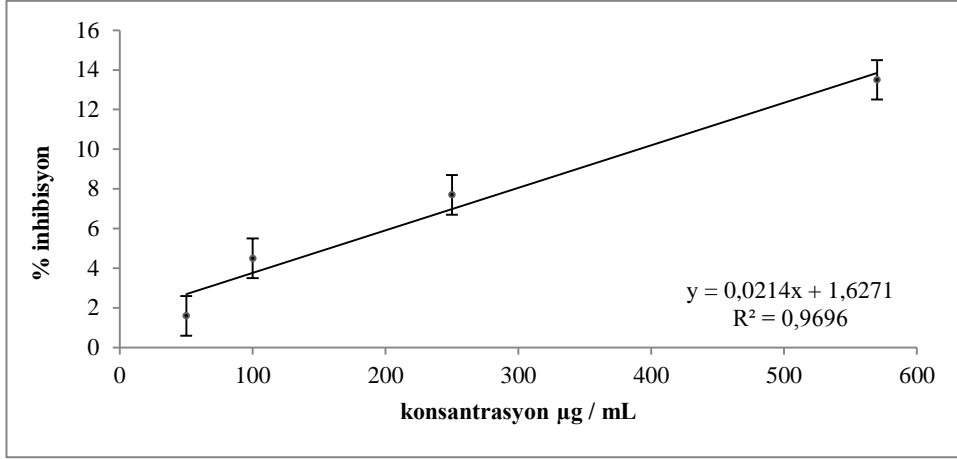
Şekil 4.16. DPPH testi sonucu EGA için elde edilen konsantrasyon-% inhibisyon grafiği



Şekil 4.17 DPPH testi sonucu EGM için elde edilen konsantrasyon-% inhibisyon grafiği



Şekil 4.18 DPPH testi sonucu EGH için elde edilen konsantrasyon-% inhibisyon grafiği



Şekil 4.19. DPPH testi sonucu ESH için elde edilen konsantrasyon-% inhibisyon grafiği

Bu doğrulardaki %50 inhibisyon değerine karşılık gelen konsantrasyon değeri, bitki ekstraktının DPPH radikalini %50 oranında sönmülendirmesi için gerekli ekstrakt konsantrasyonunu ifade eden  $IC_{50}$  değerini vermektedir. Dolayısıyla, bitki ekstraktı/antioksidan için  $IC_{50}$  değeri azaldıkça antioksidan aktivite de o oranda artmaktadır. Tüm ekstraktlar için bulunan  $IC_{50}$  değerleri Çizelge 4.14'te standart sapmalarıyla birlikte verilmiştir.

Çizelge 4.14. Bitki ekstraktları için DPPH testi sonucunda hesaplanan  $IC_{50}$  değerleri

	Ortalama $IC_{50}$
ESA	151,1 ± 3,9
ESM	61,7 ± 0,1
EGA	236,4 ± 0,9
EGM	150,8 ± 2,0
EGH	1192,6 ± 0,2
ESH	2260,4 ± 0,5

In vitro antioksidan akvitelerini incelemek amacıyla yapılan testlerden olan bu testte, sentetik bir radikal olan DPPH'nin polar ortamdaki antioksidan aktivitesi ölçülmüştür. Çalışmada elde edilen sonuçlar yorumlanırken DPPH testi sonuçları, DPPH radikalinin absorpsiyonunda %50 inhibisyona neden olacak ekstrakt veya saf antioksidan konsantrasyonunu ifade eden  $IC_{50}$  değeri ile ifade edilmiştir. Buna göre test edilen bileşikler/ekstraktlar için azalan  $IC_{50}$  değerleri, artan antioksidan aktivite anlamına gelmektedir. Çizelge 4.14'te görüldüğü gibi daha düşük  $IC_{50}$  değerine sahip polar ekstraktlar (ESA, ESM, EGA ve EGM), apolar ekstraktlara (EGH ve ESH) göre daha yüksek radikal yakalama aktivitesine sahiptir. Çizelge 4.14'e göre en güçlü antioksidan aktivite gösteren ekstrakt, diğerlerine göre oldukça düşük  $IC_{50}$  değerine sahip olan ESM'dir. DPPH radikal yakalama aktivitesi ekstraktlar için şu şekilde azalmaktadır; ESM>EGM>ESA>EGA>EGH>ESH.

### 4.3. ABTS<sup>+</sup> Radikali Yakalama Aktivitesi Sonuçları

Re vd (1999)'nin çalışmasında belirtilen yöntem esas alınarak yapılan çalışmada, bitki ekstraktlarının ABTS<sup>+</sup> radikalini yakalama yeteneği ölçülmüştür. ABTS, oda sıcaklığında K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> ile reaksiyona sokularak ABTS<sup>+</sup> radikali oluşturulmuştur. Ekstraktlar ABTS<sup>+</sup> radikali ile reaksiyona sokularak 734 nm de absorbans ölçümleri yapılmıştır. Radikal ile reaksiyona sokulan ekstrakt konsantrasyonu 10 µg/mL-1000 µg/mL aralığında tutulmuştur. % inhibisyon değerleri eşitlik 3.1'de verilen formüle göre hesaplanmıştır;

Elde edilen inhibisyon değerlerinin konsantrasyona karşı çizilen eğrileri ile bu testte standart olarak kullanılan troloks için elde edilen aynı tip eğrinin karşılaştırılmasıyla, söz konusu ekstrakt için antioksidan aktivite, troloks eşdeğeri antioksidan kapasite anlamına gelen TEAC değeri ile ifade edilmiştir.

Çeşitli konsantrasyonlardaki bitki ekstraktları ve kontroller için ölçülen absorbans, hesaplanan % inhibisyon ve kontrol değerleri ESA, ESM, EGA, EGM, EGH ve ESH için sırasıyla Çizelge 4.15, Çizelge 4.16, Çizelge 4.17, Çizelge 4.18, Çizelge 4.19 ve Çizelge 4.20'te verilmiştir. Troloks standardına ait ölçülen absorbans, hesaplanan % inhibisyon ve kontrol değerleri Çizelge 4.21.'de verilmiştir. Veriler üç paralel ölçümün ortalaması olarak standart sapmalarıyla birlikte çizelgelerde yer almaktadır. Paralel ölçüm sonuçlarının tamamı EK\_2'de görülebilir.

Çizelge 4.15. ESA için ABTS<sup>+</sup> testi sonucu elde edilen ortalama absorbans ve % inhibisyon değerleri

Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama Absorbans	Kontrol	Ortalama İnhibisyon
25	0,538 ± 0,002	0,627	14,3 ± 0,4
50	0,487 ± 0,004	0,627	22,3 ± 0,7
100	0,440 ± 0,005	0,627	29,9 ± 0,7
250	0,301 ± 0,002	0,572	47,3 ± 0,4
500	0,266 ± 0,002	0,572	53,4 ± 0,3
1015	0,268 ± 0,002	0,572	53,1 ± 0,3



Çizelge 4.16. ESM için ABTS<sup>+</sup> testi sonucu elde edilen ortalama absorbans ve % inhibisyon değerleri

Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama Absorbans	Kontrol	Ortalama İnhibisyon
10	0,595 ± 0,005	0,620	4,0 ± 0,8
25	0,555 ± 0,005	0,620	10,5 ± 0,8
50	0,498 ± 0,003	0,620	19,7 ± 0,5
100	0,419 ± 0,003	0,620	32,3 ± 0,4
250	0,268 ± 0,003	0,632	57,6 ± 0,3
500	0,109 ± 0,002	0,632	82,7 ± 0,1
1040	0,022 ± 0,001	0,632	96,5 ± 0,8

Çizelge 4.17. EGA için ABTS<sup>+</sup> testi sonucu elde edilen ortalama absorbans ve % inhibisyon değerleri

Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama Absorbans	Kontrol	Ortalama İnhibisyon
10	0,606 ± 0,003	0,630	3,9 ± 0,5
25	0,572 ± 0,005	0,630	9,3 ± 0,7
50	0,532 ± 0,002	0,630	15,7 ± 0,3
100	0,549 ± 0,002	0,630	12,9 ± 0,3
250	0,475 ± 0,002	0,631	24,7 ± 0,3
500	0,366 ± 0,012	0,631	41,9 ± 1,8
1230	0,203 ± 0,006	0,631	67,8 ± 0,6

Çizelge 4.18. EGM için ABTS<sup>+</sup> testi sonucu elde edilen ortalama absorbans ve % inhibisyon değerleri

Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama Absorbans	Kontrol	Ortalama İnhibisyon
10	0,576 ± 0,001	0,609	5,4 ± 0,1
25	0,536 ± 0,001	0,609	12,0 ± 0,2
50	0,476 ± 0,001	0,609	21,8 ± 0,2
100	0,401 ± 0,002	0,609	34,1 ± 0,3
250	0,275 ± 0,003	0,594	53,7 ± 0,5
500	0,152 ± 0,003	0,594	74,5 ± 0,5
1228	0,005 ± 0,002	0,594	99,1 ± 0,3

Çizelge 4.19. EGH için ABTS<sup>+</sup> testi sonucu elde edilen ortalama absorbans ve % inhibisyon değerleri

Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama Absorbans	Kontrol	Ortalama İnhibisyon
25	0,586 ± 0,004	0,589	0,4 ± 0,7
50	0,583 ± 0,001	0,589	1,0 ± 0,1
100	0,563 ± 0,002	0,589	4,3 ± 0,3
250	0,527 ± 0,001	0,589	10,6 ± 0,1
610	0,449 ± 0,002	0,589	23,6 ± 0,3

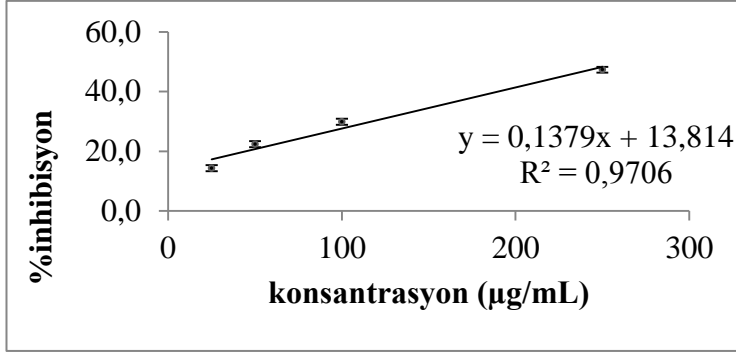
Çizelge 4.20. ESH için ABTS<sup>+</sup> testi sonucu elde edilen ortalama absorbans ve % inhibisyon değerleri

Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama Absorbans	Kontrol	Ortalama İnhibisyon
50	0,594 ± 0,001	0,596	0,2 ± 0,1
100	0,576 ± 0,003	0,596	3,4 ± 0,5
250	0,544 ± 0,003	0,596	8,7 ± 0,5
500	0,505 ± 0,001	0,590	14,4 ± 0,1
780	0,505 ± 0,002	0,590	14,4 ± 0,4

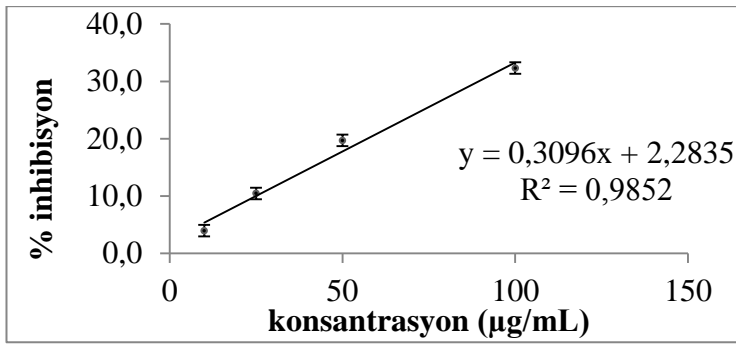
Çizelge 4.21. Troloks için ABTS<sup>+</sup> testi sonucu elde edilen ortalama absorbans ve % inhibisyon değerleri

Konsantrasyon mM	Ortalama Absorbans	Kontrol	Ortalama İnhibisyon
0,0025	0,605 ± 0,001	0,621	2,6 ± 0,1
0,005	0,593 ± 0,001	0,621	4,5 ± 0,1
0,01	0,577 ± 0,001	0,621	7,1 ± 0,1
0,025	0,518 ± 0,005	0,621	16,6 ± 0,8
0,05	0,427 ± 0,001	0,621	31,3 ± 0,2
0,1	0,226 ± 0,002	0,621	63,6 ± 0,3

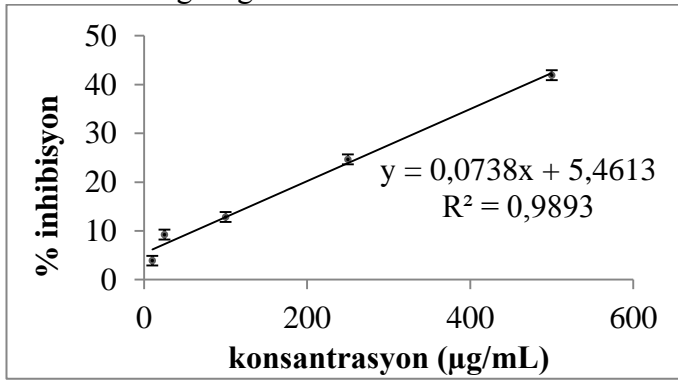
Çizelgelerdeki % inhibisyon değerlerinin konsantrasyona karşı grafikleri çizilmiş, doğrusal regresyon analizi ile elde edilen en iyi doğru denklemi ve korelasyon katsayısının kareleri ile birlikte ESA, ESM, EGA, EGM, EGH, ESH ve troloks standardı için sırasıyla Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24, Şekil 4.25 ve Şekil 4.26.'da verilmiştir.



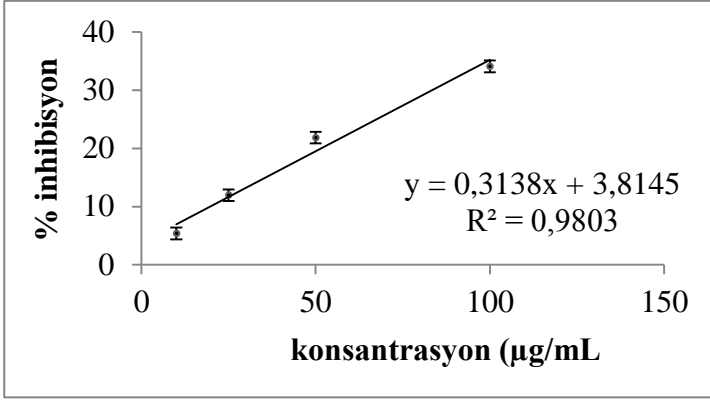
Şekil 4.20. ABTS<sup>+</sup> testi sonucu ESA için elde edilen konsantrasyon-% inhibisyon grafiği



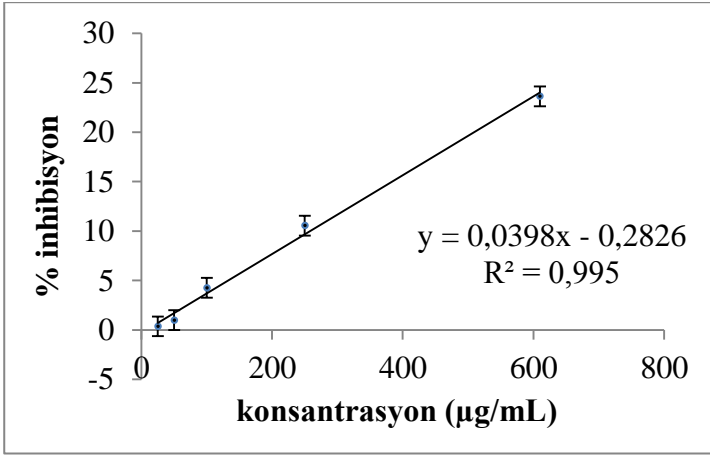
Şekil 4.21. ABTS<sup>+</sup> testi sonucu ESM için elde edilen konsantrasyon-% inhibisyon grafiği



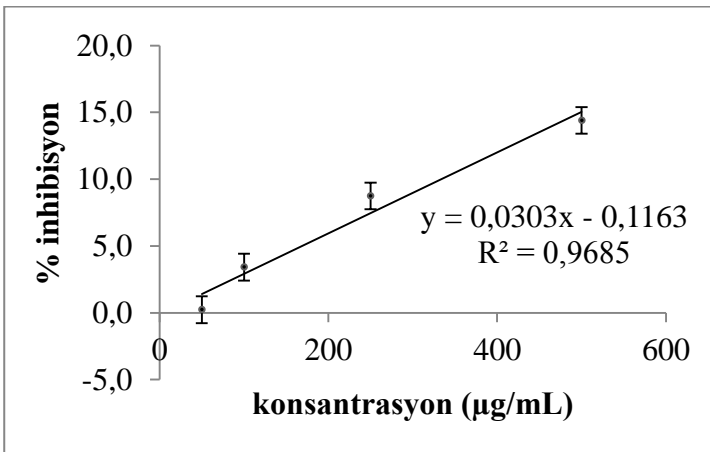
Şekil 4.22. ABTS<sup>+</sup> testi sonucu EGA için elde edilen konsantrasyon-% inhibisyon grafiği



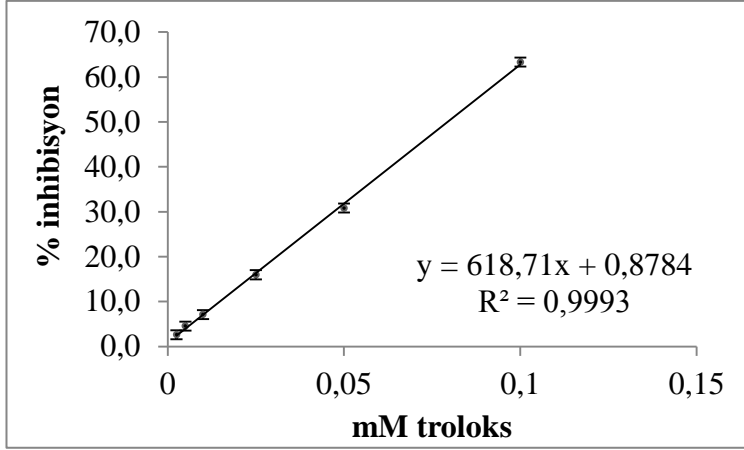
Şekil 4.23. ABTS<sup>+</sup> testi sonucu EGM için elde edilen konsantrasyon-% inhibisyon grafiği



Şekil 4.24. ABTS<sup>+</sup> testi sonucu EGH için elde edilen konsantrasyon-% inhibisyon grafiği



Şekil 4.25. ABTS<sup>+</sup> testi sonucu ESH için elde edilen konsantrasyon-% inhibisyon grafiği



Şekil 4.26. ABTS<sup>+</sup> testi sonucu Troloks için elde edilen konsantrasyon-% inhibisyon grafiği

Tüm ekstraktlar için bulunan IC<sub>50</sub> değerleri Çizelge 4.22’te standart sapmalarıyla birlikte verilmiştir.

Çizelge 4.22. Bitki ekstraktları için ABTS<sup>+</sup> testi sonucunda hesaplanan IC<sub>50</sub> değerleri

	Ortalama IC <sub>50</sub>
ESA	262,4 ± 0,4
ESM	154,1 ± 0,5
EGA	603,5 ± 0,4
EGM	147,2 ± 0,4
EGH	1263,4 ± 1,7
ESH	1654 ± 3,2

Bu IC<sub>50</sub> değerleri kullanılarak tüm ekstraktlar için hesaplanan TEAC değerleri mM Trolox/g ekstrakt cinsinden Çizelge 4.23’te standart sapmalarıyla birlikte verilmiştir.

Çizelge 4.23. Bitki ekstraktları için ABTS<sup>+</sup> testi sonucunda hesaplanan TEAC değerleri

	mM Troloks/g ekstrakt
ESA	0,302 ± 0,005
ESM	0,515 ± 0,004
EGA	0,131 ± 0,006
EGM	0,539 ± 0,005
EGH	0,063 ± 0,001
ESH	0,048 ± 0,001

In vitro antioksidan aktivitelerini incelemek amacıyla yapılan testlerden olan bu testte, sentetik bir radikal olan ABTS<sup>+</sup> nin polar ortamdaki antioksidan aktivitesi ölçülmüştür. Bir bitki ekstraktı için TEAC değeri, aynı koşullarda söz konusu ekstraktın bir gramı ile aynı antioksidan aktiviteye sahip troloksun mM biriminde hesaplanmış konsantrasyonunu ifade etmektedir. Bu bakımdan artan troloks eşdeğeri antioksidan aktivite (TEAC) değeri, artan antioksidan aktivite anlamına gelmektedir. Buna daha yüksek TEAC değerine sahip polar ekstraktlar (ESA, ESM, EGA ve EGM), apolar ekstraktlara (EGH ve ESH) göre daha yüksek radikal yakalama aktivitesine sahiptir. Çizelge 4.23'te görülen değerlere göre en güçlü antioksidan aktivite gösteren ekstrakt EGM dir. ABTS<sup>+</sup> radikal yakalama aktivitesi ekstraktlar için şu şekilde azalmaktadır; EGM>ESM>ESA>EGA>EGH>ESH.

#### 4.4. Klorofil a, Klorofil b ve Toplam Karotenoid İçeriği Sonuçları

Ekstraktlardaki klorofil a (C<sub>a</sub>), klorofil b (C<sub>b</sub>) ve toplam karotenoid (C<sub>x+c</sub>) miktarları Bölüm 3.6'da verilen yöntemle göre mg / 100 g ekstrakt cinsinden belirlenmiştir.

Klorofil içeriğini belirlemek için bitki ekstraktları Çizelge 4.49'da gösterilen konsantrasyonlarda ve belirtilen çözücüler kullanılarak hazırlanmıştır.

Çizelge 4.24. Klorofil içeriğini belirlemek için uygulanan yöntemde ekstrakt çözeltilerinin hazırlanması ile ilgili bilgiler

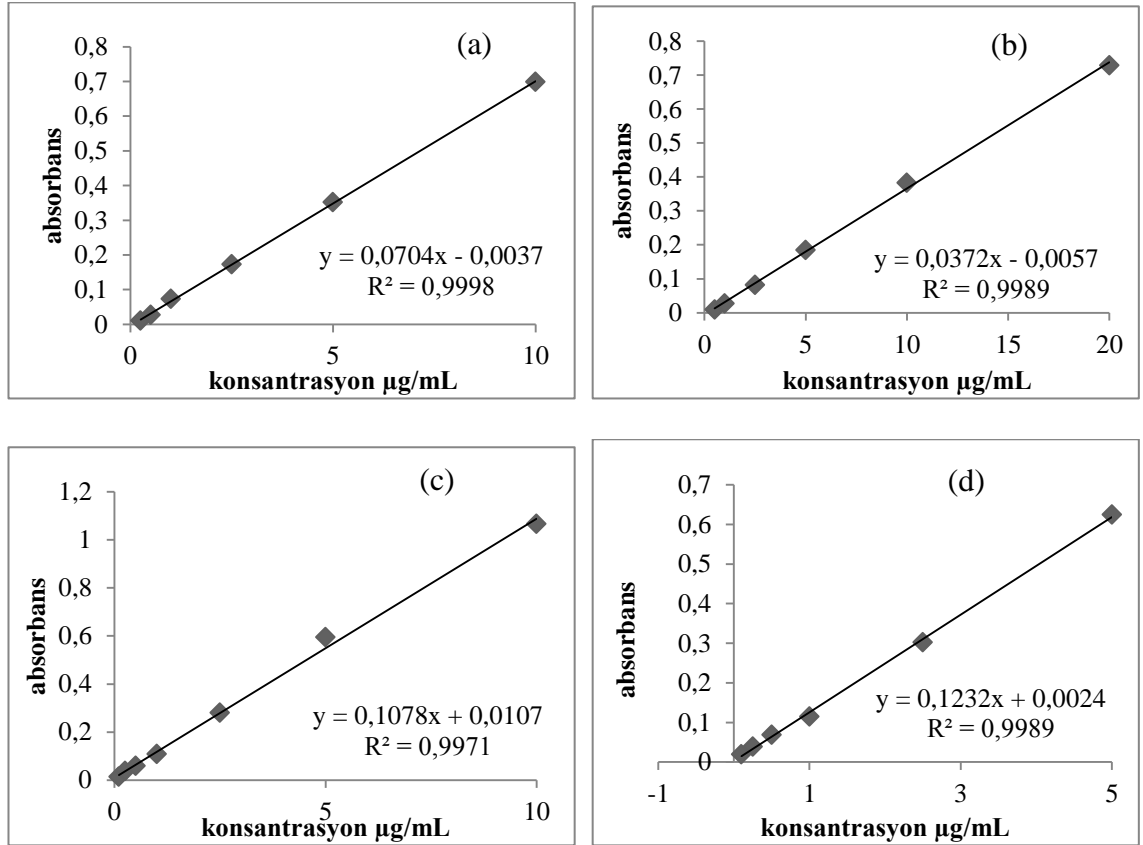
	Tartım (mg)	Son hacim (ml)	Konsantrasyon (µg/mL)	Çözgen
ESA	5,5	10	550	Metanol
ESM	7,2	10	720	Metanol
EGA	5,4	10	540	Metanol
EGM	6	10	600	Metanol
EGH	5,2	10	520	Dietileter
ESH	3	10	300	Dietileter

Klorofil a ve b standartları 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 ve 20,0 µg/mL konsantrasyonlarda Çizelge 4.24'te belirtilen çözücüler kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler için elde edilen absorban değerleri ve ölçüldükleri dalga boyları Çizelge 4.25'te verilmiştir. Absorban değerleri iki paralel ölçümün ortalaması olarak ve ölçüm sınırları da belirtilerek verilmiştir. Tekrar ölçümlerin tamamı EK\_3'te görülebilir.

Çizelge 4.25. Metanol ve dietil eter içinde farklı konsantrasyonlarda hazırlanan klorofil standartları için farklı dalga boylarında elde edilen ortalama absorbans değerleri

Konsantrasyon (µg/mL)	Ortalama Absorbans			
	Klorofil a (MeOH)	Klorofil a (dietileter)	Klorofil b (MeOH)	Klorofil b (dietileter)
	666nm	662nm	653nm	646nm
0,1	-	0,014 ± 0,0007	-	0,019 ± 0,0003
0,25	0,010 ± 0,0008	0,037 ± 0,0013	-	0,039 ± 0,0006
0,5	0,028 ± 0,0004	0,059 ± 0,0011	0,010 ± 0,0060	0,068 ± 0,0006
1,0	0,073 ± 0,0001	0,108 ± 0,0006	0,027 ± 0,0004	0,114 ± 0,0003
2,5	0,173 ± 0,0008	0,280 ± 0,0004	0,082 ± 0,0010	0,302 ± 0,0003
5,0	0,352 ± 0,0007	0,595 ± 0,0007	0,184 ± 0,0004	0,624 ± 0,0010
10	0,699 ± 0,0006	1,067 ± 0,0141	0,383 ± 0,0001	0,916 ± 0,0003
20			0,729 ± 0,0010	

Klorofil a ve b standartlarının metanolde ve dietileterde hazırlanmış kalibrasyon eğrileri Şekil 4.27’de gösterilmiştir.



Şekil 4.27. Klorofil a ve klorofil b standart çözeltileri için elde edilen kalibrasyon eğrileri. a) Klorofil a metanol çözeltisi b) Klorofil b metanol çözeltisi c) Klorofil a dietileter çözeltisi d) Klorofil b dietileter çözeltisi

Klorofil a ve klorofil b içeriği testi sonucu, bitki ekstraktları için elde edilen absorban değerleri Çizelge 4.26’da verilmiştir. Veriler üç paralel ölçümün ortalaması olup standart sapmalarıyla birlikte gösterilmiştir. Ölçüm sonuçlarının tamamı EK\_3’te görülebilir.

Çizelge 4.26. Klorofil a ve klorofil b içeriği testi sonucu, bitki ekstraktları için elde edilen ortalama absorban değerleri

	Ortalama absorban (MeOH)		
	666nm	653nm	470nm
ESA	0,119 ± 0,001	0,134 ± 0,002	0,061 ± 0,001
ESM	0,114 ± 0,001	0,102 ± 0,001	0,204 ± 0,001
EGA	0,051 ± 0,001	0,075 ± 0,001	0,048 ± 0,001
EGM	0,023 ± 0,001	0,022 ± 0,001	0,063 ± 0,001

	Ortalama absorban (dietileter)		
	662nm	644nm	470nm
EGH	0,040 ± 0,005	0,005 ± 0,001	0,051 ± 0,001
ESH	0,135 ± 0,001	0,023 ± 0,001	0,108 ± 0,007

Çalışılan bitki ekstraktlarının bu absorban değerlerine karşılık gelen ve µg/mL olarak tespit edilen klorofil a, klorofil b ve toplam karotenoid miktarları Çizelge 4.27’de gösterilmiştir. Metanolde hazırlanan ekstraktlar (ESA, ESM, EGA, EGM)’in absorban değerlerinden konsantrasyon (µg/mL) elde edilirken C<sub>a</sub> için eşitlik 3.4, C<sub>b</sub> için eşitlik 3.5 ve C<sub>x+c</sub> için eşitlik 3.6 kullanılmış ve ilgili yerlere belirli dalga boyundaki absorban değerleri yerleştirilmiştir. Dietileterde hazırlanan ekstraktlar (EGH, ESH)’in absorban değerlerinden konsantrasyon (µg/mL) elde edilirken C<sub>a</sub> için eşitlik 3.1, C<sub>b</sub> için eşitlik 3.2 ve C<sub>x+c</sub> için eşitlik 3.3 kullanılmış ve ilgili yerlere belirli dalga boyundaki absorban değerleri yerleştirilmiştir.

Çizelge 4.27. Absorbanstan elde edilen ortalama C<sub>a</sub>, C<sub>b</sub> ve C<sub>x+c</sub> değerleri (µg/mL)

	Metanolde hazırlanan ekstraktların konsantrasyonları (µg/ml)		
	Ca	Cb	Cx+c
ESA	0,875 ± 0,017	2,294 ± 0,040	--
ESM	1,044 ± 0,020	1,471 ± 0,035	0,043 ± 0,019
EGA	0,256 ± 0,005	1,448 ± 0,025	--
EGM	0,189 ± 0,014	0,351 ± 0,026	0,069 ± 0,016

	Dietileterde hazırlanan ekstraktların konsantrasyonları (µg/ml)		
	Ca	Cb	Cx+c
EGH	0,395 ± 0,047	--	0,230 ± 0,005
ESH	1,343 ± 0,012	--	0,480 ± 0,031



Bitki ekstraktlarının içerdiği klorofil a, klorofil b ve toplam karotenoid miktarlarının mg / 100 g ekstrakt cinsinden sonuçları Çizelge 4.28’de verilmiştir.

Çizelge 4.28. Bitki ekstraktlarının klorofil a (C<sub>a</sub>), klorofil b (C<sub>b</sub>) ve toplam karotenoid (C<sub>x+c</sub>) içeriği için mg / 100 g ekstrakt cinsinden sonuç tablosu

	Klorofil a mg/100g	Klorofil b mg/100g	Toplam karotenoid mg/100g
ESA	159,17 ± 3,0	417,06 ± 7,2	--
ESM	144,95 ± 2,8	204,29 ± 4,9	6,05 ± 2,6
EGA	47,39 ± 0,9	268,19 ± 4,7	--
EGM	31,49 ± 2,3	58,44 ± 4,3	11,85 ± 2,6
EGH	75,94 ± 9,0	--	44,18 ± 1,0
ESH	447,60 ± 4,1	--	159,03 ± 10,2

Çizelge 4.28’deki değerlere bakıldığında, polar ekstraktların (ESA, ESM, EGA ve EGM), klorofil b içeriğinin klorofil a içeriğinden daha yüksek olduğu görülebilir. Bunun tersine, bitkilerin apolar fraksiyonunu temsil eden hekzanda çözünen fraksiyonlar olan EGH ve ESH’da klorofil b hiç saptanamamıştır. Toplam karotenoid içeriğinin ise tahmin edilebileceği gibi apolar fraksiyonlarda (EGH ve ESH) polar olanlara göre çok daha yüksek olduğu görülmektedir. Bunun nedeni apolar karakterdeki karotenoidlerin hekzan içinde metanol ve asetona göre çözünürlüğünün çok daha yüksek olmasıdır. Ayrıca, polar ekstraktlar için hekzan ile ilave yıkamalar yapılması sırasında karotenoid grubu bileşiklerin çoğu ekstraktlardan uzaklaştırılmış durumdadır. Klorofil a içeriği için sıralama ESH > ESA > ESM > EGH > EGA > EGM olarak verilebilir. Klorofil b içeriği en fazla ESA ‘de gözlemlenmiştir. Klorofil b içeriği ESA > EGA > ESM > EGM sırasında azalmaktadır. Toplam karotenoid içeriği azalma sıralaması ise ESH > EGH > EGM > ESM olarak yazılabilir.

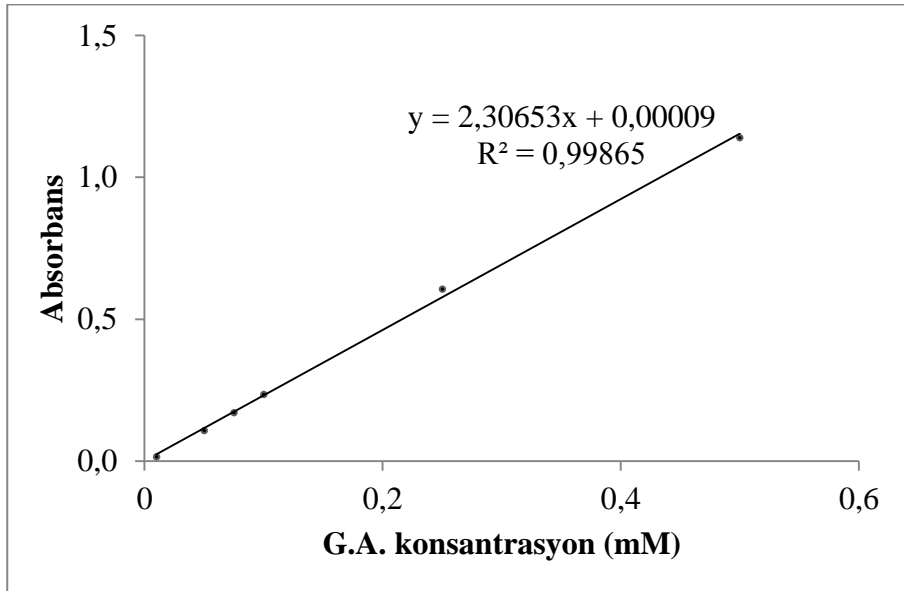
#### 4.5. Toplam Fenolik İçeriği (TPC) Sonuçları

Toplam fenolik içeriği Singleton vd (1999) tarafından rapor edilen yöntem esas alınarak Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) kullanılarak belirlenmiştir. Bitki ekstraktları için tespit edilen toplam fenolik bileşen içerikleri (TPC) gallik asit eşdeğeri (mg GAE/g ekst) olarak ifade edilmiştir. Bitki ekstraktlarının absorbans değerlerini gallik asit eşdeğerine dönüştürmek için gallik asit standardının farklı konsantrasyonlardaki absorbansları ölçülerek Çizelge 4.29’da verilmiştir. Veriler paralel ölçümlerin ortalaması olup standart sapmalarıyla birlikte gösterilmiştir. Ölçüm sonuçlarının tamamı EK\_4’te görülebilir.

Çizelge 4.29. Toplam fenolik bileşen içeriği testinde standart olarak kullanılan gallik asit (GA) için 760 nm’de elde edilen ortalama absorbans değerleri

mM G.A.	Kontrol	Ortalama absorbans
0,01	0,010	0,015 ± 0,001
0,05	0,010	0,107 ± 0,004
0,075	0,010	0,171 ± 0,001
0,1	0,010	0,235 ± 0,004
0,25	0,010	0,606 ± 0,003
0,5	0,010	1,139 ± 0,001

Gallik asit için elde edilen konsantrasyona karşılık ortalama absorbans değerleri Şekil 4.28’de grafik halinde sunulmuştur.



Şekil 4.28. TPC testi sonucu gallik asit için 760 nm de elde edilen konsantrasyon-absorbans eğrisi

Bitki ekstraktları için 760 nm de elde edilen ortalama absorbans değerleri Çizelge 4.30’da verilmiştir.

Çizelge 4.30. Toplam fenolik bileşen testi sonucu bitki ekstraktları için 760 nm’de elde edilen ortalama absorbans değerleri

	Kontrol	Düzeltilmiş ortalama absorbans
ESA	0,051	0,402 ± 0,060
ESM	0,065	0,343 ± 0,016
EGA	0,175	0,473 ± 0,046
EGM	0,227	0,599 ± 0,017
EGH	0,190	0,019 ± 0,031
ESH	0,192	0,048 ± 0,030

Çizelge 4.30’da verilen bitki ekstraktlarına ait absorbans değerleri Şekil 4.28’deki veriler yardımıyla mg GAE/g ekstrakt şeklinde hesaplanarak TPC değerleri olarak Çizelge 4.31’de verilmiştir.

Çizelge 4.31. Bitki ekstraktlarına ait toplam fenolik bileşen içeriği (TPC, mg GAE/g ekst) değerleri

	Ortalama TPC (mg GAE/g ekstrakt)
ESA	667,6 ± 88,8
ESM	602,5 ± 23,6
EGA	954,7 ± 67,3
EGM	1219,3 ± 25,2
EGH	309,1 ± 46,0
ESH	354,4 ± 43,6

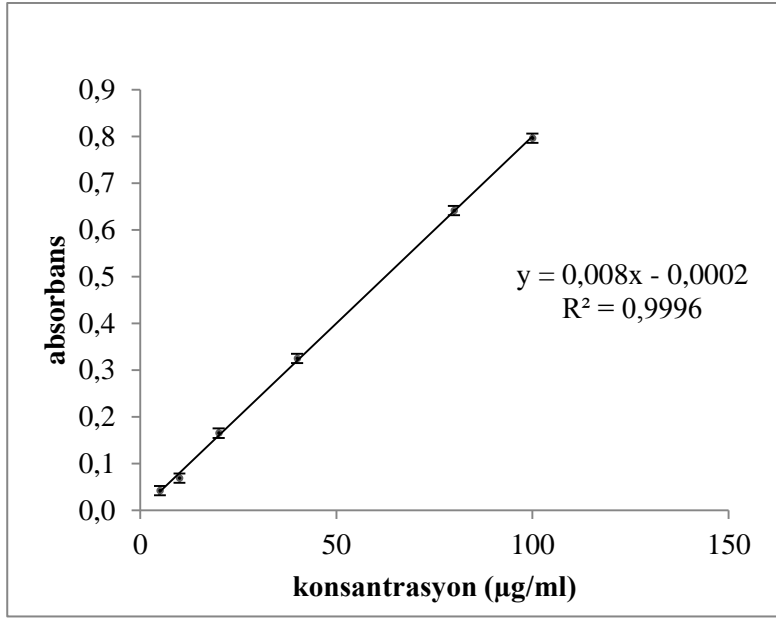
Çizelge 4.31’e göre polar çözügen ekstraktlarında daha yüksek miktarda fenolik bileşen tespit edilmiştir. Özellikle EGM ve EGA ekstraktları oldukça yüksek TPC değerine sahiptir. *D. sericea* ekstraktları ise bu iki ekstratı takip etmektedir. TPC değeri en yüksek bitki ekstrakt EGM tür. TPC değerleri tüm bitki ekstraktları için şu şekilde azalmaktadır; EGM>EGA>ESM>ESA>ESH>EGH.

#### 4.6. Toplam Flavonoid İçeriği (TFC) Sonuçları

TFC testinde standart olarak kullanılan rutin için farklı konsantrasyonları için elde edilen ortalama absorbans değerleri Çizelge 4.32’de verilmiş, bu değerlerden oluşturulan konsantrasyon-absorbans eğrisi ise Şekil 4.29’de gösterilmiştir. Veriler üç paralel ölçümün ortalaması olup standart sapmalarıyla birlikte gösterilmiştir. Ölçüm sonuçlarının tamamı EK\_5’te görülebilir.

Çizelge 4.32. TFC testi sonucu rutin standardı için 430 nm’de elde edilen ortalama absorbans değerleri

Rutin ( $\mu\text{g/ml}$ )	Kontrol	Ortalama abs
5	0,0458	$0,042 \pm 0,004$
10	0,0458	$0,069 \pm 0,014$
20	0,0458	$0,165 \pm 0,013$
40	0,0458	$0,325 \pm 0,013$
80	0,0458	$0,641 \pm 0,007$
100	0,0458	$0,796 \pm 0,066$



Şekil 4.29. TFC testi sonucu rutin için 430 nm’de elde edilen konsantrasyon-absorbans eğrisi

TFC testi sonucu bitki ekstraktları için 430 nm’de elde edilen absorbans değerleri Çizelge 4.33’de verilmiştir.

Çizelge 4.33. TFC testi sonucu bitki ekstraktları için elde edilen ortalama absorbanans değerleri

	Kontrol	Düzeltilmiş ortalama absorbanans
ESA	0,202	0,195 ± 0,016
ESM	0,113	0,115 ± 0,007
EGA	0,018	0,018 ± 0,001
EGM	0,023	0,024 ± 0,001
EGH	0,014	0,014 ± 0,002
ESH	0,115	0,097 ± 0,016

Bitki ekstraktlarının rutin eşdeğeri olarak TFC değerleri mg rutin/g ekstrakt olarak Çizelge 4.34’de verilmiştir.

Çizelge 4.34. Bitki ekstraktlarına ait toplam flavanoid bileşen içeriği (TFC, mg rutin/g ekstrakt) değerleri

	Ortalama TFC (mg rutin / g ekstrakt)
ESA	39,1 ± 4,9
ESM	121,3 ± 19,7
EGA	144,2 ± 8,2
EGM	244,5 ± 19,5
EGH	18,0 ± 2,5
ESH	30,0 ± 1,4

Çizelge 4.34’deki sonuçlara göre polar ekstraktlar (ESA, ESM, EGA ve EGM) apolar ekstraktlara göre daha yüksek TFC değerine sahiptir. *D.gnidioides* ekstratları en yüksek iki değere sahiptir ve toplam flavonoid içeriği en yüksek ekstrakt EGM’dir. Sıralama ise EGM > EGA > ESM > ESA > ESH > EGH şeklindedir.

#### 4.7. Büyükbaş Hayvan Beyni Lipozomları (BBE)’nda Lipid Peroksidasyon İnhibisyonunun Ölçümü Sonuçları

Bölüm 3.6.’daki yönteme göre yapılan çalışmada, büyükbaş hayvan beyne (BBE) ekstraktından hazırlanan lipozomlarda bitki ekstraktlarının lipid peroksidasyonunu önleme yeteneği ölçülmüştür. Sonuçlar, ekstraktlar tarafından lipid peroksidasyon reaksiyonunun inhibe edilme oranını temsil eden % inhibisyon değerleri olarak verilmiştir.

BBE testi sonucu, bitki ekstraktlarının kullanıldığı durumlarda elde edilen absorbands değerleri Çizelge 4.35’de gösterilmiştir. Veriler üç paralel ölçümün ortalaması olup standart sapmalarıyla birlikte gösterilmiştir. Ölçüm sonuçlarının tamamı EK\_6’da görülebilir.

Çizelge 4.35. BBE testinde ekstrakt absorbandslarının ortalamaları

	5µg/ml	10µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100µg/ml	250 µg/ml
ESA	0,317 ± 0,009	0,299 ± 0,048	0,247 ± 0,001	0,234 ± 0,014	0,208 ± 0,005	0,287 ± 0,004
ESM	0,263 ± 0,002	0,248 ± 0,003	0,227 ± 0,006	0,228 ± 0,006	0,224 ± 0,006	0,209 ± 0,015
EGA	0,452 ± 0,041	0,350 ± 0,020	0,281 ± 0,010	0,136 ± 0,012	0,142 ± 0,034	0,199 ± 0,053
EGM	0,439 ± 0,008	0,410 ± 0,010	0,297 ± 0,004	0,127 ± 0,003	0,260 ± 0,002	0,207 ± 0,005
EGH	0,311 ± 0,002	0,397 ± 0,005	0,405 ± 0,016	0,407 ± 0,005	0,425 ± 0,008	0,438 ± 0,002
ESH	0,159 ± 0,001	0,174 ± 0,003	0,184 ± 0,005	0,220 ± 0,011	0,311 ± 0,008	0,372 ± 0,007

BBE testi sonucu, pozitif kontrol antioksidanlar (Kersetin, BHT, α-tokoferol ve ferulik asit) in kullanıldığı durumlarda elde edilen absorbands değerleri Çizelge 4.36’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.36. BBE testi sonucu, pozitif kontrol antioksidanların kullanıldığı durumlarda elde edilen ortalama absorbands değerleri

	5µg/ml	10µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100µg/ml	250 µg/ml
Kersetin	0,483 ± 0,005	0,464 ± 0,017	0,464 ± 0,008	0,509 ± 0,013	0,501 ± 0,006	0,448 ± 0,012
BHT	0,469 ± 0,006	0,441 ± 0,012	0,338 ± 0,010	0,314 ± 0,005	0,196 ± 0,004	0,148 ± 0,004
α-tokoferol	0,267 ± 0,003	0,179 ± 0,004	0,176 ± 0,006	0,164 ± 0,005	0,152 ± 0,011	0,145 ± 0,010
Ferulik asit	0,547 ± 0,011	0,546 ± 0,002	0,542 ± 0,016	0,524 ± 0,002	0,519 ± 0,047	0,467 ± 0,014

Bitki ekstraktları için absorbands değerlerinden yola çıkılarak hesaplanan % inhibisyon değerleri Çizelge 4.37’de verilmiştir.

Çizelge 4.37. BBE testi sonucu, ekstraktlarda elde edilen ortalama %inhibisyon değerleri

µg/ml	% inhibisyon					
	ESA	ESM	EGA	EGM	EGH	ESH
5	54,8 ± 1,3	62,0 ± 0,6	35,7 ± 5,9	37,6 ± 1,1	55,8 ± 0,2	52,4 ± 0,2
10	61,6 ± 6,4	64,7 ± 0,5	50,2 ± 2,9	41,9 ± 2,0	43,5 ± 0,7	47,8 ± 0,9
25	64,9 ± 0,4	67,6 ± 0,8	59,9 ± 1,5	57,8 ± 0,6	42,3 ± 2,3	44,8 ± 1,4
50	65,7 ± 2,5	67,3 ± 1,0	80,6 ± 1,8	81,9 ± 0,4	42,1 ± 0,7	34,3 ± 3,3
100	70,4 ± 0,7	68,5 ± 0,6	79,8 ± 4,9	63,0 ± 0,2	39,6 ± 1,1	7,0 ± 2,3
250	59,2 ± 0,6	70,1 ± 2,5	71,7 ± 7,5	70,5 ± 0,6	37,7 ± 0,3	--

Pozitif kontrol antioksidanlar için BBE testi sonucu elde edilen % inhibisyon değerleri de Çizelge 4.38’de verilmiştir.

Çizelge 4.38. BBE testi sonucu, pozitif kontrollerde elde edilen ortalama %inhibisyon değerleri

µg/ml	% inhibisyon			
	Kersetin	BHT	α-tokoferol	Ferulik asit
5	25,5 ± 0,7	27,7 ± 0,9	58,9 ± 0,5	15,6 ± 1,7
10	28,4 ± 2,7	32,0 ± 1,8	72,4 ± 0,6	15,7 ± 0,3
25	28,4 ± 1,3	47,9 ± 1,6	72,9 ± 0,9	16,4 ± 2,5
50	21,4 ± 2,0	51,5 ± 0,8	75,2 ± 0,8	19,1 ± 0,3
100	22,7 ± 0,9	69,8 ± 0,6	76,6 ± 1,7	20,0 ± 7,3
250	30,9 ± 1,8	77,1 ± 1,1	77,7 ± 1,6	28,0 ± 2,1

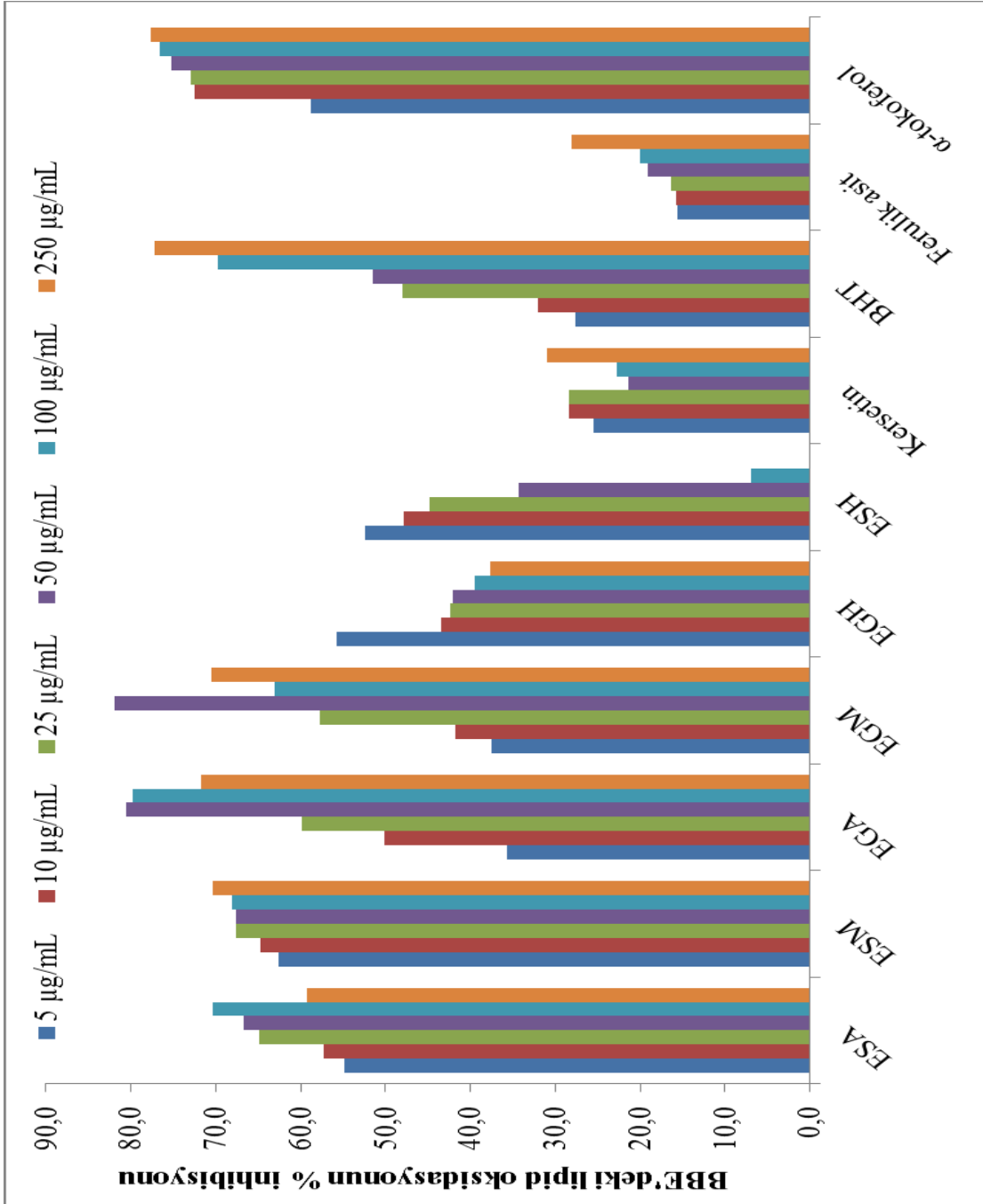
BBE testi sonucu elde edilen, bitki ekstraktlarına ve pozitif kontrol antioksidanlara ait % inhibisyon değerleri grafiksel olarak Şekil 4.30’da gösterilmiştir.

*D. sericea* dan elde edilen polar yapıdaki ESA ve ESM, 100 veya 250 µg/mL’ye kadar kullanıldıklarında konsantrasyonla artan bir eğilimle BBE’de meydana gelen lipid oksidasyonunu inhibe etme yeteneği göstermişlerdir (Şekil 4.30). EGA ve EGM’nin aktivitelerinin ise 5-50 µg/mL aralığında en yüksek olduğu bulunmuştur. ESA ve ESM için etkili konsantrasyon aralığında BBE lipid substratında oksidasyonu inhibe etme yeteneği %55-70 aralığında konsantrasyonla beraber artmakta iken EGA ve EGM ‘nin kullanıldığı durumlarda lipid oksidasyonunun daha başarılı olarak inhibe edildiği görülmektedir (Şekil 4.30). Özellikle bu ekstraktlar için 50-250 µg/mL aralığında inhibisyon yüzdeleri %70-80 civarındadır. Çalışılan polar pozitif kontrol antioksidanlardan kersetinin farklı konsantrasyonlarda kullanılması lipid oksidasyonunun inhibe edilme derecesinde önemli bir farklılık yaratmamış olup %20-30 aralığında aktivite gösterilmiştir. Çalışılan diğer polar antioksidan olan ferulik asit durumunda ise 100 µg/mL ye kadar gösterilen aktivitede konsantrasyon artışı ile yavaş bir artış, bu noktadan sonra ise daha hızlı bir artış sergilenmiştir. Ancak genel anlamda tüm konsantrasyonlarda ferulik asit BBE oksidasyonunu etkili olarak inhibe edememiştir.

Çalışmada ekstraktlarla kıyaslanan lipofilik antioksidanlardan biri olan BHT durumunda konsantrasyonla beraber artan bir antioksidatif koruma gözlenmiştir. Özellikle 100 ve 250 µg/mL lik BHT konsantrasyonlarında BBE’de gösterilen antioksidatif koruma dikkat çekicidir. Test edilen diğer apolar antioksidan olan ve güçlü aktivitesi pek çok kez kanıtlanmış α-tokoferolün ise genel olarak tüm konsantrasyonlarda BBE içinde en etkin antioksidatif korumayı sağladığı açıkça görülmektedir (Şekil 4.30). α-tokoferolün BBE’de sağladığı lipid oksidasyon reaksiyonunu inhibe etme yeteneği çalışılan konsantrasyon aralığında %55-75 olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrollerle ilgili sonuçlardan, lipofilik antioksidanların BBE içinde daha homojen çözünebilme ve dispersiyeye olma özelliklerinden dolayı lipid oksidasyonuna karşı daha etkili koruma sağladığı sonucuna varılabilir.

Genel olarak bitki ekstraktları ve saf antioksidanlar kıyaslandığında, ESA, ESM, EGA ve EGM'nin BBE içinde saf antioksidanların sağladığı koruma yanında göz ardı edilemeyecek aktivitelerle koruma gösterdiği anlaşılmıştır. ESA ve ESM çalışılan tüm konsantrasyonlarda aynı şartlardaki apolar saf antioksidanlara yakın etkin koruma sağlarken, EGA ve EGM, özellikle 50 ve 100 µg/mL de antioksidan aktivitesinin en yüksek olduğu belirlenen  $\alpha$ -tokoferole çok yakın bir davranış sergilemiştir (Şekil 4.30).

Şekil 4.30. BBE'de meydana gelen lipid peroksidasyonunun bitki ekstraktları ve saf antioksidanlarca % inhibisyonu





#### 4.8. Süperoksit Anyon Radikali (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) Yakalama Aktivitesi Sonuçları

Valentao vd (2001) tarafından rapor edilen yöntem temel alınarak yapılan O<sub>2</sub><sup>-</sup> yakalama aktivite testi sonucu, 25 µg/mL ile 500 µg/mL arasında hazırlanmış etanolik bitki ekstraktlarının 560 nm’de absorbanları ölçülmüştür. Absorbans değerleri diğer pek çok testte olduğu gibi O<sub>2</sub><sup>-</sup> radikalini yakalama başarısını ifade eden %inhibisyon değerleri olarak rapor edilmiştir. Pozitif kontrol antioksidanlara ait sonuçları da içeren tüm absorbans ve hesaplanan % inhibisyon değerleri Çizelge 4.39’den Çizelge 4.44’e kadar numaralandırılmış çizelgelerde verilmiştir. Bitkilere ait hekzan ekstraktları olan EGH ve ESH, belirli bir O<sub>2</sub><sup>-</sup> radikali yakalama aktivitesi göstermediği için bu iki ekstraktla ilgili sonuçlar (veri gösterilmemiştir) Bölüm 4.8 kapsamındaki çizelge ve şekillere dahil edilmemiştir. Veriler üç paralel ölçümün ortalaması olup standart sapmalarıyla birlikte gösterilmiştir. Ölçüm sonuçlarının tamamı EK\_7’de görülebilir.

Çizelge 4.39. Süperoksit anyon radikali yakalama aktivite testi sonucu ESA için elde edilen ortalama absorbans ve hesaplanan % inhibisyon değerleri

µg/ml	Ortalama absorbans	Ortalama % inhibisyon
25	0,397 ± 0,002	8,3 ± 0,4
50	0,365 ± 0,005	15,8 ± 1,2
100	0,343 ± 0,001	20,7 ± 0,2
250	0,334 ± 0,016	22,8 ± 3,8
500	0,326 ± 0,002	24,8 ± 0,6
kontrol	0,433	

Çizelge 4.40. Süperoksit anyon radikali yakalama aktivite testi sonucu ESM için elde edilen ortalama absorbans ve hesaplanan % inhibisyon değerleri

µg/ml	Ortalama absorbans	Ortalama % inhibisyon
25	0,397 ± 0,012	8,3 ± 2,9
50	0,374 ± 0,015	13,7 ± 3,5
100	0,366 ± 0,003	15,6 ± 0,7
250	0,331 ± 0,007	23,6 ± 1,6
500	0,305 ± 0,018	29,6 ± 4,0
kontrol	0,433	

Çizelge 4.41. Süperoksit anyon radikali yakalama aktivite testi sonucu EGA için elde edilen ortalama absorbans ve hesaplanan % inhibisyon değerleri

$\mu\text{g/ml}$	Ortalama absorbans	Ortalama % inhibisyon
25	$0,373 \pm 0,015$	$13,8 \pm 3,5$
50	$0,367 \pm 0,002$	$15,3 \pm 0,5$
100	$0,345 \pm 0,005$	$20,4 \pm 1,2$
250	$0,190 \pm 0,021$	$56,2 \pm 4,7$
500	$0,267 \pm 0,012$	$38,3 \pm 2,7$
kontrol	0,433	

Çizelge 4.42. Süperoksit anyon radikali yakalama aktivite testi sonucu EGM için elde edilen ortalama absorbans ve hesaplanan % inhibisyon değerleri

$\mu\text{g/ml}$	Ortalama absorbans	Ortalama % inhibisyon
25	$0,413 \pm 0,016$	$4,7 \pm 3,7$
50	$0,372 \pm 0,027$	$14,1 \pm 6,3$
100	$0,359 \pm 0,002$	$17,1 \pm 0,4$
250	$0,179 \pm 0,005$	$58,6 \pm 1,0$
500	$0,292 \pm 0,006$	$32,6 \pm 1,3$
kontrol	0,433	

Çizelge 4.43. Süperoksit anyon radikali ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) yakalama aktivite testi sonucu Ferulik asit için elde edilen ortalama absorbans ve hesaplanan % inhibisyon değerleri

$\mu\text{g/ml}$	Ortalama absorbans	Ortalama % inhibisyon
10	$0,328 \pm 0,010$	$24,3 \pm 2,2$
25	$0,322 \pm 0,007$	$25,7 \pm 1,6$
50	$0,288 \pm 0,005$	$33,5 \pm 1,2$
100	$0,239 \pm 0,009$	$44,8 \pm 2,0$
kontrol	0,433	

Çizelge 4.44. Süperoksit anyon radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) yakalama aktivite testi sonucu Kersetin için elde edilen ortalama absorbans ve hesaplanan % inhibisyon değerleri

$\mu\text{g/ml}$	Ortalama absorbans	Ortalama % inhibisyon
10	$0,315 \pm 0,010$	$27,3 \pm 1,5$
25	$0,294 \pm 0,07$	$32,1 \pm 2,3$
50	$0,249 \pm 0,05$	$42,6 \pm 0,7$
100	$0,177 \pm 0,09$	$59,0 \pm 2,7$
kontrol	0,433	

Çizelge 4.45. Süperoksit anyon radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) yakalama aktivite testi sonucu BHT için elde edilen ortalama absorbans ve hesaplanan % inhibisyon değerleri

$\mu\text{g/ml}$	Ortalama absorbans	Ortalama % inhibisyon
10	$0,399 \pm 0,003$	$7,8 \pm 0,6$
25	$0,398 \pm 0,004$	$8,2 \pm 0,8$
50	$0,397 \pm 0,008$	$8,4 \pm 1,9$
100	$0,418 \pm 0,005$	$3,5 \pm 1,1$
kontrol	0,433	

Çizelge 4.46. Süperoksit anyon radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) yakalama aktivite testi sonucu  $\alpha$ -tokoferol için elde edilen ortalama absorbans ve hesaplanan % inhibisyon değerleri

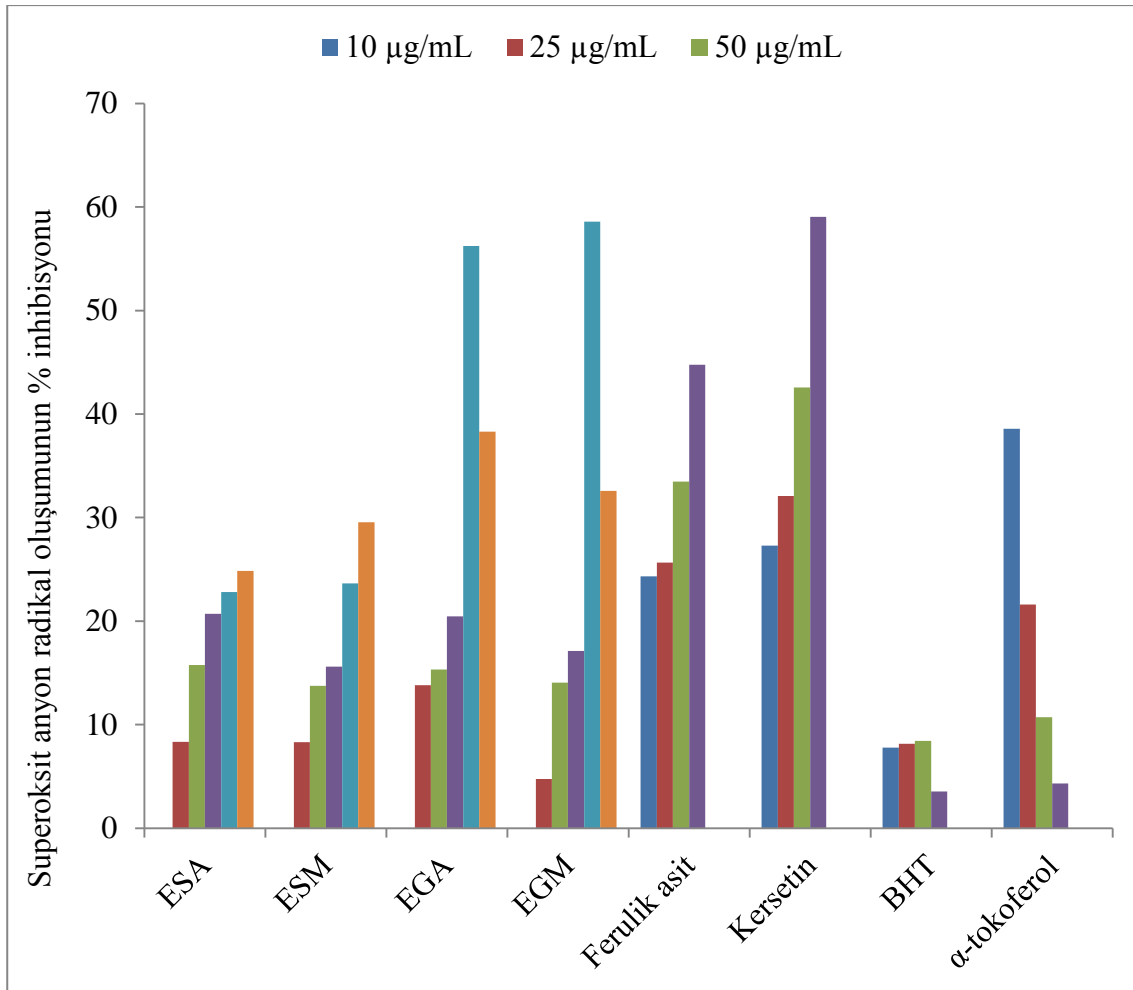
$\mu\text{g/ml}$	Ortalama absorbans	Ortalama % inhibisyon
10	$0,266 \pm 0,014$	$38,6 \pm 3,2$
25	$0,340 \pm 0,004$	$21,6 \pm 0,9$
50	$0,387 \pm 0,011$	$10,7 \pm 2,5$
100	$0,414 \pm 0,008$	$4,3 \pm 1,8$
kontrol	0,433	

Süperoksit anyon radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ) yakalama aktivite testi sonucu, bitki ekstraktları ve pozitif kontrol antioksidanları için farklı konsantrasyonlarda elde edilen % inhibisyon değerleri grafiksel olarak Şekil 4.31.'de gösterilmiştir. Şekil 4.31.'e göre, *D. sericea* polar ekstraktları olan ESA ve ESM hariç diğer tüm ekstraktlar 50  $\mu\text{g/mL}$ 'de prooksidan aktivite göstermeye başlamış olup 250  $\mu\text{g/mL}$  den sonra bu ekstraktların aktivitesinde azalma olduğuna karar verilmiştir. ESA ve ESM, 500  $\mu\text{g/mL}$  ye kadar artan konsantrasyonla beraber  $O_2^{\cdot-}$  radikal oluşumunu belli bir seviyeye kadar artan bir şekilde inhibe etmeyi başarmıştır. *D. gnidioides* in polar fraksiyonları olarak adlandırabileceğimiz EGA ve EGM için en etkili konsantrasyonun 250  $\mu\text{g/mL}$  olduğu belirlenmiş olup bu iki ekstraktın bu konsantrasyonda,  $O_2^{\cdot-}$  radikalinin oluşumunu tüm

çalışılan ekstrakt ve konsantrasyonlar içinde en başarılı şekilde inhibe ettiği (%55-60) gözlenmiştir.

Genel olarak pozitif kontrol bileşikleri içinde polar antioksidanlar ferulik asit ve kersetinin apolar antioksidanlara göre aktivitelerinin belirgin olarak daha yüksek olduğu söylenebilir. BHT'nin tüm konsantrasyonlarda aktivitesinin çok düşük olduğu,  $\alpha$ -tokoferolün ise sadece 10  $\mu\text{g/mL}$  de %30-40 arasında bir oranda  $\text{O}_2^-$  radikalini yakalama yeteneği gösterdiği belirlenmiştir. Bunu, lipofilik apolar antioksidanlar olan BHT ve  $\alpha$ -tokoferolün,  $\text{O}_2^-$  radikal yakalama test ortamının polar çözücülerinde homojen olarak dispersiyeye edilememesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Polar antioksidanlar olan ferulik asit ve kersetinin de 100  $\mu\text{g/mL}$  lik konsantrasyona kadar  $\text{O}_2^-$  radikallerini yakalama aktivitesi gösterdiği, daha yüksek konsantrasyonlarda (250 ve 500  $\mu\text{g/mL}$ ) ise hiçbir aktivite göstermediği görülmüştür (Şekil 4.31.). Özellikle polar pozitif kontrol antioksidanlar ile bitki ekstraktlarını kıyasladığımızda, 250  $\mu\text{g/mL}$  da EGA ve EGM'nin 100  $\mu\text{g/mL}$  deki ferulik asit ve kersetine çok yakın bir aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Şekil 4.31. Süperoksit anyon radikali ( $\text{O}_2^-$ ) oluşumunun farklı konsantrasyonlardaki bitki ekstraktları ve pozitif kontrol antioksidanlarınca %inhibisyonu



#### 4.9. Tiobarbitürik Asitle Tepkimeye Giren Maddeler (TBARS) Testinin Sonuçları

TBARS testi Bölüm 3.14.'de anlatıldığı gibi Laguerre vd (2007) tarafından rapor edilen yöntem esas alınarak yürütülmüştür. Bu yöntemle lipid peroksidasyonun primer oksidasyon ürünleri olan lipid hidroksiperoksitlerinin degradasyonu ile oluşan sekonder ürünlerden biri olan malondialdehit oluşumu takip edilmiştir. 1000 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan bitki ekstraktları linoleik asit içeren reaksiyon karışımına eklenmiş ve 8 gün boyunca her 24 saatte bir alınan örnekler TBA reaktifi ile etkileştirilip oluşan kırmızı renkli MDA-TBA kompleksinin absorbanı, 500 nm de mikropilaka okuyucu ile ölçülmüştür. Pozitif kontrol antioksidanlar 100 µg/mL ve 1000 µg/mL'lik iki ayrı konsantrasyonda değerlendirilmiştir. Sonuçlar kontrol örneğine göre TBARS oluşumunun % inhibisyonu olarak ifade edilmiştir.

Bitki ekstraktları için elde edilen ortalama absorban ve % inhibisyon değerleri Çizelge 4.47'de, pozitif kontroller için elde edilen ortalama absorban ve % inhibisyon değerleri ise Çizelge 4.48'de gösterilmiştir. Veriler üç paralel ölçümün ortalaması olup standart sapmalarıyla birlikte gösterilmiştir. Ölçüm sonuçlarının tamamı EK\_8'de görülebilir.

Çizelge 4.47. 8 günlük inkübasyon sonunda, bitki ekstraktları için TBARS testi sonucu ölçülen ortalama absorban (abs) ve ortalama % inhibisyon (ort % inh) değerleri

	ESA	ESM	EGA	EGM	EGH	ESH
1.gün ort abs	0,483 ± 0,004	0,314 ± 0,020	0,302 ± 0,020	1,053 ± 0,021	0,324 ± 0,003	0,273 ± 0,007
1.gün ort % inh	--	19,7 ± 5,0	22,8 ± 5,2	-	17,3 ± 0,7	30,2 ± 1,8
2.gün ort abs	0,260 ± 0,006	0,383 ± 0,012	0,271 ± 0,004	0,316 ± 0,011	0,365 ± 0,012	0,255 ± 0,012
2.gün ort % inh	30,3 ± 1,5	-	27,3 ± 1,0	15,0 ± 3,0	2,4 ± 0,8	31,6 ± 3,3
3.gün ort abs	0,396 ± 0,009	0,499 ± 0,004	0,400 ± 0,007	0,725 ± 0,013	0,303 ± 0,002	0,722 ± 0,015
3.gün ort % inh	22,3 ± 1,7	2,1 ± 0,8	21,6 ± 1,3	-	40,7 ± 0,5	-
4.gün ort abs	0,344 ± 0,010	0,416 ± 0,011	0,470 ± 0,011	0,433 ± 0,012	0,372 ± 0,006	0,323 ± 0,011
4.gün ort % inh	35,8 ± 1,8	22,3 ± 2,1	12,2 ± 2,0	19,2 ± 2,2	30,4 ± 1,2	39,8 ± 2,1
5.gün ort abs	0,337 ± 0,013	0,396 ± 0,005	0,371 ± 0,007	0,422 ± 0,018	0,313 ± 0,026	0,278 ± 0,002
5.gün ort % inh	43,7 ± 2,1	33,8 ± 0,8	38,0 ± 1,2	29,4 ± 3,0	47,6 ± 4,3	53,5 ± 0,4
6.gün ort abs	0,339 ± 0,001	0,466 ± 0,012	0,427 ± 0,016	0,361 ± 0,006	0,252 ± 0,012	0,257 ± 0,014
6.gün ort % inh	44,4 ± 0,2	23,5 ± 1,9	30,0 ± 2,7	40,8 ± 1,1	58,6 ± 2,0	57,9 ± 2,2
7.gün ort abs	0,447 ± 0,011	0,450 ± 0,024	0,401 ± 0,003	0,370 ± 0,015	0,280 ± 0,003	0,311 ± 0,013
7.gün ort % inh	29,3 ± 1,7	28,9 ± 3,7	36,6 ± 0,4	41,4 ± 2,3	55,7 ± 0,4	50,7 ± 0,013
8.gün ort abs	0,498 ± 0,034	0,624 ± 0,015	0,499 ± 0,024	0,641 ± 0,013	0,818 ± 0,017	0,837 ± 0,012
8.gün ort % inh	24,6 ± 5,1	5,6 ± 2,3	24,4 ± 3,6	3,0 ± 1,9	-	-

Çizelge 4.48. 8 günlük inkübasyon sonundapozitif kontroller için TBARS testi sonucu ölçülen ortalama absorbans (abs) ve ortalama % inhibisyon (ort % inh) değerleri

	BHT 100 µg/mL	α-tokoferol 100 µg/mL	Ferulik asit 100 µg/mL	Kersetin 100 µg/mL
1.gün ort abs	0,327 ± 0,022	0,284 ± 0,007	0,704 ± 0,008	0,378 ± 0,014
1.gün ort % inh	16,3 ± 5,6	27,5 ± 1,8	-	3,4 ± 0,6
2.gün ort abs	0,339 ± 0,012	0,222 ± 0,002	0,601 ± 0,019	0,509 ± 0,021
2.gün ort % inh	8,9 ± 3,2	40,3 ± 0,6	-	-
3.gün ort abs	0,218 ± 0,011	0,276 ± 0,007	0,552 ± 0,014	0,405 ± 0,009
3.gün ort % inh	57,3 ± 2,2	45,9 ± 1,3	-	20,6 ± 1,8
4.gün ort abs	0,306 ± 0,006	0,505 ± 0,010	0,559 ± 0,010	0,448 ± 0,007
4.gün ort % inh	42,9 ± 1,1	5,6 ± 1,8	-	16,4 ± 1,3
5.gün ort abs	0,336 ± 0,012	0,341 ± 0,011	0,301 ± 0,009	0,657 ± 0,014
5.gün ort % inh	43,9 ± 1,9	43,0 ± 1,8	49,7 ± 1,5	-
6.gün ort abs	0,260 ± 0,017	0,244 ± 0,009	0,292 ± 0,024	0,284 ± 0,010
6.gün ort % inh	57,4 ± 2,8	59,9 ± 1,4	52,1 ± 3,9	53,4 ± 1,6
7.gün ort abs	0,244 ± 0,001	0,257 ± 0,003	0,288 ± 0,005	0,271 ± 0,010
7.gün ort % inh	61,4 ± 0,2	59,4 ± 0,5	54,4 ± 1,3	57,1 ± 1,7
8.gün ort abs	0,568 ± 0,030	0,765 ± 0,022	0,491 ± 0,016	0,796 ± 0,044
8.gün ort % inh	14,1 ± 4,6	-	25,7 ± 2,4	-
	BHT 1000 µg/mL	α-tokoferol 1000 µg/mL	Ferulik asit 1000 µg/mL	Kersetin 1000 µg/mL
1.gün ort abs	0,476 ± 0,011	0,452 ± 0,05	0,296 ± 0,002	0,609 ± 0,023
1.gün ort % inh	-	-	24,3 ± 0,6	-
2.gün ort abs	0,277 ± 0,012	0,199 ± 0,004	0,268 ± 0,007	0,621 ± 0,017
2.gün ort % inh	25,5 ± 3,1	46,6 ± 1,0	28,1 ± 1,9	-
3.gün ort abs	0,332 ± 0,003	0,296 ± 0,011	0,385 ± 0,012	0,499 ± 0,011
3.gün ort % inh	34,9 ± 0,7	41,9 ± 2,1	24,5 ± 2,3	2,2 ± 1,1
4.gün ort abs	0,482 ± 0,015	0,745 ± 0,005	0,745 ± 0,005	0,503 ± 0,015
4.gün ort % inh	9,9 ± 2,9	-	-	6,0 ± 2,8
5.gün ort abs	0,319 ± 0,010	0,318 ± 0,010	0,342 ± 0,009	0,591 ± 0,005
5.gün ort % inh	46,7 ± 1,6	46,8 ± 1,7	42,8 ± 1,5	1,1 ± 0,9
6.gün ort abs	0,263 ± 0,012	0,397 ± 0,010	0,251 ± 0,008	0,378 ± 0,014
6.gün ort % inh	56,9 ± 2,0	35,0 ± 1,6	58,9 ± 1,4	37,9 ± 2,3
7.gün ort abs	0,300 ± 0,020	0,331 ± 0,008	0,288 ± 0,005	0,322 ± 0,005
7.gün ort % inh	52,6 ± 3,1	47,6 ± 1,2	54,4 ± 0,8	49,0 ± 0,7
8.gün ort abs	0,523 ± 0,033	0,758 ± 0,042	0,805 ± 0,024	1,015 ± 0,044
8.gün ort % inh	20,8 ± 4,9	-	-	-

TBARS testi lipid oksidasyon reaksiyonu sırasında lipidlerde oluşan sekonder reaksiyon ürünlerinin seviyelerinin takip edilmesi için kullanılan yaygın bir testtir (Laguerre vd 2007). Bu test öncelikli olarak iki veya daha fazla çifte bağa sahip çoklu doymamış yağ asitlerinin oksitlenmesi sonucu ortaya çıkan malondialdehit (MDA) bileşiğinin oluşumunu takip etmek için uygulanmaktadır. Testte oluşan MDA 2-

tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girerek kırmızı renkli bir kompleks oluşturmaktadır (Şekil 3.6). Oluşan bileşiğin 532 nm de absorbanısı ölçülerek MDA bileşiğinin oluşum seviyesi takip edilir. Ancak bu testte MDA dan başka bazı sekonder reaksiyon ürünleri de TBA ile kompleks oluşturmaktadır. Netice olarak bu test oksidasyon sırasında oluşan sekonder reaksiyon ürünlerinin bir temsilcisi olarak MDA bileşiğinin takip edilmesi için sıklıkla kullanılan genel bir testtir. Şekil 4.32’de çalışılan ekstraktlar ve pozitif kontrol antioksidanların kullanıldığı durumlarda 1-8 gün aralığındaki oksidasyon periyodu boyunca çoklu doymamış bir yağ asidi olan ve gıda lipidlerinde sıklıkla yer alan linoleik asitin oksidasyonu sırasında meydana gelen sekonder oksidasyon ürünlerinin seviyesini temsil eden TBARS oluşumunun inhibe edilme yüzdesi görülmektedir.

Elde edilen sonuçlara göre bitkilerin hekzan ile ekstraksiyonu sonucu izole edilen ekstraktlar olan EGH ve ESH’nın TBARS testinde hemen hemen hiç aktivite göstermediği, sekonder lipid oksidasyon ürünlerinin oluşumunu önlemede bir etkinliği bulunmadığı (data verilmemiştir) açıkça belirlenmiştir. Bu nedenle, Şekil 4.32’de bu ekstraktlara ait %inhibisyon verileri değerlendirmeye alınmamıştır.

Şekil 4.32.’ye göre, ESA genel olarak 2-6 günlük inkübasyon sırasında linoleik asitte en yüksek aktiviteyi (%30-45) göstermiş olup diğer inkübasyon sürelerinde gittikçe düşen bir aktivite sergilemiştir. ESM, 4-7 günlük inkübasyon süresinde %20-35 arasında değişen bir aktivite gösterip ESA’ya göre daha düşük oranda sekonder oksidasyon ürünlerinin oluşumunu inhibe edebilmiştir. EGA genel olarak bakıldığında 2-8 günlük ısıtma periyodunda %20-40 aralığında değişen bir aktivite göstermiştir. EGM ise 5-7 günlük inkübasyon aralığında ESA’ya yakın olarak %30-40 oranında inhibisyon yüzdesi sergilemiştir.

Çalışılan bitkilerin polar ekstraktları olan ESA, ESM, EGA ve EGM için izlenen genel davranışa bakıldığı zaman, bazı istisnalarla beraber, 4-7 günlük inkübasyon süresince bu ekstraktların linoleik asitin oksidasyonunu %25-45 aralığındaki düzeylerde inhibe ettiği anlaşılmaktadır. Bunun dışında kalan 1, 2 ve 8 günlük oksidasyon sürelerinde, diğer bir deyişle oksidasyonun erken evrelerinde ve uzun oksidasyon sürelerinde ekstraktların etkili olamadıkları sonucuna varılabilir. Buradan ESA, ESM, EGA ve EGM orta derecedeki inkübasyon sürelerinde lipid oksidasyon inhibitörleri olarak belli bir seviyeye kadar aktivite gösterebildiği sonucu çıkmaktadır.

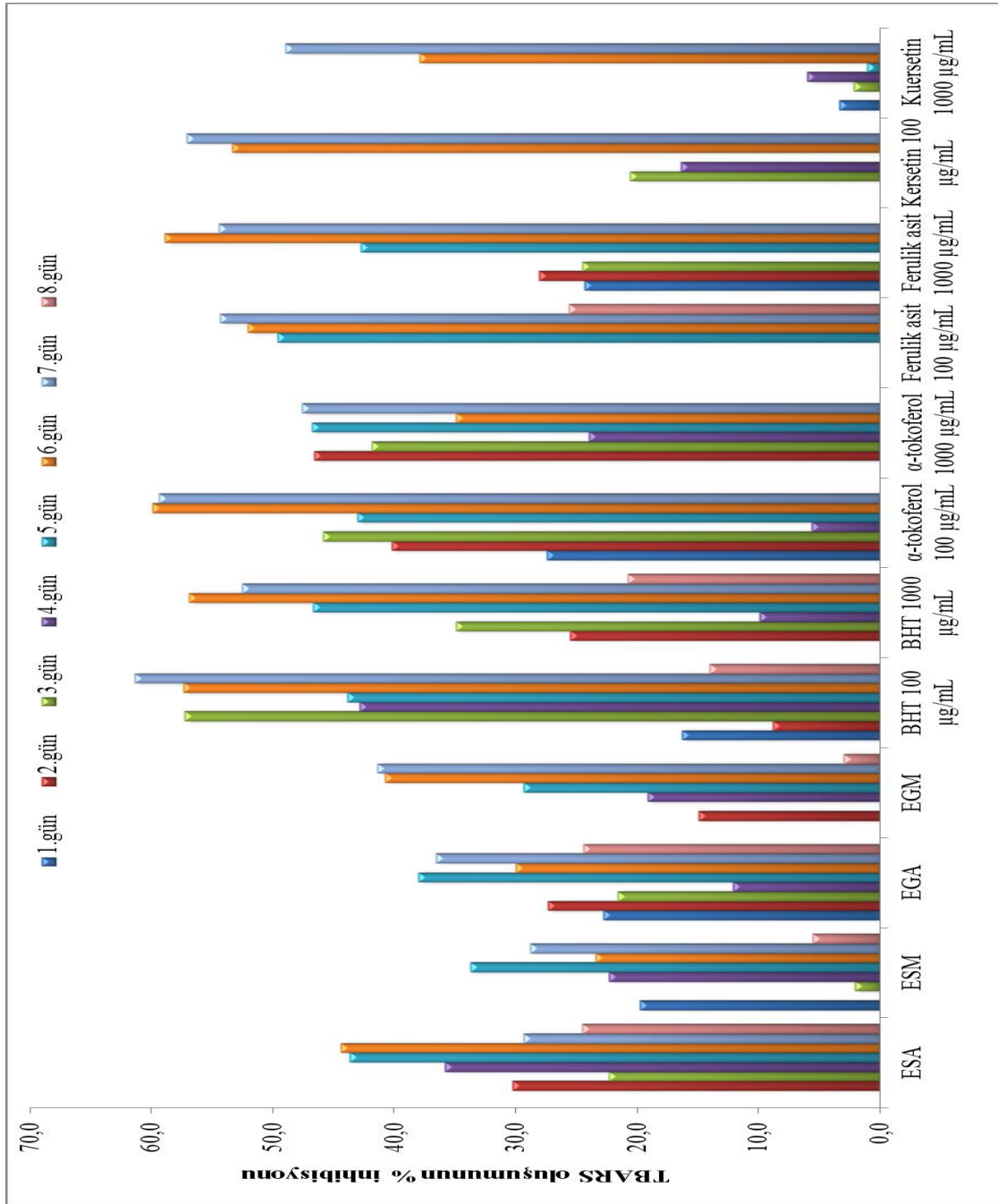
Lipofilik pozitif kontrol antioksidanlardan BHT ve  $\alpha$ -tokoferolün 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  lik konsantrasyonda eklendiğinde 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ye göre pek çok durumda daha iyi antioksidatif koruma sağladığı bulunmuştur. Polar yapıdaki antioksidanlara bakıldığında ise özellikle ferulik asitin daha yüksek konsantrasyonda (1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) kullanılmasının hemen hemen tüm inkübasyon sürelerinde daha etkili olduğu açıkça görülmektedir. Kersetin durumunda, ferulik asitin tersine, çoğu kez 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de lipid substratına eklenmenin oksidasyonu önlemek veya geciktirmek açısından oldukça etkili olduğu anlaşılmıştır.

Şekil 4.32’ye genel olarak bakıldığında pozitif kontrol antioksidanların, bitki ekstraktlarına göre pek çok durumda TBARS oluşumunu daha yüksek düzeyde inhibe ettiği, ancak polar ekstraktlar ESA, ESM, EGA ve EGM, özellikle de ESA ve EGM’nin

pek çok durumda belli bir seviyeye kadar linoleik asit için oksidasyona karşı koruma sağlayabildiği görülmüştür.

TBARS testi sonucu, bitki ekstraktları ve pozitif kontrol antioksidanları için farklı konsantrasyonlarda elde edilen % inhibisyon değerleri, farklı inkübasyon süreleri (1-8 gün) için grafiksel olarak Şekil 4.32.'de gösterilmiştir.

Şekil 4.32. TBARS testi sonucu, bitki ekstraktları ve pozitif kontrol antioksidanları için farklı konsantrasyonlar ve inkübasyon sürelerinde elde edilen % inhibisyon değerleri.





#### 4.10. LDL Oksidasyonu İnhibisyonunun Test Sonuçları

Bölüm 3.15’de anlatılan yöntemle göre yapılan testte, 1000 µg/ml olarak hazırlanan ve 3 paralelli çalışılan bitki ekstraktları 4., 12. ve 36. saatte 37 °C’lik inkübasyondan alınarak 532 nm’de mikropilaka okuyucuda ölçülmüştür. Kontrol örneğine göre % inhibisyonları hesaplanmıştır. Bitki ekstraktları ve pozitif kontroller olan kersetin, ferulik asit, alfa-tokoferol ve BHT’ye ait bulunan ortalama absorbans ve ortalama % inhibisyon verileri Çizelge 4.49’da verilmiştir. Ölçüm sonuçlarının tamamı EK\_9’da görülebilir.

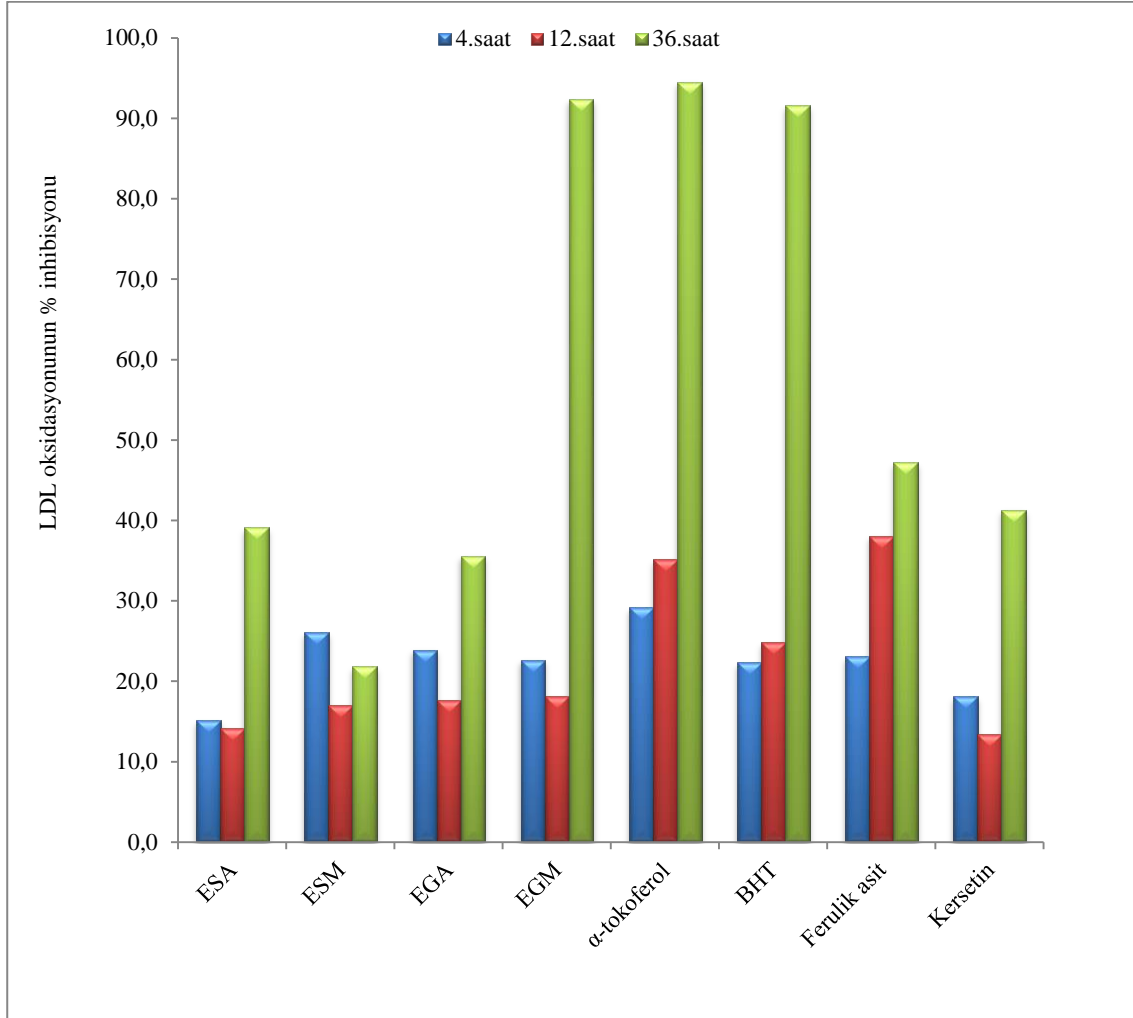
Çizelge 4.49. LDL testi sonucu, 4, 12 ve 36 saatlik inkübasyondan sonra elde edilen ortalama absorbans (ort abs) ve ortalama % inhibisyon (ort % inh) değerleri

	4 saatlik inkübasyon		12 saatlik inkübasyon		36 saatlik inkübasyon	
	Ort abs	Ort % inh	Ort abs	Ort % inh	Ort abs	Ort % inh
ESA	0,074 ± 0,001	15,2 ± 1,0	0,080 ± 0,001	14,2 ± 1,2	0,855 ± 0,009	39,2 ± 0,6
ESM	0,064 ± 0,001	26,1 ± 1,7	0,078 ± 0,001	17,0 ± 0,6	1,099 ± 0,031	21,8 ± 2,2
EGA	0,066 ± 0,002	23,9 ± 1,8	0,077 ± 0,001	17,6 ± 0,3	0,905 ± 0,007	35,6 ± 0,5
EGM	0,067 ± 0,005	22,6 ± 5,6	0,077 ± 0,002	18,1 ± 2,3	0,108 ± 0,001	92,4 ± 0,1
BHT	0,067 ± 0,001	22,3 ± 0,5	0,070 ± 0,001	24,8 ± 0,2	0,119 ± 0,002	91,6 ± 0,1
α-tokoferol	0,062 ± 0,001	29,2 ± 1,4	0,061 ± 0,001	35,1 ± 0,4	0,077 ± 0,001	94,5 ± 0,1
Ferulik asit	0,069 ± 0,001	23,0 ± 0,5	0,058 ± 0,001	38,0 ± 1,4	0,742 ± 0,010	47,2 ± 0,7
Kersetin	0,071 ± 0,005	18,1 ± 6,1	0,081 ± 0,003	13,4 ± 2,7	0,825 ± 0,007	41,3 ± 0,5
Kontrol	0,087 ± 0,006		0,094 ± 0,002		1,406 ± 0,024	

Şekil 4.33’te inkübasyon ortamından 4, 12 ve 36 saat sonunda bitki ekstraktları ve saf antioksidanlar tarafından gösterilen LDL içindeki lipid oksidasyonunun inhibe edilme yüzdesi, diğer bir deyişle bu süreler sonunda meydana gelen oksidasyon düzeyi görülmektedir. Buna göre 37°C’de inkübasyon süresi arttıkça gerek saf antioksidanlar, gerekse ekstraktların LDL oksidasyonunu inhibe etme yeteneğinde artış olduğu görülmektedir. Çalışılan en uzun inkübasyon süresi olan 36 saat koşullarında, *D. gnidioides* in metanolik ham ekstraktı olan EGM’nin ve lipofilik saf antioksidanlar olan α-tokoferol ve BHT nin LDL oksidasyonunu inhibe etme yeteneğinin %90 civarına ulaştığı açıkça görülmektedir. EGM, α-tokoferol ve BHT’nin 36 saat sonunda gösterdikleri bu antioksidatif koruma yetenekleri 12 saat sonundakilere göre oldukça yüksektir. Polar antioksidanlar, ferulik asit ve kersetinin, lipofilik antioksidanlar olan α-tokoferol ve BHT ye göre aktivitelerinin 4 ve 12 saatlik oksidasyon sürelerinde yakın olduğu, ancak 36 saat gibi daha uzun inkübasyon koşullarında aktivitelerinin bu antioksidanlara göre oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak EGM’nin özellikle uzun oksidasyon sürelerinde LDL için α-tokoferol ve BHT kadar etkili bir lipid oksidasyon inhibitörü olduğu söylenebilir. Bunun nedeni olarak, uzun inkübasyon sürelerinde ekstrakt içindeki fenolik bileşenlerden bazılarının degradasyona uğramış olabileceği ve degradasyon ürünlerinin bazılarının, ekstrakt içinde var olan diğer

bileşiklerle sinerjik etki göstererek toplam antioksidan aktiviteye katkıda bulunabileceği (Schwarz vd 1992) söylenebilir.

Şekil 4.33. LDL lipid peroksidasyonunun bitki ekstraktları ve saf antioksidanlarca % inhibisyonunun çubuk grafikler halinde gösterimi



Son olarak Şekil 4.33'ten EGM'nin (*D. gnidioides* metanol ekstraktı) 36. saatin sonunda en yüksek LDL oksidasyonu inhibisyonuna sahip ekstrakt olduğu, ardından ESA (*D. sericea* aseton ekstraktı) ve EGA'nın (*D. gnidioides* aseton ekstraktı) geldiği, EGM'nin ise en düşük inhibisyona sahip ekstrakt olduğu sonucu çıkarılmaktadır.

#### 4.11. Oksijen Radikali Absorpsiyon Kapasitesi (ORAC) Testi Sonuçları

ORAC testi bölüm 3.13'te anlatılan yöntem takip edilerek tamamlanmıştır. AAPH'nin termal bozunması ile zamanla oluşan ROS, floresan prop olan fluoresceinin sinyalini söndürmektedir. Yeterli miktarda antioksidanın üretiminden sonra fluorescein sinyali sabit kalmaktadır; yani sinyal stabilitesi antioksidanın kapasitesi ile ilgilidir. Çalışma sonucunda elde edilen toplanmış değerler troloks değeri ile karşılaştırılmıştır. Buna göre bulunan sonuçlar aşağıda gösterilmiştir.

Çizelge 4.50. ORAC testi sonucu Troloksun ve kontrolün alan değerleri

Saniye	Kontrol	Troloks 12,5 µg/ml	Troloks 25 µg/ml	Troloks 50 µg/ml	Troloks 100 µg/ml
120	125,021	127,406	127,523	129,064	131,746
180	124,225	126,873	126,938	128,593	131,045
240	124,263	126,598	126,975	128,314	130,918
300	124,176	126,361	126,782	128,132	130,741
360	124,239	126,572	126,821	128,305	130,498
420	124,223	126,451	126,890	128,159	130,395
600	120,036	122,081	122,709	123,744	126,287
630	117,890	120,262	120,548	121,526	124,070
660	115,648	118,239	118,570	119,416	121,746
690	113,635	116,295	116,556	117,424	119,375
720	113,601	116,135	116,566	117,277	119,280
750	113,562	116,350	116,429	117,254	119,200
780	113,578	116,324	116,454	117,345	119,008
810	113,638	116,478	116,294	117,504	119,035
900	113,747	116,445	116,614	117,472	119,007
960	113,723	116,535	116,759	117,538	118,749
1020	113,667	116,697	116,841	117,637	118,799
1080	113,750	116,745	116,782	117,672	118,618
1140	113,550	116,761	116,642	117,657	118,586
1200	113,563	116,898	116,740	117,684	118,416
1260	113,532	116,994	116,649	117,673	118,459
1320	113,735	116,896	116,686	117,680	118,468
1380	113,963	116,853	116,552	117,879	118,639
1440	113,946	116,823	116,792	117,959	118,888
1500	113,888	116,838	116,860	117,815	119,136
1560	113,797	116,700	116,967	117,891	119,056
1620	113,729	116,802	117,079	117,998	119,076
1680	113,627	116,916	117,302	117,853	119,056
1740	113,793	117,097	117,125	117,960	118,794
1800	113,787	117,147	117,173	118,070	118,683
1860	113,842	117,445	117,187	118,034	118,953
1920	114,166	117,362	117,098	117,972	118,947
1980	114,163	117,421	117,109	117,796	119,091
2040	114,301	117,430	117,340	117,705	119,133
2100	114,450	117,468	117,215	117,865	119,135
2160	114,544	117,245	117,141	117,863	119,052
2220	114,419	117,443	117,218	117,911	119,148

Çizelge 4.51. ORAC testi sonucu ekstraktların ve pozitif kontrollerin alan değerleri

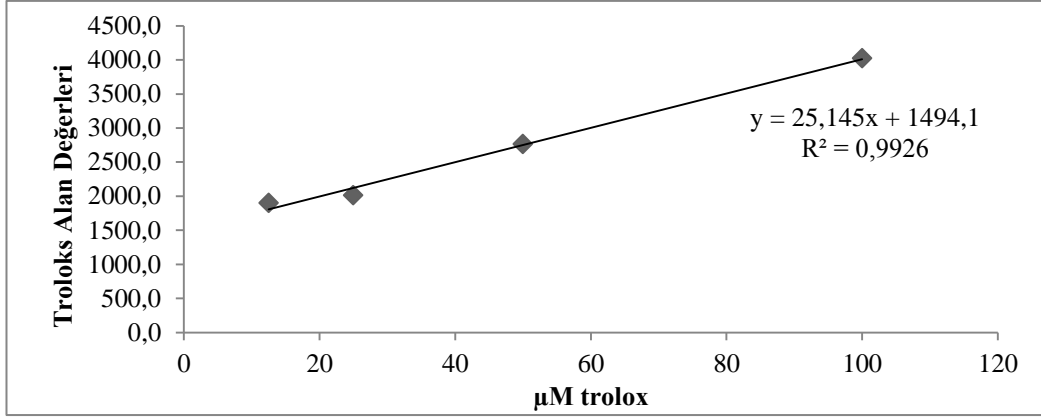
Saniye	ESA	ESM	EGA	EGM	Kersetin	Ferulik asit
120	134,4820	129,8548	130,0513	130,3944	129,1093	129,2142
180	133,3747	129,0586	129,4057	129,8407	128,5423	128,4908
240	132,7873	128,7808	129,0497	129,4332	128,2119	128,2448
300	132,4682	128,6616	129,1805	129,4409	128,1902	128,0768
360	132,5181	128,6227	129,0931	129,3735	128,0029	127,8545
420	132,3943	128,6330	129,3173	129,4895	128,1503	127,8896
600	127,8371	123,9341	125,0817	124,9513	123,8730	123,7909
630	125,9704	121,9458	122,8336	122,8600	121,6022	121,5755
660	124,0095	119,7645	120,7415	120,7579	119,3755	119,4746
690	121,9460	117,5856	118,6825	118,4533	117,4164	117,2998
720	121,8201	117,5704	118,4312	118,2925	117,3296	117,4896
750	121,8312	117,5753	118,2383	118,3782	117,4412	117,4005
780	121,7616	117,4101	118,3027	118,3904	117,4448	117,4921
810	121,7244	117,4127	118,3219	118,2162	117,6461	117,4397
900	121,8365	117,1770	118,4537	118,5353	117,6423	117,3518
960	121,8593	117,0938	118,4074	118,7311	117,8555	117,4571
1020	121,7851	117,0055	118,4181	118,6226	117,9046	117,3173
1080	121,7983	117,0611	118,4404	118,4171	118,0524	117,3002
1140	121,8655	117,0670	118,4430	118,7667	117,9651	117,1050
1200	121,9459	116,9899	118,5374	118,5138	117,7804	117,4425
1260	121,8774	116,9218	118,8678	118,4148	117,9313	117,3714
1320	121,8954	116,9268	118,8891	118,2588	118,0299	117,6511
1380	121,8818	116,7812	119,1033	118,2087	118,0875	117,8049
1440	121,6067	116,9101	119,1079	118,0572	118,2146	117,8419
1500	121,4221	116,9325	119,0499	118,2033	118,3222	117,8149
1560	121,4696	117,1104	118,9250	118,2819	118,2307	117,7614
1620	121,3207	116,9986	118,9336	118,4771	118,2777	117,6937
1680	121,2481	116,9233	118,9566	118,5112	118,2553	117,4489
1740	121,3621	116,9645	119,0321	118,0421	118,3511	117,7890
1800	121,4746	117,1101	119,0102	118,2011	118,2010	117,8851
1860	121,4598	116,9303	118,8878	118,3255	118,2236	117,6955
1920	121,3848	116,9110	118,9963	118,2203	118,2113	117,7785
1980	121,4633	117,1063	118,9432	118,5180	118,2999	117,8990
2040	121,5280	117,1021	118,9988	118,4423	118,3102	117,9222
2100	121,4766	116,9955	119,0355	118,4023	118,2788	117,7796
2160	121,3932	116,9606	119,0210	118,3422	118,2887	117,8521
2220	121,6122	116,9987	118,8999	118,2626	118,3101	117,8433

Çizelge 4.52. ORAC testi sonucu Troloksun ve kontrolün toplam alan değerleri

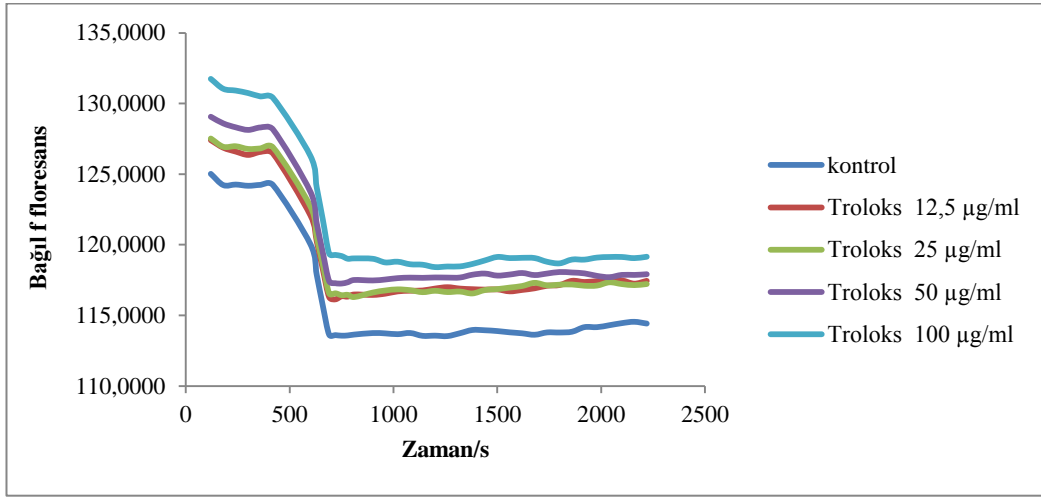
Saniye	Kontrol	Troloks 12,5 µg/ml	Troloks 25 µg/ml	Troloks 50 µg/ml	Troloks 100 µg/ml
120	125,021	127,406	127,523	129,064	131,746
180	249,246	254,279	254,461	257,656	262,791
240	373,508	380,877	381,436	385,971	393,709
300	497,684	507,238	508,219	514,103	524,450
360	621,924	633,810	635,040	642,408	654,948
420	746,146	760,261	761,930	770,567	785,343
600	866,182	882,342	884,639	894,311	911,629
630	984,072	1002,604	1005,187	1015,837	1035,700
660	1099,720	1120,843	1123,757	1135,253	1157,446
690	1213,355	1237,138	1240,313	1252,677	1276,821
720	1326,956	1353,273	1356,878	1369,954	1396,102
750	1440,518	1469,623	1473,307	1487,208	1515,302
780	1554,097	1585,947	1589,762	1604,553	1634,310
810	1667,735	1702,425	1706,056	1722,057	1753,345
900	1781,481	1818,870	1822,670	1839,529	1872,352
960	1895,205	1935,405	1939,429	1957,066	1991,100
1020	2008,872	2052,102	2056,270	2074,703	2109,900
1080	2122,622	2168,847	2173,052	2192,375	2228,518
1140	2236,172	2285,608	2289,695	2310,031	2347,104
1200	2349,735	2402,506	2406,435	2427,715	2465,520
1260	2463,267	2519,500	2523,084	2545,388	2583,980
1320	2577,003	2636,397	2639,770	2663,068	2702,448
1380	2690,966	2753,250	2756,322	2780,947	2821,087
1440	2804,911	2870,073	2873,115	2898,906	2939,975
1500	2918,799	2986,911	2989,974	3016,721	3059,110
1560	3032,596	3103,611	3106,942	3134,612	3178,166
1620	3146,325	3220,413	3224,021	3252,610	3297,242
1680	3259,952	3337,329	3341,322	3370,462	3416,298
1740	3373,744	3454,426	3458,448	3488,423	3535,092
1800	3487,531	3571,573	3575,620	3606,492	3653,775
1860	3601,373	3689,018	3692,808	3724,527	3772,729
1920	3715,539	3806,381	3809,906	3842,498	3891,676
1980	3829,702	3923,802	3927,015	3960,294	4010,767
2040	3944,003	4041,232	4044,355	4077,999	4129,900
2100	4058,453	4158,700	4161,570	4195,864	4249,035
2160	4172,997	4275,944	4278,711	4313,727	4368,087
2220	4287,416	4393,388	4395,929	4431,638	4487,235
Toplam alan	82524,829	84423,351	84534,968	85287,215	86544,735
Kontrolden çıkarılmış alan değerleri		1898,523	2010,139	2762,387	4019,906

Çizelge 4.53. ORAC testi sonucu ekstraktların ve pozitif kontrollerin alan değerleri

Saniye	ESA	ESM	EGA	EGM	Kersetin	Ferulik asit
120	134,482	129,855	130,051	130,394	129,109	129,214
180	267,857	258,913	259,457	260,235	257,652	257,705
240	400,644	387,694	388,507	389,668	385,863	385,950
300	533,112	516,356	517,687	519,109	514,054	514,027
360	665,630	644,979	646,780	648,483	642,057	641,881
420	798,025	773,612	776,098	777,972	770,207	769,771
600	925,862	897,546	901,179	902,924	894,080	893,562
630	1051,832	1019,492	1024,013	1025,784	1015,682	1015,137
660	1175,842	1139,256	1144,754	1146,541	1135,058	1134,612
690	1297,788	1256,842	1263,437	1264,995	1252,474	1251,911
720	1419,608	1374,412	1381,868	1383,287	1369,804	1369,401
750	1541,439	1491,987	1500,106	1501,666	1487,245	1486,802
780	1663,201	1609,397	1618,409	1620,056	1604,690	1604,294
810	1784,925	1726,810	1736,731	1738,272	1722,336	1721,733
900	1906,762	1843,987	1855,185	1856,807	1839,978	1839,085
960	2028,621	1961,081	1973,592	1975,538	1957,833	1956,542
1020	2150,406	2078,086	2092,010	2094,161	2075,738	2073,860
1080	2272,204	2195,148	2210,451	2212,578	2193,790	2191,160
1140	2394,070	2312,215	2328,894	2331,345	2311,756	2308,265
1200	2516,016	2429,204	2447,431	2449,859	2429,536	2425,707
1260	2637,893	2546,126	2566,299	2568,273	2547,467	2543,079
1320	2759,788	2663,053	2685,188	2686,532	2665,497	2660,730
1380	2881,670	2779,834	2804,291	2804,741	2783,585	2778,535
1440	3003,277	2896,744	2923,399	2922,798	2901,799	2896,377
1500	3124,699	3013,677	3042,449	3041,001	3020,121	3014,191
1560	3246,169	3130,787	3161,374	3159,283	3138,352	3131,953
1620	3367,489	3247,786	3280,308	3277,760	3256,630	3249,647
1680	3488,737	3364,709	3399,264	3396,272	3374,885	3367,096
1740	3610,100	3481,674	3518,296	3514,314	3493,236	3484,885
1800	3731,574	3598,784	3637,306	3632,515	3611,437	3602,770
1860	3853,034	3715,714	3756,194	3750,840	3729,661	3720,465
1920	3974,419	3832,625	3875,191	3869,061	3847,872	3838,244
1980	4095,882	3949,731	3994,134	3987,579	3966,172	3956,143
2040	4217,410	4066,833	4113,133	4106,021	4084,482	4074,065
2100	4338,887	4183,829	4232,168	4224,423	4202,761	4191,844
2160	4460,280	4300,790	4351,189	4342,765	4321,050	4309,697
2220	4581,892	4417,788	4470,089	4461,028	4439,360	4427,540
Toplam alan	88301,525	85237,356	86006,913	85974,882	85373,306	85217,876
Kontrolden çıkarılmış alan değerleri	5776,697	2712,527	3482,084	3450,053	2848,478	2693,047



Şekil 4.34. ORAC testi sonucu troloks için elde edilen konsantrasyon-absorbans eğrisi



Şekil 4.35. ORAC testi sonucu troloksa ve pozitif kontrollere ait saniye-relatif floresans eğrileri

Ekstraktlara ait elde edilen µM troloks / g ekstrakt cinsinden sonuçlar Çizelge 4.54'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.54. ORAC testinin µM troloks / g ekstrakt cinsinden sonuçları

	ESA	ESM	EGA	EGM	Kersetin	Ferulik asit
µM troloks / g ekstrakt	1703,16	484,56	790,61	777,87	538,63	476,81

Oksijen radikali absorplama kapasitesi (ORAC) ölçümünde sadece polar ekstraktlar (ESA, ESM, EGA ve EGM) değerlendirmeye alınmıştır. Apolar ekstraktlar herhangi bir aktivite göstermediği için data verilmemiştir. Sonuç çizelgesinde (Çizelge 4.54) de gösterildiği gibi *D. gnidioides*'e ait aseton (EGA) ve metanol (EGM) ekstraktlarında birbirine benzer sonuçlar elde edilmiştir. *D. sericea*'nın asetondaki ekstraktında (ESA)

diğer tüm ekstraktlara göre daha fazla absorplama kapasitesi görülmüştür. *D. sericea*'nın metanoldeki ekstraktı (ESM) ise en düşük absorplama kapasitesi sahip olan ekstrakttır. Ekstraktlar beklendiği gibi AAPH eklenmesinden sonra fluoresinin sinyalini söndürmektedir ve bir süre sonra sabit kalmasını sağlamıştır (Şekil 4.35.). Oksijen radikali absorplama kapasitesi sıralaması  $ESA > EGA > EGM > ESM$  olarak belirlenmiştir.

#### **4.12. Uygulanan Diğer Antioksidan Aktivite Testleri**

Yukarıda anlatılan testlere ilave olarak hidroksil radikali yakalama testi ve ferik tiyosiyanat (FTC) lipid peroksidasyon inhibisyonunun ölçülmesi testleri de uygulanmış ancak gerek tekrar denemelerinde gerekse diğer test sonuçlarıyla karşılaştırıldığında uyumlu sonuçlar elde edilememiştir. Bu testlerin çalışılan sistemler için uygun olmadığı düşünülmektedir. Dolayısıyla da sonuçları teze eklenmemiştir.



## 5. SONUÇ

Bu çalışmada *Thymelaeaceae* familyasına ait *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitkilerinin aseton, metanol ve hekzan ham ekstraktlarının in vitro antioksidan aktiviteleri ve çeşitli substratlarda lipid oksidasyonunu inhibe etme yetenekleri farklı testlerle incelenmiştir. Lipofilik saf antioksidanlar BHT ve  $\alpha$ - tokoferol ile polar antioksidanlar ferulik asit ve kersetin pozitif kontrol olarak ekstraktların kullanılmasıyla elde edilen sonuçları karşılaştırmak için kullanılmıştır. Her bir durumda, bitkilerin polar çözücüler olan metanol ve aseton ekstraktlarının (ESA, ESM, EGA ve EGM), hekzan ekstraktlarından (EGH ve ESH) önemli derecede daha güçlü antioksidan aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Özellikle *D. gnidioides* bitkisinden metanol ekstraksiyonu ile elde edilen EGM'nin uygulanan testlerin büyük bir bölümünde daha etkili olarak in vitro antioksidan aktivite ve lipid oksidasyonunu inhibe etme kapasitesi gösterdiği belirlenmiştir. EGM'nin uygulanan testlerin çoğunda, lipofilik veya polar pozitif kontrol antioksidanların en az birine yakın derecede antioksidatif koruma sağladığı gözlenmiştir. HPLC-DAD analiz sonuçları EGM'nin diğer ekstraktlara göre daha yüksek konsantrasyonda fenolik asit ve flavanoid bileşikleri içerdiğini göstermiştir. Toplam flavanoid ve fenolik bileşen içeriğinin zenginliği bakımından da bu ekstrakt, incelenen ekstraktlar içinde ilk sıralarda yer almaktadır.

*Daphne* türlerinin sitotoksik etkilerinin bilinmesinden dolayı bu iki bitkinin hidrofilik ve lipofilik ortamlarda antioksidan aktivitesi ile ilgili olarak literatürde detaylı çalışmalara rastlanmamaktadır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, çalışılan iki *Daphne* türü olan *D. sericea* ve *D. gnidioides*'in metanol ve aseton ekstraktlarının bazılarının göz ardı edilemeyecek bir düzeyde fenolik bileşikleri içerdiklerini, bir noktaya kadar in vitro antioksidan aktivite gösterdiklerini ve pek çok durumda da saf antioksidanlarla kıyaslanabilecek derecede lipid oksidasyon inhibitörü olarak etkileri olduklarını açıkça ortaya koymuştur. Elde edilen bulgulardan yola çıkılarak bu ekstraktlardan, gıda sistemlerinde olmasa bile eczacılık, biyokimya ve tıp alanında yararlanılabileceği ortaya çıkmaktadır.

## 6. KAYNAKLAR

- AJILA, C.M., NAIDU, K.A., BHAT, U.J.S., RAO, P. 2007. Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. *Food Chemistry*, 105: 982-988.
- AMARAL, S., MIRA, L., NOGUEIRA, J.M., DA SILVA, A.P., HELENA FLORENCIO, M. 2009. Plant extracts with anti-inflammatory properties-a new approach for characterization of their bioactive compounds and establishment of structure-antioxidant activity relationships. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17: 1876-1883.
- ARUOMA, O.I., EVANS, P.J., HARPARKASH, K., SUTCLIFFE, L., HALLIWELL, B. 1990. An evaluation of the antioxidant and potential pro-oxidant properties of food additives and of Trolox C, Vitamin E and Probuco. *Free Radical Research Communications*, 10: 143-157.
- ARUOMA, O.I., CUPPETT, S.L. 1997, Antioxidant methodology: In Vivo and In Vitro Concept. The American Oil Chemists' Society Press, Illinois, 241 p.
- ARUOMA, O.I. 1998. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. The American Oil Chemists Society, pp. 199-212, Illinois.
- ARTS, M.J.T.J., HAENEN, G.R.M.M., WILMS, L.C., BEETSTRA, S.A.J.N., HEIJNEN, C.G.M., VOSS, H., BAST, A. 2002. Interactions between flavonoids and proteins: Effect on the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 1184-1187.
- BATISTA, R., OLIVEIRA, M. 2010. Plant natural variability may affect safety assessment data. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 58: 8-12.
- BENT, S., KO, R. 2004. Commonly used herbal medicines in the united states: a review. *American Journal of Medicine*, 116: 478-485.
- BENTAYEB, K., VERA, P., RUBIO, C., NERIN, C. 2009. Adaptation of the ORAC assay to the common laboratory equipment and subsequent application to antioxidant plastic films. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394: 903-910.
- BLOIS, M.S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable radical. *Nature*, 181: 1199-200.
- BRIGELIUS-FLOHE, R., TRABER, M.G. 1999. Vitamin E: function and metabolism. *The FASEB Journal*, 13 (10):1145-1155.
- BURTON, G. W., INGOLD, K.U. 1981. Autoxidation of biological molecules. 1. The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 103: 6472-6477.

- CAI, X., ZHOU, H., WONG, Y.F., XIE, Y., LIU, Z.Q., JIANG, Z.H., BIAN, Z.X., XU, H.X., LIU, L. 2007. Suppression of the onset and progression of collagen-induced arthritis in rats by QFGJS, a preparation from an anti-arthritic chinese herbal formula. *Journal of Ethnopharmacology*, 110 (1): 39-48.
- CADENAS, E., PACKER, L. 2002. Handbook of Antioxidants, Second Edition. CRC Press, New York, 732 p.
- CHAN, K. 2003. Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines. *Chemosphere*, 52: 1361-1371.
- CHIRINOS, R., ZULOETA, G., PEDRESCHI, R., MIGNOLET, E., LARONDELLE, Y., CAMPOS, D. 2013. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*): A seed source of polyunsaturated fatty acids, tocopherols, phytosterols, phenolic compounds and antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 141: 1732-1739.
- CONKLIN, P.L., WILLIAMS, E.H. AND LAST, R.L. 1996. Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient Arabidopsis mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93: 9970-9974.
- DOĞANCA, S., APAK, S. 1986. Daphne pontica L. üzerinde fitokimyasal araştırmalar. *Marmara Üniversitesi Eczacılık Dergisi*, 2: 157-160.
- DROGE, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82: 47-95.
- ESSERS, A.J.A., ALINK, G.M., SPEIJERS, G.J.A., ALEXANDER, J. 1998. Food plant toxicants and safety. Risk assessment and regulation of inherent toxicants in plant foods. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 5:155-172.
- FOOTE C.S., DENNY R.W. 1968. Chemistry of Singlet Oxygen. VII. Quenching by  $\beta$ -carotene. *Journal of the American Chemical Society*, 90 (22): 6233–6235.
- GALVEZ, M., MARTIN-CORDERO, C., HOUGHTON, P.J., AYUSO, M.J. 2005. Plantago. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1927-1933.
- GÖKPINAR, Ş., KORAY, T., AKÇİÇEK, E., GÖKSAN, T., DURMAZ, Y. 2006. Algal antioksidanlar. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 23: 85-89
- GRIEVE, M., LEYEL, C.F. 1967. A modern herbal the medicinal, culinary, cosmetic and economic properties, cultivation and folk-lore of herbs, grasses, fungi; shrubs and trees, Volume II. Dover Publications, New York. 889 p.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., ARUOMA, O.I. 1987. The Deoxyribose method: A simple test-tube assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical Biochemistry*, 165: 215-219.

- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. 1999. Free radicals in biology and medicine (3rd ed.). Oxford University Press, London, 777 p.
- HALLIWELL, B. 2007. Dietary polyphenols: good, bad or indifferent for your health?, *Cardiovascular Research*, 73: 341-347.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. 2007. Free radicals in biology and medicine (4th ed.). Oxford University Press, London, 888 p.
- HANDELMAN, G.J., CAO, G., WALTER, M.F., NIGHTINGALE, Z.D., PAUL, G.L., PRIOR, R.L., BLUMBERG, J.B. 1999. Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 1. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation and oxygen radical absorbance capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 4888-4893.
- HARRIGAN, G.G., GLENN, K.C., RIDLEY, W.P. 2010. Assessing the natural variability in crop composition. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 58: 13-20.
- HELLER, W., FORKMANN, G. 1993. The flavonoids: Advances in Research since 1986. Chapman & Hall/CRC, pp. 499-535, London,.
- HEYWOOD, V.H. 1979. Flowering plants of the World. Oxford University Press, pp. 159-161, London.
- HUANG, Z., WANG, B., EAVES, D.H., SHIKANY, J.M., PACE, R.D. 2007. Phenolic compound profile of selected vegetables frequently consumed by African Americans in the southeast United States. *Food Chemistry*, 103: 1395-1402.
- ITO, N., FUKUSHIMA, S., HASEGAWA, A., SHIBATA, M., OGISO, T. 1983. Carcinogenicity of butylatedhydroxyanisole in f344 rats. *Journal of National Cancer Institute*, 70: 343-347.
- KAHKONEN, M.P., HOPIA, A.I., VUORELA, H.J., RAUCHA, J.P., PIHLAJA, K., KUJALA, T.S., 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 3954-3962.
- KILANI, S., ABDELWAHED A., CHRAIEF, I., BEN AMMAR, R., HAYDER, N., HAMMAMI, M., GHEDIRA, K., CHEKIR-GHEDIRA, L. 2005. Chemical composition, antibacterial and antimutagenic activities of essential oil from (Tunisian) *Cyperus rotundus*. *Journal of Essential Oil Research*, 17: 695-700.
- KOHEN, R., NYSKA, A. 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30: 620-650.
- KORKINA, L.G., AFANS'EV, I.B. 1997. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Advances in Pharmacology*, 38: 151-163.

- KRIS-ETHERTON, P.M., LEFEVRE, M., BEECHER, G.R., GROSS, M.D., KEEN, C.L., ETHERTON, T.D. 2004. Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for establishing biological function: the antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis. *Annual Review of Nutrition*, 24: 511-538.
- KUPCHAN, S.M., BAXTER, R.L. 1970. Mezerein: antileukemic principle from daphne mezereum L. *Tetrahedron Letters*, 49: 4261-4264.
- LAGUERRE, M., LECOMTE, J., VILLENEUVE, P. 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46: 244-282.
- LICHTENTHALER, H.K., WELLBURN, A.R. 1983. Determination of total carotenoids and chlorophylls A and B of leaf in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11: 591-592.
- LU, J.M., NURKO, J., WEAKLEY S.M., JIANG, J., KOUGIAS, P., LIN, P.H., YAO, Q., CHEN, C. 2010. Molecular mechanisms and clinical applications of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and its derivatives: An update. *Medical Science Monitore*, 16(5): 93-100.
- MAGALHAES, L.M., SEGUNDO, M.A., REIS, S., LIMA, J.L.F.C. 2008. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613: 1-19.
- MAURO, A.D., FALLICO B., PASSERINI A., RAPISARDA P., MACCARONE E., 1999. Recovery of hesperidin from orange peel by concentration of Extract on styrene-divinylbenzene resin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 4391-4397.
- MEYER, A. S., YI, O.S., PEARSON, D. A., WATERHOUSE, A.L., FRANKEL, E.N. 1997. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (*Vitis vinifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5: 1638–1643.
- MOORE, J., YIN, J-J., YU, L. 2006. Novel fluorometric assay for hydroxyl radical scavenging capacity (HOSC) estimation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 617-626.
- MURAKAM, S., ARAI, I., MURAMATSU, M., OTOMOTO, S., BABA, K., KOZAWA, M. 1992. Daphnodorins inhibit gastric H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and acid secretion. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*, 2: 108-111.
- MÜLLER-WALDECK, F., SITZMANN, J., SCHNITZLER, W.H., GRASSMANN, J. 2010. Determination of toxic perilla ketone, secondary plant metabolites and antioxidative capacity in five perilla frutescens L varieties. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 264-270.

- NICHENAMETLA, S.N., TARUSCIO, T.G., BARNEY, D.L., EXON, J.H. 2006. A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46: 161–183.
- NIKI, E., SAITO, T., KAWAKAMI, A., KAMIYA, Y. 1984. Inhibition of methyl linoleate in solution by vitamin E and vitamin C. *Journal of Biological Chemistry*, 259: 4177–4182.
- OHIRA, S., HASEGAWA, T., HYASHI, K.I., HOSHINO, T., TAKAOKA, D., NOZAKI, H. 1998. Sesquiterpenes from cyperus rotundus. *Phytochemistry*, 47: 1577-1581.
- PAVIA, S.A., RUSSELL, R.M. 1999. Beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*, 18 (5): 426-33.
- PEARSON, D.A., FRANKEL, E.N., AESCHBACH, R., GERMAN, J. B. 1997. Inhibition of endothelial cell-mediated oxidation of low-density lipoprotein by rosemary and plant phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 578-582.
- PORTER, N.A., WOLF, R.A., WEENEN, H. 1980. The free radical oxidation of polyunsaturated lecithins. *Lipids*, 15:163–167.
- PRIOR, R.L., WU, X., SCHAICH, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4290-4302.
- QUETTIER-DELEU, C., GRESSIER, B., VASSEUR, J., DINE, T., BRUNET, C., LUYCKX, M., CAZIN, M., CAZIN, J.-C., BAILLEUL, F., TROTIN, F. 2000. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology*, 72: 35-42.
- RAHMAT, A., EDRINI, S., ISMAIL, P., HIN, T.Y.Y., BAKAR, M.F.A. 2006. Chemical constituents, antioxidant activity and cytotoxic effects of essential oil from *Strobilanthes crispus* and *Lawsonia inermis*. *Journal of Biological Sciences*, 6: 1005–1010.
- RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., RICE-EVANS, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26: 1231-1237.
- RICE-EVANS, C.A., MILLER, N. J., PAGANGA, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2: 152–159.
- ROBBINS R.J. 2003. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, 51: 2866-2887.

- SAKIHAMA, Y., COHEN, M.F., GRACE, S.C., YAMASAKI, H. 2002. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, 177: 67-80.
- SARDESAI, V.M. 2002. Herbal medicines: poisons or potions? *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 139: 343-348.
- SCADALIOS, J. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol*, 101: 7-12.
- SCALBERT, A., JOHNSON, I.T., SALTMARSH, M. 2005. Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81: 215-217.
- SCHWARZ, K., TERNES, W., & SCHMAUDERER, E. 1992. Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. III. Stability of phenolic diterpenes of rosemary extracts under thermal stress as required for technological processes. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, 195: 104–107.
- SHAIJI, F., JANITHA, P. K., WANASUNDARA, P. D. 1992. Phenolic Antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32 (1): 67-103.
- SIEMS, W.G., GRUNE, T., ESTERBAUER, H. 1995. 4-hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small-intestine. *Life Science*, 57: 785-789.
- SINGLETON, V.L., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTOS, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299: 152-178.
- SPANOS, G.A., WROLSTAD, R.E. 1992. Phenolic of apple, pear and white grape juices and their changes with processing and storage. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, 40: 1478-1487.
- SROKA, Z. 2005. Antioxidative and antiradical properties of plant phenolics. *Zeitschrift für Naturforschung*, 60 (11-12): 833-843.
- STADTMAN, E.R. 2004. Role of oxidant species in aging. *Current Medical Chemistry*, 11: 1105-1112.
- STAHL, W., SIES, H. 2003. Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24: 345–351.
- STANNER, S.A., HUGHES, J., KELLY, C.N., BUTTRISS, J.A. 2004. Review of the epidemiological evidence for the antioxidant hypothesis. *Public Health Nutrition*, 7: 407-422.

- STOUT, G.H., BALKENHOL, W.G., POLING, M., HICKERNELL, G.L. 1970. The isolation and structure of daphnetoxin, the poisonous principle of daphne species. *Journal of American Chemical Society*, 92: 1070-1071.
- TAN, K., DAVIS, P.H. 198. Flora of Turkey and The East Aegean Islands. University Press, pp. 521-526, Edinburgh.
- TANG, S.Y., WHITEMAN, M., PENG, Z.F., JENNER, A., YONG, E.L., HALLIWELL, B. 2004. Characterization of antioxidant and antiglycation properties and isolation of active ingredients from traditional Chinese medicines. *Free Radical Biology and Medicine*, 36: 1575-1587.
- TINDLE, H.A., DAVIS, R.B., PHILIPS, R.S., EISENBERG, D.M. 2005, Trends in use of complementary and alternative medicine by US adults: 1997-2002. *Alternative Therapy*, 11 (1): 42-49.
- ULUBELEN, A., TEREM, B., TUZLACI, E. 1986. Coumarins and flavonoids from daphne gnidioides. *Journal of Natural Products*, 49: 692-694.
- ULUBELEN, A., TAN, N., TUZLACI, E. 1990. Constituents of daphne mucronata. *Fitoterapia*, 61: 1281.
- VALENTAO, P., FERNANDES, E., CARVALHO, F., ANDRADE, P.B., SEABRA, R.M., BASTOS, M.L. 2001. Antioxidant activity of Centaurium erythraea infusion evidenced by its superoxide radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 3476-3479.
- VINSON, J.A., DABBAGH, Y.A., SERRY, M.M., JANG, J.H. 1995. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 2800-2802.
- WOLFE, K., XIINZHONG, W.U., LIU, R.H. 2003. Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 609-614.
- YAMAOKA, M., CARILLOT, M.-J., NAKAHARA, T., KOMIYAMA, K. 1991. Antioxidative activities of tocotrienols on phospholipid liposomes. *Journal of American Oil Chemists Society*, 68: 114-118.
- YOUNG, I.S., WOODSIDE, J. V. 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54: 176-186.
- YU, L.L., ZHOU, K., PARRY, J.W. 2005, Inhibitory effects of wheat bran extracts on human LDL oxidation and free radicals. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 38: 463-470.



## 7. EKLER

### EK\_1. DPPH· Radikali Yakalama Testi Verileri

Çizelge 7.1. ESA için DPPH testi sonucu elde edilen absorbans ve % inhibisyon değerleri

Konsantrasyon	Absorbans	Kontrol Absorbans	% inhibisyon
25µg/ml 1.paralel	1,032	1,301	20,7
25µg/ml 2.paralel	1,037	1,301	20,3
25µg/ml 3.paralel	1,042	1,301	19,9
50µg/ml 1.paralel	1,012	1,301	22,2
50µg/ml 2.paralel	1,013	1,301	22,1
50µg/ml 3.paralel	1,006	1,301	22,7
100µg/ml 1.paralel	0,756	1,301	41,9
100µg/ml 2.paralel	0,760	1,301	41,6
100µg/ml 3.paralel	0,753	1,301	42,1
250µg/ml 1.paralel	0,345	1,301	73,5
250µg/ml 2.paralel	0,382	1,301	70,7
250µg/ml 3.paralel	0,338	1,301	74,0
500µg/ml 1.paralel	0,285	1,253	77,2
500µg/ml 2.paralel	0,281	1,253	77,6
500µg/ml 3.paralel	0,280	1,253	77,7
1000µg/ml 1.paralel	0,181	1,253	85,6
1000µg/ml 2.paralel	0,178	1,253	85,8
1000µg/ml 3.paralel	0,180	1,253	85,7

Çizelge 7.2. ESM için DPPH testi sonucu elde edilen absorbands ve % inhibisyon değerleri

Konsantrasyon	Absorbans	Kontrol Absorbans	% inhibisyon
10µg/ml 1.paralel	1,131	1,245	9,2
10µg/ml 2.paralel	1,129	1,245	9,4
10µg/ml 3.paralel	1,131	1,245	9,2
25µg/ml 1.paralel	0,984	1,245	21,0
25µg/ml 2.paralel	0,975	1,245	21,7
25µg/ml 3.paralel	0,980	1,245	21,3
50µg/ml 1.paralel	0,693	1,238	44,0
50µg/ml 2.paralel	0,708	1,238	42,8
50µg/ml 3.paralel	0,695	1,238	43,8
100µg/ml 1.paralel	0,249	1,238	79,9
100µg/ml 2.paralel	0,280	1,238	77,4
100µg/ml 3.paralel	0,269	1,238	78,3
250µg/ml 1.paralel	0,059	1,251	95,3
250µg/ml 2.paralel	0,056	1,251	95,5
250µg/ml 3.paralel	0,056	1,251	95,5
500µg/ml 1.paralel	0,066	1,251	94,7
500µg/ml 2.paralel	0,073	1,251	94,2
500µg/ml 3.paralel	0,078	1,251	93,8

Çizelge 7.3. EGA için DPPH testi sonucu elde edilen absorbands ve % inhibisyon değerleri

Konsantrasyon	Absorbans	Kontrol Absorbans	% inhibisyon
25µg/ml 1.paralel	1,155	1,204	4,0
25µg/ml 2.paralel	1,144	1,204	4,9
25µg/ml 3.paralel	1,150	1,204	4,5
50µg/ml 1.paralel	1,022	1,204	15,0
50µg/ml 2.paralel	1,015	1,204	15,6
50µg/ml 3.paralel	1,021	1,204	15,1
100µg/ml 1.paralel	0,870	1,204	27,7
100µg/ml 2.paralel	0,885	1,204	26,4
100µg/ml 3.paralel	0,878	1,204	27,0
250µg/ml 1.paralel	0,586	1,195	50,9
250µg/ml 2.paralel	0,579	1,195	51,5
250µg/ml 3.paralel	0,583	1,195	51,2
500µg/ml 1.paralel	0,287	1,195	76,0
500µg/ml 2.paralel	0,280	1,195	76,6
500µg/ml 3.paralel	0,280	1,195	76,6
1230µg/ml 1.paralel	0,113	1,171	90,4
1230µg/ml 2.paralel	0,109	1,171	90,7
1230µg/ml 3.paralel	0,103	1,171	91,2

Çizelge 7.4. EGM için DPPH testi sonucu elde edilen absorbans ve % inhibisyon değerleri

Konsantrasyon	Absorbans	Kontrol Absorbans	% inhibisyon
10µg/ml 1.paralel	1,143	1,170	2,3
10µg/ml 2.paralel	1,120	1,170	4,2
10µg/ml 3.paralel	1,126	1,170	3,8
25µg/ml 1.paralel	1,074	1,170	8,2
25µg/ml 2.paralel	1,093	1,170	6,5
25µg/ml 3.paralel	1,076	1,170	8,0
50µg/ml 1.paralel	0,974	1,170	16,8
50µg/ml 2.paralel	0,958	1,170	18,1
50µg/ml 3.paralel	0,957	1,170	18,2
100µg/ml 1.paralel	0,792	1,170	32,3
100µg/ml 2.paralel	0,780	1,170	33,3
100µg/ml 3.paralel	0,784	1,170	32,9
250µg/ml 1.paralel	0,490	1,170	58,1
250µg/ml 2.paralel	0,493	1,170	57,8
250µg/ml 3.paralel	0,485	1,170	58,5
500µg/ml 1.paralel	0,115	1,170	90,2
500µg/ml 2.paralel	0,079	1,170	93,3
500µg/ml 3.paralel	0,114	1,170	90,2

Çizelge 7.5. EGH için DPPH testi sonucu elde edilen absorbans ve % inhibisyon değerleri

Konsantrasyon	Absorbans	Kontrol Absorbans	% inhibisyon
25µg/ml 1.paralel	1,141	1,183	3,6
25µg/ml 2.paralel	1,140	1,183	3,6
25µg/ml 3.paralel	1,141	1,183	3,5
50µg/ml 1.paralel	1,132	1,183	4,2
50µg/ml 2.paralel	1,134	1,183	4,1
50µg/ml 3.paralel	1,136	1,183	4,0
100µg/ml 1.paralel	1,125	1,186	5,1
100µg/ml 2.paralel	1,119	1,186	5,7
100µg/ml 3.paralel	1,106	1,186	6,7
250µg/ml 1.paralel	1,030	1,186	13,1
250µg/ml 2.paralel	1,033	1,186	12,9
250µg/ml 3.paralel	1,016	1,186	14,3
660µg/ml 1.paralel	0,860	1,202	28,5
660µg/ml 2.paralel	0,857	1,202	28,7
660µg/ml 3.paralel	0,861	1,202	28,3

Çizelge 7.6. ESH için DPPH testi sonucu elde edilen absorbans ve % inhibisyon değerleri

Konsantrasyon	Absorbans	Kontrol Absorbans	% inhibisyon
25µg/ml 1.paralel	1,162	1,167	0,4
25µg/ml 2.paralel	1,173	1,167	-0,6
25µg/ml 3.paralel	1,163	1,167	0,3
50µg/ml 1.paralel	1,130	1,167	3,1
50µg/ml 2.paralel	1,158	1,167	0,8
50µg/ml 3.paralel	1,156	1,167	0,9
100µg/ml 1.paralel	1,132	1,185	4,5
100µg/ml 2.paralel	1,133	1,185	4,4
100µg/ml 3.paralel	1,130	1,185	4,7
250µg/ml 1.paralel	1,097	1,185	7,5
250µg/ml 2.paralel	1,099	1,185	7,3
250µg/ml 3.paralel	1,085	1,185	8,4
570µg/ml 1.paralel	1,022	1,181	13,5
570µg/ml 2.paralel	1,023	1,181	13,4
570µg/ml 3.paralel	1,019	1,181	13,7

## EK\_2. ABTS<sup>+</sup> Radikali Yakalama Testi Verileri

Çizelge 7.7. ESA için ABTS<sup>+</sup> testi sonucu elde edilen absorbans değerleri

Ekstrakt (µg/ml)	1.Absorbans	2.Absorbans	3.Absorbans	Ortalama Absorbans
25	0,540	0,537	0,535	0,538
50	0,492	0,484	0,485	0,487
100	0,436	0,438	0,445	0,440
250	0,303	0,302	0,299	0,301
500	0,267	0,267	0,264	0,266
1015	0,270	0,269	0,266	0,268
Kontrol	0,627	0,572		

Çizelge 7.8. ESA için ABTS<sup>+</sup> testi sonucu hesaplanan % inhibisyon ve standart sapma (SD) değerleri

Ekstrakt (µg/ml)	1.İnhibisyon	2.İnhibisyon	3.İnhibisyon	% Ortalama inhibisyon	Ortalama Troloks	SD
25	13,9	14,3	14,6	14,3		
50	21,6	22,8	22,7	22,3		
100	30,4	30,1	29,0	29,9		
250	47,0	47,2	47,8	47,3		
500	53,3	53,2	53,8	53,4		
1015	52,8	53,0	53,5	53,1		
mM Trolox / gr ekstrakt	0,302	0,302	0,304		0,302	0,001

Çizelge 7.9. ESM için ABTS<sup>+</sup> testi sonucu elde edilen absorbands değerleri

Ekstrakt (µg/ml)	1.Absorbans	2.Absorbans	3.Absorbans	Ortalama Absorbans
10	0,600	0,594	0,591	0,595
25	0,555	0,549	0,559	0,555
50	0,500	0,498	0,495	0,498
100	0,422	0,418	0,418	0,419
250	0,264	0,268	0,271	0,268
500	0,111	0,111	0,107	0,109
1040	0,022	0,023	0,021	0,022
Kontrol	0,620	0,632		

Çizelge 7.10. ESM için ABTS<sup>+</sup> testi sonucu hesaplanan % inhibisyon ve standart sapma (SD) değerleri

Ekstrakt (µg/ml)	1.İnhibisyon	2.İnhibisyon	3.İnhibisyon	% Ortalama inhibisyon	Ortalama Troloks	SD
10	3,1	4,2	4,6	4,0		
25	10,3	11,3	9,7	10,5		
50	19,2	19,6	20,2	19,7		
100	31,8	32,6	32,6	32,3		
250	58,2	57,6	57,1	57,6		
500	82,5	82,5	83,1	82,7		
1040	96,6	96,4	96,6	96,5		
mM Trolox / gr ekstrakt	0,511	0,515	0,519		0,515	0,004

Çizelge 7.11. EGA için ABTS<sup>+</sup> testi sonucu elde edilen absorbands değerleri

Ekstrakt (µg/ml)	1.Absorbans	2.Absorbans	3.Absorbans	Ortalama Absorbans
10	0,604	0,609	0,604	0,606
25	0,576	0,567	0,573	0,572
50	0,532	0,533	0,529	0,531
100	0,548	0,549	0,551	0,549
250	0,473	0,477	0,475	0,475
500	0,375	0,353	0,370	0,366
1230	0,210	0,202	0,198	0,203
Kontrol	0,630	0,624		

Çizelge 7.12. EGA için ABTS<sup>+</sup> testi sonucu hesaplanan % inhibisyon ve standart sapma (SD) değerleri

Ekstrakt (µg/ml)	1.İnhibisyon	2.İnhibisyon	3.İnhibisyon	% Ortalama inhibisyon	Ortalama Troloks	SD
10	4,2	3,3	4,2	3,9		
25	8,7	10,1	9,0	9,3		
50	15,5	15,5	16,0	15,7		
100	13,1	12,9	12,6	12,9		
250	24,3	23,7	23,9	24,0		
500	39,9	43,5	40,8	41,4		
mM Trolox / gr ekstrakt	0,126	0,137	0,129		0,131	0,006

Çizelge 7.13. EGM için ABTS<sup>+</sup> testi sonucu elde edilen absorbans değerleri

Ekstrakt (µg/ml)	1.Absorbans	2.Absorbans	3.Absorbans	Ortalama Absorbans
10	0,575	0,576	0,576	0,576
25	0,536	0,535	0,537	0,536
50	0,475	0,475	0,477	0,476
100	0,402	0,403	0,399	0,401
250	0,276	0,277	0,272	0,275
500	0,154	0,153	0,148	0,152
1228	0,007	0,004	0,004	0,005
Kontrol	0,609	0,594		

Çizelge 7.14. EGM için ABTS<sup>+</sup> testi sonucu hesaplanan % inhibisyon ve standart sapma (SD) değerleri

Ekstrakt (µg/ml)	1.İnhibisyon	2.İnhibisyon	3.İnhibisyon	% Ortalama inhibisyon	Ortalama Troloks	SD
10	5,5	5,3	5,3	5,4		
25	12,0	12,1	11,8	12,0		
50	22,0	21,9	21,6	21,8		
100	34,0	33,8	34,5	34,1		
250	53,5	53,3	54,3	53,7		
500	74,0	74,3	75,0	74,5		
1228	98,8	99,3	99,3	99,1		
mM Trolox / gr ekstrakt	0,537	0,536	0,545		0,539	0,005

Çizelge 7.15. EGH için ABTS<sup>+</sup> testi sonucu elde edilen absorbans değerleri

Ekstrakt (µg/ml)	1.Absorbans	2.Absorbans	3.Absorbans	Ortalama Absorbans
25	0,583	0,591	0,585	0,586
50	0,583	0,583	0,582	0,583
100	0,565	0,562	0,563	0,563
250	0,527	0,526	0,527	0,527
610	0,452	0,449	0,447	0,449
Kontrol	0,593	0,584		

Çizelge 7.16. EGH için ABTS<sup>+</sup> testi sonucu hesaplanan % inhibisyon ve standart sapma (SD) değerleri

Ekstrakt (µg/ml)	1.İnhibisyon	2.İnhibisyon	3.İnhibisyon	% Ortalama inhibisyon	Ortalama Troloks	SD
25	0,9	-0,5	0,7	0,4		
50	0,9	0,9	1,1	1,0		
100	3,9	4,5	4,4	4,3		
250	10,4	10,7	10,5	10,6		
610	23,3	23,6	24,0	23,6		
mM Trolox / gr ekstrakt	0,062	0,064	0,063		0,063	0,001

Çizelge 7.17. EGH için ABTS<sup>+</sup> testi sonucu elde edilen absorbans değerleri

Ekstrakt (µg/ml)	1.Absorbans	2.Absorbans	3.Absorbans	Ortalama Absorbans
50	0,596	0,594	0,594	0,594
100	0,574	0,579	0,574	0,576
250	0,545	0,546	0,541	0,544
500	0,505	0,506	0,505	0,505
780	0,504	0,508	0,504	0,505
Kontrol	0,596	0,590		

Çizelge 7.18. EGH için ABTS<sup>+</sup> testi sonucu hesaplanan % inhibisyon ve standart sapma (SD) değerleri

Ekstrakt (µg/ml)	1.İnhibisyon	2.İnhibisyon	3.İnhibisyon	% Ortalama inhibisyon	Ortalama Troloks	SD
50	0,1	0,3	0,3	0,2		
100	3,7	2,9	3,6	3,4		
250	8,6	8,4	9,3	8,7		
500	14,5	14,3	14,4	14,4		
780	14,7	13,9	14,6	14,4		
mM Trolox / gr ekstrakt	0,048	0,048	0,048		0,048	0,000

Çizelge 7.19. ABTS<sup>+</sup> testi için Trolox absorbansları ve % inhibisyon değerleri

Troloks mM	1.Absorbans	2.Absorbans	3.Absorbans	Ortalama Absorbans
0,0025	0,605	0,606	0,605	2,6
0,005	0,593	0,594	0,593	4,5
0,01	0,578	0,577	0,577	7,1
0,025	0,515	0,522	0,518	16,0
0,05	0,427	0,426	0,427	30,8
0,1	0,228	0,225	0,226	63,3
1.Kontrol	0,622			
2.Kontrol	0,617			

### EK\_3. Klorofil a, Klorofil b ve Toplam Karotenoid İçeriği Testi Verileri

Çizelge 7.20. Metanol ve dietileter içinde farklı konsantrasyonlarda hazırlanan klorofil standartları için farklı dalga boylarında elde edilen absorbands değerleri

Konsantrasyon (µg/ml)	1.Absorbans			
	Klorofil a (MeOH)	Klorofil a (dietileter)	Klorofil b (MeOH)	Klorofil b (dietileter)
	666nm	662nm	653nm	646nm
0,1	-	0,013	-	0,019
0,25	0,095	0,036	-	0,038
0,5	0,027	0,058	0,010	0,068
1,0	0,073	0,108	0,027	0,114
2,5	0,172	0,280	0,081	0,302
5,0	0,351	0,594	0,184	0,624
10	0,698	1,057	0,383	0,916
20			0,729	

Konsantrasyon (µg/ml)	2.Absorbans			
	Klorofil a (MeOH)	Klorofil a (dietileter)	Klorofil b (MeOH)	Klorofil b (dietileter)
	666nm	662nm	653nm	646nm
0,1	-	0,014	-	0,019
0,25	0,011	0,038	-	0,039
0,5	0,028	0,060	0,001	0,069
1,0	0,073	0,109	0,028	0,115
2,5	0,173	0,281	0,083	0,302
5,0	0,352	0,595	0,185	0,625
10	0,699	1,077	0,383	0,916
20			0,730	

Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama Absorbans			
	Klorofil a (MeOH)	Klorofil a (dietileter)	Klorofil b (MeOH)	Klorofil b (dietileter)
	666nm	662nm	653nm	646nm
0,1	-	0,014	-	0,019
0,25	0,010	0,037	-	0,039
0,5	0,028	0,059	0,010	0,068
1,0	0,073	0,108	0,027	0,114
2,5	0,173	0,280	0,082	0,302
5,0	0,352	0,595	0,184	0,624
10	0,699	1,067	0,383	0,916
20			0,729	



Çizelge 7.21. Absorbanstan elde edilen  $C_a$ ,  $C_b$  ve  $C_{x+c}$  değerleri ( $\mu\text{g/mL}$ )

	1. absorbans (MeOH) ( $\mu\text{g/ml}$ )			2. absorbans (MeOH) ( $\mu\text{g/ml}$ )			3. absorbans (MeOH) ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	$C_a$	$C_b$	$C_{x+c}$	$C_a$	$C_b$	$C_{x+c}$	$C_a$	$C_b$	$C_{x+c}$
ESA	0,889	2,249		0,880	2,322		0,857	2,311	
ESM	1,059	1,453	0,052	1,021	1,511	0,022	1,051	1,449	0,057
EGA	0,261	1,441		0,251	1,476		0,256	1,427	
EGM	0,195	0,342	0,077	0,199	0,330	0,083	0,173	0,379	0,053
	1. absorbans (dietileter) ( $\mu\text{g/ml}$ )			2. absorbans (dietileter) ( $\mu\text{g/ml}$ )			3. absorbans (dietileter) ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	$C_a$	$C_b$	$C_{x+c}$	$C_a$	$C_b$	$C_{x+c}$	$C_a$	$C_b$	$C_{x+c}$
EGA	0,378		0,227	0,448		0,236	0,378		0,227
EGH	1,344		0,476	1,355		0,447	1,344		0,476

Çizelge 7.22. Bitki ekstraktlarının mg/100g ekstrakt cinsinden  $C_a$ ,  $C_b$  ve  $C_{x+c}$  değerleri

	Klorofil A mg/100g			Klorofil B mg/100g			Toplam karotenoid mg/100g		
	$C_a$	$C_b$	$C_{x+c}$	$C_a$	$C_b$	$C_{x+c}$	$C_a$	$C_b$	$C_{x+c}$
ESA	161,63	160,05	155,81	408,83	422,24	420,13	--	--	--
ESM	147,14	141,80	145,91	201,81	209,88	201,18	7,22	3,03	7,91
EGA	48,30	46,53	47,36	266,87	273,38	264,31	--	--	--
EGM	32,43	33,18	28,86	57,04	55,05	63,23	12,81	13,85	8,91
EGA	72,71	86,15	68,97	--	--	--	43,68	45,35	43,52
EGH	447,92	451,56	443,31	--	--	--	158,83	148,95	169,32

#### EK\_4. Toplam Fenolik İçeriği (TPC) Verileri

Çizelge 7.23. Toplam fenolik bileşen içeriği testinde standart olarak kullanılan gallik asit (GA) için 760 nm'de elde edilen absorbans değerleri

mM G.A.	Absorbans_1	Absorbans_2	Ortalama absorbans
0,01	0,015	0,015	0,015
0,05	0,104	0,110	0,107
0,075	0,170	0,171	0,171
0,1	0,232	0,238	0,235
0,25	0,604	0,608	0,606
0,5	1,138	1,140	1,139

Çizelge 7.24. Toplam fenolik bileşen testi sonucu bitki ekstraktları için 760 nm’de elde edilen absorbans değerleri

	1. absorbans	2. absorbans	3. absorbans	Ortalama Absorbans	Kontrol	Ortalama absorpsiyon (kontrol çıkarılmış)
ESA	0,521	0,407	0,430	0,453	0,051	0,402
ESM	0,391	0,411	0,423	0,408	0,065	0,343
EGA	0,660	0,596	0,685	0,647	0,175	0,473
EGM	0,844	0,810	0,826	0,827	0,227	0,599
EGH	0,188	0,245	0,196	0,210	0,190	0,019
ESH	0,220	0,227	0,274	0,240	0,192	0,048

Çizelge 7.25. Bitki ekstraktlarına ait toplam fenolik bileşen içeriği (mg GAE/g ekstrakt) verileri

	1. paralel TPC	2. paralel TPC	3. paralel TPC	Ortalama TPC (mg GAE/g ekstrakt)
ESA	768,1	599,8	634,8	667,6 ± 88,8
ESM	577,1	606,4	623,8	602,5 ± 23,6
EGA	974,0	879,8	1010,2	954,7 ± 67,3
EGM	1245,0	1194,7	1218,2	1219,3 ± 25,2
EGH	276,6	361,7	289,0	309,1 ± 46,0
ESH	323,8	335,0	404,3	354,4 ± 43,6

#### EK\_5. Toplam Flavonoid İçeriği (TFC) Verileri

Çizelge 7.26. TFC testi sonucu rutin standardı için 430 nm’de elde edilen absorbans değerleri

Rutin (µg/ml)	1. absorbans	2. absorbans	3. absorbans	Ortalama absorbans
5	0,046	0,045	0,039	0,043
10	0,066	0,085	0,058	0,070
20	0,151	0,171	0,176	0,166
40	0,334	0,311	0,332	0,326
80	0,649	0,635	0,643	0,642
100	0,814	0,852	0,724	0,797

Çizelge 7.27. TFC testi sonucu bitki ekstraktları için 430 nm’de elde edilen absorbanans değerleri

	1. absorbanans	2. absorbanans	3. absorbanans	Ortalama absorbanans
ESA	0,206	0,177	0,202	0,195
ESM	0,122	0,109	0,113	0,115
EGA	0,018	0,017	0,018	0,018
EGM	0,025	0,023	0,023	0,024
EGH	0,016	0,012	0,014	0,014
ESH	0,089	0,086	0,115	0,097

Çizelge 7.28. Bitki ekstraktlarına ait toplam flavanoid bileşen içeriği (TFC, mg rutin/g ekstrakt) değerleri

	1. absorbanans	2. absorbanans	3. absorbanans	Ortalama TFC (mg rutin / g ekstrakt)
ESA	258,1	222,3	253,3	39,1 ± 4,9
ESM	153,3	137,1	142,3	121,3 ± 19,7
EGA	23,0	21,6	22,9	144,2 ± 8,2
EGM	31,6	29,1	29,3	244,5 ± 19,5
EGH	20,8	15,8	17,6	18,0 ± 2,5
ESH	111,3	108,5	144,0	30,0 ± 1,4

#### **EK\_6. Büyükbaş Hayvan Beyni Lipozomları (BBE)’nda Lipid Peroksidasyon İnhibisyonunun Ölçümü Verileri**

Çizelge 7.29. ESA için BBE testi absorbanans değerleri

µg/mL	1. absorbanans	2. absorbanans	3. absorbanans	Ortalama absorbanans
5	0,324	0,307	0,320	0,317
10	0,244	0,330	0,326	0,300
25	0,248	0,246	0,246	0,247
50	0,251	0,226	0,226	0,234
100	0,208	0,213	0,203	0,208
250	0,290	0,287	0,282	0,287

Çizelge 7.30. ESM için BBE testi absorbans değerleri

µg/mL	1. absorbans	2. absorbans	3. absorbans	Ortalama absorbans
5	0,261	0,262	0,265	0,263
10	0,251	0,245	0,249	0,248
25	0,222	0,228	0,233	0,228
50	0,222	0,228	0,233	0,227
100	0,221	0,224	0,226	0,224
250	0,225	0,198	0,202	0,209

Çizelge 7.31. EGA için BBE testi absorbans değerleri

µg/mL	1. absorbans	2. absorbans	3. absorbans	Ortalama absorbans
5	0,418	0,440	0,497	0,452
10	0,328	0,366	0,357	0,350
25	0,280	0,272	0,293	0,282
50	0,151	0,129	0,129	0,136
100	0,148	0,105	0,173	0,142
250	0,260	0,169	0,168	0,199

Çizelge 7.32. EGM için BBE testi absorbans değerleri

µg/mL	1. absorbans	2. absorbans	3. absorbans	Ortalama absorbans
5	0,430	0,443	0,443	0,439
10	0,400	0,409	0,420	0,410
25	0,293	0,296	0,301	0,297
50	0,130	0,125	0,127	0,127
100	0,262	0,259	0,259	0,260
250	0,212	0,206	0,203	0,207

Çizelge 7.33. EGH için BBE testi absorbanans değerleri

µg/mL	1. absorbanans	2. absorbanans	3. absorbanans	Ortalama absorbanans
5	0,312	0,309	0,311	0,310
10	0,392	0,399	0,401	0,397
25	0,387	0,411	0,417	0,405
50	0,401	0,411	0,409	0,407
100	0,424	0,417	0,432	0,425
250	0,435	0,439	0,438	0,438

Çizelge 7.34. ESH için BBE testi absorbanans değerleri

µg/mL	1. absorbanans	2. absorbanans	3. absorbanans	Ortalama absorbanans
5	0,158	0,159	0,159	0,159
10	0,171	0,176	0,176	0,174
25	0,183	0,180	0,190	0,184
50	0,232	0,212	0,215	0,219
100	0,307	0,305	0,319	0,311
250	0,364	0,377	0,374	0,372

Çizelge 7.35. Kersetin için BBE testi absorbanans değerleri

µg/mL	1. absorbanans	2. absorbanans	3. absorbanans	Ortalama absorbanans
5	0,483	0,478	0,487	0,483
10	0,480	0,445	0,467	0,464
25	0,473	0,457	0,463	0,464
50	0,500	0,504	0,524	0,509
100	0,496	0,500	0,507	0,501
250	0,435	0,452	0,457	0,448

Çizelge 7.36. BHT için BBE testi absorbans değerleri

$\mu\text{g/mL}$	1. absorbans	2. absorbans	3. absorbans	Ortalama absorbans
5	0,476	0,466	0,465	0,469
10	0,435	0,455	0,432	0,441
25	0,349	0,335	0,329	0,338
50	0,309	0,319	0,315	0,314
100	0,192	0,200	0,196	0,196
250	0,149	0,155	0,141	0,148

Çizelge 7.37.  $\alpha$ -tokoferol için BBE testi absorbans değerleri

$\mu\text{g/mL}$	1. absorbans	2. absorbans	3. absorbans	Ortalama absorbans
5	0,268	0,263	0,269	0,267
10	0,177	0,183	0,176	0,179
25	0,181	0,178	0,169	0,176
50	0,156	0,161	0,166	0,161
100	0,139	0,157	0,159	0,152
250	0,138	0,157	0,140	0,145

Çizelge 7.38. Ferulik asit için BBE testi absorbans değerleri

$\mu\text{g/mL}$	1. absorbans	2. absorbans	3. absorbans	Ortalama absorbans
5	0,559	0,546	0,537	0,547
10	0,546	0,549	0,545	0,546
25	0,527	0,542	0,558	0,542
50	0,526	0,524	0,523	0,525
100	0,573	0,496	0,488	0,519
250	0,459	0,458	0,482	0,467

Çizelge 7.39. ESA için BBE testi % inhibisyon değerleri

µg/mL	1. inhibisyon	2. inhibisyon	3. inhibisyon	Ortalama % inhibisyon
5	53,8	56,2	54,3	54,8
10	65,1	65,5	54,2	61,6
25	64,9	64,5	65,3	64,9
50	64,9	63,7	68,4	65,7
100	70,4	69,6	71,0	70,4
250	58,7	59,1	59,8	59,2

Çizelge 7.40. ESM için BBE testi % inhibisyon değerleri

µg/mL	1. inhibisyon	2. inhibisyon	3. inhibisyon	Ortalama % inhibisyon
5	61,9	62,7	61,5	62,0
10	64,3	65,2	64,6	64,7
25	66,8	68,4	67,6	67,6
50	68,5	66,7	66,9	67,3
100	68,8	68,9	67,8	68,5
250	67,1	71,8	71,2	70,1

Çizelge 7.41. EGA için BBE testi % inhibisyon değerleri

µg/mL	1. inhibisyon	2. inhibisyon	3. inhibisyon	Ortalama % inhibisyon
5	40,6	37,4	29,2	35,7
10	53,4	47,9	49,2	50,2
25	60,2	61,3	58,3	59,9
50	78,6	81,6	81,6	80,6
100	78,9	85,1	75,4	79,8
250	63,0	76,0	76,1	71,7

Çizelge 7.42. EGM için BBE testi % inhibisyon değerleri

µg/mL	1. inhibisyon	2. inhibisyon	3. inhibisyon	Ortalama % inhibisyon
5	38,8	37,0	36,9	37,6
10	43,1	43,0	39,6	41,9
25	58,3	57,9	57,2	57,8
50	81,5	82,3	81,9	81,9
100	62,7	63,1	63,2	63,0
250	69,8	70,6	71,1	70,5

Çizelge 7.43. EGH için BBE testi % inhibisyon değerleri

µg/mL	1. inhibisyon	2. inhibisyon	3. inhibisyon	Ortalama % inhibisyon
5	55,6	56,0	55,8	55,8
10	44,3	43,2	43,0	43,5
25	44,9	41,5	40,6	42,3
50	42,9	41,5	41,9	42,1
100	39,6	40,6	38,5	39,6
250	38,0	37,5	37,6	37,7

Çizelge 7.44. ESH için BBE testi % inhibisyon değerleri

µg/mL	1. inhibisyon	2. inhibisyon	3. inhibisyon	Ortalama % inhibisyon
5	52,6	52,3	52,3	52,4
10	48,8	47,3	47,3	47,8
25	45,1	46,0	43,2	44,8
50	30,5	36,6	35,7	34,3
100	8,0	8,6	4,3	7,0



Çizelge 7.45. Kersetin için BBE testi % inhibisyon değerleri

µg/mL	1. inhibisyon	2. inhibisyon	3. inhibisyon	Ortalama % inhibisyon
5	25,5	26,3	24,8	25,5
10	26,0	31,3	27,9	28,4
25	27,0	29,6	28,6	28,4
50	22,9	22,3	19,1	21,4
100	23,5	22,9	21,8	22,7
250	32,9	30,4	29,5	30,9

Çizelge 7.46. BHT için BBE testi % inhibisyon değerleri

µg/mL	1. inhibisyon	2. inhibisyon	3. inhibisyon	Ortalama % inhibisyon
5	26,7	28,1	28,3	27,7
10	32,8	29,9	33,3	32,0
25	46,2	48,3	49,3	47,9
50	52,3	50,7	51,5	51,5
100	70,4	69,2	69,7	69,8
250	77,0	76,1	78,3	77,1

Çizelge 7.47. α-tokoferol için BBE testi % inhibisyon değerleri

µg/mL	1. inhibisyon	2. inhibisyon	3. inhibisyon	Ortalama % inhibisyon
5	58,6	59,5	58,5	58,9
10	72,7	71,7	72,8	72,4
25	72,2	72,6	73,9	72,9
50	75,9	75,2	74,4	75,2
100	78,5	75,8	75,4	76,6
250	78,8	75,9	78,4	77,7

Çizelge 7.48. BHT için BBE testi % inhibisyon değerleri

µg/mL	1. inhibisyon	2. inhibisyon	3. inhibisyon	Ortalama % inhibisyon
5	13,8	15,8	17,2	15,6
10	15,8	15,3	16,0	15,7
25	18,8	16,5	13,9	16,4
50	18,8	19,2	19,3	19,1
100	11,6	23,5	24,8	20,0
250	29,2	29,3	25,6	28,0

### EK\_7. Süperoksit Anyon Radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) Yakalama Aktivitesi Verileri

Çizelge 7.49. Süperoksit anyon radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) yakalama aktivite testi sonucu ESA için elde edilen absorbans ve hesaplanan % inhibisyon değerleri

µg/ml	1.abs	2.abs	3.abs	Abs Ortalama	%inhibisyon 1	%inhibisyon 2	%inhibisyon 3	%inhibisyon ortalama
25	0,396	0,399	0,396	0,397	8,5	7,9	8,6	8,3
50	0,369	0,359	0,366	0,365	14,8	17,0	15,5	15,8
100	0,342	0,344	0,344	0,343	21,0	20,6	20,6	20,7
250	0,348	0,338	0,316	0,334	19,6	21,9	27,0	22,8
500	0,325	0,323	0,328	0,326	24,9	25,4	24,2	24,8
kontrol	0,446	0,421	0,433	0,433				

Çizelge 7.50. Süperoksit anyon radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) yakalama aktivite testi sonucu ESM için elde edilen absorbans ve hesaplanan % inhibisyon değerleri

µg/ml	1.abs	2.abs	3.abs	Abs Ortalama	%inhibisyon 1	%inhibisyon 2	%inhibisyon 3	%inhibisyon ortalama
25	0,384	0,4000	0,408	0,397	11,5	7,6	5,9	8,3
50	0,382	0,356	0,383	0,374	11,9	17,7	11,6	13,7
100	0,369	0,363	0,365	0,366	14,9	16,2	15,8	15,6
250	0,337	0,323	0,332	0,331	22,2	25,4	23,3	23,6
500	0,320	0,286	0,310	0,305	26,2	34,0	28,5	29,6
kontrol	0,446	0,421	0,433	0,433				

Çizelge 7.51. Süperoksit anyon radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) yakalama aktivite testi sonucu EGA için elde edilen absorbans ve hesaplanan % inhibisyon değerleri

µg/ml	1.abs	2.abs	3.abs	Abs Ortalama	%inhibisyon 1	%inhibisyon 2	%inhibisyon 3	%inhibisyon ortalama
25	0,374	0,358	0,388	0,373	13,6	17,4	10,4	13,8
50	0,366	0,369	0,365	0,367	15,5	14,8	15,6	15,3
100	0,348	0,339	0,347	0,345	19,6	21,8	20,0	20,4
250	0,198	0,166	0,204	0,190	54,2	61,6	52,8	56,2
500	0,271	0,254	0,277	0,267	37,5	41,3	36,1	38,3
kontrol	0,446	0,421	0,433	0,433				

Çizelge 7.52. Süperoksit anyon radikali ( $O_2^-$ ) yakalama aktivite testi sonucu EGM için elde edilen absorbans ve hesaplanan % inhibisyon değerleri

µg/ml	1.abs	2.abs	3.abs	Abs Ortalama	%inhibisyon 1	%inhibisyon 2	%inhibisyon 3	%inhibisyon ortalama
25	0,426	0,395	0,417	0,413	1,8	8,8	3,7	4,7
50	0,344	0,399	0,374	0,372	20,6	8,0	13,6	14,1
100	0,360	0,360	0,356	0,359	16,8	17,0	17,6	17,1
250	0,175	0,184	0,180	0,179	59,7	57,6	58,4	58,6
500	0,286	0,296	0,294	0,292	34,0	31,6	32,1	32,6
kontrol	0,446	0,421	0,433	0,433				

Çizelge 7.53. Süperoksit anyon radikali yakalama aktivite testi sonucu Ferulik asit için elde edilen absorbans ve hesaplanan % inhibisyon değerleri

µg/ml	1.abs	2.abs	3.abs	Abs Ortalama	%inhibisyon 1	%inhibisyon 2	%inhibisyon 3	%inhibisyon ortalama
10	0,338	0,319	0,326	0,328	21,9	26,3	24,7	24,3
25	0,315	0,329	0,322	0,322	27,2	24,0	25,7	25,7
50	0,294	0,283	0,288	0,288	32,2	34,6	33,6	33,5
100	0,231	0,248	0,238	0,239	46,6	42,7	45,0	44,8
kontrol	0,446	0,421	0,433	0,433				

Çizelge 7.54. Süperoksit anyon radikali yakalama aktivite testi sonucu Kersetin için elde edilen absorbans ve hesaplanan % inhibisyon değerleri

µg/ml	1.abs	2.abs	3.abs	Abs Ortalama	%inhibisyon 1	%inhibisyon 2	%inhibisyon 3	%inhibisyon ortalama
10	0,310	0,322	0,313	0,315	28,4	25,7	27,8	27,3
25	0,285	0,304	0,293	0,294	34,3	29,7	32,3	32,1
50	0,252	0,247	0,248	0,249	41,8	43,1	42,8	42,6
100	0,166	0,189	0,176	0,177	61,6	56,2	59,3	59,0
kontrol	0,446	0,421	0,433	0,433				

Çizelge 7.55. Süperoksit anyon radikali yakalama aktivite testi sonucu BHT için elde edilen absorbans ve hesaplanan % inhibisyon değerleri

µg/ml	1.abs	2.abs	3.abs	Abs Ortalama	%inhibisyon 1	%inhibisyon 2	%inhibisyon 3	%inhibisyon ortalama
10	0,397	0,402	0,399	0,399	8,3	7,1	8,0	7,8
25	0,402	0,397	0,395	0,398	7,3	8,3	8,9	8,2
50	0,406	0,390	0,394	0,397	6,3	10,0	9,0	8,4
100	0,423	0,417	0,413	0,418	2,4	3,7	4,5	3,5
kontrol	0,446	0,421	0,433	0,433				

Çizelge 7.56. Süperoksit anyon radikali yakalama aktivite testi sonucu  $\alpha$ -tokoferol için elde edilen absorbans ve hesaplanan % inhibisyon değerleri

$\mu\text{g/ml}$	1.abs	2.abs	3.abs	Abs Ortalama	%inhibisyon 1	%inhibisyon 2	%inhibisyon 3	%inhibisyon ortalama
10	0,278	0,251	0,269	0,266	35,8	42,1	37,9	38,6
25	0,339	0,344	0,336	0,340	21,8	20,6	22,3	21,6
50	0,398	0,376	0,386	0,387	8,2	13,1	10,9	10,7
100	0,423	0,408	0,413	0,414	2,4	5,9	4,7	4,3
kontrol	0,446	0,421	0,433	0,433				

## EK\_8. Tiyobarbitürik Asitle Tepkimeye Giren Maddeler Testinin Verileri

Çizelge 7.57. 1 günlük inkübasyon sonunda, bitki ekstraktları ve saf antioksidanlar için TBARS testi sonucu ölçülen absorbans değerleri

	1.Absorbans	2.Absorbans	3.Absorbans	Ortalama absorbans
ESA	0,482	0,479	0,487	0,482
ESM	0,333	0,294	0,315	0,314
EGA	0,284	0,324	0,298	0,302
EGM	1,073	1,053	1,032	1,053
EGH	0,327	0,323	0,322	0,324
ESH	0,271	0,281	0,268	0,273
BHT-100 $\mu\text{g/ml}$	0,308	0,324	0,351	0,328
BHT-1000 $\mu\text{g/ml}$	0,470	0,490	0,469	0,476
$\alpha$ -tokoferol -100 $\mu\text{g/ml}$	0,276	0,290	0,285	0,284
$\alpha$ -tokoferol -1000 $\mu\text{g/ml}$	0,456	0,447	0,453	0,452
Ferulik asit-100 $\mu\text{g/ml}$	0,698	0,713	0,700	0,704
Ferulik asit-1000 $\mu\text{g/ml}$	0,296	0,294	0,299	0,296
Kersetin-100 $\mu\text{g/ml}$	0,380	0,391	0,363	0,378
Kersetin-1000 $\mu\text{g/ml}$	0,621	0,622	0,582	0,609
Kontrol	0,396	0,372	0,406	0,391

Çizelge 7.58. 1 günlük inkübasyon sonunda, bitki ekstraktları ve saf antioksidanlar için TBARS testi sonucu hesaplanan %inhibisyon değerleri

	1. % inhibisyon	2. % inhibisyon	3. % inhibisyon	% inhibisyon ortalama
ESA	0,0	0,0	0,0	0,0
ESM	14,9	24,9	19,5	19,7
EGA	27,3	17,1	23,9	22,8
EGM	0,0	0,0	0,0	0,0
EGH	16,5	17,5	17,8	17,3
ESH	30,8	28,2	31,6	30,2
BHT-100 $\mu\text{g/ml}$	21,4	17,2	10,3	16,3
BHT-1000 $\mu\text{g/ml}$	0,0	0,0	0,0	0,0
$\alpha$ -tokoferol -100 $\mu\text{g/ml}$	29,5	25,9	27,1	27,5
$\alpha$ -tokoferol -1000 $\mu\text{g/ml}$	0,0	0,0	0,0	0,0
Ferulik asit-100 $\mu\text{g/ml}$	0,0	0,0	0,0	0,0
Ferulik asit-1000 $\mu\text{g/ml}$	24,4	24,9	23,7	24,3
Kersetin-100 $\mu\text{g/ml}$	2,9	0,1	7,2	3,4
Kersetin-1000 $\mu\text{g/ml}$	0,0	0,0	0,0	0,0

Çizelge 7.59. 2 günlük inkübasyon sonunda, bitki ekstraktları ve saf antioksidanlar için TBARS testi sonucu ölçülen absorbans değerleri

	1.Absorbans	2.Absorbans	3.Absorbans	Ortalama absorbans
ESA	0,258	0,266	0,255	0,260
ESM	0,381	0,372	0,396	0,383
EGA	0,271	0,274	0,267	0,271
EGM	0,328	0,305	0,316	0,317
EGH	0,366	0,377	0,352	0,365
ESH	0,258	0,241	0,265	0,255
BHT-100 µg/ml	0,350	0,342	0,326	0,339
BHT-1000 µg/ml	0,288	0,265	0,279	0,277
α-tokoferol -100 µg/ml	0,225	0,221	0,221	0,222
α-tokoferol -1000 µg/ml	0,196	0,203	0,197	0,199
Ferulik asit-100 µg/ml	0,616	0,580	0,608	0,601
Ferulik asit-1000 µg/ml	0,267	0,261	0,275	0,268
Kersetin-100 µg/ml	0,501	0,533	0,492	0,509
Kersetin-1000 µg/ml	0,623	0,602	0,637	0,621
Kontrol	0,360	0,385	0,372	0,372

Çizelge 7.60. 2 günlük inkübasyon sonunda, bitki ekstraktları ve saf antioksidanlar için TBARS testi sonucu hesaplanan %inhibisyon değerleri

	1. % inhibisyon	2. % inhibisyon	3. % inhibisyon	% inhibisyon ortalama
ESA	30,7	28,6	31,5	30,3
ESM	0,0	0,0	0,0	0,0
EGA	27,3	26,4	28,3	27,3
EGM	12,0	18,0	15,0	15,0
EGH	1,6	0,0	5,4	2,4
ESH	30,7	35,2	28,9	31,6
BHT-100 µg/ml	6,1	8,1	12,4	8,9
BHT-1000 µg/ml	22,7	28,8	25,0	25,5
α-tokoferol -100 µg/ml	39,6	40,6	40,6	40,3
α-tokoferol -1000 µg/ml	47,2	45,5	47,1	46,6
Ferulik asit-100 µg/ml	0,0	0,0	0,0	0,0
Ferulik asit-1000 µg/ml	28,4	29,8	26,0	28,1
Kersetin-100 µg/ml	0,0	0,0	0,0	0,0
Kersetin-1000 µg/ml	0,0	0,0	0,0	0,0

Çizelge 7.61. 3 günlük inkübasyon sonunda, bitki ekstraktları ve saf antioksidanlar için TBARS testi sonucu ölçülen absorbans değerleri

	1.Absorbans	2.Absorbans	3.Absorbans	Ortalama absorbans
ESA	0,391	0,406	0,391	0,396
ESM	0,504	0,495	0,499	0,499
EGA	0,403	0,404	0,392	0,399
EGM	0,710	0,733	0,731	0,725
EGH	0,299	0,304	0,304	0,303
ESH	0,731	0,730	0,704	0,722
BHT-100 µg/ml	0,211	0,211	0,231	0,218
BHT-1000 µg/ml	0,329	0,331	0,335	0,332
α-tokoferol -100 µg/ml	0,280	0,280	0,268	0,276
α-tokoferol -1000 µg/ml	0,309	0,289	0,292	0,296
Ferulik asit-100 µg/ml	0,546	0,543	0,569	0,552
Ferulik asit-1000 µg/ml	0,374	0,397	0,383	0,385
Kersetin-100 µg/ml	0,396	0,405	0,414	0,405
Kersetin-1000 µg/ml	0,506	0,504	0,486	0,499
Kontrol	0,492	0,514	0,523	0,510

Çizelge 7.62. 3 günlük inkübasyon sonunda, bitki ekstraktları ve saf antioksidanlar için TBARS testi sonucu hesaplanan %inhibisyon değerleri

	1. % inhibisyon	2. % inhibisyon	3. % inhibisyon	%inhibisyon ortalama
ESA	23,3	20,4	23,4	22,3
ESM	1,2	2,8	2,2	2,1
EGA	20,9	20,8	23,1	21,6
EGM	0,0	0,0	0,0	0,0
EGH	41,2	40,3	40,5	40,7
ESH	0,0	0,0	0,0	0,0
BHT-100 µg/ml	58,5	58,6	54,8	57,3
BHT-1000 µg/ml	35,5	35,0	34,2	34,9
α-tokoferol -100 µg/ml	45,1	45,1	47,4	45,9
α-tokoferol -1000 µg/ml	39,5	43,4	42,7	41,9
Ferulik asit-100 µg/ml	0,0	0,0	0,0	0,0
Ferulik asit-1000 µg/ml	26,6	22,1	24,8	24,5
Kersetin-100 µg/ml	22,4	20,5	18,8	20,6
Kersetin-1000 µg/ml	0,7	1,2	4,6	2,2

Çizelge 7.63. 4 günlük inkübasyon sonunda, bitki ekstraktları ve saf antioksidanlar için TBARS testi sonucu ölçülen absorbans değerleri

	1.Absorbans	2.Absorbans	3.Absorbans	Ortalama absorbans
ESA	0,354	0,342	0,334	0,344
ESM	0,414	0,405	0,428	0,416
EGA	0,482	0,461	0,469	0,471
EGM	0,444	0,421	0,433	0,433
EGH	0,377	0,365	0,375	0,372
ESH	0,313	0,319	0,335	0,322
BHT-100 µg/ml	0,309	0,310	0,299	0,306
BHT-1000 µg/ml	0,500	0,474	0,473	0,482
α-tokoferol -100 µg/ml	0,503	0,497	0,516	0,505
α-tokoferol -1000 µg/ml	0,392	0,410	0,420	0,407
Ferulik asit-100 µg/ml	0,565	0,548	0,566	0,560
Ferulik asit-1000 µg/ml	0,740	0,751	0,745	0,745
Kersetin-100 µg/ml	0,449	0,453	0,440	0,448
Kersetin-1000 µg/ml	0,516	0,487	0,508	0,503
Kontrol	0,540	0,523	0,544	0,535

Çizelge 7.64. 4 günlük inkübasyon sonunda, bitki ekstraktları ve saf antioksidanlar için TBARS testi sonucu hesaplanan %inhibisyon değerleri

	1. % inhibisyon	2. % inhibisyon	3. % inhibisyon	%inhibisyon ortalama
ESA	33,9	36,1	37,5	35,8
ESM	22,7	24,3	20,1	22,3
EGA	10,0	14,0	12,5	12,2
EGM	17,0	21,4	19,1	19,2
EGH	29,5	31,8	30,0	30,4
ESH	41,5	40,4	37,4	39,8
BHT-100 µg/ml	42,3	42,2	44,2	42,9
BHT-1000 µg/ml	6,6	11,5	11,6	9,9
α-tokoferol -100 µg/ml	6,0	7,2	3,6	5,6
α-tokoferol -1000 µg/ml	26,8	23,4	21,6	23,9
Ferulik asit-100 µg/ml	0,0	0,0	0,0	0,0
Ferulik asit-1000 µg/ml	0,0	0,0	0,0	0,0
Kersetin-100 µg/ml	16,0	15,3	17,8	16,4
Kersetin-1000 µg/ml	3,7	9,1	5,2	6,0

Çizelge 7.65. 5 günlük inkübasyon sonunda, bitki ekstraktları ve saf antioksidanlar için TBARS testi sonucu ölçülen absorbans değerleri

	1.Absorbans	2.Absorbans	3.Absorbans	Ortalama absorbans
ESA	0,323	0,338	0,349	0,337
ESM	0,393	0,394	0,401	0,396
EGA	0,371	0,363	0,377	0,371
EGM	0,404	0,440	0,424	0,422
EGH	0,286	0,317	0,337	0,313
ESH	0,276	0,280	0,279	0,278
BHT-100 µg/ml	0,324	0,336	0,347	0,336
BHT-1000 µg/ml	0,308	0,327	0,322	0,319
α-tokoferol -100 µg/ml	0,328	0,345	0,349	0,341
α-tokoferol -1000 µg/ml	0,312	0,313	0,330	0,318
Ferulik asit-100 µg/ml	0,296	0,297	0,311	0,301
Ferulik asit-1000 µg/ml	0,335	0,352	0,339	0,342
Kersetin-100 µg/ml	0,640	0,665	0,666	0,657
Kersetin-1000 µg/ml	0,585	0,594	0,595	0,592
Kontrol	0,562	0,570	0,579	

Çizelge 7.66. 5 günlük inkübasyon sonunda, bitki ekstraktları ve saf antioksidanlar için TBARS testi sonucu hesaplanan %inhibisyon değerleri

	1. % inhibisyon	2. % inhibisyon	3. % inhibisyon	%inhibisyon ortalama
ESA	45,9	43,5	41,7	43,7
ESM	34,3	34,1	32,9	33,8
EGA	37,9	39,3	36,9	38,0
EGM	32,5	26,5	29,2	29,4
EGH	52,2	47,0	43,6	47,6
ESH	53,9	53,1	53,4	53,5
BHT-100 µg/ml	45,9	43,8	42,0	43,9
BHT-1000 µg/ml	48,5	45,3	46,2	46,7
α-tokoferol -100 µg/ml	45,1	42,3	41,7	43,0
α-tokoferol -1000 µg/ml	47,9	47,6	44,9	46,8
Ferulik asit-100 µg/ml	50,6	50,4	48,0	49,7
Ferulik asit-1000 µg/ml	44,0	41,1	43,3	42,8
Kersetin-100 µg/ml	0,0	0,0	0,0	0,0
Kersetin-1000 µg/ml	2,1	0,7	0,5	1,1



Çizelge 7.67. 6 günlük inkübasyon sonunda, bitki ekstraktları ve saf antioksidanlar için TBARS testi sonucu ölçülen absorbans değerleri

	1.Absorbans	2.Absorbans	3.Absorbans	Ortalama absorbans
ESA	0,338	0,341	0,339	0,339
ESM	0,469	0,477	0,454	0,467
EGA	0,432	0,408	0,439	0,427
EGM	0,368	0,357	0,357	0,361
EGH	0,265	0,241	0,252	0,252
ESH	0,245	0,254	0,271	0,257
BHT-100 µg/ml	0,251	0,248	0,279	0,260
BHT-1000 µg/ml	0,277	0,253	0,258	0,263
α-tokoferol -100 µg/ml	0,237	0,242	0,254	0,244
α-tokoferol -1000 µg/ml	0,405	0,400	0,385	0,397
Ferulik asit-100 µg/ml	0,287	0,271	0,318	0,292
Ferulik asit-1000 µg/ml	0,258	0,242	0,252	0,251
Kersetin-100 µg/ml	0,284	0,294	0,274	0,284
Kersetin-1000 µg/ml	0,385	0,362	0,388	0,378
Kontrol	0,614	0,613	0,602	0,610

Çizelge 7.68. 6 günlük inkübasyon sonunda, bitki ekstraktları ve saf antioksidanlar için TBARS testi sonucu hesaplanan %inhibisyon değerleri

	1. % inhibisyon	2. % inhibisyon	3. % inhibisyon	%inhibisyon ortalama
ESA	44,6	44,1	44,5	44,4
ESM	23,1	21,8	25,5	23,5
EGA	29,2	33,0	27,9	30,0
EGM	39,6	41,5	41,4	40,8
EGH	56,6	60,5	58,7	58,6
ESH	59,9	58,3	55,5	57,9
BHT-100 µg/ml	58,8	59,3	54,2	57,4
BHT-1000 µg/ml	54,6	58,5	57,7	56,9
α-tokoferol -100 µg/ml	61,1	60,3	58,3	59,9
α-tokoferol -1000 µg/ml	33,6	34,4	36,8	35,0
Ferulik asit-100 µg/ml	53,0	55,5	47,8	52,1
Ferulik asit-1000 µg/ml	57,7	60,4	58,7	58,9
Kersetin-100 µg/ml	53,4	51,8	55,1	53,4
Kersetin-1000 µg/ml	36,8	40,6	36,4	37,9

Çizelge 7.69. 7 günlük inkübasyon sonunda, bitki ekstraktları ve saf antioksidanlar için TBARS testi sonucu ölçülen absorbans değerleri

	1.Absorbans	2.Absorbans	3.Absorbans	Ortalama absorbans
ESA	0,456	0,449	0,435	0,447
ESM	0,432	0,477	0,441	0,450
EGA	0,398	0,402	0,402	0,401
EGM	0,354	0,376	0,381	0,370
EGH	0,282	0,281	0,277	0,280
ESH	0,313	0,323	0,298	0,311
BHT-100 µg/ml	0,243	0,245	0,245	0,244
BHT-1000 µg/ml	0,280	0,320	0,299	0,300
α-tokoferol -100 µg/ml	0,260	0,253	0,257	0,257
α-tokoferol -1000 µg/ml	0,339	0,331	0,323	0,331
Ferulik asit-100 µg/ml	0,295	0,280	0,291	0,288
Ferulik asit-1000 µg/ml	0,294	0,287	0,284	0,288
Kersetin-100 µg/ml	0,266	0,264	0,283	0,271
Kersetin-1000 µg/ml	0,326	0,325	0,317	0,323
Kontrol	0,632	0,630	0,635	0,632

Çizelge 7.70. 7 günlük inkübasyon sonunda, bitki ekstraktları ve saf antioksidanlar için TBARS testi sonucu hesaplanan %inhibisyon değerleri

	1. % inhibisyon	2. % inhibisyon	3. % inhibisyon	%inhibisyon ortalama
ESA	27,9	28,9	31,2	29,3
ESM	31,7	24,6	30,2	28,9
EGA	37,1	36,4	36,3	36,6
EGM	44,1	40,5	39,7	41,4
EGH	55,4	55,5	56,2	55,7
ESH	50,5	48,8	52,9	50,7
BHT-100 µg/ml	61,5	61,3	61,2	61,4
BHT-1000 µg/ml	55,6	49,4	52,7	52,6
α-tokoferol -100 µg/ml	58,9	59,9	59,3	59,4
α-tokoferol -1000 µg/ml	46,4	47,6	48,8	47,6
Ferulik asit-100 µg/ml	53,3	55,8	53,9	54,4
Ferulik asit-1000 µg/ml	53,6	54,7	55,1	54,4
Kersetin-100 µg/ml	57,9	58,3	55,2	57,1
Kersetin-1000 µg/ml	48,5	48,7	49,8	49,0

Çizelge 7.71. 8 günlük inkübasyon sonunda, bitki ekstraktları ve saf antioksidanlar için TBARS testi sonucu ölçülen absorbans değerleri

	1.Absorbans	2.Absorbans	3.Absorbans	Ortalama absorbans
ESA	0,463	0,502	0,530	0,498
ESM	0,640	0,609	0,624	0,624
EGA	0,507	0,473	0,518	0,499
EGM	0,633	0,634	0,655	0,641
EGH	0,839	0,807	0,809	0,818
ESH	0,834	0,827	0,850	0,837
BHT-100 µg/ml	0,596	0,572	0,536	0,568
BHT-1000 µg/ml	0,560	0,498	0,512	0,523
α-tokoferol -100 µg/ml	0,789	0,761	0,746	0,765
α-tokoferol -1000 µg/ml	0,710	0,776	0,787	0,758
Ferulik asit-100 µg/ml	0,506	0,475	0,493	0,491
Ferulik asit-1000 µg/ml	0,807	0,829	0,780	0,805
Kersetin-100 µg/ml	0,788	0,757	0,843	0,796
Kersetin-1000 µg/ml	0,992	0,988	1,066	1,015
Kontrol	0,652	0,668	0,662	0,661

Çizelge 7.72. 8 günlük inkübasyon sonunda, bitki ekstraktları ve saf antioksidanlar için TBARS testi sonucu hesaplanan %inhibisyon değerleri

	1. % inhibisyon	2. % inhibisyon	3. % inhibisyon	%inhibisyon ortalama
ESA	29,9	24,0	19,8	24,6
ESM	3,2	7,9	5,6	5,6
EGA	23,2	28,5	21,6	24,4
EGM	4,3	4,0	0,8	3,0
EGH	0,0	0,0	0,0	0,0
ESH	0,0	0,0	0,0	0,0
BHT-100 µg/ml	9,7	13,5	18,9	14,1
BHT-1000 µg/ml	15,2	24,7	22,5	20,8
α-tokoferol -100 µg/ml	0,0	0,0	0,0	0,0
α-tokoferol -1000 µg/ml	0,0	0,0	0,0	0,0
Ferulik asit-100 µg/ml	23,4	28,1	25,5	25,7
Ferulik asit-1000 µg/ml	0,0	0,0	0,0	0,0
Kersetin-100 µg/ml	0,0	0,0	0,0	0,0
Kersetin-1000 µg/ml	0,0	0,0	0,0	0,0

## EK\_9. LDL Oksidasyonu İnhibisyonunun Test Verileri

Çizelge 7.73. LDL testi sonucu, 4 saatlik inkübasyondan sonra elde edilen absorbands değerleri

	1.Absorbans	2.Absorbans	3.Absorbans	Ortalama absorbands
ESA	0,073	0,075	0,074	0,074
ESM	0,066	0,063	0,064	0,064
EGA	0,065	0,068	0,066	0,066
EGM	0,072	0,063	0,067	0,067
BHT	0,067	0,068	0,067	0,067
$\alpha$ -tokoferol	0,060	0,063	0,062	0,062
Ferulik asit	0,067	0,066	0,067	0,069
Kersetin	0,068	0,077	0,069	0,071
Kontrol	0,081	0,093	0,086	0,087

Çizelge 7.74. LDL testi sonucu, 4 saatlik inkübasyondan sonra elde edilen absorbands değerleri

	1. % inhibisyon	2. % inhibisyon	3. % inhibisyon	%inhibisyon ortalama
ESA	16,1	14,2	15,2	15,2
ESM	24,2	27,5	26,5	26,1
EGA	25,5	21,9	24,3	23,9
EGM	16,8	28,0	23,0	22,6
BHT	22,3	21,8	22,8	22,3
$\alpha$ -tokoferol	30,6	27,8	29,1	29,2
Ferulik asit	22,6	23,5	23,0	23,0
Kersetin	22,2	11,2	21,0	18,1

Çizelge 7.75. LDL testi sonucu, 12 saatlik inkübasyondan sonra elde edilen absorbands değerleri

	1.Absorbans	2.Absorbans	3.Absorbans	Ortalama absorbands
ESA	0,081	0,079	0,080	0,080
ESM	0,077	0,078	0,078	0,078
EGA	0,077	0,077	0,077	0,077
EGM	0,079	0,074	0,077	0,077
BHT	0,070	0,071	0,070	0,070
$\alpha$ -tokoferol	0,061	0,060	0,061	0,061
Ferulik asit	0,057	0,059	0,058	0,058
Kersetin	0,079	0,084	0,080	0,081
Kontrol	0,092	0,094	0,095	0,094

Çizelge 7.76. LDL testi sonucu, 12 saatlik inkübasyondan sonra elde edilen absorbands değerleri

	1. % inhibisyon	2. % inhibisyon	3. % inhibisyon	%inhibisyon ortalama
ESA	12,9	15,3	14,2	14,2
ESM	17,6	16,6	16,8	17,0
EGA	17,6	17,3	17,9	17,6
EGM	16,0	20,5	17,8	18,1
BHT	24,8	24,6	25,0	24,8
$\alpha$ - tokoferol	35,2	35,5	34,6	35,1
Ferulik asit	39,2	36,5	38,4	38,0
Kersetin	15,7	10,4	14,0	13,4

Çizelge 7.77. LDL testi sonucu, 36 saatlik inkübasyondan sonra elde edilen absorbands değerleri

	1.Absorbans	2.Absorbans	3.Absorbans	Ortalama absorbands
ESA	0,845	0,862	0,859	0,855
ESM	1,063	1,120	1,114	1,099
EGA	0,912	0,899	0,905	0,905
EGM	0,108	0,106	0,108	0,108
BHT	0,117	0,121	0,119	0,119
$\alpha$ - tokoferol	0,076	0,078	0,077	0,077
Ferulik asit	0,752	0,732	0,743	0,742
Kersetin	0,822	0,833	0,821	0,825
Kontrol	1,431	1,384	1,403	1,406

Çizelge 7.78. LDL testi sonucu, 36 saatlik inkübasyondan sonra elde edilen absorbands değerleri

	1. % inhibisyon	2. % inhibisyon	3. % inhibisyon	%inhibisyon ortalama
ESA	39,9	38,7	38,9	39,1
ESM	24,4	20,3	20,8	21,8
EGA	35,1	36,1	35,6	35,6
EGM	92,3	92,4	92,3	92,3
BHT	91,7	91,4	91,6	91,6
$\alpha$ - tokoferol	94,6	94,4	94,5	94,5
Ferulik asit	46,5	47,9	47,1	47,1
Kersetin	41,5	40,8	41,6	41,3

## ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Almanya'da doğmuştur. İlk, orta ve lise öğrenimini Antalya'da tamamlamıştır. 2004 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nden mezun olmuştur. 2005 yılında kimya sektöründe iş hayatına atılmıştır ve gıda analiz laboratuvarlarında çalışma hayatına devam etmiştir. 2011 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında yüksek lisansa başlamıştır. Temmuz 2012'den beri Akdeniz Üniversitesi Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi'nde çalışmaktadır.