
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

YAŞ VE KURU NANE BİTKİLERİNDE ANTİOKSİDAN AKTİVİTE TAYİNİ

Erdoğan ÇAYIR

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOKİMYA (ECZ) ANABİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

EYLÜL 2014

ERDOĞAN ÇAYIR tarafından hazırlanan "YAŞ VE KURU NANE BİTKİLERİNDE ANTİOKSİDAN AKTİVİTE TAYİNİ ." adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi BİYOKİMYA Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman-Başkan: Prof.Dr. H.Bolkan ŞİMŞEK
Biyokimya, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~ .....

Üye : Prof.Dr. Sevgi AKAYDIN
Biyokimya, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~ .....

Üye : Prof.Dr. Osman ÜSTÜN
Farmakoknozi, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~ .....

Tez Savunma Tarihi: 18/09/2014

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....
Doç. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,

- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,

- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,

- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,

- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Erdoğan ÇAYIR
18.09.2014

YAŞ VE KURU NANE BİTKİLERİNDE ANTİOKSİDAN AKTİVİTE TAYİNİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Erdoğan ÇAYIR

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Eylül 2014

ÖZET

Bu çalışmada nane (*Mentha piperita* L.) bitkisinin antioksidan aktivitesi incelendi. Bu amaçla liyofilize numunenin ve gölgede kurutulmuş numunenin etanol, metanol, su kullanılarak ayrı ayrı ekstreleri hazırlandı. Ekstrelerin Folin-Ciocalteu reaktifi ile toplam fenolik madde içeriği, bakır(II) indirgeme (CUPRAC) metodu ile toplam antioksidan aktivitesi ve DPPH, ABTS, DMPD, süperoksit radikalleri giderme aktivitesi tayin edildi. Elde edilen sonuçlar gallik asit, trolox, askorbik asit, BHT ve BHA standart maddeleriyle karşılaştırılarak değerlendirildi. Fenolik madde tayininde en yüksek verim sulu ekstrelerde görüldü. Gölgede kurutulmuş bitki için 59,91± 24,97 mg/g GAE, liyofilize bitki için 58,20 ±2,34 mg/g GAE fenolik madde tespit edildi. CUPRAC deneyinde elde edilen verilere göre bitkinin iki şeklinin de standart maddelere yakın düzeyde toplam antioksidan kapasiteye sahip olduğu görüldü. DPPH radikal süpürücü etki gölgede kurutulmuş bitkide daha yüksek bulundu. ABTS radikal giderme aktivitesi de gölgede kurutulmuş bitkide daha yüksekti. Her iki numunenin ABTS radikal giderme aktivitesi, etanollü ve metanollü fazda askorbik asitten, sulu fazda BHT' den yüksek bulundu. DMPD radikal giderme aktivitesinin gölgede kurutulmuş bitkide daha fazla olduğu görüldü. Her iki numunenin DMPD radikal giderme aktivitesi, çalışılan tüm fazlarda BHA' dan yüksek bulundu. Süperoksit radikal giderme aktivitesi gölgede kurutulmuş bitkide liyofilize bitkiden daha fazla idi. Her iki numune BHA'dan daha yüksek oranda süperoksit radikal giderme aktivitesi gösterdi.

Bilim Kodu : 727.10
Anahtar Sözcükler : Antioksidan, nane, serbest radikal.
Sayfa Adedi : 87
Danışman : Prof.Dr. Bolkan ŞİMŞEK

ANTIOXIDANT ACTIVITY ASSAY OF FRESH AND DRIED MINT PLANTS

(M. Sc. Thesis)

Erdoğan ÇAYIR

GAZİ UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

September 2014

ABSTRACT

In this study, antioxidant activity of plant peppermint (*Mentha piperita* L.) is examined. To this end, using ethanol, methanol and water lyophilized and air-cured extracts are prepared. For each extract, total phenolic substance by Folin-Ciocalteu reagent and total antioxidant activity via cupper(II) reduction (CUPRAC) methodology and DPPH, ABTS, DMPD, superoxide free radical scavenging activities are assigned. Results are evaluated by comparison of gallic acid, trolox, ascorbic acid, BHT & BHA substances. The highest performance on spesification of total phenolic substance is occured in water extracts. For air-cured plant 59,91± 24,97 mg/g GAE, for lyophilized plant 58,20 ±2,34 mg/g GAE phenolic substance is determined. According to the results of the CUPRAC study, it is found that each state of the plant yields similar level of total antioxidant capacity to standard substances. DPPH radical scavenging activity is found to be higher in air-cured plant. ABTS radical scavenging activity is also higher in air-cured plant. ABTS radical scavenging effect in ethanol and methanol phases is higher than ascorbic acid and in water phase is higher than BHT for each sample of the plant. DMPD radical scavenging activity is found to be more effective in air-cured plant sample. For all the phases examined, DMPD radical scavenging effect is higher than BHA for each of the samples. Superoxide radical scavenging activity is found to be more effctive in air-cured plant rather than lyophilized plant. Both plant samples show higher superoxide radical scavenging activity than BHA.

Science Code : 727.10
Key words : Antioxidant, mint, free radical.
Page Number : 87
Supervisor : Prof.Dr. Bolkan ŞİMŞEK

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinden başlayarak son ana kadar çalışmalarıma yön veren, engin bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, kıymetli danışman hocam ve Anabilim Dalı başkanımız Prof.Dr. Bolkan ŞİMŞEK'e, labratuvar çalışmalarımda yanımda olup desteğini esirgemeyen, pratikliğine ve labratuvar tecrübesine hayran kaldığım ayrıca tezimin tamamlanmasında manevi desteği ile daima beni motive eden Prof.Dr. Sevgi AKAYDIN'a, deneylerim sırasında çok yardımını gördüğüm Araştırma Görevlisi Ece MİSER'e katkılarından dolayı teşekkür ederim. Çalışmalarımda hoşgörülü ve güler yüzlü yaklaşımları ile beni gayretlendiren Biyokimya Anabilim Dalının değerli akademisyenleri ve çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca anneme, babama ve kıymetli meslektaşım sevgili eşim Eczacı Elif ÇAYIR'a manevi desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Bu araştırma, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından desteklenen '02/2012-47' numaralı 'Yaş ve kuru nane örneklerinde antioksidan aktivitenin değerlendirilmesi ' isimli proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLERİN	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xi
RESİMLER LİSTESİ	xiii
KISALTMALARIN LİSTESİ	xiv
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Nane (Mentha sp.)	3
2.1.1. Botanik ve biyokimyasal özellikler	4
2.1.2. Tarihsel süreç	5
2.1.3. Kullanım alanları	6
2.2. Serbest Radikallerin Oluşumu	9
2.2.1 Kovalent bağların homolitik Yıkılması	9
2.2.2. Normal bir molekülün tek bir elektron kaybetmesi	10
2.2.3 Normal bir molekülün tek bir elektron alması	10
2.3. Serbest Radikal Türleri	10
2.3.1. Reaktif oksijen türleri (Reactive Oxygen Species, ROS)	11
2.3.2 Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$)	12
2.3.3. Hidrojen peroksit (H_2O_2)	13
2.3.4. Hidroksil radikali ($^{\bullet}OH$)	13
2.3.5. Singlet oksijen ($^1O_2$)	15
2.4. Serbest Radikal Kaynakları	16
2.4.1. İntrasellüler (Endojen) kaynaklar	16
2.4.2. Eksojen kaynaklar	16
2.5. Serbest Radikallerin Etkileri	17
2.5.1. Lipidler üzerine etki	17
2.5.2. Proteinler üzerine etki	19
2.5.3. DNA üzerine etki	19

2.6. Antioksidanlar 20
2.6.1. Antioksidanların etki mekanizmaları 21
2.6.2. Endojen antioksidanlar 22
2.6.3. Eksojen antioksidanlar 27
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER 37
3.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler 37
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler 38
3.3. Bitkilerin Toplanması ve Kurutulması 38
3.4. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması 38
3.5. Uygulanan Yöntemler 39
3.5.1. Folin Ciocalteu Yöntemi (Toplam Fenol İçeriği Tayin Yöntemi) 39
3.5.2 Bakır(II) İndirgeme Antioksidan Kapasite (CUPRAC) yöntemi 40
3.5.3. DPPH yöntemi 40
3.5.4. ABTS radikali giderme aktivitesi tayini 41
3.5.5. DMPD radikali giderme aktivitesi 42
3.5.6. Süperoksit radikali giderme aktivitesi 42
4. BULGULAR 45
4.1. Folin Ciocalteu Yöntemi (Total Fenol İçeriği Tayini) 45
4.2. Bakır(II) İndirgeme Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi 46
4.3. DPPH Yöntemi 50
4.4. ABTS Radikali Giderme Aktivitesi 53
4.5. DMPD Radikali Giderme Aktivitesi 57
4.6. Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi 60
5. TARTIŞMA 65
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 73
KAYNAKLAR 75
ÖZGEÇMİŞ 87

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge		Sayfa
Çizelge 2.1.	Bazı serbest radikaller ve sembolleri	10
Çizelge 2.2.	Endojen ve ekzojen antioksidanlar	21
Çizelge 4.1.	Folin Ciocalteu yönteminde sulu ekstrelerin konsantrasyon-Gallik asit eşdeğerleri	46
Çizelge 4.2.	Cuprac yöntemine göre etanollü çalışmalarda elde edilen ortalama absorbanslar ve standart sapma değerleri	47
Çizelge 4.3.	Cuprac yöntemine göre metanollü çalışmalarda elde edilen ortalama absorbanslar ve standart sapma değerleri	48
Çizelge 4.4.	Cuprac yöntemine göre sulu ortamdaki çalışmalarda elde edilen ortalama absorbanslar ve standart sapma değerleri	49
Çizelge 4.5.	DPPH yöntemine göre etanollü çalışmalarda elde edilen % inhibisyon ve standart sapma değerleri	50
Çizelge 4.6.	DPPH yöntemine göre metanollü çalışmalarda elde edilen % inhibisyon ve standart sapma değerleri	51
Çizelge 4.7.	DPPH yöntemine göre sulu ortamdaki çalışmalarda elde edilen % inhibisyon ve standart sapma değerleri	52
Çizelge 4.8.	ABTS yöntemine göre etanollü çalışmalarda elde edilen % inhibisyon ve standart sapma değerleri	54
Çizelge 4.9.	ABTS yöntemine göre metanollü çalışmalarda elde edilen % inhibisyon ve standart sapma değerleri	55
Çizelge 4.10.	ABTS yöntemine göre sulu ortamdaki çalışmalarda elde edilen % inhibisyon ve standart sapma değerleri	56
Çizelge 4.11.	DMPD yöntemine göre etanollü çalışmalarda elde edilen % inhibisyon ve standart sapma değerleri	57
Çizelge 4.12.	DMPD yöntemine göre metanollü çalışmalarda elde edilen % inhibisyon ve standart sapma değerleri	58
Çizelge 4.13.	DMPD yöntemine göre sulu ortamdaki çalışmalarda elde edilen % inhibisyon ve standart sapma değerleri	59
Çizelge 4.14.	Süperoksit yöntemine göre etanollü çalışmalarda elde edilen % inhibisyon ve standart sapma değerleri	61

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.15. Süperoksit yöntemine göre metanollü çalışmalarda elde edilen % inhibisyon ve standart sapma değerleri 62

Çizelge 4.16. Süperoksit yöntemine göre sulu ortamdaki çalışmalarda elde edilen % inhibisyon ve standart sapma değerleri 63

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil		Sayfa
Şekil 2.1	Lipid Peroksidasyonu	18
Şekil 2.2.	Lipid peroksidasyonunun temel reaksiyonları	18
Şekil 2.3.	Serbest Radikallerin oluşumu ve enzimatik detoksifikasyonu	22
Şekil 2.4.	Melatonin	26
Şekil 2.5.	Bütillenmiş hidroksitoluen	28
Şekil 2.6.	Bütillenmiş hidroksianisol	28
Şekil 2.7.	Tersiyer Bütil hidrokinon	29
Şekil 2.8.	Propilgallat	29
Şekil 2.9.	D- α –tokoferol	30
Şekil 2.10.	β-karoten	31
Şekil 2.11.	Askorbik asit ve radikal formları arası dönüşüm	32
Şekil 2.12.	Temel Flavonoit Yapısı	34
Şekil 2.13.	Gallik Asit	34
Şekil 2.14.	Klorojenik Asit	35
Şekil 2.15.	Kafeik Asit	35
Şekil 4.1.	Folin Ciocalteu yöntemine göre Gallik asit kalibrasyon grafiği	45
Şekil 4.2.	Folin Ciocalteu yöntemine göre sulu nane ekstrelerinin konsantrasyon-GAE grafiği	46
Şekil 4.3.	Cuprac yöntemine göre etanollü çalışmalarda elde edilen ortalama absorbanslara ait grafik	47
Şekil 4.4.	Cuprac yöntemine göre metanollü çalışmalarda elde edilen ortalama absorbanslara ait grafik	48
Şekil 4.5.	Cuprac yöntemine göre sulu ortamdaki çalışmalarda elde edilen ortalama absorbanslara ait grafik	49
Şekil 4.6.	DPPH yöntemine göre etanollü çalışmalarda elde edilen % inhibisyon değerlerine ait grafik	51
Şekil 4.7.	DPPH yöntemine göre metanollü çalışmalarda elde edilen % inhibisyon değerlerine ait grafik	52
Şekil 4.8.	DPPH yöntemine göre sulu ortamdaki çalışmalarda elde edilen % inhibisyon değerlerine ait grafik	53

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.9. ABTS yöntemine göre etanollü çalışmalarda elde edilen % inhibisyon değerlerine ait grafik 54
Şekil 4.10. ABTS yöntemine göre metanollü çalışmalarda elde edilen % inhibisyon değerlerine ait grafik 55
Şekil 4.11. ABTS yöntemine göre sulu ortamdaki çalışmalarda elde edilen % inhibisyon değerlerine ait grafik 56
Şekil 4.12. DMPD yöntemine göre etanollü çalışmalarda elde edilen % inhibisyon değerlerine ait grafik 58
Şekil 4.13. DMPD yöntemine göre metanollü çalışmalarda elde edilen % inhibisyon değerlerine ait grafik 59
Şekil 4.14. DMPD yöntemine göre sulu ortamdaki çalışmalarda elde edilen % inhibisyon değerlerine ait grafik 60
Şekil 4.15. Süperoksit yöntemine göre etanollü çalışmalarda elde edilen % inhibisyon değerlerine ait grafik 61
Şekil 4.16. Süperoksit yöntemine göre metanollü çalışmalarda elde edilen % inhibisyon değerlerine ait grafik 62
Şekil 4.17. Süperoksit yöntemine göre sulu ortamdaki çalışmalarda elde edilen % inhibisyon değerlerine ait grafik 63

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim		**Sayfa**
Resim 2.1.	Mentha piperita yaprakları	4
Resim 2.2.	Mentha piperita çiçek ve yaprakları	4

KISALTMALARIN LİSTESİ

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar	Açıklama
ABTS	2,2´-Azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)
$ABTS^{\bullet+}$	2,2´-Azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) radikali
BHA	Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş hidroksitoluen
CAT	Katalaz
DMPD	N,N-Dimethil-fenilendiamin dihidroklorür
$DMPD^{\bullet+}$	N,N-Dimethil-fenilendiamin dihidroklorür radikali
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
$DPPH^{\bullet}$	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikali
DPPH-H	İndirgenmiş 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
FCR	Folin Ciocalteu Reaktifi
GAE	Gallik asit eşdeğeri
GK	Gölgede kurutulmuş bitki örneği
GPX	Glutatyon Peroksidaz
GR	Glutatyon Redüktaz
GST	Glutatyon-S-Transferaz
$L^{\bullet}$	Lipid radikali
LY	Liyoflizasyon uygulanmış bitki örneği
MDA	Malondialdehid
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADH	İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid
NBT	Nitroblue tetrazolium
NBT^{2+}	Yükseltgenmiş nitroblue tetrazolium
PG	Propilgallat
PMS	Fenazin metasülfat
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit Dismutaz

Kısaltmalar	Açıklama
TBHQ	Tersiyer Bütil hidrokinon
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

1.GİRİŞ

Canlı organizmada çeşitli reaksiyonlar sonucu oluşan, dış orbitallerinde paylaşılmamış elektron içeren kimyasal türler bulabilecekleri herhangi bir yapı ile etkileşime girerek, elektron alır ya da ona bir elektron verir. Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine girip onların yapısını bozan bu türlere "serbest radikaller", "oksidan moleküller" ya da "reaktif oksijen türleri" denir. Serbest radikallerde paylaşılmamış elektron, atom veya molekülün üst kısmına konulan bir nokta ile belirtilir [1].

Serbest radikaller endojen ve ekzojen kaynaklardan ortaya çıkabilmektedirler. Serbest radikallerin öncelikle kanser, miyokard enfarktüsü ve enflamatuvar hastalıklar gibi pek çok hastalığa neden olduğu günümüzde ortaya konulmuş ve antioksidanların günlük diyette kullanımının proflaktik etki göstererek bu hastalıkların oluşum riskini azalttığı gösterilmiştir [2,3]. Oksidasyonu önleyen veya geciktirebilen bu maddelere antioksidanlar, bu olaya antioksidan savunma denir [4].

Antioksidan savunmada oksidanların organizmadaki düzeylerini artırıcı etkenlerin bilinmesi, risk faktörlerinin iyi belirlenmesi ve bunlardan uzak durulması ilk yapılması gereken girişim olmalıdır. İkincil prensip ROS(Reaktif Oksijen Türleri)' larla tetiklenen biyokimyasal reaksiyonların bir ya da birkaç basamakta kırılması üçüncül olarak ise oluşan mediyatörlerle aktive olan enflamatuvar hücrelerin lezyon yerine hücumunun ve orada aşırı birikiminin önlenmesidir. Oksidan moleküllerle mücadelede üzerinde durulması gereken esas girişim ise belirli düzeyi aşmış oksidanlara direkt olarak etki edip onları inaktif hale getiren antioksidanlardır. Antioksidan savunma elemanları hücre içi ve hücre dışı ortamda farklıdırlar. İnsanda bellibaşlı hücre içi antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleridir. SOD'un yapısında bakır, çinko ve manganez; GPx'de ise selenyum iyonu bulunduğundan bu enzimler metaloenzim olarak da adlandırılırlar. Hücre içi ortamın aksine hücre dışı ortamda da antioksidan savunma unsurlarına E vitamini, C vitamini, beta karoten ve fenolik bileşikler örnek gösterilebilir [5,6].

Fenolik bileşikler içerisinde en fazla bulunanlar flavonoitler, fenolik asitler ve fenolik terpenlerdir [7]. Fenolik bileşiklerin antioksidan etkisi, serbest radikalleri temizleme, metal iyonlarla bileşik oluşturma (metal şelatlama) ve singlet (tekli) oksijen oluşumunu

engelleme veya azaltma gibi özelliklerinden kaynaklanmaktadır [8,9]. Bu bileşikler, lipitlerin ve diğer biyomoleküllerin (protein, karbohidrat, nükleik asitler) serbest radikallerce okside olmalarını engellemek için aromatik halkalarındaki hidroksil gruplarda bulunan hidrojeni verebilmektedirler [10]. Flavonoitler ve diğer fenolik bileşikler çoğunlukla bitkinin yaprak, çiçek ve odunsu kısımlarında bulunmaktadır [11].

Söz konusu fenolik yapılar, aromatik bitkiler sınıfında bulunan nane (*Mentha piperita*)'nin bileşenleri arasında bulunmaktadır. Nane bitkisinin antioksidan özelliğe sahip olduğu literatürde bildirilmiş olup, bu özelliğin başlıca fenolik yapılardan ileri geldiği vurgulanmıştır. Ancak bir bütün olarak, değişik birkaç yöntem ile nanenin kuru bitki numunesinde ve liyofilize edilmiş şeklinde antioksidan kapasite tayini ile ilgili bilgiye rastlanmamıştır. Bu nedenle, bu tez kapsamında; yiyecek olarak tüketildiği gibi geleneksel olarak çesitli hastalıkların tedavisinde kullanılan nane bitkisinin, gölgede kurutulması suretiyle kuru bitki numunesi, liyofilizatörde suyunun uçurulması suretiyle de yaş bitki numunesi hazırlanarak çeşitli yöntemlerle antioksidan kapasitelerinin tespit edilmesi ve kurutma yöntemlerine göre antioksidan kapasitelerinde fark olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Tıbbi ve aromatik bitkiler, hastalıkları önlemek, sağlığı sürdürmek veya hastalıkları iyileştirmek için ilaç olarak kullanılan bitkilerdir. Tıbbi ve aromatik bitkilerin standart hale gelmiş bir gruplandırılması bulunmamakla birlikte, genellikle familyalarına, içerdikleri etken maddelere, tüketim ve kullanımlarına, yararlanılan organlarına ve farmakolojik etkilerine göre gruplandırılabilirler. Ancak, en yaygın olarak kullanılanı etken maddelerine göre yapılan gruplandırmadır. Bilinen aromatik bitkilerin bazılarına nane, biberiye (Rosmarinus officinalis), adaçayı (Salvia officinalis), lavanta (Lavandula angustifolia), kekik (Thymus vulgaris), mercanköşk/kekik(Origanum hirtum), oğulotu (Melissa officinalis) örnek gösterilebilir.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre yaklaşık 20.000 bitki tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır. Dünyada bitkisel droglar için başlıca ticaret merkezleri Almanya (Hamburg), ABD (New York) ve Hong Kong'dur[12,13]. Türkiye coğrafi konumu, iklim ve bitki çeşitliliği, tarımsal potansiyeli, geniş yüzölçümü sayesinde tıbbi ve aromatik bitkiler ticaretinde önde gelen ülkelerden biridir. Türkiye'nin bu önemi; bitkisel ilaç, bitki kimyasalları, gıda ve katkı maddeleri, kozmetik ve parfümeri sanayilerinin hammaddesini oluşturan pek çok bitkisel ürünü veren bitkilerin ülkemiz florasında bulunmasından kaynaklanmaktadır. Bu bitkiler daha çok doğadan toplanarak pazarlanmaktadır. Tıbbi ve aromatik bitkiler ağırlıklı olarak Ege, Marmara, Akdeniz, Doğu Karadeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinden toplanmaktadır. Türkiye'nin ihraç ettiği önemli tıbbi ve aromatik bitkiler kekik, defne yaprağı, kimyon, anason, rezene tohumu, ardıç kabuğu, mahlep, çemen, biberiye, meyan kökü, sumak, adaçayı ve ıhlamur çiçeği ve nanedir[14].

2.1. Nane (Mentha sp.)

Çalışmamızda Çankırı Ilgaz ilçesinden 950 metre rakımda yetişmiş nane(*Mentha piperita* L.) kullanılmıştır. Eski çağlardan beri yiyeceklere stabilitesini ve tadını iyileştirmek için pek çok aromatik bitki ve baharat ilave edilir, bunlar zararsız doğal antioksidan maddelerdir. Nane Türk mutfağında da yemek ve salatalara tat ve koku vermek için kullanılan aromatik bitkilerdendir (Resim 2.1)(Resim 2.2).



Resim 2.1. *Mentha piperita* yaprakları



Resim 2.2. *Mentha piperita* çiçek ve yaprakları

2.1.1. Botanik ve biyokimyasal özellikler

Nane Labiatae (Lamiaceae) (Ballıbabagiller) familyasına ait otsu bir bitkidir. Salgı tüyleri taşır ve uçucu yağ içerir. Gövde 4 köşeli, yapraklar çoğu zaman basit, bazan parçalı ve dekusat dizilişlidir; çiçekler her nodusta vertisillastrum durumundadır. Korolla aktinomorf olup 4 lopludur;4 stamen eşit boydadır.

Linoleik, linolenik ve palmitik asit gibi yağ asitleri ile mentol, menton ve izonmenton gibi çeşitli uçucu bileşikler, β-karoten, klorofil, tokoferoller, askorbik asit, folik asit, tiyamin, riboflavin ve niasin, kalsiyum, potasyum, sodyum, magnezyum, fosfor ve demir nane yapraklarında bulunan başlıca unsurlardır [15,16].

Mentha piperita (nane, İngiliz nanesi) bir kültür bitkisidir, sulak yerleri sever, sürünücü yapıdaki stolonlarıyla çok kolay ürer, çok yıllıktır. Boyu 50-100 cm'e ulaşabilen bitkinin leylak rengi çiçekleri vardır. Yaprakları kodeks ve farmakopelerde kayıtlıdır. Folia *Menthae piperitae* T.K. (Nane Yaprağı) 3-4 cm boyunda, ovat-lanseolat, tepede akut, tabanı obtus veya trunkat, saplı, kenarları serrat, koyu yeşil renkli ve kokuludur. Yaprakları % 0.8-4 oranında uçucu yağ ile flavonlar, rozmarinik asit, kafeik asit, klorojenik asit ve triterpenik maddeler taşımaktadır. Uçucu yağı; % 45-50 mentol, % 5-20 mentol esterleri (mentil asetat ve mentil izovalerat) ile daha az miktarlarda %10-30 menton, %2-5 mentofuran ökaliptol, (-) limonen ve (-)-karyofillen içermektedir [17].

Mentha spicata (M.viridis), spearmint esansı adı verilen uçucu yağı nedeniyle önemli bir türdür. Özel kokulu bu esans mentol taşımaz. Bitkinin çok iyi bir rozmarinik asit kaynağı olduğu tespit edilmiştir. Uçucu yağının ana bileşeni %42-67 oranında karvondur. Diş macunlarına, ağız sularına ve çikletlere koku vermek için kullanılır.[17]

Mentha arvensis, özellikle Japonya'da yetiştirilen türdür. Bu bitkiden elde edilen uçucu yağ japon nane esansı adıyla tanınır ve mentol bakımından en zengin olan yağdır, % 80-90 mentol içermesi nedeniyle mentol kaynağı olarak kullanılır [17] .

Mentha pulegium (yarpuz, filisgin), ülkemizde nemli ve sulak arazilerde çok miktarda yetişen, yaprakları tüylü bir bitkidir. Yapraklardan elde edilen uçucu yağı pulegon bakımından zengindir. Pulegon toksik bir bileşiktir. Yarpuz, mentol taşımaz. Türkiye'de kültürü yapılıp nane adı altında satılan türler, *Mentha rotundifolia* ve *Mentha longifolia*'dır. Bunların yapraklarında mentol yoktur, başlıca piperiton bulunur [17-21].

2.1.2. Tarihsel süreç

Tarih boyunca yaygın şekilde antiseptik, spazmolitik ve karminatif olarak kullanım bulmuş bir takson olan Mentha'nın bir türü 1696'da Ray tarafından tedavi amaçlı kullanılabileceği belirtilerek Mentha palustris olarak adlandırılmıştır. Daha sonra 1753'de Linne aynı türü

Mentha piperita L. şeklinde tanımlamıştır. Özellikleri 1705'de Dale ve 1721'de London Pharmacopoeia'de tanımlanmıştır. Avrupa ve Asya'da yayılış gösteren *Mentha piperita* 20. yy başlarında Alman göçmenler tarafından Amerika kıtasına taşınmış ve burada geniş yayılış alanları bulmuştur [18].

Anadolu'da 7 kadar Mentha türü olduğu bilinmektdir. [19] Türk Standaları Enstitüsü tarafından 3481 sayılı taze nane standardı ile 10361-ISO 3033 sayılı nane yağı standardı yapılmıştır. Çok polimorfik bir yapıya sahip olmasından ve melezleşmeye yatkın olmasından dolayı kemovaryabilitesi oldukça fazladır. Kromozom sayıları oldukça farklılık gösteren Mentha'nın vegetatif üreme yeteneğinin de katkısıyla dünyada 30 kadar subgenusunun bulunduğu bilinmektedir. Subgenuslar arası melezleşme nadir dahi olsa aynı subgenus içinde çok sayıda melezlerin olduğu belirlenmiştir [18]. Ekolojik koşullardan da oldukça etkilendiği bilinen Mentha taksonlarının ıslah edilmiş tohumları ile ilgili sitotaksonomik ve kemotaksonomik çalışmalar mevcuttur [20]. Mentha cinsinin sistematiği form zenginliğinden dolayı tamamlanamamıştır. Doğal taxonları içermeyen, kültür formları üzerinden, menton içerenler ve karvon içerenler olarak genel tasnifler yapılmıştır [17]. Melezleşme yatkınlığına bir örnek olarak farmakopelerde kayıtlı *Mentha piperita* L. verilebilir. Bu tür *Mentha longifolia* ve *Mentha rotundifolia* nın melezi olan *Mentha spicata* ile *Mentha aquatica*'nın melezidir.

2.1.3. Kullanım alanları

Uçucu yağının değerli olması nedeniyle nane türlerinin birçok ülkede ticari olarak tarımı yapılmaktadır. Ülkemizde ise bahçelerde, evlerin önünde ve tarlalarda yetiştirilen nane bitkisi tıbbi açıdan spazm ve gaz giderici, midevi, serinletici, uyarıcı ve diüretik etkilere sahip olup, nane yaprakları baharat ve bitki çayları şeklinde de çok yaygın bir sekilde kullanılmaktadır. Nane yağı ilaç, gıda, içki ve kozmetik sanayiinde geniş bir uygulama alanı olan mentolun en zengin doğal kaynağıdır [19].

<u>Antiseptik</u>

Yapılan çalışmalarda nane yağı ve bileşenlerinin antibakteriyel aktiviteleri tespit edilmiş, bu etkinin yağın içeriğindeki neomentol gibi terpenik bileşiklerinden kaynaklandığı bildirilmiştir[19,22].

Nane yağının *Helicobacter pylori*, *Salmonella enteritidis* ve metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarına karşı bakterisit etki gösterdiği, bu aktivitenin temel nedeninin l-limonen, karvon, mirsen gibi terpenik bileşiklerden kaynaklandığı bildirilmiştir[23].

Disk Difüzyon yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada nane yağının 21 bakteri ve 7 maya kökeni üzerindeki antimikrobiyal etkinliği test edilmiş olup, Pseudomonas aeruginosa hariç test edilen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkinlik sağladığı gösterilmiştir [24]. *Mentha piperita*' nın uçucu yağının gram pozitif mikroorganizmalar üzerine daha aktif iken *Mentha spicata*' dan elde edilen uçucu yağın gram negatif bakteriler üzerinde daha etkili olduğu tespit edilmiştir [25]. Nane yağının tüm bu antibakteryel aktivitesi, yağın lipofilik özelliği nedeniyle biyolojik zarlar üzerinde etkili olmasından kaynaklanmaktadır [26]. Mikroorganizmaların etkili olduğu nefes yolları enfeksiyonlarında kullanıldığı, öksürüğü geçirdiği, bel soğukluğu tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir [27].

Nane ekstrelerinin aynı zamanda mantara karşı etkinliği gösterilmiştir. Nane yağının patojenik mantarlardan Pythium türlerinin büyümesinin inhibe edilmesinde etkili olduğu bulunmuştur. İnsan patojenlerinden *Candia albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum* ve *Sporothrix schenckii* karşı nanenin antifungal aktivitesi tespit edilmiştir [28].

Herpes Simpleks Virus (HSV) tip-1, tip-2 ve Asiklovir'e dirençli HSV-1 ile çeşitli düzeylerde enfekte hücreler nane ekstresi ile muamele edilmiş ve sonuçta plak azaltma nötralizasyon yöntemine göre hücrelerin nötralize olduğu in vitro olarak gösterilmiştir [29].

Analjezik

Halk ilacı olarak kulanılan *Mentha piperita* L. genellikle kurutulmuş nane yapraklarının sıcak suda kısa bir süre bekletilerek uçucu yağlarının suya geçmesi sonucunda çay şeklinde içilir. Kuvvetli içeriğinden dolayı bazı yörelerde buna nane ruhu da denir. Diş ağrısına iyi geldiğine inanılmaktadır [19,21]. Bitkinin yapraklarından elde edilen yağ, etanol ile muamele edilerek haricen kullanılmak suretiyle baş ağrısı duyarlılığında bir azalma

yaparak önemli bir analjezik etkiye sahiptir [30]. Migren ağrılarının giderilmesinde ağrı başlangıcında masaj şeklinde şakaklara uygulanmaktadır. [31,32].

Radyoprotektif etki

Radyoterapi kanser tedavisinde önemli bir tedavi yöntemi olarak günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak uygulanan radyasyonun sağlam hücrelere olan olumsuz etkileri nedeniyle sınırlı dozlarda uygulama yapılmaktadır. Bazı tıbbi aromatik bitkiler söz konusu radyosyonun zararlı etkilerine karşı koruyucudurlar. *Mentha piperita* ve *Mentha arvensis*'in, fareleri gama ışınına bağlı hastalık ve ölüme karşı koruduğu gösterilmiştir. Bu etkilerini muhtemelen serbest radikal temizleyici antioksidan etkileri ile sağladıkları düşünülmektedir [33].

Uyarıcı etki

Limbik sistem (Hippocampus, amygdala) endokrin bezi ve vejetatif sinir sistemine iletilerle duyguları ve hafızayı harekete geçirir. Limon, nane, kuşdili uçucu yağları limbik sistemi uyarmada kullanılır [34].

Bitkinin bileşenlerinden olan mentolun burun tıkanıklığı ve öksürük gibi soğuk algınlığı ve grip semptomlarını hafifletmek için yaygın olarak kullanılmasına rağmen, ayrıca yapılan bir çalışmada mentolün; burun tıkanıklığını azaltmadığı ancak burun içinde bulunan ve trigeminal sinirlerce innerve edilen duyusal sinir uçlarını uyardığı böylece kolay nefes alma hissini geliştirdiği tespit edilmiştir [35-37].

Antienflamatuvar etki

Nane türlerinin antienflamatuvar etkilerinin olduğu çeşitli çalışmalarda ortaya konulmuştur. Antienflamatuar etkinlik büyük ölçüde in vivo antioksidan modüle kabiliyetinden kaynaklanmaktadır [38]. Bu antienflamatuvar etkinin, nanenin makrofajlardan nitrik oksit salgılanmasını azaltması, bu nedenle de enflamatuar hastalık sürecinde yararlı olduğu gösterilen α-TNF pro-enflamatuarsitokinlerin ekspresyonunun azalmasını sağladığı şeklinde düşünülmektedir [39]. Nane yağı içeren enterik kaplı kapsüller iltihabi barsak sendromu ve spastik kolon tedavi etmek için kullanılır. Uçucu

yağının içeriğindeki L-mentol bronşiyal astım, alerjik rinit ve kolit gibi kronik enflamatuar hastalıkların tedavisinde yararlıdır [40].

Hepatoprotektif etki

Nane türlerinin farmakolojik olarak hepatoprotektif etkisi olduğu ratlarda yapılan bazı çalışmalarda gösterilmiş, ratlarda karbon tetra klorür ile oluşturulan karaciğer hasarı sonrasında değişik konsantrasyondaki nane ekstreleri uygulanmış ve sonuç kuvvetli hepatoprotektif olan silimarinle karşılaştırılmıştır. Sonuçta farmakolojik olarak nane yapraklarının güçlü hepatoprotektif etkiye sahip olduğu ve toksik maddelerin yan etkilerini azalttığı tespit edilmiştir [41].

Diğer etkiler

Nanenin yapraklarının hekzan ekstresinde antihelmintik [42], yağının ise spazm giderici etkisinin olduğu gösterilmiştir [43]. Mentol ve nanenin sıçan, atriyal ve papiller kaslarında kalsiyum kanal blokajı yaptığı, tavşanlarda ise topik uygulama sonucu kulak kan damarlarının damar genişlemesine yol açtığı gösterilmiştir [44,45]. Nane yapraklarının hekzanlı ekstrelerinin antihelmentik etki gösterdiği tespit edilmiştir [46].

2.2. Serbest Radikallerin Oluşumu

Normalde, hücrelerde en büyük serbest radikal kaynağı elektron transport zincirinde elektron sızıntısıdır. Yaşam döngümüz içinde kimyasal ve fiziksel olarak gerçekleşen olaylar sebebiyle devamlılık gösteren serbest radikal oluşumu söz konusudur. Temelde üç mekanizma ile serbest radikal oluşumu açıklanmaktadır.

2.2.1 Kovalent bağların homolitik Yıkılması

Yüksek sıcaklık (500- 600 ºC) ve enerjisi yüksek elektromanyetik dalgalar kovalent bağların kırılmasına sebep olurlar. Bölünme sonrasında her bir atomda ortaklanmamış elektron kalır. Oluşan bu yeni yapı radikalik özellik taşımaktadır.

2.2.2. Normal bir molekülün tek bir elektron kaybetmesi

Radikal karakteri olmayan normal bir molekülden elektronun kaybı ile bağı oluşturan iki elektronun da bir atomda kalmasıdır. Bu olaya heterolitik yıkılma da denilebilir.

2.2.3 Normal bir molekülün tek bir elektron alması

Radikal karakteri olmayan bir molekülün dışarıdan bir elektron alması ile yapısında ortaklanmamış elektron oluşması sonucu radikal oluşabilir.

2.3. Serbest Radikal Türleri

Hayvanlarda ve insanlarda fizyolojik ve patolojik koşullarda oluşan en önemli serbest radikaller azottan ve oksijenden oluşanlardır. En bilinen serbest radikallere örnekler Çizelge 2.1 de görülmektedir [47].

Çizelge 2.1. Bazı serbest radikaller ve sembolleri

Adı	**Formülü**	**Tanımı**
Hidrojen atomu	$H^{\bullet}$	En basit serbest radikal
Süperoksit	$O2^{\bullet -}$	Oksijen merkezli radikal, seçimli reaktif
Hidrojen peroksit	H_2O_2	Reaktivitesi en düşük, moleküler hasar yeteneği düşük.
Hidroksil	$^{\bullet}OH$	En fazla reaktif oksijen radikali. İnsan vücudundaki tüm moleküllere saldırır.
Singlet oksijen	$^1O_2$	Oksijenin güçlü oksidatif formu
Tiyil	$RS^{\bullet}$	Kükürt üzerinde eşleşmemiş elektron bulunduran türlerin genel adı
Peroksil, Alkoksil	$RO_2^{\bullet}$ $RO^{\bullet}$	Organik peroksitlerin yıkımı sırasında oluşan oksijen merkezli radikaller.
Nitrik oksit	$NO^{\bullet}$	L-arginin amino asidinden in vivo koşullarda üretilir.
Azotdioksit	$NO_2^{\bullet}$	$NO^{\bullet}$'nun O_2 ile reaksiyonunda oluşur. Kirli hava, sigara dumanında vb. bulunur.

2.3.1. Reaktif oksijen türleri (Reactive Oxygen Species, ROS)

Organizmada pek çok türde ROS oluşabilmektedir. Ancak en sık olarak lipid yapılarla oluşur. Doymamış yağ asitlerinin alil grubundan bir hidrojen çıkarsa lipid radikali meydana gelir. Oluşan lipid oksijen ile reaksiyona girer ve lipid peroksil radikalini oluşturur. Lipid peroksi radikali diğer lipidlerle zincir reaksiyonu başlatır ve lipid hidroperoksitler oluşur [48]. Lipid radikaller yüksek derecede sitotoksik ürünlere de dönüşebilir. Hidrojen peroksit hücreler üzerinde bazı fizyolojik rollere sahip olabilir, fakat çiftlenmemiş elektrona sahip olmadığından radikal olarak adlandırılamaz. Ancak reaktif oksijen türleri, süperoksit gibi radikaller, ayrıca hidrojen peroksit gibi radikal olmayanlar için ortak olarak kullanılan bir terimdir [49]. Reaktif Oksijen Türleri aşağıda gösterilmiştir.

$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\bullet -}$ (süperoksit anyon radikali)

$+ e^- \longrightarrow H_2O_2$ (hidrojenperoksit))

$+ e^- \longrightarrow {}^{\bullet}OH$ **(** hidroksil radikali)

$+ e^- \longrightarrow H_2O$ (su)

Radikaller

Süperoksit radikal ($O_2^{\bullet -}$)
Hidroksil radikal ($^{\bullet}OH$)
Alkoksil radikal (LO^-)
Peroksil radikal (LOO^-)

Radikal olmayanlar

Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Lipid hidroperoksit (LOOH)
Hipoklorik asit (HOCl)

Singlet oksijen

2.3.2 Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$)

Oksijen molekülü, dış orbitalinde çiftlenmemiş elektron taşıyorsa "Süperoksit Radikali" olarak adlandırılır [5]. Organizmada en kolay oluşan serbest radikaldir. Hemen hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu, serbest süperoksit radikal anyonu meydana gelir.

$$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\bullet -}$$

Süperoksit radikali, ksenobiyotikler gibi ajanlarla, ksantin oksidaz'ın rol aldığı enzimatik tepkimelerle, bazı oksidaz tepkimelerinde, fagositoz sırasında, elektron transport sistemi sırasında oluşur [50]. Süperoksit radikalinin birikimi, diğer radikallerin oluşumuna da neden olduğu için önemlidir [51,52].

Süperoksit radikali düşük pH değerlerinde daha reaktiftir ve oksidan olan perhidroksil radikalini ($HO_2^{\bullet}$) oluşturmak üzere protonlanır. Süperoksit radikali ve perhidroksi radikali birbiriyle reaksiyona girince biri yükseltgenir, diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonu sonucu H_2O_2 oluşur [53].

$$HO_2^{\bullet} + O_2^{\bullet -} + H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

Süperoksidin fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit ile birleşmesi sonucu reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitrit meydana gelir. Bu şekilde nitrik oksitin normal etkisi inhibe olur, ayrıca peroksinitritler direkt proteinlere etki ederler [53].

$$O_2^{\bullet -} + NO^{\bullet} \longrightarrow ONOO^-$$

İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu süperoksidi meydana getirebilir. Süperoksit radikalinin H_2O_2 kaynağı olmasının yanında bir önemi de geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Ayrıca hücresel koşullarda üretilen süperoksit hem oksitleyici hem de indirgeyici olarak davranabilir. Örneğin; süperoksit radikali mitokondri'deki elektron taşıma sisteminde indirgeyici olarak davranarak bir elektron kaybeder ve oksijene dönüşür.

Adrenalinin oksidasyonunda ise oksidan olarak davranarak bir elektron alır ve H_2O_2'ye indirgenir [53].

2.3.3. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Oksijen molekülünün etrafındaki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksitin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Oluşan yapı iki hidrojen atomuyla birleşerek hidrojen peroksiti (H_2O_2) meydana getirir.

$$O_2 + 2\,e^- + 2\,H^+ \longrightarrow H_2O_2 \quad \text{veya} \quad 2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

Hidrojen peroksitin biyolojik sistemlerde esas oluşum şekli süperoksitin dismutasyonu olup bu reaksiyona süperoksit dismutaz (SOD) enzimi aracılık eder [50]. Çiftlenmemiş elektrona sahip olmadığı için radikalik özellik göstermez. Hidrojen peroksit uzun ömürlü bir oksidan olup biyolojik membranları aşabilir bunun nedeni asidik ve nötral ortamlarda net yük taşımamasıdır.

Hidrojen peroksit (H_2O_2), biyolojik önemi olan moleküllerin çoğu ile spesifik olarak reaksiyona girmemekle birlikte $^{\bullet}OH$ radikali gibi daha reaktif ve toksik oksidanların oluşumunda bir ön madde olarak rol oynamaktadır. Organizmada hem grubundaki demir ile reaksiyona girerek yapıdaki demiri güçlü bir oksidan form olan ferril demir ve perferril demir'e dönüştürür ki bu da hücre zarında lipit peroksidasyonu reaksiyonlarını başlatarak, hücresel hasara neden olabilir [54].

2.3.4. Hidroksil radikali ($^{\bullet}OH$)

Hidroksil radikali, son derece güçlü bir oksidan molekül olup en reaktif radikal olarak bilinmektedir. Yarılanma ömrü çok kısadır, oluştuğu yerde büyük hasara neden olur. Biyolojik sistemlerde karşılaştığı tüm biyomoleküller ile reaksiyona girebilir [55]. Tioller, yağ asitleri, proteinler, nükleik asitler gibi çeşitli moleküllerden bir proton koparark yeni radikallerin oluşmasına yol açar [56,57]. Hidroksil radikali canlılarda iki yolla meydana gelir [58].

Geçiş metal iyonlarının etkisi

Demir ve bakır gibi geçiş metal iyonları canlı sistemde serbest radikal oluşturan güçlü birer oksidatif katalist olarak görev yapmaktadırlar. Özellikle demir oksidatif reaksiyonları teşvik etmede daha etkili bir metaldir [59].

Süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet -}$), Fe^{+2} katalizörlüğünde H_2O ile reaksiyona girdiği zaman zararlı $^{\bullet}OH$ radikallerini oluşturan "Haber-Weiss reaksiyonu" meydana gelmektedir [60].

$$O_2^{\bullet -} + H_2O \xrightarrow{Fe^{+2}} O_2 + OH^- + {}^{\bullet}OH \quad \textit{(Haber-Weiss reaksiyonu)}$$

$$^{\bullet}OH + RH \longrightarrow R^{\bullet} + H_2O \quad \textbf{\textit{(Zarar)}}$$

Demir iyonları, hidroperoksitlerin zararlı hidroksil radikaline dönüştüğü "Fenton-tip reaksiyonları" da katalizlemektedir. Hidroksil radikali ise oldukça reaktif bir tür olup, hızlı bir şekilde lipid radikallerini oluşturarak lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonlarını başlatmaktadır [61].

$$O_2^- + Fe^{+3} \longrightarrow Fe^{+2} + O_2$$

$$Fe^{+2} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{+3} + {}^{\bullet}OH + OH^- \quad \textit{(Fenton Reaksiyonu)}$$

Beyin yüksek oksijen kullanımının yanında aynı zamanda yüksek düzeylerde Fe ve diğer divalent katyonları içermekte ve oluşan Fenton-tip reaksiyonlar reaktif oksijen türleri üreterek nöronlara zarar vermektedir. Beyin oksidatif zararlara karşı dokuyu zayıflatan çoklu doymamış yağ asitlerini de yüksek düzeyde içermektedir. Oksidatif strese maruz kalan beyin dokusunda oluşan hasarların beyin iskemisi, hafıza bulanıklığı, Alzheimer, Parkinson gibi birçok sinirsel bozuklukta önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır [62].

İyonlaştırıcı radyasyonun etkisi

Sulu ortamda su moleküllerinin homolitik yıkım ile iyonlaşması sonucu gerçekleşir. Bu reaksiyon femtosaniye içinde gerçekleşir. Meydana gelen hidroksil radikali canlılarda yüksek enerjili dalgaların toksik etkilerinden sorumludur [61].

$$H_2O + \text{Enerji} \longrightarrow H^{\bullet} + {}^{\bullet}OH$$

2.3.5. Singlet oksijen ($^1O_2$)

Moleküler oksijen (O_2), iki kovalent bağ yapmasına rağmen, molekülün paramanyetik özellikte olması eşleşmemiş elektron içerdiğini gösterir. Dış orbitallerinde bulunan iki elektron spinleri aynı yönde ve farklı orbitallerde iken molekül minimum enerji seviyesindedir [63]. Enerji absorbsiyonu ile oksijenin paylaşılmamış en dış elektronları spinlerini değiştirebilir [52].

Moleküler oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle singlet oksijen oluşur. Singlet oksijen ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal değildir. Oksijenin ortaklanmamış elektronları paralel spinli olduğundan oksijendeki spin kısıtlaması singlet oksijende yoktur ve oldukça reaktif bir oksijen bileşiğidir [53].

Singlet oksijen **($^1O_2$)**, lipid peroksidasyonunu başlatmak üzere çoklu doymamış yağ asitlerinden bir hidrojen iyonunu koparabilir. Bu yüzden, biyolojik sistemlerde $^1O_2$ membran lipidlerinin peroksidasyonunda önemli bir role sahiptir. Ayrıca bu reaktif oksijen türünün DNA hasarı oluşturduğu ve mutajenik etkilerinin bulunduğu da gösterilmiştir. In vivo olarak singlet oksijen üretimine neden olan tepkimeler aşağıda verilmektedir [1,52].

Süperoksit anyon radikalinin kendiliğinden dismutasyonu ile singlet oksijen oluşabilir.

$$H_2O + 5/2\ O_2^{\bullet -} \xrightarrow{2H^+} {}^1O_2 + 2\ H_2O_2$$

Haber-Weiss tepkimesi sonucunda singlet oksijen oluşabilir.

$$O_2^{\bullet -} + H_2O_2 \longrightarrow {}^1O_2 + {}^{\bullet}OH + OH^-$$

Süperoksit anyon radikallerinin diaçil peroksitlerle verdiği tepkime ile singlet oksijen oluşur.

$$2\ O_2^{\bullet -} + RCOOCR \longrightarrow {}^1O_2 + 2\ RCOO^-$$

Süperoksit anyon ve hidroksil radikalinin etkileşmesi sonucunda singlet oksijen oluşur [64].

$$O_2^{\bullet -} + {}^{\bullet}OH \longrightarrow {}^1O_2 + OH^-$$

2.4. Serbest Radikal Kaynakları

2.4.1. İntrasellüler (Endojen) kaynaklar

Mitokondri elektron transport sistemindeki sızıntılar [47].

Endoplazmik retikulum ve nükleer membranlarda sitokromların oksidasyonu
Tiyoller, katekolaminler, tetrahidrofolatlar, flavinler gibi bazı küçük moleküllerin otooksidasyonu

Ksantin oksidaz, aldehit oksidaz, flavoprotein dehidrogenaz, monoamino oksidaz, siklooksigenaz, lipooksigenaz, triptofan dioksigenaz, indolamin dioksigenaz gibi birçok enzimin katalitik işlemleri [65,66].

Fagositik enflamasyon hücreleri (nötrofil, monosit, makrofaj, eosinofil) ile endotelyal hücrelerde gerekleşen oksidatif işlemler sonucu salgılanma

Hemoraji, travma, iskemi gibi oksidatif stres oluşturan durumlar

2.4.2. Eksojen kaynaklar

Stres sonucu katekoamin düzeyinin artması ve katekolamin oksidasyonu

Radyoaktivite

İlaçlar, antineoplastik ajanlar, inhale anestezikler

Bağımlılık yapıcı maddeler uyuşturucular, alkol

Çevresel etkenler, pestisitler, hava kirliliği, sigara dumanı, poliaromatik hidrokarbonlar [66].

2.5. Serbest Radikallerin Etkileri

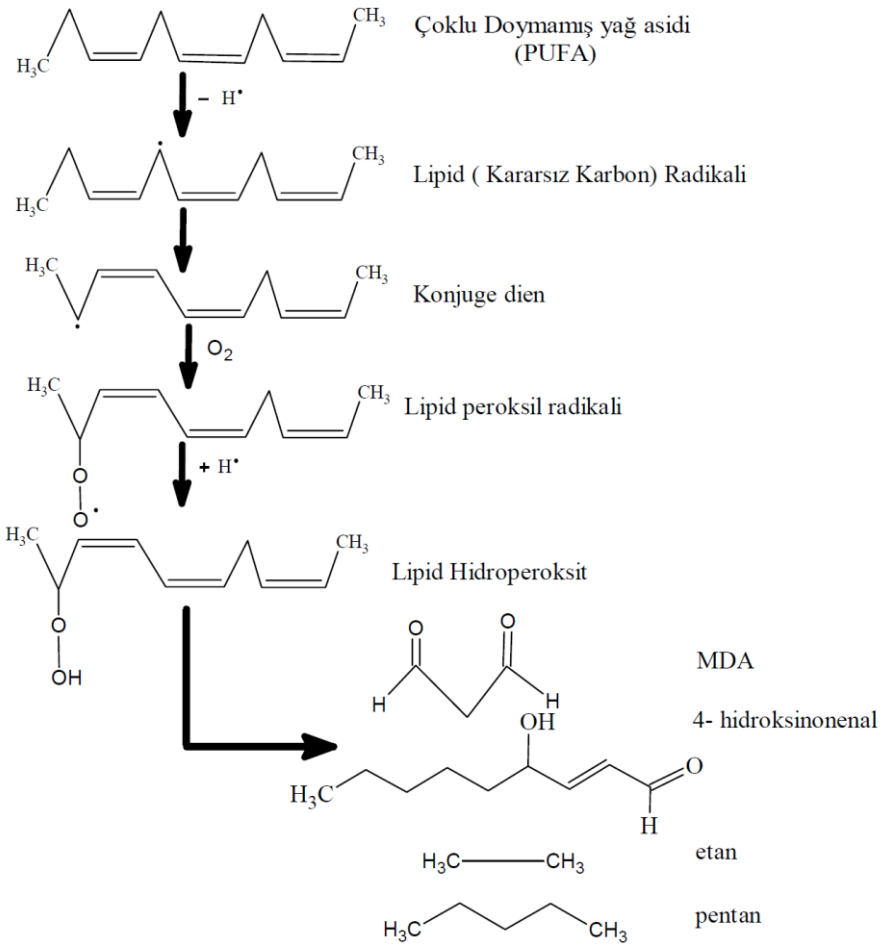
Serbest radikaller ile vücudun antioksidan savunma sistemleri arasındaki dengenin radikal lehine değişmesiyle meydana gelen lipid peroksidasyonu sonucu hücre zarının tahrip olması ve doku hasarı oluşması oksidatif stres olarak tanımlanmaktadır [67].

Serbest radikaller zararsız hale getirilmediklerinde organizmada protein, lipid, DNA ve nükleotid koenzimler gibi birçok hücresel makromolekül ve biyolojik materyal üzerinde zararlı etki oluşturmaktadırlar [68]. İnsanlarda kanser, atheroskleroz, hipertansiyon, diyabet, nörolojik sistemde dejeneratif olaylar sonrası Alzheimer ve Parkinson, solunum sisteminde kistik fibrozis ve astım gibi hastalıklar ile hücre yıpranması, yaşlanma, kıkırdak iltihabı, Down sendromu oluşumuna serbest radikallerin katkı yaptığı bilinmektedir [69].

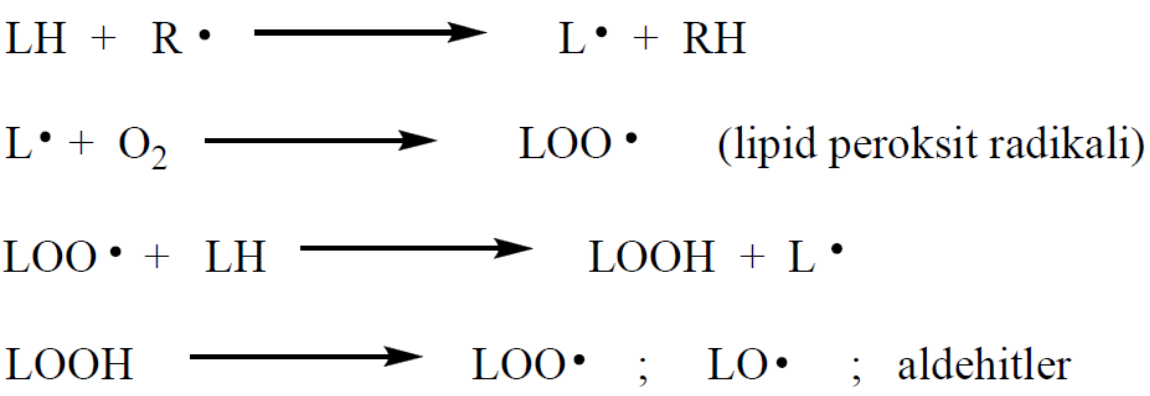
2.5.1. Lipidler üzerine etki

Lipid Peroksidasyonu; serbest radikaller tarafından başlatılan ve membran yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan böylece membran lipid yapısını değiştirerek hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan kimyasal bir olaydır [70,71].

Doymamış yağ asidi özellikle $^{\bullet}OH$ etkisiyle hidrojen ve kendi üzerinde birer elektron kalacak şekilde parçalanır ve karbon merkezli lipid radikali (L•) oluşturur. Bu reaksiyonun devamında $L^{\bullet}$ ' radikali de oksijenle reaksiyona girerek lipid peroksil radikalini ($LOO^{\bullet}$) oluşturur. Lipid peroksil radikali de diğer doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girer. Böylece zincirleme bir reaksiyon başlamış olur. Ayrıca lipid peroksiller ortamdaki hidrojen atomları ile de reaksiyona girerek lipid hidroperoksidleri (LOOH) oluştururlar. ROS başlatıcılı lipid peroksidasyonu sonrasında lipid peroksitler malondialdehid (MDA) ve 4-hidroksi nonenal gibi yıkım ürünlerine dönüşürler [72-74].



Şekil 2.1 Lipid Peroksidasyonu

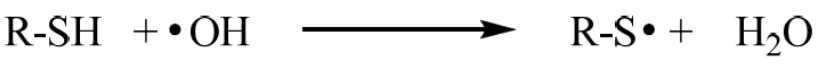


Şekil 2.2. Lipid peroksidasyonunun temel reaksiyonları

Reaksiyon sonucunda biyolojik olarak aktif olan bileşikler ya hücre düzeyinde metobolize edilir veya ilk hedef bölgesinden hücreye difüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. ROS başlangıçlı bu olay membran yapısına direkt ve oluşturduğu reaktif aldehitlerle diğer hücre bileşenlerine indirekt olarak zarar veren geri dönüşümsüz bir olaydır. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan MDA, lipid peroksidasyon seviyesinin göstergesi olarak kabul edilmektedir [75].

2.5.2. Proteinler üzerine etki

Proteinler üzerinde oluşan oksidasyonlar yapı değişimine neden olacağından, bu oksidasyonlar proteinleri yıkıma götürür. Oksidatif stresin proteinlerin oksidasyonuna neden olduğu belirlenmiştir[76]. Özellikle Triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi doymamış bağ içeren ve metiyonin, sistein gibi kükürt bulunduran aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden çabuk etkilenir [77].



Bu reaksiyonlar sonucu albümin ve immunoglobin G (IgG) gibi fazla sayıda disülfit bağı bulunduran proteinlerin tersiyer yapısı bozulur. Hemoglobinin ferro demiri (Fe^{+2}) süperoksit ve diğer oksitleyici ajanlarla oksitlenmeye duyarlı olup, bunun sonucunda oksijen taşımayan methemoglobin oluşur[65].

Lipit peroksidasyonunun bazı oksidatif aşamaları ve ürünleri proteinlerde karbonil oluşumuna yol açabilmektedir [78,79]. Oksidasyona uğramış bu hasarlı proteinlerin, fibroblastlarda, eritrositlerde ve beyin dokusunda birikimi yaşla birlikte artmaktadır. İleri yaşlarda daha sık görülen, Parkinson ve Alzheimer gibi hastalıklarda, fazla miktarlarda biriktikleri de gösterilmiştir [80,81].

2.5.3. DNA üzerine etki

Oksidatif stres değişik mekanizmalar ile tümör oluşumunda rol oynar. DNA hasarına, onarılamazsa mutasyonlara, tek veya çift zincir kırıklarına, kromozom kırıkları ve kopan parçaların değişik yerlere yapışmalarına neden olur [82,83].

Mitokondrial DNA'nın daha fazla oksidatif hasara uğradığı belirlenmiştir. Çünkü mitokondri elektron transport sistemi nedeniyle bu radikallerin oluşum bölgesidir. Ayrıca çekirdek zarı gibi DNA'sını koruyan bir kılıf yoktur. Bu nedenle oksidatif hasara karşı mitokondrial genom çok hassastır ve bu hasar zamanla bu genomda bozulmalara yol açar [84]. Günümüzde yaklaşık 100 kadar oksidatif DNA baz hasarı tanımlanmıştır [85].

2.6. Antioksidanlar

Antioksidanlar, oksidanların biyolojik hedeflerle reaksiyona girmesini, radikal zincir reaksiyonları olusturmalarını ya da oksijenin oldukça reaktif ürünlere dönüşmesini önleyerek serbest radikallerin vereceği hasarı en aza indirmeye çalışırlar [86].

Antioksidanlar, doğal (endojen kaynaklı) ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabilir (Çizelge 2.2.) ya da serbest radikalin meydana gelişini önleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler şeklinde de ikiye ayrılabilirler. Ayrıca enzim ve enzim olmayanlar olarakta sınıflandırılırlar [53].

Çizelge 2.2. Endojen ve ekzojen antioksidanlar

ENDOJEN ANTİOKSİDANLAR	**EKSOJEN ANTİOKSİDANLAR**	
Enzimatik Antioksidanlar	**Ksantin Oksidaz İnhibitörleri**	
Süperoksit Dismutaz (SOD)	Tungsten	
Katalaz	Allopürinol	
Glutatyon Peroksidaz (GPX)	Oksipürinol	
Glutatyon Redüktaz(GR)	Folik Asit	
Glutatyon-S-Transferaz(GST)	Pterin Aldehit	
Sitokrom Oksidaz		
Nonenzimatik Antioksidanlar	**NADPH Oksidaz İnhibitörleri**	
Melatonin	Adenozin	
Ürik asit	Lokal Anestezikler	
Albümin	Kalsiyum kanal blokerleri	
Haptaglobulin	Non Steroidal Antienflamatuvar ilaçlar	
Transferin	Cetiedil	
Laktoferin	Difenilen iodonium	
Metionin	Trolox	
Myoglobin	**Gıda Antioksidanları**	
Glutatyon		
Ferritin	Butillenmiş hidroksitoluen(BHT)	
Oksipurinol	Butillenmiş hidroksianisol(BHA)	
Ubikinon	Propilgallat(PG)	
Mannitol	Tersiyer Bütil hidrokinon(TBHQ)	
lipoik asit	**Bitkisel Antioksidanlar**	
Seruloplazmin		
Hemopeksin	Beta Karoten	Vitamin C
Sistein	Vitamin E	Fenolik Bileşikler

2.6.1. Antioksidanların etki mekanizmaları

Antioksidanlar, serbest radikallerinin oluşumunu engellemek ve oluşmuş bulunan radikalleri işlevsiz hale getirmek suretiyle iki şekilde etki gösterir.

Serbest radikal oluşumunun engellenmesi

Başlatıcı reaktif türevlerini uzaklaştırıcı etki

Oksijen uzaklaştırıcı veya konsantrasyonunu azaltıcı etki

Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırıcı etki[58]

Serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi

Scavenging (temizleme) etkisi: Oksidanları zayıf bir moleküle çevirme şeklinde olan bu etki enzimler tarafından yapılır.

Quencher (baskılama) etkisi: Oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme şeklinde olan bu etki vitaminler ve flavonoitler tarafından yapılır.

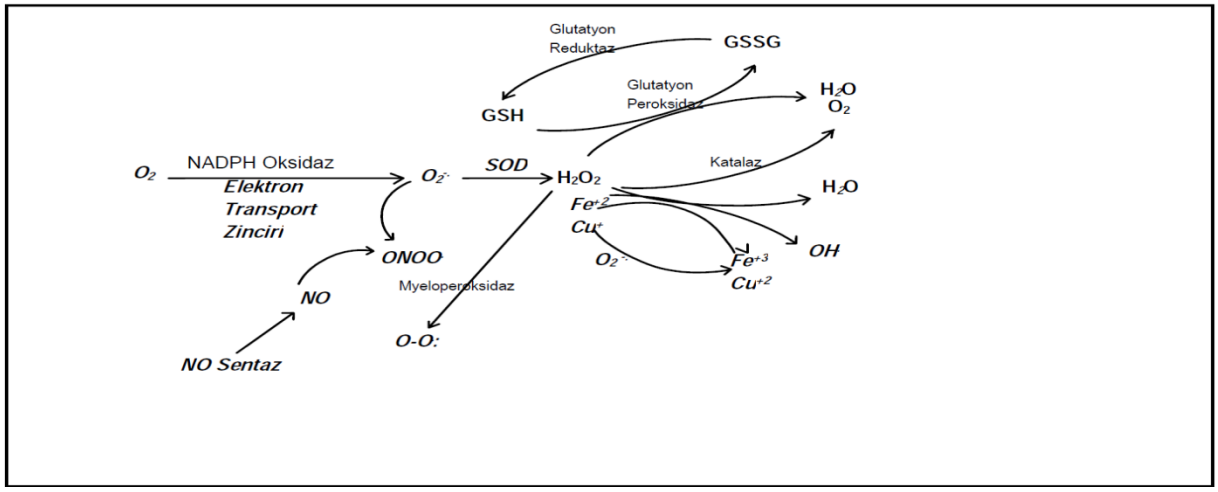
Onarma etkisi

Zincir koparma etkisi: Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleyen ağır metaller şeklinde olan bu etki hemoglobin, seruloplazmin ve E vitamini tarafından yapılır[87].

2.6.2. Endojen antioksidanlar

Enzim yapısındaki antioksidanlar

Oksidatif toksik ara ürünleri metabolize ederler. Sinerjik çalışırla**r.**



Şekil 2.3. Serbest Radikallerin oluşumu ve enzimatik detoksifikasyonu

Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD, oksijenden ilk oluşan reaktif ürün olan süperoksit anyonun moleküler oksijene ve daha az reaktif bir ürün olan hidrojen perokside dönüşünü katalize eden metalloenzimdir. SOD doğada bilinen en etkili antioksidan maddelerin başında gelmektedir. İnsan vücudunda üç çesit SOD vardır. Bunlar mitokondride lokalize Mn-SOD, sitozolde lokalize Cu-Zn SOD ve Cu içeren ve plazmadaki süperoksid radikallerini metabolize eden vasküler endotele bağlı Cu-SOD'dir[54,88].

CuZn-SOD

Süperoksit anyonu, enzimde Cu^{+2} ve bir arginin rezidüsünün guanido grubuna bağlanır. Bu bağlanma sonucu süperoksitten bir elektron Cu^{+2} ye geçerken Cu^{+} ve moleküler oksijen meydana gelir. Başka bir süperoksit anyonu Cu^{+} dan bir elektron ,bağlanma ortağından ise iki proton alarak hidrojen peroksiti oluşururken enzim ilk haline geri dönmüş olur [89].

$$\text{Enzim-}Cu^{2+} + O_2^{\cdot-} \longrightarrow \text{Enzim-}Cu^{+} + O_2$$

$$\text{Enzim-}Cu^{+} + O_2^{\cdot-} + 2H^{+} \longrightarrow \text{Enzim-}Cu^{2+} + H_2O_2$$

Cu-Zn SOD, ısıya, proteazların yıkımına ve üre'nin denetürasyonuna karşı oldukça dayanıklıdır. Zn^{2+} katalitik döngüde fonksiyon göstermez fakat enzimi kararlı hale getirir [90].

Mn-SOD

$$Mn^{3+} + O_2^{\cdot-} \rightleftharpoons [Mn^{3+}\text{-}O_2^{\cdot-}] \longrightarrow Mn^{2+} + O_2$$

$$Mn^{2+} + O_2^{\cdot-} \rightleftharpoons [Mn^{2+}\text{-}O_2^{\cdot-}] + 2H^{+} \longrightarrow Mn^{3+} + H_2O_2$$

Mn-SOD kimyasallarla veya ısıyla denatürasyona daha fazla duyarlıdır [91].
Tüm SOD enzimleri aynı net reaksiyonu vermekte olup katalitikçe de süperoksitlerin uzaklaştırılmasına spesifik görünmektedir [92].

$$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^{+} \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

Katalaz (CAT)

Katalaz, SOD enzimi faaliyeti sonucunda meydana gelen toksik hidrojen peroksiti (H_2O_2), su ve oksijene dönüştürmektedir [60].

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{Katalaz}} 2H_2O + O_2$$

Peroksizomlarda lokalize, her biri bir prostetik grup olan ve yapısında Fe^{+3} bulunduran dört alt birimden oluşan bir hemproteindir. Tüm hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunur. Katalaz aktivitesi eritrosit, karaciğer ve böbrekte yoğundur.

H_2O_2 oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda indirgeyici aktivite gösterir.
H_2O_2 oluşum hızının düşük olduğu veya yüksek konsantrasyonlarda elektron vericisi bulunduğu durumlarda peroksitatif aktivite gösterir [65,75].

Glutatyon Peroksidaz (GPX)

Glutatyon peroksidaz, her birinde selenosistein içeren 4 alt birimden oluşur. Hidrojen peroksit ve büyük moleküllü lipid hidroperoksitleri indirger. GPx, aşırı hidrojen peroksit varlığında glutatyonun (GSH) okside glutatyona (GSSG, glutatyon disülfür) oksidasyonunu katalize ederken, hidrojen peroksiti de suya dönüştürür. Böylece membran lipidlerini ve hemoglobini oksidatif strese karşı korur [93,94].

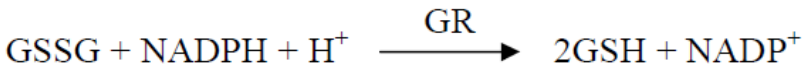
$$H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{GPx} GSSG + 2H_2O$$

Glutatyon peroksidaz, E vitamini yetersiz olursa membranı peroksidasyona karşı korur. Eritrositlerde en kuvvetli antioksidandır. Glutatyon peroksidaz yetersizliği selenyum eksikliği sonucu olabilir. Çünkü selenyum bu enzimin bir integral parçasıdır [72,95,96].

Glutatyon Redüktaz (GR)

Reaksiyonlar sonucunda oksitlenmiş glutatyon (GSSG) konsantrasyonundaki artış oksidatif stresin bir göstergesidir. Antioksidan savunmanın etkinliğini sürdürebilmesi için oksitlenmiş glutatyonun tekrar indirgenmiş şekle (G-SH) dönüşmesi gerekir [97].

GR prostetik grubu flavin adenin dinükleotid (FAD) olan, dimerik yapıda sitozol ve mitokodride bulunan bir enzimdir. NADPH varlığında oksitlenmiş glutatyonun indirgenme reaksiyonunu katalizler [47].



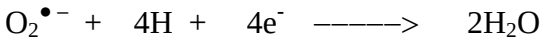
Glutatyon-S-Transferaz(GST)

GST her biri iki alt birimden oluşmuş bir enzim ailesidir. Katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahiptirler. Antioksidan savunma mekanizması açısından önemleri ksenobiyotiklerin biyotransformasyonu ve detoksifikasyonunda önemli rol almaları ve başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlere karşı selenyumdan bağımsız GSH-Px aktivitesi göstermeleridir [53].



Sitokrom Oksidaz

Mitokondrilerde solunum zincirinin en son basamağında yer alan ve bakır içeren bir enzimdir. Solunum zincirindeki görevini sürdürürken süperoksit radikalini detoksifiye ederek H_2O'ya dönüşümünü sağlar. Ancak süperoksit radikallerinin oluşumu çoğu kez enzimin kapasitesini aşar ve diğer enzimlerin devreye girmesi ile süperoksitin zararlı etkileri önlenir [98].

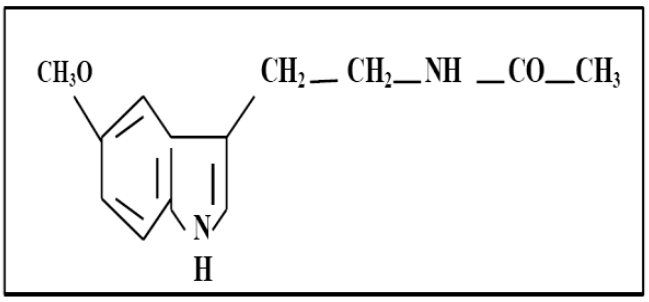


<u>Enzim olmayan antioksidanlar</u>

Melatonin (MEL)

Melatonin, bilinen en reaktif radikal olan hidroksil radikali ile reaksiyona girerek indolil katyon radikalini oluşturur. Bu radikal de ortamdaki süperoksit radikalini tutarak etkisizleştirir.

MEL'in antioksidan özelliği, yapısında bulunan pirol halkasından kaynaklanmaktadır. Radikal varlığında pirol halkasının yıkımı; yüksek reaktiviteye sahip N1-asetil-N2-formil-5-metoksikinüramin (AFMK) metabolitinin oluşumu ile sonuçlanmaktadır. MEL'in bu metabolitinin radikal tutucu aktivite gösterdiği belirlenmiştir [99,100].



Şekil 2.4. Melatonin

MEL'in hem hidrofilik hem de lipofilik özelliği olduğundan, organizmada çok geniş alanda antioksidan etki gösterebilmektedir. Hücre zarını, organelleri ve çekirdeği etkin bir şekilde serbest radikal hasarından koruyabilmektedir. Radikallerle membrandan önce temasa geçerek onları detoksifiye eder ve hücre membranı korur. MEL varlığında, mitokondriyal solunum zincirinden kaynaklanan $O2^{-\bullet}$, $^{\bullet}OH$ ve H_2O_2 gibi radikallerin üretimi de azalmaktadır. Çekirdeğe kadar ulaşabilme özelliği ile DNA'yı oksidatif hasara karşı koruması melatonini diğer antioksidanlardan üstün kılar. [101]. Ayrıca diğer antioksidanların aksine, çok yüksek dozlarda (300 mg/gün) ve 5 yıl gibi uzun süre kullanımda bile, MEL'in toksik bir etki göstermemesi diğer bir üstün özelliğidir [102].

Enzim olmayan diğer endojen antioksidanlar

Transferrin, serbest demir iyonlarını bağlayarak fenton reaksiyonunu inhibe eder.

Laktoferrin, düşük pH'lı ortamlardaki demir iyonlarını bağlar.

Haptoglobinler, hemoglobin bağlayarak hem' in salınmasını önler.

Hemopeksin, Ortamdaki serbest hem proteinlerini bağlayarak oksidasyonu inhibe eder.

Albumin, LOOH ve HOCL radikalini toplar.

*Serüloplazmin, s*üperoksit radikalini nötralize eder, bakır iyonlarını bağlar.

Bilirubin, önemli bir peroksit radikali toplayıcısıdır.

Ürik Asit, hidroksil, süperoksit, peroksi radikali ve singlet oksijeni temizler. Genelde metal bağlayıcı olarak çalışır [103,104].

2.6.3. Eksojen antioksidanlar

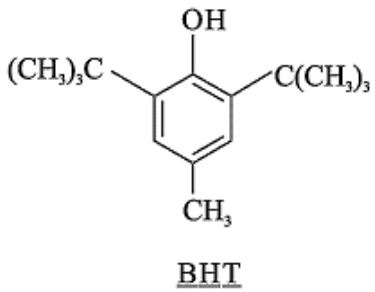
Sentetik antioksidanlar

Lipid peroksidasyonunu kontrol etmek için butil hidroksitoluen (BHT), butil hidroksianisol (BHA), tersiyer butil hidroksikinon (TBHQ) ve propil galatlar(PG) gibi sentetik antioksidan maddeler gıdalarda kullanılmaktadır. Sentetik antioksidanlar ucuz olmaları, yüksek düzeyde stabilite ve güçlü antioksidan aktivite göstermelerinden dolayı tercih edilmektedirler [105].

Sentetik antioksidanların son yıllarda kanserli hücre oluşumuna etkisi olduğu belirlenmiştir. Bu yüzden bazı ülkelerde kullanımı sınırlanırken bazılarında yasaklanmıştır. Örneğin TBHQ Amerika'da serbest olmasına rağmen Avrupa Birliği ülkelerinde yasaklanmıştır [106].

Butil hidroksitoluen (BHT)

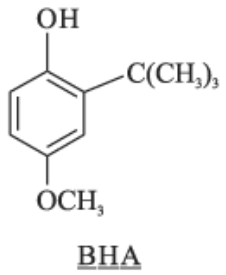
BHT beyaz kristal görünümündedir. Yağda tamamıyla eriyip suda erimez Sentetik yolla elde edilen bu antioksidan önceleri petrol ürünlerinin oksidatif gelişmesini önlemek için kullanılmıştır. Uçuculuğundan dolayı BHT ambalajlama materyallerine katılarak da kullanılabilmektedir. Buradan gıdaya nüfuz eder. Gıdalarda en fazla kullanılan antioksidan olduğu bilinmektedir. BHT ile BHA birlikte kullanıldıkları zaman sinerjik bir etki oluşmaktadır. Fındık, ceviz gibi kabuklu ürünlerdeki oksidatif reaksiyonu engellemede bu antioksidan kombinasyonu çok iyi sonuç vermektedir [107-110].



Şekil 2.5. Bütillenmiş hidroksitoluen

Butil hidroksianisol (BHA)

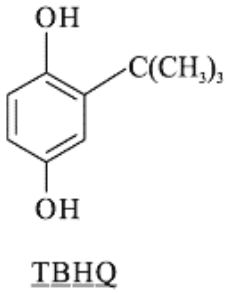
Kimyasal olarak iki izomerin kanşımı olup (3-tertiary butyl-4-hıdroksianisol ve 2-tertiary butyl-4-hidroksianisol) beyaz mumsu parçacıklar halindedir. BHA'nın gıda içinde taşınması BHT'den daha iyidir. BHA hayvansal yağlara nazaran bitkisel yağların oksidasyonunu önlemede daha etkilidir. BHA özellikle uçucu yağların renk ve tat-kokuların korunmasında faydalıdır. Bilhassa kısa zincirli yağ asitlerinin oksidasyonunu (Hindistan cevizi ve palm çekirdeği yağları) kontrol etmede etkilidir. Genellikle tahıl ürünlerinde kullanılır [107,109,111,112].



Şekil 2.6. Bütillenmiş hidroksianisol

Tersiyer butil hidroksikinon (TBHQ)

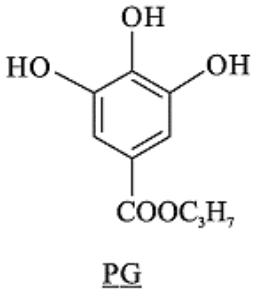
Bej renkli bir toz olan TBHQ, katı ve sıvı yağlarda erir. Demir ve bakır iyonlan ile kompleksler meydana getirmez. Yağları oksidasyona karşı korumak için en iyi antioksidan olarak bilinmektedir. Kızartma işlemi bitmiş ürünleri iyi bir şekilde korumaktadır. Tek başına veya BHA ve/veya BHT ile kombine olarak kullanımı daha uygundur. Sitrik asit gibi bir şelat ile karıştırıldığında stabilize edici özellik kazanmaktadır. TBHQ Fındık ürünleri ve şekerlemede kullanılmaktadır [107,111,113].



Şekil 2.7. Tersiyer Bütil hidrokinon

Propil galatlar(PG)

Gallik asidin en çok kullanılan esterleridir. PG beyaz kristal tozdur. Suda çok az çözünür. Erime noktası 148 °C olup bu derecenin üzerinde etkisini kaybeder. Gallik asit ile propil alkolün esterifikasyonu ve takiben fazla alkolün distilasyonla uzaklaştırılmasıyla elde edilir. TBHQ'dan daha az etkilidir. Sitrik asit, demir ve bakır iyonlannın kataliz ettiği prooksidatıf reaksiyonlan önleyebilmektedir. BHA ve BHT ile iyi sinerjist etki oluşturmaktadır. Çeşitli et ürünleri, sosis ve salamlar ve baharatlarda kullanılmaktadır [107,110,114].



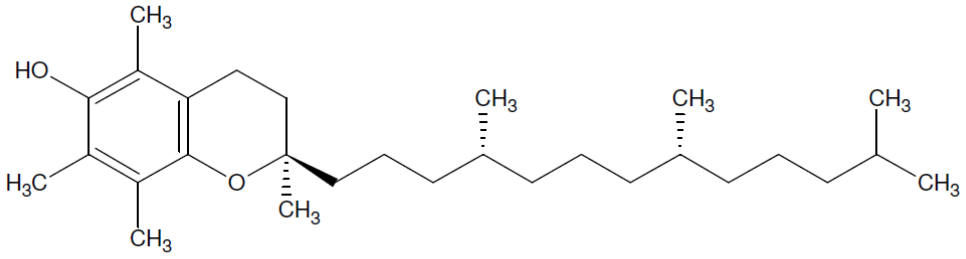
Şekil 2.8. Propilgallat

Bitkisel Antioksidanlar

Vitamin E

Yağda çözünen vitamin olduğu için hem sellüler hem de subsellüler membranlarda ve lipoproteinlerde bulunur [95,115]. E vitamini α, β, γ, δ tokoferolleri ve tokotrienolleri içeren grubu kapsamaktadır. Özellikle D- α -tokoferol, en yüksek biyolojik aktiviteye sahip tokoferoldür [116,117]. Yağ bakımından zengin bitkiler, E vitaminin temel doğal kaynaklarıdır. Hindistan cevizi yağı, kakao yağı, soya fasülyesi, arpa, buğday, ayçiçeği,

yer fıstığı, ceviz, susam ve zeytinyağında bulunur [118,119]. Minimum gereksinim 12 mg/gün olup yüksek doz α-tokoferol ve askorbat kombinasyonunun insan derisinde ultraviyolenin oluşturduğu immunsupresyonu azalttığı gösterilmiştir [120].



Şekil 2.9. D- α –tokoferol

Vitamin E, bilinen yüksek lipofilik özelliğinden dolayı önemli bir hücre içi antioksidandır. Yağda çözünmüş olarak bulunur, yağ sindirimi sırasında açığa çıkar ve herhangi bir taşıyıcı protein olmadan pasif diffüzyon ile emilir. Membranlarda $O_2^{-\bullet}$, $^{\bullet}OH$ ve $LOO^{\bullet}$ radikallerinin ana temizleyicisidir. Böylece membran yağ asitlerini lipit peroksidasyonundan korur. Antioksidan aktivitesi yapısındaki fenolik hidroksil grubuna sahip aromatik halkadan kaynaklanır [53]. Glutatyon peroksidaz ve E vitamini serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. Enzim oluşan peroksitleri ortadan kaldırırken, E vitamini de peroksitlerin sentezini engeller [53,97].

En aktif formu olan α-tokoferol zincir kırıcı antioksidan olarak görev yapar. Molekülün hidrofobik kısmına hidrojenini kolaylıkla verebilen –OH grubu bağlıdır. Burada lipid peroksidasyonu esnasında oluşan peroksil ve alkoksil radikalleri yağ asidi yerine α-tokoferolle birleşerek reaksiyon zinciri kırılmış olur. Böylece α-tokoferol yeni bir radikal olan α-tokoferol-O-(tokoferoksil)'e dönüştürülmüş olur. Bu radikalin ise başka bir yağ asidiyle birleşebilme aktivitesi düşüktür. Sonuçta zincir reaksiyonunu durdurur. Oluşan bu tokoferoksil radikali membran yüzeyinde askorbik asitle (C vitamini) reaksiyona girerek tekrar tokoferole dönüşmektedir [95,115,121,122].

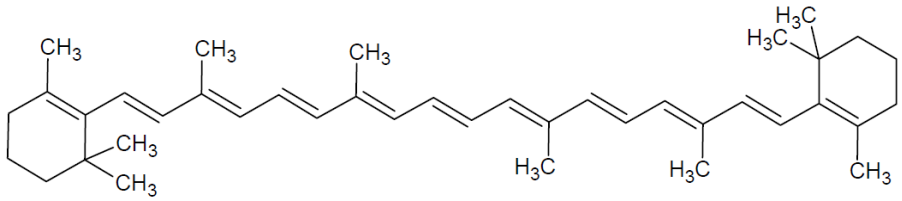
α-tokoferol-OH + $COO^{\bullet}$ ——–> α-tokoferol-$O^{\bullet}$ + COOH

α-tokoferol-$O^{\bullet}$ + Askorbik Asid ——–> α-tokoferol + DH Askorbik Asid

Beta Karoten

Provitamin A' nın başlıca karotenoiti β-karoten dir. A Vitaminleri görme, üreme, büyüme ve epitel dokusunun sağlamlığı için gerekli olan bir gurup bileşiklerdir. α-tokoferolle karşılaştırıldığında oldukça zayıf bir antioksidandır. İnsan LDL'sinde α-tokoferol'ün 1/20'si oranında bulunur ve α-tokoferol bittikten sonra kullanılır [132]. β-karoten çok önemli biyolojik etkilere sahiptir. En belirgin etkileri arasında, antioksidan etki, provitamin A etkisi, antikanser etki, cilt koruyucu etki vb. bulunmaktadır. Bu etkiler çok çeşitlilik göstermektedir.

β-karoten yapısındaki konjuge çift bağlar sebebiyle yüksek antioksidan aktivite gösterir. Singlet oksijen türlerini giderme ve doğrudan serbest radikalleri süpürme etkisine sahiptirler. Oksijen yakalama kapasitesi doğrudan yapısındaki konjuge çifte bağlarla alakalıdır [123-125].



Şekil 2.10. β-karoten

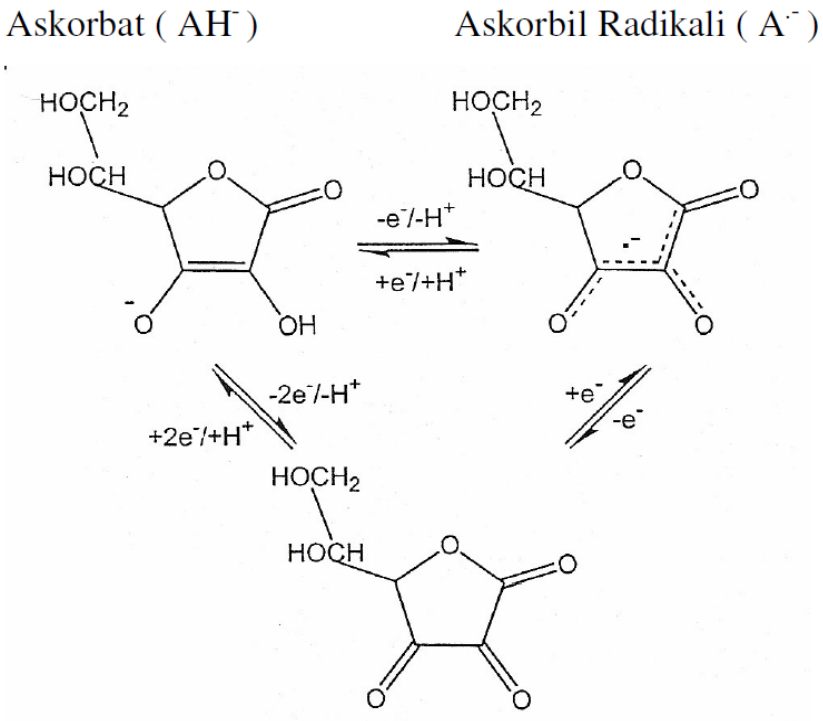
Vitamin C (Askorbik asit)

C vitamini (askorbik asit, askorbat) bitkilerde yaygın olarak bulunan; moleküler oksijen, nitrat, sitokrom a ve c gibi bileşiklerin indirgenmesine neden olan ve sulu ortamlarda serbest radikallerle reaksiyona girebilme kabiliyetinde olan suda eriyen bir vitamindir. Altı karbonlu lakton yapısına sahiptir [69].

Çoğu hayvanın karaciğer veya böbreklerinde glukozdan, bitkilerde ise yaprak kısımlarında özellikle kloroplastlarında sentezlenir [126]. İnsanlar bu vitamini sentezleyemezler [127]. İhtiyaçlarını taze sebze ve meyvelerden karşılarlar. Portakal, çilek, kivi, greyfurt, kavun, mango gibi meyvelerde, brokoli, brüksel lahanası, kırmızı veya yeşil biber, domates, lahana, patates, karnıbahar gibi sebzelerde, yüksek miktarda bulunmaktadır [69]. Yüksek doz C vitamininin (2g) yan etkisi bulunmamaktadır [121,122].

Askorbik asit; plazmada oksidan ajanlara karşı ilk antioksidan defansı oluşturur. LDL kolesterolün oksidasyonunu önleyerek atheroskleroza karşı korunmada yardımcı olur. Kollojen sentezinde, tirozin yıkımında, epinefrin sentezinde, safra oluşumunda ve pek çok hidroksilasyon reaksiyonunda indirgeyici ajan olarak rol alır [95,124,128].

C vitamini, reaktif oksijen (süperoksit, peroksil radikalleri, singlet oksijen, ozon), türlerini kolayca süpürür ve bu suretle diğer substratları oksidatif hasardan korur [129]. Hem askorbik asit hem de bunun bir elektron yükseltgenmiş hali olan askorbil radikali düşük redüksiyon potansiyeline sahiptir [130]. Böylece ilgili radikal ve oksidanlarla reaksiyona girebilir. Askorbil radikali, eşleşmemiş elektronun rezonans kararlılığı nedeniyle düşük redüksiyon potansiyeli gösterir ve kolayca askorbat ve dehidroaskorbik asite dönüşür [131]. Bununla birlikte, askorbik asit, hem askorbil radikalinden hem de dehidroaskorbik asitten enzimatik veya enzimatik olmayan yollarla kolaylıkla üretilir. Bu özelliklerinden dolayı askorbik asit etkili bir antioksidandır [69].



Şekil 2.11. Askorbik asit ve radikal formları arası dönüşüm

C vitamini süperoksit ve hidroksil radikalleriyle reaksiyona girip onları temizleyen bir antioksidan olmasının yanı sıra tokoferoksil radikalinin tekrar tokoferole dönüşmesini

sağlar. Böylece bu esnada kendisi de dehidroaskorbata okside olur. Böylece Vitamin E nin rejenerasyonu sağlanmış olur.

Plazma C vitamini düşük (0.2 mmol/L'den düşük) olduğu zaman oksidan etki de gösterebilir. Bu durumda oluşan tokoferoksil radikalleri tokoferole dönüşüm için GSH ile reaksiyona girer ve hücredeki GSH miktarını azaltır [95,128,132]. Askorbat, ferrik demiri ferröz demire indirgeyen süperoksit radikali dışındaki tek selüler yapıdır. Askorbat proteine bağlı ferrik demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan ferrik demiri indirgeyerek Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksitle etkileşmeye uygun olan ferröz demire çevirir [52].

$$\text{Askorbat} + \text{Fe}^{+3}\text{-Protein} \longrightarrow \text{Dehidroaskorbat(DHA)} + \text{Fe}^{+2} + \text{Protein}$$

$$\text{Fe}^{+3} + \text{Vitamin C} \longrightarrow \text{Fe}^{+2} + \text{Askorbil}^{\bullet} + 2\text{H}^{+}$$

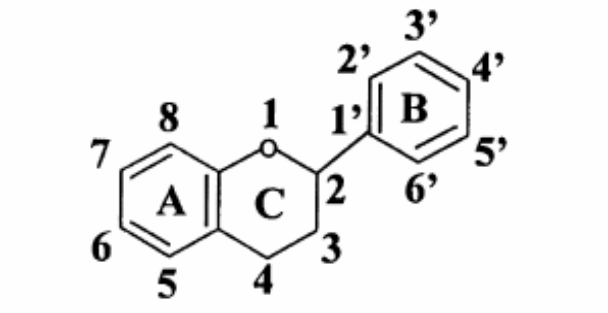
Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler, benzen halkasına bağlı hidroksil grubu içeren, bu özellikleri nedeniyle zincir kırılması ve peroksit radikallerini temizleyerek lipid peroksidasyonunun inhibe edilmesinde rol alan antioksidan bileşiklerdir [133]. Bu bileşikler, çok fonksiyonlu olup hidrojen atomu vericisi, singlet oksijeni süpürücüsü ve indirgeyicisi olarak, bazen de metal iyonlarını şelatlama özellikleri ile antioksidan aktivite gösterirler [69,134]. Fenolik bileşiklerin serbest radikal süpürücü aktivite için ideal kimyasal yapıya sahip oldukları ve in vitro olarak α-tokoferol ve vitamin C'den daha etkin antioksidan özelliğe sahip oldukları gösterilmiştir[135].

Fenolik bileşikler Süper oksit ($O_2^{\bullet -}$), lipid alkoksil ($LO^{\bullet}$), lipid peroksil ($LOO^{\bullet}$) radikallerini temizleme, Fe ve Cu şelatlama, α-tokoferol rejenerasyonu gibi fonksiyonlara katılmaktadırlar. Bileşiğin yapısı ile antioksidan kapasitesi ilişkilidir, fenolik bileşiklerde –OH grubu sayısı, flavonoitlerde B halkasının 5-OH, 3-OH ve 4-OH grupları olması antioksidan aktivite üzerinde etkilidir [136,137,138]. Bitkilerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşikler; flavonoitler, fenolik asitler(hidroksibenzoik asitler, hidroksisinamik asitler) ve fenolik polimerler(Tanenler) olmak üzere 3 sınıfta toplanmaktadırlar.

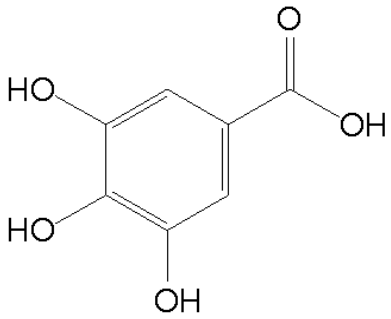
Flavonoitler, bitkilerin sekonder metabolitleri olup fenolik bileşiklerin en geniş sınıfını oluşturmaktadırlar. Flavonoitler kateşinler, antosiyanidinler, flavonoller, flavanonlar ve

proantosiyanidinler (löykoantosiyanidinler) olmak üzere beş alt gruba ayrılmaktadırlar [69]. Konjüge yapılarının ve hidroksil gruplarının önemli hidrojen verici olması, bunlara antioksidan özellik kazandırırken radikal oluşumunda görev alan lipoksigenaz, ksantinoksidaz enzimleri üzerinde inhibitör etki gösterirler.



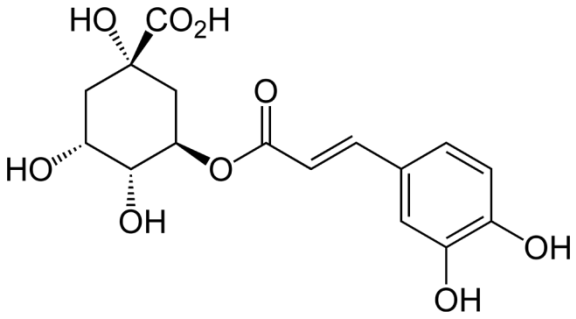
Şekil 2.12. Temel Flavonoit Yapısı

Fenolik asitler hidroksi benzoik asit ve hidroksi sinnamik asit olarak adlandırılan farklı iki sınıftan oluşmaktadır [69]. Fenolik asitlerin ve esterlerinin antioksidan aktiviteleri, sterik engelleme ile güçlenen moleküldeki hidroksil gruplarının sayısına bağlıdır. Benzoik asidlerde karboksilat grubunun elektron-çekme özelligi, hidroksi benzoatların hidrojen atomu verme yeteneklerine negatif etki yapar. Fenolik asitler içinde Gallik asit yüksek antioksidan aktivete göstermektedir [139,140]. Gallik asitin antioksidan etkisi neredeyse tokoferollerinki kadar yüksek olup, askorbik asit gibi suda çözünen antioksidanlardan daha yüksektir.

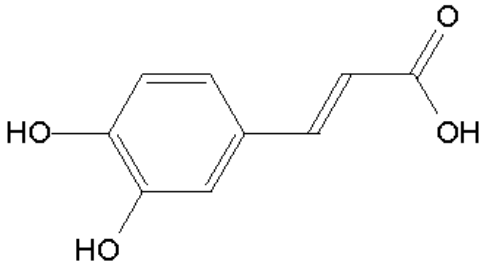


Şekil 2.13. Gallik Asit

Hidroksi sinnamik asitler eşdeğer benzoatlarından daha etkilidirler [139]. Kafeik asit, klorojenik asit, p-kumarik asit bitkilerde en fazla bulunan hidroksi sinnamik asitlerdir [141,142].



Şekil 2.14. Klorojenik Asit



Şekil 2.15. Kafeik Asit

Fenolik polimerler (Tanenler), polimerik yapıdaki yüksek molekül tartısına sahip tanenler kondanse ve hidrolizlenebilir olmak üzere iki alt sınıfa ayrılır. Kondanse tanenler polimerik flavonoitlerdir. Hidrolizlenebilir tanenler, gallik asit ve benzer bileşiklerin karbohidratlara esterlenmiş yapılarıdır. Bu bileşikler çay, kırmızı sarap, meyve, baklagil ve tahıllarda bol miktarda bulunmaktadırlar [69,143,144].

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler

Amonyum asetat (NH_4Ac)	(Fluka)
Neokuproin	(Aldrich)
Trolox	(Acros)
N,N-dimetil-fenilendiamin dihidroklorür (DMPD)	(Fluka)
Demir(III)klorür ($FeCI_3$)	(Aldrich)
Sodyum karbonat (Na_2C0_3)	(Sigma&Aldrich)
Sodyum potasyum tartarat ($NaKC_4H_4O_6$)	(Sigma&Aldrich)
Folin Ciocalte's fenol reajan	(Sigma &Aldrich)
Bakır(II)sülfat ($CuS0_4$)	(Sigma &Aldrich)
Bakır(II)klorür	(Merck)
2,2'-azino-bis(3- etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS)	(Aldrich)
1,1 -difenil 2-pikril hidrazil (DPPH)	(Aldrich)
Nitroblue tetrazolium (NBT)	(Sigma &Aldrich)
Nikotinamid adenin dinükleotid (NADH)	(Sigma)
Fenazin metasülfat (PMS)	(Sigma)
Trizma hidroklorik asit (Tris-HCI)	(Sigma)
L- Ascorbik asit	(Sigma)
Sodyum dihidrojen fosfat monohidrat ($NaH_2P0_4.H_20$)	(Merck)
Disodyum hidrojen fosfat ($Na_2HP0_4.12H_20$)	(Merck)
% 96 etanol (% 96 EtOH)	(Merck)
Metanol (MetOH)	(Sigma &Aldrich)
Ultra saf Su	(Millipore)
Sodyum hidroksit (NaOH)	(Merck)
Gallik asit	(Merck)
Bütil Hidroksi Anisol (BHA)	(Aldrich)
Bütil Hidroksi Toluen (BHT)	(Aldrich)

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

T80 + UV-VIS Spektrofotometre	PG Instruments Ltd.
pH-metre	inoLab WTW
Hassas terazi	GR-200 AND. GİS. KAL. MERK.
Vorteks	Firlabo
Magnetik karıştırıcı	MK 318
Ultrasonik banyo	Bandelin Sonorex
Yüksek devirli soğutmalı santrifüj	Jouan MR 1822
Ultra saf su cihazı	Millipore
Ayarlı pipetler	Eppendorf
Liyofilizatör	Christ Alpha 1-2 LD
Derin dondurucu	Jouan

3.3. Bitkilerin Toplanması ve Kurutulması

Deneylerde kullanılan nane bitkisi Çankırı İli Ilgaz İlçesinden toplanmıştır. Kurallara uygun olarak preslenip kurutulduktan sonra teşhis edilmiştir. Bitkinin bir kısmı gölgede kurutulmak suretiyle kuru bitki numunesi hazırlanmış ve çalışmada kullanılmak üzere havanda öğütülmüştür. Diğer bir kısım bitki ise yaş bitki numunesi şeklinde liyofilizatörde suyu uçurulup kurutularak deneyde kullanılmaya hazır hale getirilmiştir.

3.4. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması

Gölgede ve liyoflizatörde kurutulan bitki etanol ve metanolün %50 (v/v) oranı, diklorometan ve bidistile su ile ekstre edilmiştir. Bunun için kurutulmuş naneler havanda öğütülerek toz hale getirilmiştir. Bundan yaklaşık 2 g tartılan kurutulmuş örnekler önce çözücünün 15mL'si ile 45 dakika, 5 mL daha ilave edilerek ikinci bir 45 dakika ve en son 5 mL daha ilave edilerek ultrasonik banyoda, ağızları kapalı cam erlenler içinde ekstre edilmiştir. Bitki ekstreleri pilili süzgeç kağıdandan geçirilmiştir. Süzülen tüm bitki ekstrelerinin çözücüleri uçurularak -80ºC de porsiyonlanarak saklanmıştır [145]. Çalışma esnasında çözücüsü uçurularak kurutulmuş örneklerden 1 mg/mL stok çözelti hazırlanarak gerekli seyreltmelerde kullanılmıştır.

3.5. Uygulanan Yöntemler

Çalışmamızda bitkinin toplam fenolik madde miktarı, antioksidan kapasitesi ile DPPH, ABTS, DMPD ve Süperoksit radikallerini giderme aktiviteleri tespit edilmiştir. Bu yöntemlerin uygulanışında gallik asit, trolox, BHA, BHT, C vitamini gibi antioksidan/antiradikal aktiviteleri bilinen maddeler kullanılmıştır.

3.5.1. Folin Ciocalteu Yöntemi (Toplam Fenol İçeriği Tayin Yöntemi)

Folin Ciocalteu yöntemi bitki örneklerinin toplam fenolik madde içeriğini ölçmek için geliştirilmiştir. Yöntemde kullanılan CuSO4 [bakır(II) sülfat] alkali ortamda protein veya antioksidanla kompleks yapar. Folin fenol reaktifi (fosfomolibdik-fosfotungstik asit) eklendiğinde, folin reaktifi proteine bağlanır. Protein veya antioksidanla Cu(II)'nin reaksiyonundan açığa çıkan Cu(I) molibdatotungstat reaktifini heteropoli mavisine indirger ve rengi sarıdan maviye dönüsür. Reaksiyon tamamlanınca 750 nm'de örnek absorbansları ölçülür [145-147].

Kullanılan Çözeltiler

0,1 M NaOH
Lowry A
Lowry B
Lowry C
%1 $NaKC_4H_4O_6$
Folin reaktifi (1:3 Etanolle seyreltilmiş)

Yöntemin Uygulanması

Etanol, metanol ve su fazında hazırlanan bitki ekstrelerinin 1000-500-250-125-62,5-31,25-15,625 µg/ml konsantrasyonları çalışıldı. Her bir örnek ekstresinden 100 µl alınarak üzerine 125 µl Lowry C eklenip 10 dakika bekletildi. Süre sonunda karışıma 12,5 µl folin reaktifi ilave edilip oluşan mavi rengin sabit kalması için 30 dakika beklenildi. 750 nm'de referans çözeltiye karşı absorbans değerleri kaydedildi. Standart olarak gallik asitin 1000-500-250-125-62,5-31,25-15,625 µg/ml konsantrasyonları kullanıldı.

3.5.2 Bakır(II) İndirgeme Antioksidan Kapasite (CUPRAC) yöntemi

Kromojenik bir redoks reaktifi olan bis (neokuproin)-bakır(II)klorür ile hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidan kapasite kolaylıkla tayin edilebilir. Bu yöntemde, 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuproin-Nc)'in bakır(II) ile oluşturduğu bakır(II)-neokuproin kompleksinin bitki ekstresi ile 450 nm'de absorbans veren bakır(I)-neokuproin[Cu(I)-Nc] şelatına indirgenme yeteneğinden yararlanarak antioksidan kapasite hesaplanır [147,148].

Kullanılan Çözeltiler

10^{-2} M Cu(II)klorür çözeltisi
1 M (pH:7) Amonyum asetat(NH_4Ac) tamponu
$7,5x10^{-3}$ M Neokuproin çözeltisi

Yöntemin Uygulanması

Su, etanol, metanol fazında hazırlanan bitki ekstrelerinin 1000-500-250-125-62,5-31,25-15,625 µg/ml konsantrasyonlarında çalışma yapıldı. Kuyucuklara sırasıyla 50 µl Cu(II)klorür çözeltisi, 50 µl amonyum asetat tamponu, 50 µl %96 etil alkolde hazırlanan neokuproin çözeltisi koyuldu arkasından 27,5 µl bitki örneği ve 27,5 µl distile su ilave edilerek oda sıcaklığında 30 dakika karanlıkta çalkalanarak bekletildi. 450 nm'de reaktif körüne karşı absorbansı ölçüldü.

3.5.3. DPPH yöntemi

Bu yöntem; antioksidanların kararlı bir organik azot radikali olan DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikalinin süpürücü etkilerini ölçmeye dayalı bir yöntemdir. Bu radikal hidrojen donörleri etkileştiginde hidrazine indirgenir [148]. DPPH radikali sulu veya etanollü çözeltilerinde kararlı serbest radikaller oluşturabilir. DPPH radikallerinin optik yoğunluklarının değişiminin ölçülmesiyle test örneklerinin serbest radikal giderme aktiviteleri değerlendirilir. Bu metotta radikal olmayan formundan (DPPH-H) dolayı hidrojen bağlı antioksidanın varlığında alkol çözeltisindeki DPPH radikalinin azalması temel alınır. Bu metotla birlikte 517 nm de DPPH radikalinin absorbansındaki azalma ölçülerek antioksidan anti-radikal gücünün belirlenmesi mümkündür. Kararlı DPPH

radikaline hidrojen verilmesiyle antioksidan tarafından DPPH radikali giderildiğinde absorbans azalır ve renk mordan sarıya döner [147,149,150].

Kullanılan Çözeltiler

10^{-3} M DPPH radikal çözeltisi

Yöntemin Uygulanması

Su, etanol, metanol fazında hazırlanan bitki ekstrelerinin 1000-500-250-125-62,5-31,25-15,625 µg/ml konsantrasyonlarında DPPH süpürücü aktiviteleri ölçüldü. Bu yöntemde gerekli miktardaki ekstrelere 50 µl DPPH radikali eklendi. 30 dakika karanlıkta çalkalanarak inkübe edilmiştir. 517 nm'de kontrol çözelti ile köre karşı okundu.

3.5.4. ABTS radikali giderme aktivitesi tayini

ABTS yöntemi, 2,2´-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) (ABTS) kromojen radikal katyonunun absorbansının, antioksidanlar tarafından inhibisyonunu temel alır. Antioksidanlar varlığında $ABTS^{\bullet+}$ radikal katyonunun absorbansında belirli bir süre içindeki azalmadan yararlanarak toplam antioksidan kapasitesinin bulunması esasına dayanır [151,152].

Kullanılan Çözeltiler

ABTS radikal çözeltisi

Yöntemin Uygulanması

Su, etanol, metanol fazında hazırlanan bitki ekstrelerinin 1000-500-250-125-62,5-31,25-15,625 µg/ml konsantrasyonlarında çalışma yapıldı. Mavi-yeşil renkli ABTS radikal çözeltisi etil alkolde 1:10 oranında seyreltildi. Ekstrelerin 1000-500-250-125-62,5-31,25 ve 15,625 µg/ml konsantrasyonlarından alınan x µl üzerine 60 µl $ABTS^{\bullet+}$ radikal çözeltisi ve (240-x) µl çözücü ilave edildi. 734 nm de kendi çözücüleri kör olarak kullanılarak 1. ve 6. dakika sonundaki absorbans değerleri ölçüldü.

3.5.5. DMPD radikali giderme aktivitesi

Bu yöntemde $FeCl_3$ kullanılarak ortamda DMPD (N,N'-dimethil-p-fenilendiamin) radikal katyonu oluşturulur. Pembe renkli ve kararlı DMPD radikali, antioksidan maddeler ile kimyasal tepkimeye girerek bunlardan bir H atomu alır ve antioksidanlar DMPD'nin radikal etkisini giderirler. Sonuçta antioksidanlarla oluşan tepkime ile DMPD radikalinin pembe rengi açılır. 505 nm dalga boyunda oluşan rengin absorbans değeri ölçülür [147,153].

Kullanılan Çözeltiler

0,1 M DMPD çözeltisi
0,001 M DMPD radikal çözeltisi
0,05 M FeCl3 çözeltisi
0,1 M asetat tampon çözeltisi (pH:5,25)

Yöntemin Uygulanması

Etanol, metanol, su fazlarında hazırlanan ekstrelerin 1000-500-250-125-62,5-31,25 ve 15,625 µg/ml aralığındaki konsantrasyonları kullanıldı. 280 µl DMPD radikal çözeltisine 20 µl örnek çözeltisi ilave edildi. Reaksiyonun tamamlanması ve oluşan rengin sabit kalması için 30 dakika karanlıkta bekletildi. 505 nm dalga boyunda köre karşı kontrol çözelti ile birlikte absorbans değerleri ölçüldü.

3.5.6. Süperoksit radikali giderme aktivitesi

PMS-NADH-NBT sisteminde PMS-NADH bileşeni tarafından oksijenin parçalanmasıyla süperoksit anyonu meydana gelmektedir. Oluşan süperoksit radikali sarı renkli NBT^{2+} 'yi mavi renkli formazan türevine indirger. Ortamda antioksidan bileşik varsa mavi-mor NBT oluşumu inhibe edilir. Ancak NBT'nin direk antioksidan tarafından indirgenmesi de sözkonusudur. Nitroblue tetrazolium (NBT)' un indirgenmesi ile NBT^{2+} nin sarı rengi azalarak formazon mavisine dönüşür.

Kullanılan Çözeltiler

144 µM NBT
677 µM NADH
60 µM PMS
0,1 M Fosfat tampon çözeltisi (pH:7,4)

Yöntemin Uygulanması

Etanol, metanol, su fazlarında hazırlanan ekstrelerin 1000-500-250-125-62,5-31,25 ve 15,625 µg/ml aralığındaki konsantrasyonları kullanıldı. Ependorf tüpüne 200µl ekstre üzerine sırasıyla, 200 µl NADH, 200µl NBT eklenip, iyice karıştırıldı. Kuyucuklara bu karışımdan 150 µl alınıp, üzerine 50 µl PMS eklendi. Köre karşı 560 nm'de absorbans değerleri ölçüldü [154].

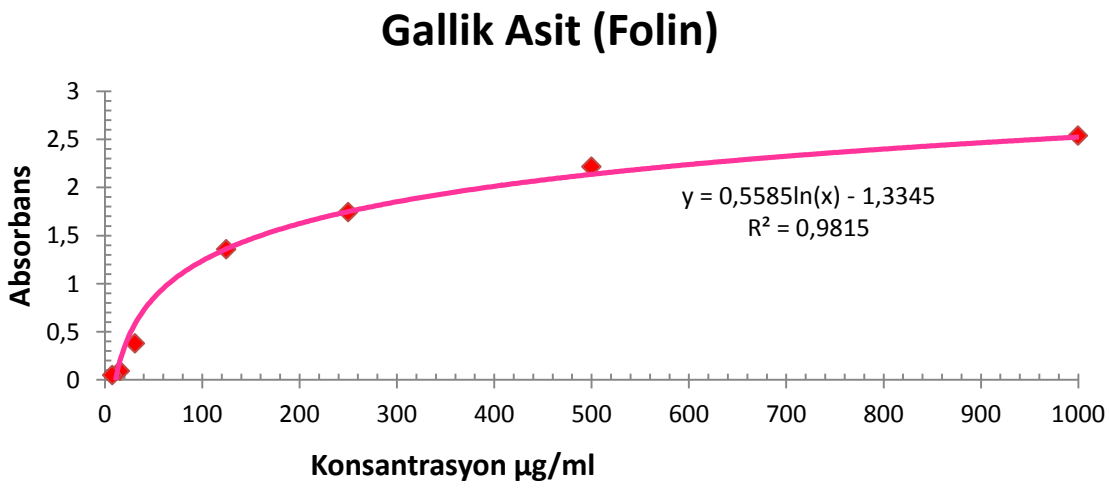
4. BULGULAR

Çalışmamızda nane bitkisinin Folin Ciocalteu yöntemi ile total fenolik madde miktarının tespit edilmesi ve Cuprac, DPPH, ABTS, DMPD, Süperoksit yöntemleri kullanılarak antioksidan aktivite tayini çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen bulgular gallik asit, trolox, BHA, BHT, C vitamini gibi antioksidan/antiradikal aktiviteleri bilinen maddelerle karşılaştırılmıştır. Uygulanan yöntem ile tutarlı sonuç elde edilemeyen standart maddelere ait değerler grafiklere dahil edilmemiştir.

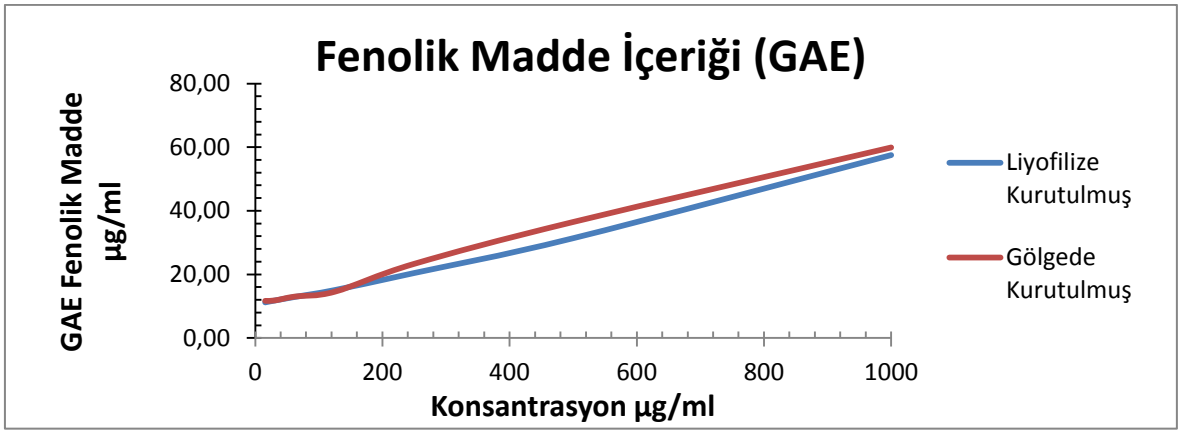
Çalışma sonucu elde edilen veriler ortalama ± standart sapma (SS) olarak ifade edilmiştir. Ortalama ± SS değerlerinin elde edilmesi ve grafiklerin oluşturulması Microsoft Office Excel 2007 programı ile yapılmıştır. Tek değer alınarak yapılan çalışmalarda standart sapma değeri 0,00 olarak görülmektedir.

4.1. Folin Ciocalteu Yöntemi (Total Fenol İçeriği Tayini)

Standart olarak Gallik asitin 15,625-1000 µg/ml aralığındaki konsantrasyonları kullanılarak bir kalibrasyon denklemi oluşturulmuştur (Şekil 4.1). Bitki ekstrelerinden elde edilen absorbans değerleri regresyon denklemine uygulanarak fenolik madde içerikleri µg gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak ifade edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.1. Folin Ciocalteu yöntemine göre Gallik asit kalibrasyon grafiği



Şekil 4.2. Folin Ciocalteu yöntemine göre sulu nane ekstrelerinin konsantrasyon-GAE grafiği

Folin Ciocalteu yöntemi gölgede ve liyofilize edilerek kurutulmuş nane örneklerinin etenol, metanol ve sulu ekstrelerine uygulandı. Çalışmalarda etanol, metanol ile hazırlanan ekstrelerde çökelek oluşumu gözlendiği için sonuçlar değerlendirilmemiştir. Yöntem sulu ekstrelerin 15,625-1000 µg/ml konsantrasyonlarına uygulanmıştır. Gallik asit eşdeğeri olarak sonuçlar aşağıda grafikte gösterilmiştir. Gallik asit eşdeğeri olarak ekstrelerin 1000 µg/ml konsantrasyonlarındaki absorbanslarına karşılık hesaplanan değerler kabul edilmiştir. (Çizelge 4.1.)

Çizelge 4.1. Folin Ciocalteu yönteminde sulu ekstrelerin konsantrasyon-Gallik asit eşdeğerleri

	Su Gallik Asit Eşdeğeri ± S.S.						
Konsantasyon µg/ml	**1000**	**500**	**250**	**125**	**62,5**	**31,25**	**15,625**
Liyofilize (LY)	58,20 ±2,34	31,75±6,37	20,68±1,73	15,25±0,90	13,07±0,35	11,94±0,12	11,32±0,06
Gölgede (GK)	59,91±24,97	36,48±10,77	23,32±5,26	14,54±0,33	13,03±0,08	11,82±0,20	11,67±0,45

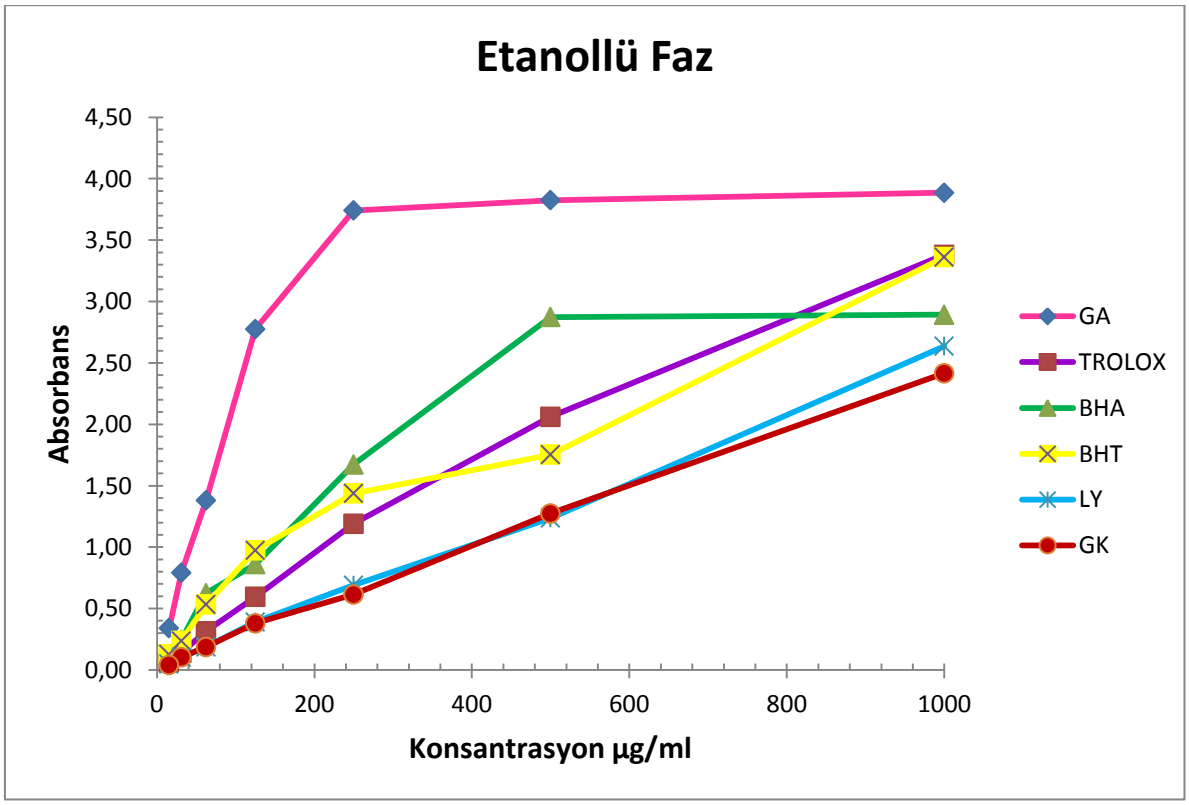
4.2. Bakır(II) İndirgeme Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi

Cuprac yönteminde etanol, metanol, su fazında; standart olarak kullanılan gallik asit, trolox, BHA, BHT ve C vitamini çözeltileri ile liyofilize edilerek kurutulmuş ve gölgede kurutulmuş bitki ekstreleri kullanılmıştır. Bu işlem 15,625- 1000 µg/ml aralığındaki çözeltilere uygulanmıştır. Elde edilen ortalama absorbans ± standart sapma değerleri ve bu değerlere ait grafik standartlarla karşılaştırmalı olarak aşağıda gösterilmiştir.

Etanolde hazırlanmış standart madde ve bitki örneklerine ait çözeltilerin ölçülen ortalama absorbans ± standart sapma değerleri ve bu değerlere ait grafik standartlarla karşılaştırmalı olarak aşağıda gösterilmiştir. (Çizelge 4.2.) (Şekil 4.3.)

Çizelge 4.2. Cuprac yöntemine göre etanollü çalışmalarda elde edilen ortalama absorbanslar ve standart sapma değerleri

Cuprac Etanollü Fazlar							
Ortalama Absorbans ± S.S.							
Konsantasyon µg/ml	**1000**	**500**	**250**	**125**	**62,5**	**31,25**	**15,625**
GA	3,89±0,02	3,82±0,05	3,74±0,12	2,78±0,18	1,38±0,32	0,79±0,09	0,34±0,01
TROLOX	3,38± 0,15	2,06±0,46	1,19±0,13	0,60±0,07	0,31±0,03	0,14±0,04	0,06±0,02
BHA	2,89±0,23	2,87±0,53	1,67±0,03	0,86±0,09	0,63±0,12	0,24±0,03	0,10±0,00
BHT	3,36±0,07	1,75±0,18	1,43±0,27	0,97±0,27	0,53±0,09	0,23±0,00	0,102±0,03
LY ÖRNEK	2,64±0,28	1,24±0,09	0,69±0,05	0,39±0,03	0,19±0,01	0,1 ± 0,02	0,05±0,01
GK ÖRNEK	2,42±0,59	1,27±0,07	0,61±0,09	0,38±0,05	0,19±0,01	0,1 ± 0,01	0,04±0,00

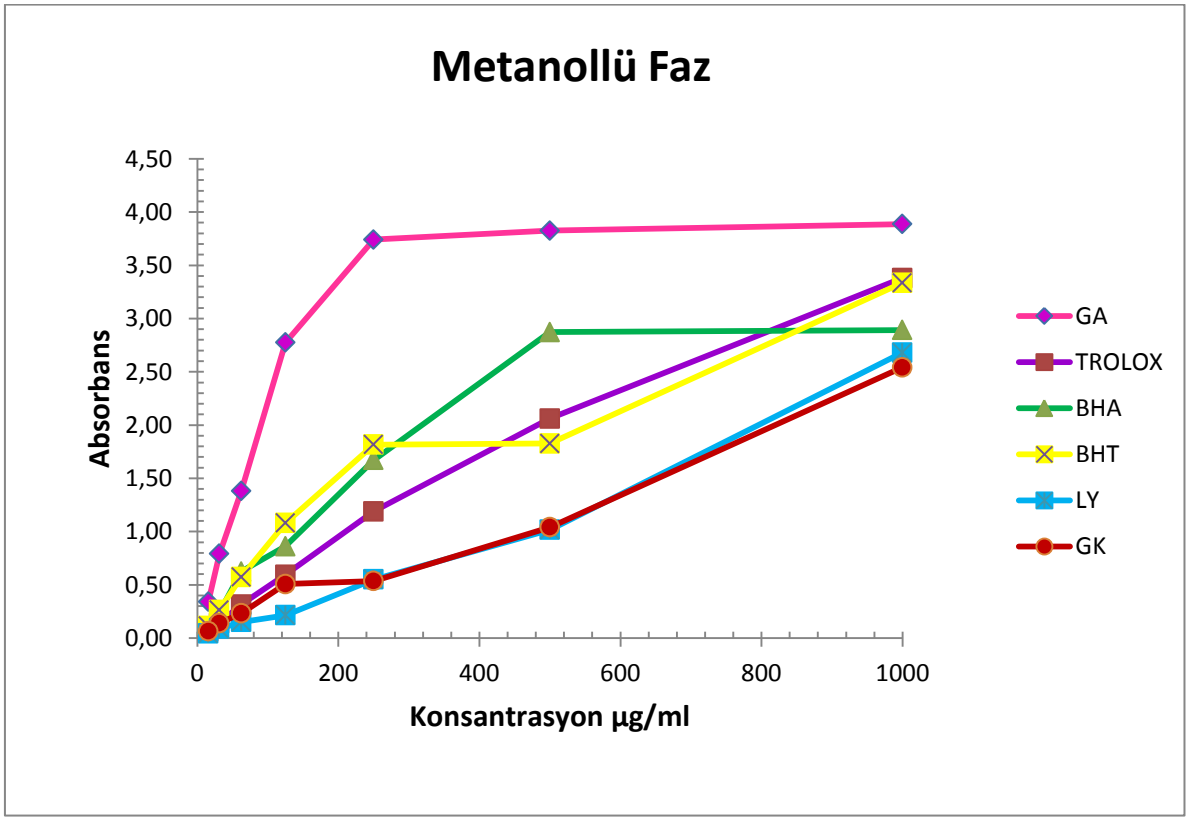


Şekil 4.3. Cuprac yöntemine göre etanollü çalışmalarda elde edilen ortalama absorbanslara ait grafik

Metanolde hazırlanmış standart madde ve bitki örneklerine ait çözeltilerin ölçülen ortalama absorbans ± standart sapma değerleri ve bu değerlere ait grafik standartlarla karşılaştırmalı olarak aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 4.3) (Şekil 4.4).

Çizelge 4.3. Cuprac yöntemine göre metanollü çalışmalarda elde edilen ortalama absorbanslar ve standart sapma değerleri

Cuprac Metanollü Fazlar							
Ortalama Absorbans ± S.S.							
Konsantasyon µg/ml	**1000**	**500**	**250**	**125**	**62,5**	**31,25**	**15,625**
GA	3,82±0,00	3,81±0,02	3,82±0,02	2,75±0,16	1,45±0,05	0,64±0,05	0,18±0,16
TROLOX	3,67±0,13	2,30±0,16	1,11±0,01	0,51±0,05	0,21±0,01	0,08±0,01	0,01±0,01
BHA	3,80±0,04	3,71±0,11	2,22±0,07	1,27±0,04	0,59±0,07	0,23±0,02	0,08±0,02
BHT	3,33±0,34	1,82±0,15	1,81±0,16	1,07±0,06	0,57±0,09	0,26±0,04	0,11±0,01
LY ÖRNEK	2,68±0,10	1,02±0,13	0,55±0,03	0,22±0,18	0,15±0,00	0,09±0,00	0,04±0,01
GK ÖRNEK	2,54±0,07	1,04±0,11	0,54±0,04	0,51±0,04	0,23±0,01	0,14±0,01	0,01±0,01

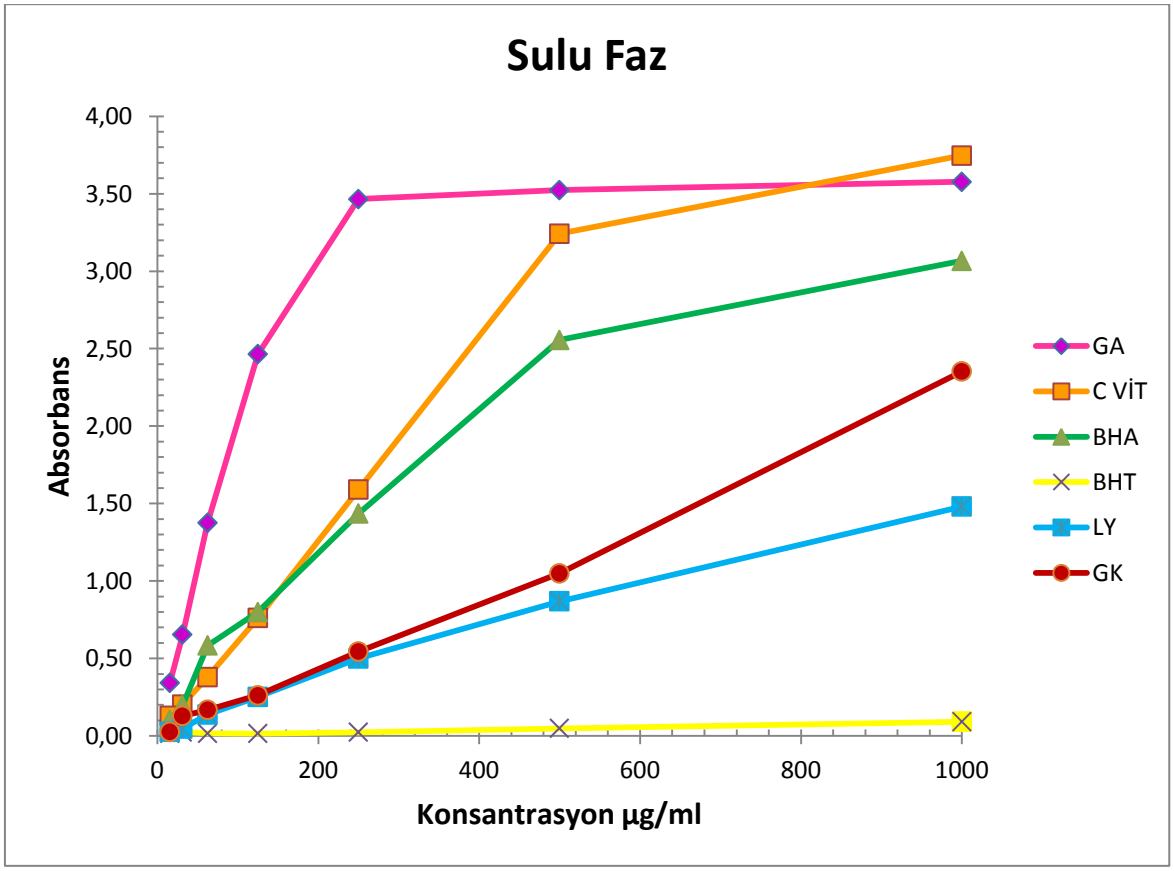


Şekil 4.4. Cuprac yöntemine göre metanollü çalışmalarda elde edilen ortalama absorbanslara ait grafik

Sulu ortamda hazırlanmış olan standart madde ve bitki örneklerine ait çözeltilerin ölçülen ortalama absorbans ± standart sapma değerleri ve bu değerlere ait grafik standartlarla karşılaştırmalı olarak aşağıda gösterilmiştir. Çizelge (4.4) (Şekil 4.5).

Çizelge 4.4. Cuprac yöntemine göre sulu ortamdaki çalışmalarda elde edilen ortalama absorbanslar ve standart sapma değerleri

Cuprac Sulu Fazlar							
Ortalama Absorbans ± S.S.							
Konsantasyon µg/ml	**1000**	**500**	**250**	**125**	**62,5**	**31,25**	**15,625**
GA	3,58±0,03	3,52±0,07	3,47±0,09	2,46±0,12	1,38±0,03	0,65±0,04	0,34±0,01
BHA	3,06±0,00	2,56±0,00	1,44±0,00	0,79±0,00	0,58±0,00	0,19±0,00	0,10±0,00
BHT	0,09±0,04	0,05±0,02	0,02±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,02±0,01	0,02±0,01
C VİT	3,75±0,16	3,24±0,05	1,59±0,07	0,76±0,02	0,38±0,01	0,20±0,02	0,13±0,01
LY ÖRNEK	1,48±0,08	0,87±0,06	0,50±0,03	0,25±0,01	0,14±0,02	0,05±0,01	0,03±0,01
GK ÖRNEK	2,35±0,61	1,05±0,03	0,54±0,08	0,26±0,00	0,17±0,15	0,13±0,00	0,03±0,00



Şekil 4.5. Cuprac yöntemine göre sulu ortamdaki çalışmalarda elde edilen ortalama absorbanslara ait grafik

4.3. DPPH Yöntemi

Yöntemde etanol, metanol, su fazında; standart olarak kullanılan gallik asit, trolox, BHA, BHT, C vitamini çözeltileri ile liyofilize edilerek kurutulmuş ve gölgede kurutulmuş bitki ekstreleri kullanılmıştır. Bu işlem 15,625- 1000 µg/ml aralığındaki çözeltilere uygulanmıştır. Ölçülen absorbans değerlerine göre; DPPH radikalinin inhibe edildiği değerler aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır. Absorbans azalışı DPPH radikali uzaklaştırma aktivitesindeki artışı göstermektedir.

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

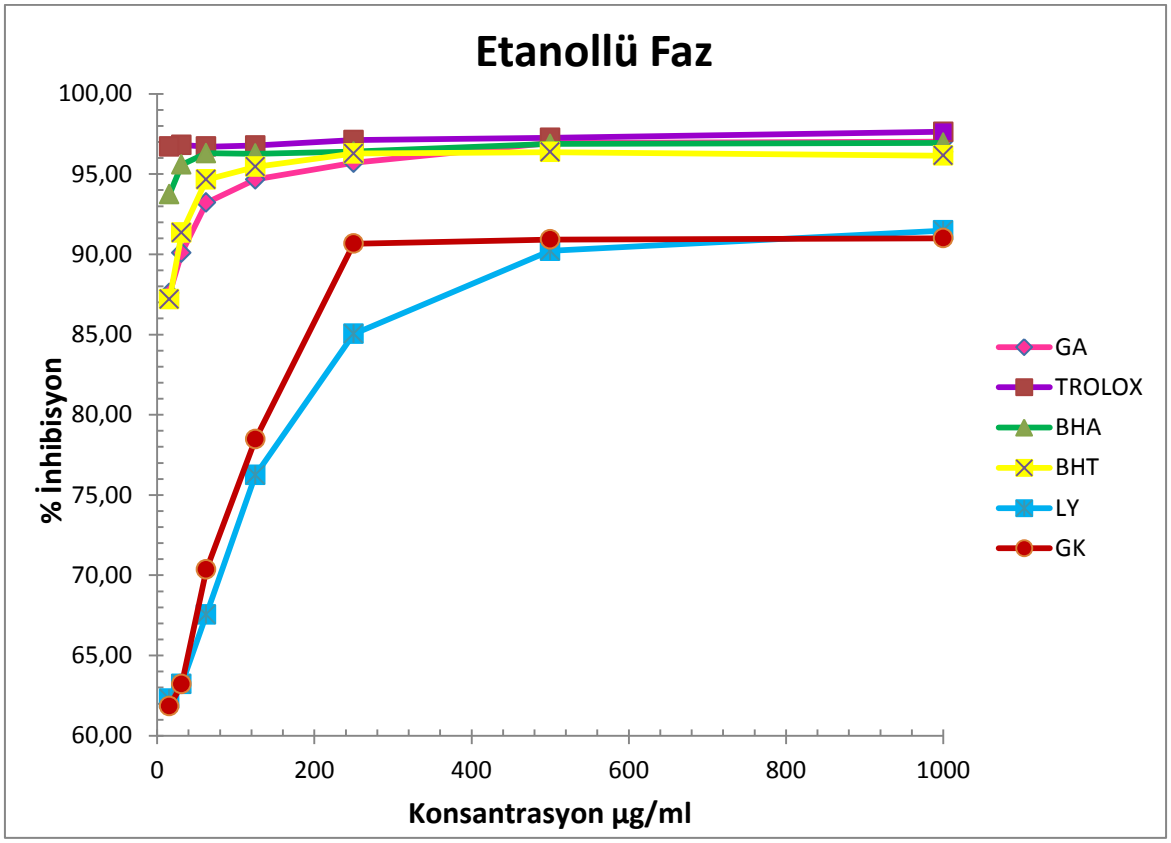
$A_{kontrol}$: Sadece DPPH radikal çözeltisi içeren kontrol değerinin absorbans değeri.

$A_{örnek}$: Örnek üzerine DDPH radikali içeren çözeltinin ilavesinden sonra ölçülen absorbans değeri.

Etanolde hazırlanmış standart madde ve bitki örneklerine ait çözeltilerin ölçülen absorbans değerlerine göre hesaplanan % inhibisyon oranları ve grafiği aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 4.5) (Şekil 4.6).

Çizelge 4.5. DPPH yöntemine göre etanollü çalışmalarda elde edilen % inhibisyon ve standart sapma değerleri

DPPH Etanollü Fazlar							
% İnhibisyon ± S.S.							
Konsantasyon µg/ml	**1000**	**500**	**250**	**125**	**62,5**	**31,25**	**15,625**
GA	97,03±0,50	96,94±0,03	95,7±1,70	94,66±2,07	93,21±1,20	90,10±2,82	87,57±1,97
TROLOX	97,64±0,00	97,26±0,26	97,12±0,9	96,78±0,97	96,70±1,23	96,81±0,00	96,71 ± 0,32
BHA	96,94±0,06	96,87±0,02	96,40±0,08	96,27±0,13	96,29±0,15	95,59±0,16	93,74 ± 0,45
BHT	96,15±0,06	96,36±0,45	96,28±0,12	95,45±0,69	94,65±0,18	91,34±0,76	87,20 ± 0,77
LY ÖRNEK	91,48±1,14	90,22±3,91	85,03±7,96	76,24±10,6	67,55±8,49	63,21±7,86	62,30 ± 9,66
GK ÖRNEK	91,00±0,99	90,92±1,60	90,66±1,66	78,47±7,19	70,36±7,89	63,21±7,23	61,83 ± 6,71

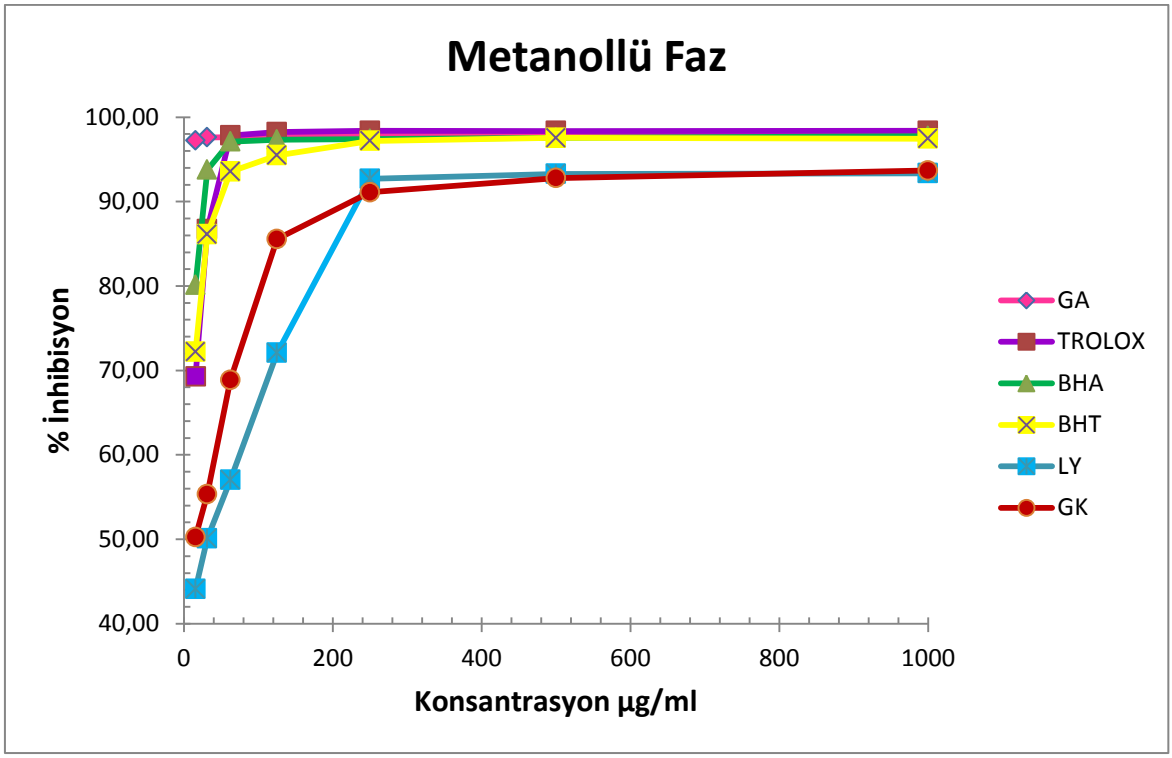


Şekil 4.6. DPPH yöntemine göre etanollü çalışmalarda elde edilen % inhibisyon değerlerine ait grafik

Metanolde hazırlanmış standart madde ve bitki örneklerine ait çözeltilerin ölçülen absorbans değerlerine göre hesaplanan % inhibisyon oranları ve grafiği aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 4.6) (Şekil 4.7).

Çizelge 4.6. DPPH yöntemine göre metanollü çalışmalarda elde edilen % inhibisyon ve standart sapma değerleri

DPPH Metanollü Fazlar							
% İnhibisyon ± S.S.							
Konsantasyon µg/ml	**1000**	**500**	**250**	**125**	**62,5**	**31,25**	**15,625**
GA	97,99±0,09	97,9±0,25	97,79±0,16	97,75±0,14	97,62±0,21	97,61±0,20	97,22±0,00
TROLOX	98,38±0,04	98,36±0,00	98,35±0,07	98,23±0,21	97,84±0,16	86,74±0,20	69,32±1,23
BHA	97,75±0,18	97,56±0,13	97,41±0,20	97,35±0,11	97,10±0,09	93,78±0,21	80,15±1,93
BHT	97,46±0,38	97,55±0,04	97,18±0,09	95,47±0,68	93,55±1,54	86,14±0,11	72,21±2,29
LY ÖRNEK	93,36±0,00	93,28±0,26	92,7±1,01	72,09±7,15	57,03±8,42	50,11±9,14	44,10±9,58
GK ÖRNEK	93,68±0,77	92,78±1,98	91,11±1,74	85,57±13,44	68,88±7,27	55,34±10,42	50,27±8,08

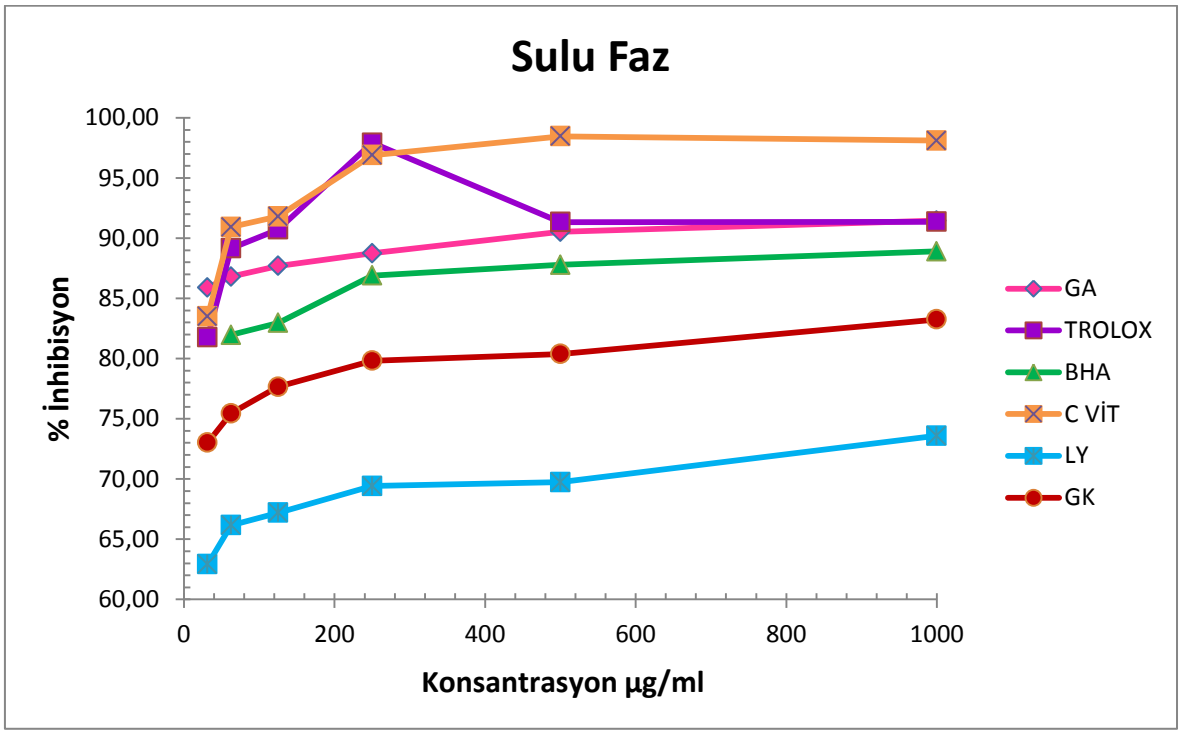


Şekil 4.7. DPPH yöntemine göre metanollü çalışmalarda elde edilen % inhibisyon değerlerine ait grafik

Sulu ortamda hazırlanmış standart madde ve bitki örneklerine ait çözeltilerin ölçülen absorbans değerlerine göre hesaplanan % inhibisyon oranları ve grafiği aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 4.7) (Şekil 4.8).

Çizelge 4.7. DPPH yöntemine göre sulu ortamdaki çalışmalarda elde edilen % inhibisyon ve standart sapma değerleri

DPPH Sulu Fazlar							
% İnhibisyon ± S.S.							
Konsantasyon µg/ml	**1000**	**500**	**250**	**125**	**62,5**	**31,25**	**15,625**
GA	91,46±1,80	90,53±3,52	88,74±2,58	87,69 ± 0,00	86,80 ± 1,64	85,90 ± 6,00	83,83 ± 2,19
TROLOX	91,36±0,00	91,33±0,00	97,91±2,15	90,72 ± 0,89	89,16 ± 0,00	81,78 ± 1,20	90,33 ± 3,28
BHA	88,90±0,00	87,78±1,54	86,90±0,19	82,96 ± 0,00	81,93 ± 0,00	83,76 ± 0,00	83,16 ± 0,00
C VİT	98,10±0,00	98,47±2,12	96,90±0,38	91,80 ± 0,90	90,93 ± 2,22	83,49 ± 3,11	89,60 ± 0,00
LY ÖRNEK	73,6 ± 0,42	69,74±0,23	69,41±0,22	67,20 ± 1,30	66,16±1,96	62,91 ± 0,38	59,74±0,20
GK ÖRNEK	83,26 ± 4,7	80,38±9,10	79,82±8,74	77,66 ± 8,90	75,45±11,60	73,03±11,79	71,27±10,72



Şekil 4.8. DPPH yöntemine göre sulu ortamdaki çalışmalarda elde edilen % inhibisyon değerlerine ait grafik

4.4. ABTS Radikali Giderme Aktivitesi

ABTS yöntemi etanol, metanol, su fazında; 15,625- 1000 µg/ml aralığında standart olarak kullanılan gallik asit, trolox, BHA, BHT, C vitamini ile gölgede ve liyofilize olarak kurutulmuş örnek ekstrelerine uygulanmıştır. Ölçülen absorbans değerlerine göre; ABTS radikalinin inhibe edildiği değerler aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır. Absorbans azalışı ABTS radikali uzaklaştırma aktivitesindeki artışı göstermektedir.

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

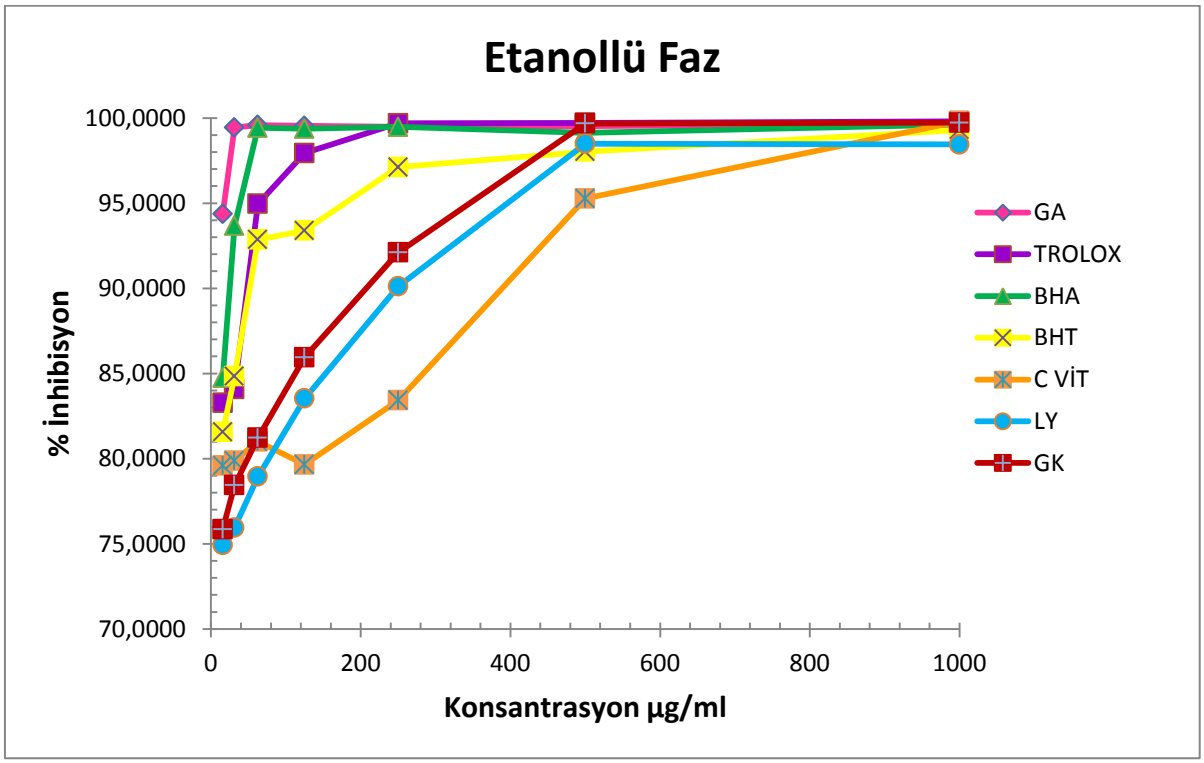
$A_{kontrol}$: Sadece ABTS radikal çözeltisi içeren kontrol değerinin absorbans değeri.

$A_{örnek}$: Örnek üzerine ABTS radikali içeren çözeltinin ilavesinden sonra ölçülen absorbans değeri.

Etanolde hazırlanmış standart madde ve bitki örneklerine ait çözeltilerin ölçülen absorbans değerlerine göre hesaplanan % inhibisyon oranları ve grafiği aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 4.8) (Şekil 4.9).

Çizelge 4.8. ABTS yöntemine göre etanollü çalışmalarda elde edilen % inhibisyon ve standart sapma değerleri

ABTS Etanollü Fazlar							
% İnhibisyon ± S.S.							
Konsantasyon µg/ml	**1000**	**500**	**250**	**125**	**62,5**	**31,25**	**15,625**
GA	99,67±0,10	99,53±0,33	99,49±0,00	99,54 ±0,33	99,59 ±0,15	99,44 ±0,07	94,36±3,10
TROLOX	99,81±0,02	99,71±0,00	99,68±0,00	97,94±2,70	94,96±1,31	84,09±2,97	83,27±0,65
BHA	99,63±0,12	99,14±0,53	99,48±1,32	99,37 ±0,00	99,42 ±0,00	93,67 ±0,00	84,73±0,00
BHT	99,30±0,20	98,03±1,53	97,12±1,91	93,39 ±1,05	92,86 ±0,76	84,83 ±1,10	81,56±1,33
C VİT	99,80±0,03	95,28±2,94	83,42±2,76	79,65 ±1,73	81,00 ±0,84	79,87 ±0,00	79,59±0,00
LY ÖRNEK	98,45±0,19	98,49±0,05	90,12±0,48	83,54± 0,69	78,95± 0,18	75,95± 1,51	74,93±1,52
GK ÖRNEK	99,73±0,02	99,68±0,04	92,10±2,05	85,95 ±0,89	81,23 ±1,01	78,44 ±1,31	75,85±0,43

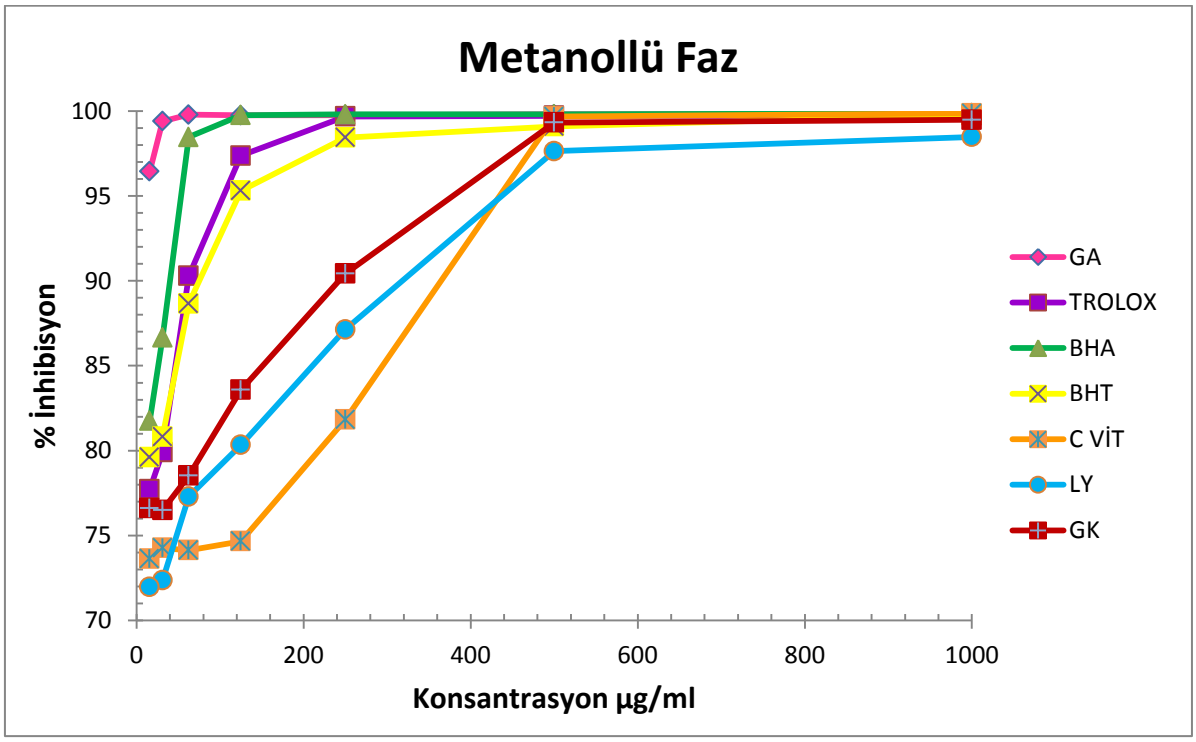


Şekil 4.9. ABTS yöntemine göre etanollü çalışmalarda elde edilen % inhibisyon değerlerine ait grafik

Metanolde hazırlanmış standart madde ve bitki örneklerine ait çözeltilerin ölçülen absorbans değerlerine göre hesaplanan % inhibisyon oranları ve grafiği aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 4.9) (Şekil 4.10).

Çizelge 4.9. ABTS yöntemine göre metanollü çalışmalarda elde edilen % inhibisyon ve standart sapma değerleri

ABTS Metanollü Fazlar							
% İnhibisyon ± S.S.							
Konsantasyon µg/ml	**1000**	**500**	**250**	**125**	**62,5**	**31,25**	**15,625**
GA	99,81±0,05	99,81±0,11	99,76±0,02	99,75 ±0,06	99,79 ±0,04	99,41 ±0,65	96,44±3,23
TROLOX	99,74±0,02	99,72±0,15	99,69±0,10	97,37± 4,01	90,29 ± 3,46	79,9 ± 2,30	77,71±1,84
BHA	99,87±0,02	99,81±0,02	99,81±0,02	99,76 ±0,07	98,47 ±0,62	86,65 ±1,39	81,76±0,12
BHT	99,78±0,02	99,10±0,24	98,45±0,36	95,31 ±0,31	88,67 ±1,15	80,82 ±0,26	79,61±0,88
C VİT	99,86±0,06	99,68±0,12	81,82±2,45	74,66±1,19	74,13±0,66	74,27±1,04	73,62±0,74
LY ÖRNEK	98,48±0,06	97,64±1,04	87,13±1,71	80,34 ±0,57	77,29 ±0,80	72,36 ±3,01	71,97±0,52
GK ÖRNEK	99,49±0,11	99,33±0,22	90,43±1,84	83,58 ±1,80	78,53 ±1,53	76,49 ±1,05	76,60±0,98

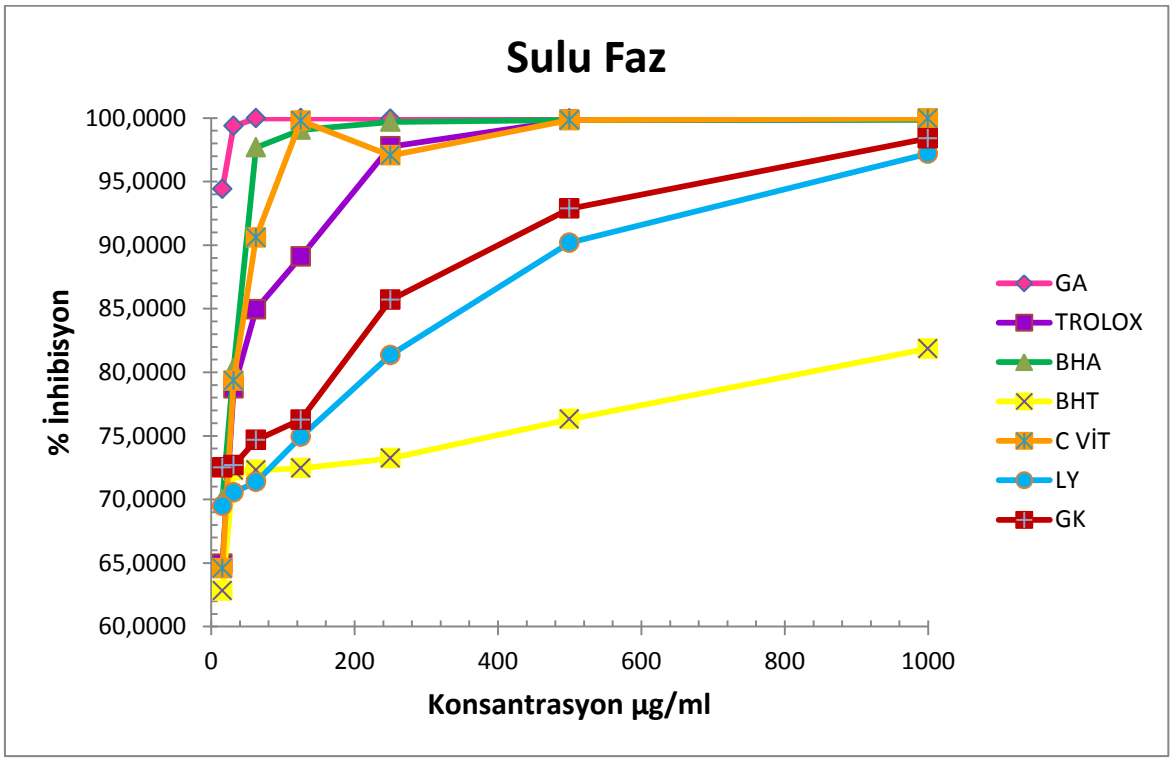


Şekil 4.10. ABTS yöntemine göre metanollü çalışmalarda elde edilen % inhibisyon değerlerine ait grafik

Sulu ortamda hazırlanmış standart madde ve bitki örneklerine ait çözeltilerin ölçülen absorbans değerlerine göre hesaplanan % inhibisyon oranları ve grafiği aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 4.10) (Şekil 4.11).

Çizelge 4.10. ABTS yöntemine göre sulu ortamdaki çalışmalarda elde edilen % inhibisyon ve standart sapma değerleri

ABTS Sulu Fazlar							
% İnhibisyon ± S.S.							
Konsantasyon µg/ml	**1000**	**500**	**250**	**125**	**62,5**	**31,25**	**15,625**
GA	99,96±0,02	99,95±0,02	99,94±0,00	99,97±0,00	99,97±0,02	99,36±0,94	94,41±0,91
TROLOX	99,88±0,02	99,85±0,11	97,76±1,64	89,10±1,34	84,95±1,51	78,72±0,55	64,94±6,94
BHA	99,87±0,02	99,83±0,1	99,70±0,26	99,06±0,55	97,69±0,76	80,32±2,75	70,01±1,7
BHT	81,86±7,97	76,31±3,66	73,24±0,00	72,45±1,17	72,30±0,95	72,28±0,00	62,81±3,66
C VİT	99,97±0,00	99,83±0,03	97,05±0,00	99,78±0,26	90,60±0,98	78,34±5,05	64,58±3,91
LY ÖRNEK	97,19±0,95	90,19±0,17	81,35±0,45	74,93±1,24	71,37±0,00	70,55±2,58	69,48±0,00
GK ÖRNEK	98,39±0,58	92,87±0,85	85,69 1,67	76,27 ±3,21	74,67 ±0,74	72,68 ±0,56	72,51±0,00



Şekil 4.11. ABTS yöntemine göre sulu ortamdaki çalışmalarda elde edilen % inhibisyon değerlerine ait grafik

4.5. DMPD Radikali Giderme Aktivitesi

DMPD yöntemi etanol, metanol, su fazında; 15,625- 1000 µg/ml aralığındaki standartlar Gallik Asit, Trolox, BHA, BHT, C Vitamini ile gölgede ve liyofilize olarak kurutulmuş örnek ekstrelerine uygulanmıştır. Ölçülen absorbans değerlerine göre hesaplanan % inhibisyon değerleri standartlarla karşılaştırmalı olarak aşağıdaki tablo ve grafiklerde gösterilmiştir. İnhibisyon değerleri (%) aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır. Absorbans azalışı DMPD radikali uzaklaştırma aktivitesindeki artışı göstermektedir.

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

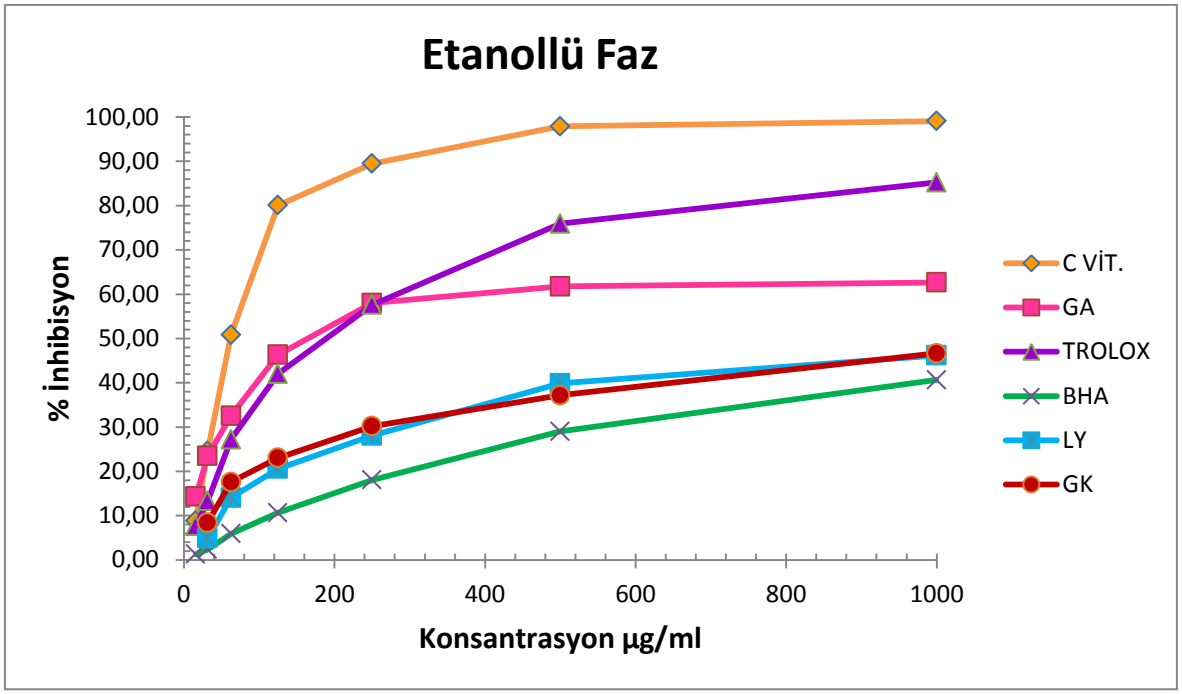
$A_{kontrol}$: Sadece DMPD radikal çözeltisi içeren kontrol değerinin absorbans değeri.

$A_{örnek}$: Örnek üzerine DMPD radikali içeren çözeltinin ilavesinden sonra ölçülen absorbans değeri.

Etanolde hazırlanmış standart madde ve bitki örneklerine ait çözeltilerin ölçülen absorbans değerlerine göre hesaplanan % inhibisyon oranları ve grafiği aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 4.11) (Şekil 4.12).

Çizelge 4.11. DMPD yöntemine göre etanollü çalışmalarda elde edilen % inhibisyon ve standart sapma değerleri

DMPD Etanollü Fazlar							
% İnhibisyon ± S.S.							
Konsantasyon µg/ml	**1000**	**500**	**250**	**125**	**62,5**	**31,25**	**15,625**
GA	62,66±0,65	61,74±1,43	57,98±0,78	46,33± 2,21	32,57± 1,95	23,49± 4,93	14,31± 1,82
TROLOX	85,25±0,19	75,93±0,4	57,6±8,64	42,02±6,36	27,20±0,88	13,28±2,88	7,66±1,07
BHA	40,63±2,23	28,99±0,28	18,05±0,98	10,65±0,28	5,92±0,00	2,37±0,84	1,28±0,14
C VİT	99,08±0,11	97,90±1,27	89,48±1,31	80,08 ±0,99	50,82 ±2,30	24,59 ±0,50	8,81 ±3,36
LY ÖRNEK	46,16±1,69	39,84±3,45	28,08±4,91	20,59 ± 1,89	14,04 ± 5,30	4,91 ± 2,76	20,54±11,23
GK ÖRNEK	46,35±3,65	37,18±7,64	30,20±4,31	23,03 ± 5,15	17,58 ± 4,57	8,41 ± 3,05	28,72 ± 9,54

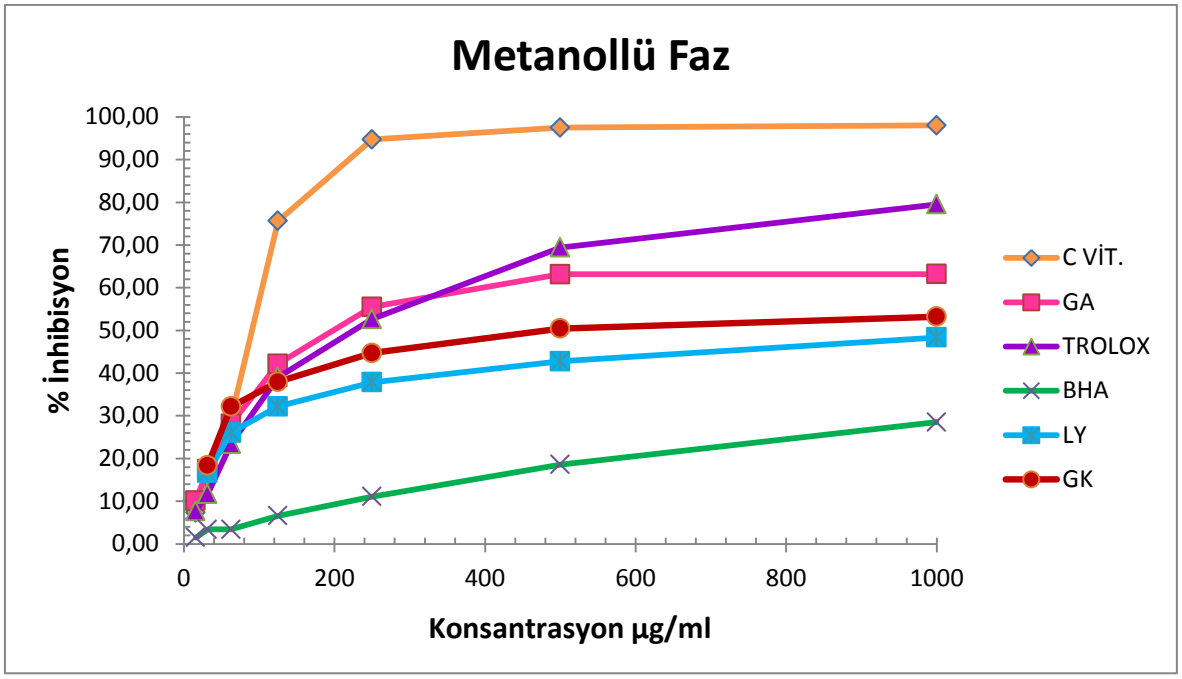


Şekil 4.12. DMPD yöntemine göre etanollü çalışmalarda elde edilen % inhibisyon değerlerine ait grafik

Metanolde hazırlanmış standart madde ve bitki örneklerine ait çözeltilerin ölçülen absorbans değerlerine göre hesaplanan % inhibisyon oranları ve grafiği aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 4.12) (Şekil 4.13).

Çizelge 4.12. DMPD yöntemine göre metanollü çalışmalarda elde edilen % inhibisyon ve standart sapma değerleri

DMPD Metanollü Fazlar							
% İnhibisyon ± S.S.							
Konsantasyon µg/ml	**1000**	**500**	**250**	**125**	**62,5**	**31,25**	**15,625**
GA	62,66±0,65	61,74±1,43	57,98±0,78	46,33± 2,21	32,57± 1,95	23,49± 4,93	14,31± 1,82
TROLOX	79,53±0,12	69,40±0,87	52,67±1,53	39,07 ±0,70	23,40 ±1,25	11,67 ±1,30	7,67 ±0,61
BHA	28,50±0,14	18,60±0,00	11,10±0,42	6,6 ±0,28	3,40 ±1,13	3,4 ±0,57	1,5 ±0,71
C VİT	98,02±0,00	97,50±0,50	94,73±0,99	75,63 ±2,83	29,45 ±1,19	15,61 ±3,27	7,38 ±3,82
LY ÖRNEK	48,33±3,34	42,77±2,81	37,85±3,26	32,18 ± 6,64	26,04 ± 2,92	16,67 ± 6,44	30,78 ± 6,63
GK ÖRNEK	53,23±6,14	50,44±7,91	44,7±13,16	37,95 ± 9,46	32,15± 7	18,35±10,21	33,21±12,46

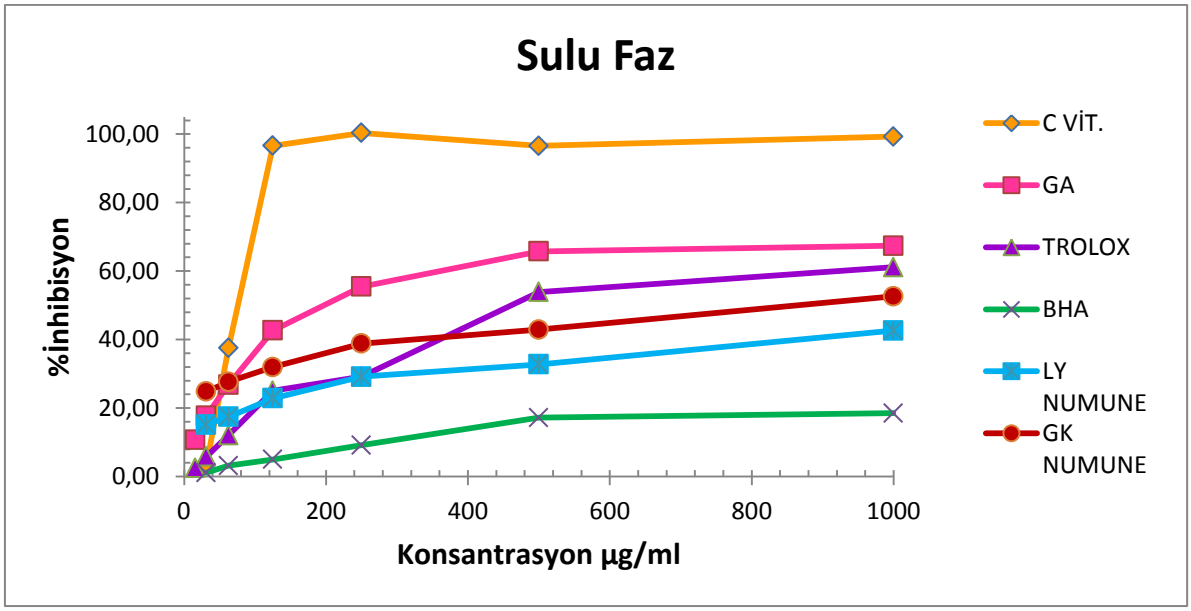


Şekil 4.13. DMPD yöntemine göre metanollü çalışmalarda elde edilen % inhibisyon değerlerine ait grafik

Sulu ortamda hazırlanmış standart madde ve bitki örneklerine ait çözeltilerin ölçülen absorbans değerlerine göre hesaplanan % inhibisyon oranları ve grafiği aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 4.13) (Şekil 4.14).

Çizelge 4.13. DMPD yöntemine göre sulu ortamdaki çalışmalarda elde edilen % inhibisyon ve standart sapma değerleri

DMPD Sulu Fazlar							
% İnhibisyon ± S.S.							
Konsantasyon µg/ml	**1000**	**500**	**250**	**125**	**62,5**	**31,25**	**15,625**
GA	67,38±0,71	65,74±0,75	55,46±1,49	42,68± 2,60	26,83± 1,89	17,76±0,41	10,71± 1,71
TROLOX	61,13±8,36	53,88±6,58	29,17±1,11	25,06±0,94	12,04±0,94	5,82 ±2,08	2,51 ± 0,36
BHA	18,49±1,21	17,21±1,09	9,16 ± 1,09	4,97 ± 0,48	3,17 ± 0,85	1,11±1,09	-0,51±0,73
C VİT	99,27±0,11	96,54±0,13	100,34±0,01	96,62±1,78	37,51±8,12	3,30±4,39	-6,08±3,15
LY ÖRNEK	42,63±7,66	32,74±7,9	29,14 ±8,86	22,85±6,92	17,42±7,87	15,13±7,98	15,52±6,91
GK ÖRNEK	52,61±7,58	42,91±11,03	38,85±12,04	31,96±11,62	27,64±12,31	24,83±13,38	22,68±13,71



Şekil 4.14. DMPD yöntemine göre sulu ortamdaki çalışmalarda elde edilen % inhibisyon değerlerine ait grafik

4.6. Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi

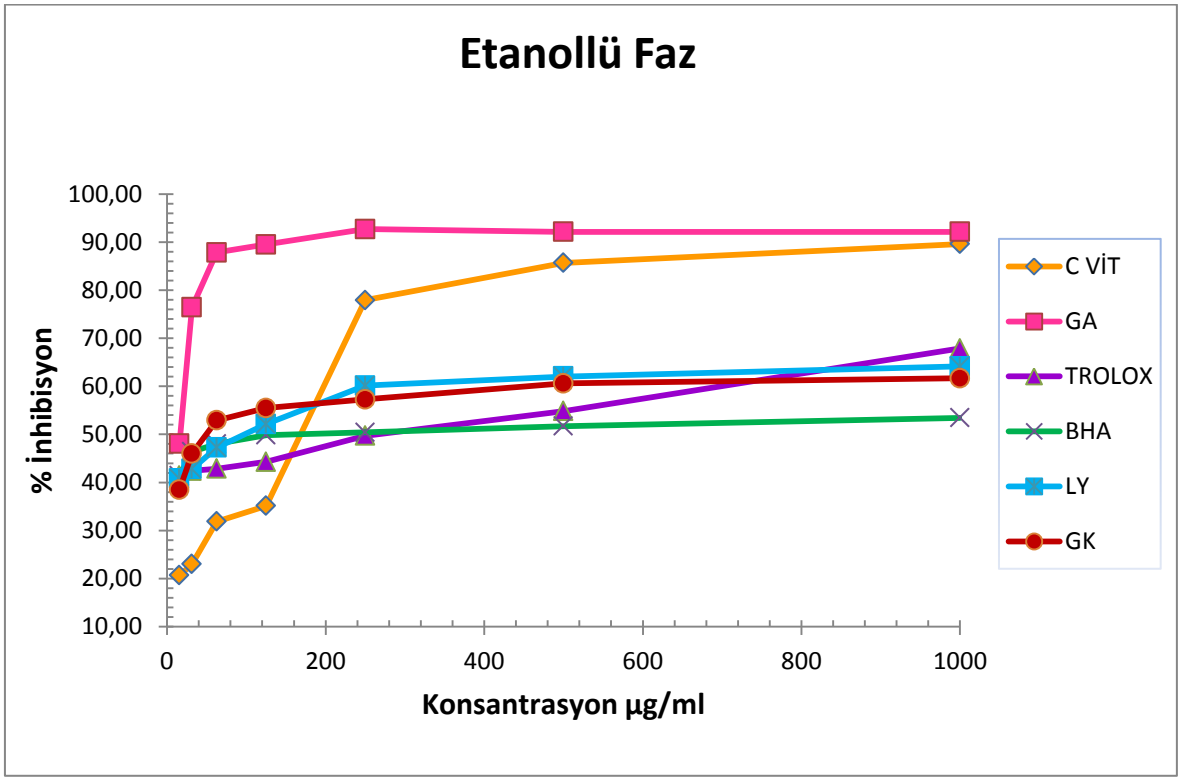
Süperoksit radikali giderme yönteminde etanol, metanol, su fazında; 15,625- 1000 µg/ml aralığındaki standartlar Gallik Asit, Trolox, BHA, BHT, C Vitamini ile gölgede ve liyofilize olarak kurutulmuş örneklerin ekstrelerine uygulanmıştır. Ölçülen absorbans değerlerine göre hesaplanan % inhibisyon değerleri standartlarla karşılaştırmalı olarak aşağıdaki tablo ve grafiklerde gösterilmiştir. İnhibisyon değerleri (%) aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır. Absorbans azalışı süperoksit anyonunun uzaklaştırma aktivitesindeki artışı göstermektedir.

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

Etanolde hazırlanmış standart madde ve bitki örneklerine ait çözeltilerin ölçülen absorbans değerlerine göre hesaplanan % inhibisyon oranları ve grafiği aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 4.14) (Şekil 4.15).

Çizelge 4.14. Süperoksit yöntemine göre etanollü çalışmalarda elde edilen % inhibisyon ve standart sapma değerleri

Süperoksit Deneyi Etanollü Fazlar							
% İnhibisyon ± S.S.							
Konsantasyon µg/ml	**1000**	**500**	**250**	**125**	**62,5**	**31,25**	**15,625**
GA	92 ± 0,14	92,33±0,16	93,10±0,44	90,29±1,45	89,10 ± 2,16	79,52 ± 5,59	58,95±19,22
TROLOX	67,86 ± 3,3	54,86±4,67	49,71±3,59	44,29±0,00	42,86 ± 3,23	42,43 ± 0,40	41,43 ± 0,20
BHA	53,43±0,00	51,71±0,00	50,43±0,00	49,86±0,00	48,00 ± 1,21	46,38 ± 4,67	41,38 ± 2,83
C VİT	89,62±1,09	85,67±4,94	77,90±3,79	35,14 ± 2,49	31,86 ± 2,74	23 ± 2,03	20,67 ± 2,21
LY ÖRNEK	64,14±7,68	62,02±5,17	60,14±4,31	52,14 ± 3,88	47,25 ± 1,98	42,77 ± 0,71	40,80 ± 0,42
GK ÖRNEK	61,67±1,40	60,62±2,81	57,29±0,43	55,48 ± 1,15	52,90 ± 1,67	46 ± 5,11	38,48 ± 3,46

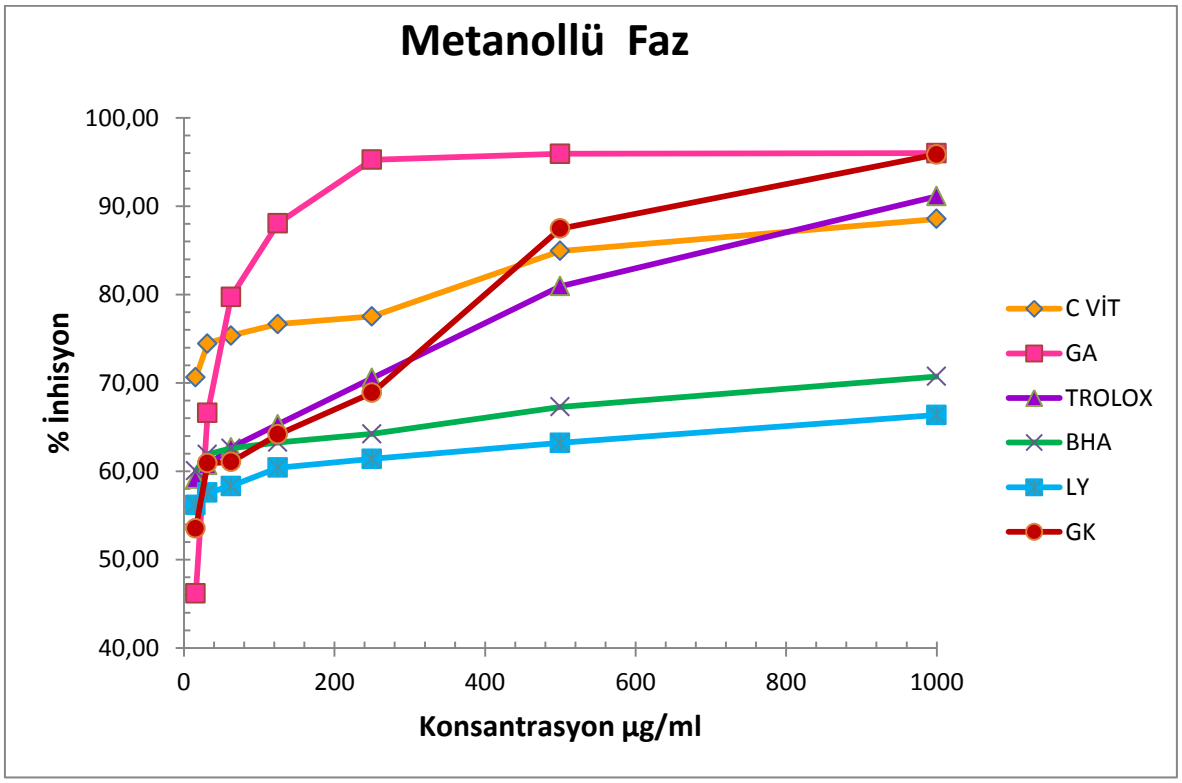


Şekil 4.15. Süperoksit yöntemine göre etanollü çalışmalarda elde edilen % inhibisyon değerlerine ait grafik

Metanolde hazırlanmış standart madde ve bitki örneklerine ait çözeltilerin ölçülen absorbans değerlerine göre hesaplanan % inhibisyon oranları ve grafiği aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 4.15) (Şekil 4.16).

Çizelge 4.15. Süperoksit yöntemine göre metanollü çalışmalarda elde edilen % inhibisyon ve standart sapma değerleri

Süperoksit Deneyi Metanollü Fazlar							
% İnhibisyon ± S.S.							
Konsantasyon µg/ml	**1000**	**500**	**250**	**125**	**62,5**	**31,25**	**15,625**
GA	96,01±0,16	95,93±0,49	95,52±0,98	88,06 ± 1,88	79,24 ± 2,81	66,62 ± 2,59	46,18 ± 2,88
TROLOX	91,14±1,45	80,96±1,46	70,56±1,53	65,31 ± 0,75	62,69 ± 1,06	60,7 ± 1,17	59,16 ± 1,29
BHA	70,74±0,75	67,30±0,27	64,22±0,87	63,27 ± 0,67	62,60 ± 0,31	61,92 ± 0,70	60,06 ± 0,34
C VİT	88,56±1,02	84,94±1,49	77,52±2,65	76,66 ± 3,06	73,35 ± 2,78	74,45 ± 2,93	70,62±10,46
LY ÖRNEK	66,37±6,45	63,22±2,94	61,41±0,95	60,40 ± 0,28	57,92 ± 3,22	57,99 ± 2,18	56,18 ± 3,79
GK ÖRNEK	95,86±3,17	87,47±4,98	68,88±4,67	64,18 ± 4,62	61,06 ± 2,15	56,11 ± 6,43	53,55 ± 4,92

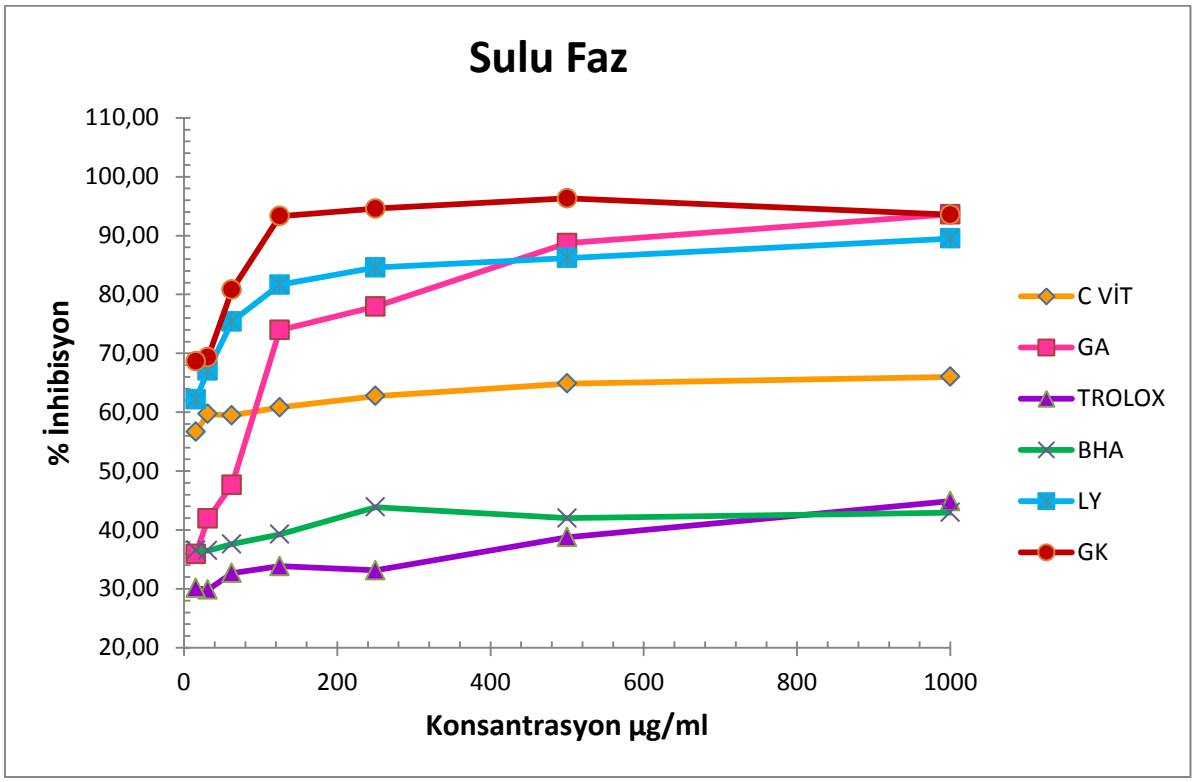


Şekil 4.16. Süperoksit yöntemine göre metanollü çalışmalarda elde edilen % inhibisyon değerlerine ait grafik

Sulu ortamda hazırlanmış standart madde ve bitki örneklerine ait çözeltilerin ölçülen absorbans değerlerine göre hesaplanan % inhibisyon oranları ve grafiği aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 4.16) (Şekil 4.17).

Çizelge 4.16. Süperoksit yöntemine göre sulu ortamdaki çalışmalarda elde edilen % inhibisyon ve standart sapma değerleri

Süperoksit Deneyi Sulu Fazlar							
% İnhibisyon ± S.S.							
Konsantasyon µg/ml	**1000**	**500**	**250**	**125**	**62,5**	**31,25**	**15,625**
GA	93,62±0,58	88,72±0,24	77,95±1,35	73,95 ± 0,85	47,67 ± 0,88	41,91 ± 0,94	35,88 ± 2,27
TROLOX	44,89±0,00	38,78±0,00	31,73±0,00	33,84 ± 0,00	32,67 ± 0,31	29,85 ± 1,76	30,12 ± 1,82
BHA	42,95±5,07	42,01±2,41	43,87±0,00	39,25 ± 0,66	37,60 ± 4,82	36,49 ± 0,25	36,55 ± 0,00
C VİT	66,02±0,13	64,86±1,00	62,75±0,00	60,82 ± 0,58	59,46 ± 0,57	59,69 ± 1,31	56,68 ± 1,76
LY ÖRNEK	89,49±3,97	93,21±0,27	94,10±0,24	93,63 ± 0,34	87,67 ± 3,50	67,08 ± 2,44	62,16 ± 1,65
GK ÖRNEK	93,54±0,62	96,32±0,60	94,59±0,94	93,3 ± 0,59	80,81 ± 0,53	69,33 ± 1,16	68,63 ± 0,65



Şekil 4.17. Süperoksit yöntemine göre sulu ortamdaki çalışmalarda elde edilen % inhibisyon değerlerine ait grafik

5. TARTIŞMA

Serbest radikaller, çeşitli kimyasal reaksiyonlarla meydana gelen dış orbitallerinde paylaşılmamış elektron içeren kimyasal türlerdir. Çevresindeki herhangi bir yapı ile etkileşime girerek, ondan elektron alırlar ya da ona bir elektron verirler. Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine girip onların yapısını bozan bu türler "oksidan moleküller" ya da "reaktif oksijen türleri" olarak da adlandırılır.

Serbest radikaller, organizmada, nükleik asitler, proteinler, lipidler ve karbohidratlar gibi makro moleküllerle reaksiyona girebilirler. Radikallerle vücudun antioksidan savunma sistemleri arasındaki mücadelenin, radikal lehine değişmesiyle hücre zarı tahrip olmakta ve sonucunda doku hasarı gelişmektedir. Bu nedenle serbest radikallerin kanser, kalp damar hastalıkları, bağışıklık sistemi hastalıkları, yaşlanma, katarakt, diyabet, böbrek ve karaciğer hastalıkları gibi pek çok hastalığa neden oldukları düşünülmektedir [68].

Antioksidanlar, radikallerin etkilerini geciktiren veya tamamen ortadan kaldıran yapılar olup; ROT'ların oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek üzere enzimatik veya nonenzimatik olarak endojen, bazı ilaçlar, vitaminler ve sentetik gıda antioksidanları olarak da eksojen olmak üzere iki grupta toplanırlar.

Sentetik antioksidanların kanserli hücre oluşumunu teşvik ettiği gözlendiğinden [106], günümüzde doğal antioksidan maddelerin kullanımı önem kazanmıştır. Bitkilerin karotenoid, flavonoit ve diğer fenolik bileşikler bakımdan zengin olmaları ve önemli yan etkilerinin tespit edilememesinden dolayı antioksidan aktivite sergileyen bitkilerin gıda ve beslenme alanlarındaki kullanımları hakkında çok sayıda çalışma yapılmıştır. Yapısında bulunan uçucu yağlardan dolayı antioksidan özelliği bulunan birçok aromatik bitkinin ve bunların ekstraktlarının kullanımının önemli olduğu düşünülmektedir. Bu etki aromatik halkadaki fenolik hidroksil gruplarından kaynaklanmaktadır [155,156].

Literatürdeki bazı araştırmalar fenolik bileşenler ve antioksidan aktivite arasındaki ilişkiyi belirtmektedir [157,158]. Bu maddelerden fenolik asitlerin ve bunların esterlerinin antioksidan aktiviteleri, sterik engelleme ile güçlenen moleküldeki hidroksil gruplarının sayısına bağlıdır. Fenolik asitler içinde gallik asit yüksek antioksidan aktiveteye sahiptir

[139,140]. Bu fenolik yapılar ülkemiz mutfağında yemek ve salatalara tat ve koku vermek için kullanılan aromatik bitkilerden nanenin bileşenleri arasında bulunmaktadır.

Mentha türlerinin de içinde bulunduğu Lamiaceae familyasındaki bitkiler, önemli doğal antioksidan kaynaklarıdır [159]. Yirmialtı sebze türündeki fenolik madde miktarının incelendiği bir çalışmada nanenin total fenolik madde miktarı Folin Ciocalteu yöntemi göre 5,15g GAE /100g (51,5mg/g) olarak bulunmuştur. Ayrıca nanede en fazla bulunan fenolik bileşiklerin kateşin, kafeik asit ve rosmarinik asit olduğu belirtilmektedir [160].

Nanenin içinde bulunan bileşiklerden olan rosmarinik asitin [161] antioksidan aktivitesinin olduğu bildirilmiştir [162]. Fenolik bileşik taşıyan Yarpuz (*Mentha pulegium),* Kantaron (*Hypericum perforatum*), Kekik (*Origanum vulgare* su*bsp. hirtum*), Kandil çayı(*Sideritis athoa*), Civanperçemi (*Achillea nobilis subsp. sipylea*), Kaz Dağı göknarı kozalağı (*Abies nordmanniana spp.equi-trojani*), kararbaş otu (*Lavandula stoechas subsp. stoechas*), Adaçayı (*Salvia tomentosa*), Nane (*Mentha spicata*), Kaz Dağı çayı (*Sideritis trojana*) gibi bitkilerde; antioksidan aktivitesi vitamin E'den ve sentetik bir antioksidan olan BHT' den yüksek olan rozmarinik asit, hem bulunma sıklığı hem de bulunma miktarı bakımından diğer fenolik asitlerden daha fazla tespit edilmiştir. En yüksek rozmarinik asit miktarı sırayla kekik-adaçayı-nane şeklinde olup, bunun etkisiyle toplam fenolik asit miktarı en yüksek bitkilerin yine aynı bitkiler olduğu görülmüştür [163]. Nane (*Mentha piperita* L.), Atkuyruğu (*Equisetum hyemale* L.), Roka (*Eruca sativa Miller*), Sarı Kantaron (*Hypericum perforatum* L.), Meyan (*Glycyrrhiza glabra* L.), Dereotu (*Anethum graveolens* L.), Hindiba (*Cichorium endivia* L.), Civan Perçemi (*Achillea millefolium* L.), Kırmızı Kantaron (*Centaurium erythraea Rafn subsp. erythraea Rafn.*), Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.), Karabaş Otu (*Lavandula stoechas* L.), Lavanta (*Lavandula angustifolia Miller*.), Ada çayı (*Sideritis congesta* P.H.Davis & Hub.-Mor.), Adaçayı (*Sideritis dichotoma Huter*), Oğulotu (*Melissa officinalis* L. *subsp. officinalis*), Kekik (*Origanum onites* L.), Karakekik (*Thymbra spicata* L. *var spicata*), Isırgan otu (*Urtica dioica* L.), Ayrıkotu (*Agropyrum repens* L.), Mısır (*Zea mays* L.) bitkilerinin α-tokoferol, β-karoten ve gallik asit gibi antioksidan oldukları bilinen maddeler yönüyle içeriklerinin belirlendiği deneysel bir çalışmada, en fazla α-tokoferol, β-karoten ve gallik asit içeriğine sahip ilk iki türün sırasıyla *Rosmarinus officinalis, Mentha piperita* olduğu belirtilmiştir [164].

Mentha longifolia L. ssp. nın metanollü ekstresinin antioksidan etkisinin olduğu, DPPH ve beta-karoten/linoleik asit testleri kullanılarak gösterilmiştir [165]. Nane bitkisinin antioksidan kapasitesinin belirlenmesine yönelik yapılan diğer bir çalışmada, dokuz farklı nane türünün metanollü ekstrelerinin DPPH radikal temizleyici etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Bitkilerin 250 µg/ml konsatrasyonda hazırlanan örneklerinde DPPH radikalini inhibe etme oranı maksimum %82 olarak bulunmuştur [166].

Popüler kullanımı olan nane, lavanta, limon, akgünlük, greyfurt, ve biberiye bitkilerinin antioksidan aktivitesi incelenmiş; bu bitkilerin ABTS radikaline karşı radikal süpürücü aktivitelerinin olduğu bulunmuş ve en yüksek aktivite nanede tespit edilmiştir [167]. *Mentha spicata* kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada bitkinin hekzan, kloroform, etil asetat ve sulu ekstreleri hazırlanarak ABTS radikali giderme aktivitesi ölçülmüştür. En yüksek radikal giderici etkinin etil asetat ve sulu ekstrelerde görüldüğü, 20 µg/ml konsantrasyondaki etil asetat ekstresinin % 95 ve 30 µg/ml konsantrasyondaki sulu ekstresinin ise % 84 oranında ABTS radikalini inhibe ettiği bulunmuştur [168].

Çalışmamızda nanenin kuru bitki numunesinde ve liyofilize edilmiş şeklinde Folin Ciocalteu yöntemine göre toplam fenolik madde içeriği GAE cinsinden tespit edildi. Aynı şekilde bitkinin iki numunesinin antioksidan kapasitesi de cuprac yöntemiyle tayin edildi. Ayrıca bitkinin iki numunesinin, DPPH, ABTS, DMPD ve Süperoksit radikallerini giderme yöntemleri kullanılarak radikal temizleyici aktiviteleri belirlendi. Elde edilen sonuçlar, antioksidan etkisi bilinen, gallik asit, trolox, BHA, BHT, C vitamini gibi standart olarak kullanılan maddelerden elde edilen değerler ile karşılaştırılarak yorumlandı.

Fenolik hidroksil grupları radikal yok etme yeteneğine sahip fonksiyonel yapılardır. Bitkilerdeki fenol bileşenleri hidroksil gruplarından hidrojenlerini radikallere vererek antioksidan aktivitede önemli rol oynayan kararlı fenoksil radikalleri oluştururlar. Bu nedenle bitki ekstrelerinin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde fenolik bileşik miktarlarının belirlenmesi önemli bir yer tutar. Çalışmamızda bitki ekstrelerindeki toplam fenolik madde miktarı FCR ile tayin edildi. Gallik asit kullanılarak yapılan deney sonucunda elde edilen kalibrasyon grafiğine göre absorbansları ölçülen bitki ekstrelerinin fenolik madde içerikleri gallik asit eşdeğeri olarak hesaplandı. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, gölgede kurutulmuş bitki ekstrelerinin fenolik madde miktarı liyofilize edilmiş bitki ekstrelerinden daha yüksek bulunmuştur. Bu miktarlar gölgede kurutma için 59,91± 24,97

mg/g GAE, liyofilize bitki için 58,20 ±2,34 mg/g GAE dir. Shan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada [160] nanedeki total fenolik madde miktarı Folin Ciocalteu yöntemi göre 5,15g/100g GAE (51,5mg/g) olarak bulunmuştur. Bu sonuç çalışmamızı destekler niteliktedir.

CUPRAC yöntemi bakır(II) nin oksidan olarak kullanıldığı total antioksidan kapasite tayin yöntemidir. Yöntem elektron transferi esasına dayanmaktadır. Bu yöntem ile hidrofilik antioksidanlar kadar lipofilik antioksidanların kapasiteleri ölçülebilmektedir. CUPRAC yöntemi ile tiyol içerikli (glutatyon ve sistein gibi) antioksidanların da kapasite tayini yapılabilmektedir. Yöntemde bakır(II)'nin bitki örneğinde bulunan antioksidanlar (redüktan) tarafından bakır(I)'e indirgenmesi temel alınmıştır. Çalışmamızda bitki örneklerinin absorbans değerleri, antioksidan aktivitesi daha önceden bilinen standart maddelerle karşılaştırılmıştır. Çalıştığımız etanol ve metanolde gallik asitin, su fazında ise C vitamininin antioksidan aktivitesinin en yüksek olduğu görülmüştür. Gallik asitin etanoldeki maksimum absorbans değeri 3,89±0,02, metanoldeki maksimum absorbans değeri 3,82±0,00 ve C vitamininin sulu fazdaki maksimum absorbans değeri 3,75±0,16 dır. Bitki örneklerinin antioksidan aktivitesi standart madde çözeltilerinin antioksidan aktivitesinden düşük çıkmıştır. Bitki örneklerinin etanollü ve metanollü ekstreleri birbirlerine çok yakın absorbans değerleri vermiştir. Bunların maksimum değerleri metanollü fazda olup liyofilize bitki için 2,68±0,10 ve gölgede kurutulmuş bitki için 2,54±0,07 olarak ölçülmüştür. Sulu fazda bitki numunelerinin antioksidan aktivitesinin azaldığı, gölgede kurutulmuş bitkinin antioksidan kapasitesinin ise liyofilize bitkiden daha yüksek olduğu görülmüştür. Sulu ortamda liyofilize bitki için maksimum absorbans değeri 1,48±0,08 olarak ölçülürken gölgede kurutulmuş bitkinin maksimum absorbansı 2,35±0,61 olarak ölçülmüştür. Ancak standart maddelerden BHT'nin sulu çözeltisinin antioksidan aktivitesi bitki örneklerinden düşük çıkmıştır. Bunun BHT'nin suda az çözünmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Cuprac yöntemi ile yaptığımız tayinde, standart maddelerin düşük konsatrasyonlarda bile maksimum absorbans değerlerini yakaladığı ve belli bir konsatrasyon değerinden sonra absorbanslarının değişmediği, yüksek değerlerde devam ettiği, bitki ekstrelerinde ise konsantrasyon arttıkça absorbans değerlerinin yükseldiği görülmüştür. Bunun, bitki ekstrelerindeki antioksidan bileşik miktarının çalışmada kullanılan standart maddelerden daha az olmasından ya da örneklerdeki bileşiklerin standart maddelerden daha zayıf antioksidan etki göstermesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

DPPH serbest radikal bağlama yönteminde, antioksidanların DPPH radikalini bağlama etkileri, hidrojen (H) iyonu verme yeteneklerinden kaynaklanmaktadır. Bu yöntem, lipid oksidasyonunu engelleyen antioksidanlar için genel olarak kabul edilmiş bir yöntemdir [169]. Çalışmamızda liyofilize ve gölgede kurutulan her iki bitki örneğinin DPPH radikalini savıcı etkisi, antioksidan aktivitesi daha önceden bilinen standart madde çözeltilerinin radikal savıcı etkisi ile karşılaştırılmıştır. DPPH yönteminde standart maddelerin etanollü ve metanollü çözeltilerinde antioksidan aktivitenin en yüksek trolox' ta olduğu görülmüştür. Trolox'un etanolde ki maksimum % inhibisyon değeri 97,64±0,00, metanolde ki maksimum % inhibisyon değeri 98,38±0,04 tür. Sulu fazda en yüksek aktivitenin C vitaminde olduğu bulunmuştur. C vitamini çözeltisinin maksimum % inhibisyon değeri 98,10±0,00 dir. Sulu çözeltilerde ki bu farkın; diğerlerine göre C vitamininin daha fazla hidrofilik özellik göstermesinden ileri geldiği düşünülmüştür. Çalıştığımız örneklerinin antioksidan aktivitesi standart madde çözeltilerinin antioksidan aktivitesinden daha düşük çıkmıştır. Bitki örneklerinin etanollü ve metanollü ekstrelerinin antioksidan aktivitesi sulu ekstrelerden daha yüksek bulunmuştur. Liyofilize ve gölgede kurutulmuş örneklerin DPPH radikal savıcı etkileri birbirine yakındır. Bunların maksimum inhibisyon değerleri metanollü fazda olup; 1000 µg/ml derişimde, liyofilize bitki için % inhibisyon değeri 93,36±0,00 ve gölgede kurutulmuş bitki için 93,68±0,77 olarak hesaplanmıştır. Bununla birlikte çalışmamızda, 250 µg/ml derişimde, liyofilize bitki için % inhibisyon değeri 92,70±1,01 ve gölgede kurutulmuş bitki için 91,11±1,74 olarak hesap edilmiştir. Bu değerler, Ahmad ve arkadaşlarının [166] yaptığı çalışmada bulunan nanenin 250 µg/ml konsatrasyonda hazırlanan metanollü örneklerinde DPPH radikalini inhibe etme oranının maksimum %82 oluşu ile uyum içindedir. Sulu ortamda ise bitki numunelerinin radikal savıcı etkisinin, etanol ve metanol fazına göre azaldığı bu durumun suyun kullanılan diğer çözücülere göre daha polar olmasından kaynaklandığı, sulu ortamdaki örneklerden gölgede kurutulmuş bitkinin % inhibisyon değerinin (83,26±4,70) liyofilize bitkiden (73,60±0,42) daha yüksek olduğu görülmüştür. Standart madde çözeltilerinin çok düşük konsatrasyonlarda bile maksimum radikal savıcı etkiyi sağladıkları ve bu yüksek seviyeyi korudukları, daha düşük % inhibisyon değerlerine sahip olmak kaydıyla bitki ekstrelerinin de aynı eğilimde olduğu, ancak bu eğilimi standart çözeltilerine göre daha yüksek konsantrasyonlarda yakaladıkları görülmüştür. Bu durum, bitki ekstrelerindeki antioksidan bileşik miktarının, çalışmada kullanılan standart maddelerden daha az olmasından ya da örneklerdeki bileşiklerin standart maddelerden daha zayıf antioksidan etki göstermesinden kaynaklanabilir.

ABTS radikali giderme aktivitesi yöntemi elektron transferi esasına dayanmaktadır. ABTS radikali geniş bir pH aralığında kararlı olduğu gibi hem sulu hem de organik çözücülerde çözünebilir ve dolayısıyla lipofilik ve hidrofilik bileşiklerin antioksidan kapasitesini ölçmek için kullanılabilir [170,171]. Yöntemin artan kullanımına rağmen bazı sınırlamaları vardır ve en büyük dezavantajı sentetik $ABTS^{\bullet+}$ radikalinin biyolojik sistemlerde bulunmamasıdır [172,173]. Çalışmamızda, liyofilize ve gölgede kurutulmuş bitki örneklerinin ABTS radikalini giderici etkisi, antioksidan aktivitesi daha önceden bilinen standart madde çözeltilerinin radikali giderici etkisi ile karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda BHT dışındaki standart maddeler ile bitki ekstrelerinin maksimum inhibisyon değerleri %95 in üzerinde bulunmuştur. Etanollü ve metanollü fazlardaki standart madde çözeltilerinin, C vitamininin düşük konsantrasyonları hariç tümünün ABTS radikalini inhibe etme oranlarının, bitki örneklerinin radikali inhibe etme oranlarından yüksek olduğu tespit edilmiştir. Sulu fazda ise C vitamininin bitki örneklerinden daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği görülürken diğer yandan BHT' nin sulu ortamdaki antioksidan kapasitesin bitki örneklerine göre daha düşük olduğu görülmüştür. Bu iki olayın da C vitamini ve BHT nin polaritesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Çalıştığımız tüm çözücülerde, gölgede kurutulmuş örnek ekstresinin liyofilize örnek ekstresinden kısmen daha iyi antioksidan aktivitesinin olduğu görülmüş, bitki örneklerine ait etanollü ve metanollü ekstrelerin %inhibisyon değerleri sulu ekstrelerin değerlerinden daha yüksek bulunmuştur. Arumugam ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada nanenin 30 µg/ml konsantrasyondaki sulu ekstresinin % 84 oranında ABTS radikalini inhibe ettiği tespit edilmiştir [168]. Çalışmamızda ise nanenin sulu ortamda 31,625 µg/ml konsantrasyonu çalışılmış, bu konsantrasyonda ABTS radikalini inhibe etme oranı gölgede kurutulmuş bitki için % 72,68 ±0,56 liyofilize bitki için % 70,55±2,58 olarak bulunmuştur. Bu sonuçların Arumugam ve arkadaşlarınca yapılan çalışmanın değerleri ile uyumlu olduğu görülmüştür. ABTS yöntemi ile yaptığımız çalışmada, standart maddelerin düşük konsatrasyonlarda maksimum inhibisyon değerlerini yakaladığı ve belli bir konsatrasyon değerinden sonra maksimum inhibisyonun sabit bir değerde seyrettiği, bitki ekstrelerinde ise inhibisyonun, konsantrasyon arttıkça arttığı 500 µg/ml derişiminden itibaren maksimum inhibisyona ulaşıldığı gözlenmiştir. Bitki ekstrelerinde görülen bu eğilimi C vitamini ve BHT çözeltileride göstermiştir. Bu durum bitki ekstreleri yönüyle değerlendirildiğinde; ekstrelerdeki antioksidan bileşik miktarının çalışmada kullanılan standart maddelerden daha az olmasından ya da örneklerdeki bileşiklerin standart

maddelerden daha zayıf antioksidan etki göstermesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

DMPD metodu, hidrofilik grupların antioksidan aktivitesinin hızlı ve duyarlı bir sekilde belirlenmesi için uygun bir yöntemdir [153]. Çalışmamızda her iki bitki örneğinin DMPD radikalini giderici etkisi, antioksidan aktivitesi daha önceden bilinen standart madde çözeltilerinin etkisi ile karşılaştırılmıştır. DMPD yönteminde standart maddelerin tüm çözeltilerinde antioksidan aktivitenin en yüksek C vitamininde olduğu görülmüştür. C vitamini' nin etanoldeki maksimum % inhibisyon değeri 99,08±0,11 metanoldeki maksimum inhibisyon değeri 98,02±0,00 sulu fazda ki maksimum % inhibisyon değeri ise 99,27±0,11 olarak bulunmuştur. Bitki örneklerinin antioksidan aktivitesinin, BHA' dan yüksek olduğu ancak diğer standart madde çözeltilerinden düşük olduğu bulunmuştur. Bitki örnekleri kıyaslandığında gölgede kurutulmuş bitkinin antioksidan aktivitesi liyofilize bitkiye göre daha fazla bulunmuştur. Numunelerin DMPD radikalini inhibisyon değerleri metanollü fazda daha yüksektir. Bu değer liyofilize bitki için % 48,33±3,34 gölgede kurutulmuş bitki numunesi için % 53,23±6,14 dir. DMPD yönteminde; bitki örnekleri ile standart maddelerin % inhibisyon değerlerin benzer eğilimde olduğu, 500 µg/ml derişiminden sonra maksimum inhibisyona ulaşıldığı, C vitaminin numunelerin ve standart maddelerin 2 katı antioksidan aktivitesinin olduğu görülmüştür. DMPD radikal giderme aktivitesi yöntemiyle yaptığımız bu çalışmada bitki ekstrelerinin ve standart madde çözeltilerinin % inhibisyon değerlerini, çalışmamızdaki diğer yöntemlerden elde ettiğimiz % inhibisyon değerlerinden daha düşük olarak tespit ettik. Bu durum DMPD yönteminin hidrofilik antioksidan maddelere duyarlı olmasından kaynakladığı şeklinde yorumlanabilir.

Süperoksit radikalinin lipitte çözünürlüğü sınırlı iken polar yapılardaki çözünürlüğü daha yüksektir. Süperoksit radikali giderme deneyinde, her iki bitki örneğinin süperoksit radikal giderici etkisi, antioksidan aktivitesi daha önceden bilinen standart madde çözeltilerinin etkisi ile karşılaştırılmıştır. Standart madde ve bitki numunelerinin çalışıldığı etanollü, metanollü ve sulu fazlarda en yüksek antioksidan aktivitenin gallik asitte olduğu görülmüştür. Gallik asitin etanoldeki maksimum % inhibisyon değeri 92,00±0,14 metanoldeki maksimum inhibisyon değeri 96,01±0,16 sulu fazda ki maksimum % inhibisyon değeri ise 93,62±0,58 olarak bulunmuştur. Bitki örneklerinin süperoksit radikali giderme aktivitesinin çalışılan tüm fazlarda BHA ve BHT'den yüksek olduğu

bulunmuştur. Çalışılan bitki örneklerin süperoksit radikal giderici etkisi en yüksek sulu ekstrelerde görülmüş olup bu değerler gölgede kurutulmuş bitki için % 93,54±0,62 liyofilize bitki için % 89,49±3,97 dir. Bitki örnekleri kıyaslandığında gölgede kurutulmuş bitkinin süperoksit radikali temizleyici etkisinin, metanollü ekstrelerde çok daha fazla olmak üzere liyofilize bitkiden yüksek bulunmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yiyecek ve içecek olarak tüketildiği gibi geleneksel olarak çesitli hastalıkların tedavisinde, ilaç, kozmetik ve parfümeri işlerinde kullanılan nane(*Mentha piperita L.*)'nin yaş ve kuru bitki formunun antioksidan aktivitesi ile total fenolik madde miktarı bu tez kapsamında araştırılmıştır. Çalışmada değişik yöntemlerle elde edilen sonuçlar, antioksidan aktivitesi önceden bilinen bazı standart maddeler ile karşılaştırma yapılarak değerlendirilmiştir. Nane(*Mentha piperita L.*)'nin standart maddelerle kıyaslanabilecek düzeyde hatta BHA ve BHT gibi bazı standart maddelerden daha fazla radikal temizleyici etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Bitkinin gölgede kurutulmuş formunun kısmen daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Tıbbi faydaları en fazla olan bitkilerden biri olmasının yanısıra tatlandırıcı, çay ve baharat yapımında yaygın olarak kullanılan ve yüksek nem içeren nanenin liyofilize ve gölgede kurutulmuş her iki formunun da antioksidan olarak kullanılabileceği kanaatine bu çalışma sonucunda varılmıştır. Bitkinin in vivo koşullardaki antioksidan etkisinin endojen antioksidan maddelerle kıyaslanarak değerlendirilebileceği deneysel bir çalışma yapılmasının bu konudaki bilginin pekiştirilmesinde yararlı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Halliwell, B., Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57, 715-725.

2. Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E Anal. *Biochemistry*, 269, 337-341.

3. Dorman, HJD. (2000). In Vitro Antioxidant Activity of a Number of Plant Essential Oils and Phytoconstituents. *Journal of Essential Oil Research*,12, 241-248.

4. Çavdar, C., Sifil, A., Çamsarı, T. (1997). Reaktif Oksijen Partikülleri Ve Antioksidan Savunma. *Office Journal of the Turkish Nephrology, Association,* 3(4), 92-95.

5. Halliwell, B. (1991). Drug antioxidant effects. *Drugs,* 42(4), 569-605.

6. Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hras, AR., Simonic, M., Knez, Z. (2005). Phenols, proanthocyanidis, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89, 191-198.

7. Javanmardi, J., Stushnoff, C., Lcke, E., Vivanco, JM. (2003). Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian Acimum Accessions. *Food Chemistry*, 83, 547-550.

8. Rice-Evans, CA., Miller, NJ., Bolwell, PG., Bramley, PM., Pridham, JB. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenol flavonoids. *Free Radical Research*, 22(4), 375-383.

9. Pekkarinan, S.S., Heinonen, I.M., Hopia, A.I. (1999). Flavonoids quercetin, myricetin, kaemferol and (+) – catechin as antioxidants in methyl linoleate. Journal of the Science of *Food and Agriculture*, 79, 499-506.

10. Burda, S., Oleszek, W., (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49, 2774-2779.

11. Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., Vuroela, HJ., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., (1999). Antioxidant activity of plants extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3954-3962.

12. Başer, H.C., (1998). Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Endüstriyel Kullanımı. *Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Bülteni,* 13,14, 19-43.

13. Lange, D., (2006). International Trade in Medicinal and Aromatic Plants. *Medicinal and Aromatic Plants*, 155-170.

14. Bayram, E., Kırıcı, S., Tansı, S., Yılmaz, G.,Arabacı, O., Kızıl, S., Telci, D., (2010). Tıbbi Ve Aromatik Bitkiler Üretiminin Arttırılması Olanakları. *Türkiye Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi Bildiriler Kitabı*-I, 11–15 Ocak. Ankara. s: 437–456

15. McKay, D. L., Blumberg, J. B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (Mentha piperita L.). *Phytotherapy Research*, 20,619–633.

16. Raghavan, S. (2006). *Handbook of spices, seasonings and flovorings*.(Second Edition). London: CRC Press p.133.

17. Tanker, N., Koyuncu, M., Coşkun, M. (1998). *Farmasötik Botanik*. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 78, 341.

18. Ceylan, A. (1983).*Tıbbi Bitkiler-II*. İzmir: Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 175.

19. Baytop, T. (1999). *Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi*. İstanbul: Nobel Kitabevi, 302-304.

20. Morton, J.F. (1977). *Major Medicinal Plants*. Illinois, USA: Publisher Charles C. Tomas.

21. Davis, P.H. (1982). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh: Edinburgh University Press., 7, 395.

22. Osawa, K., Saeki, T.,Yasuda, H., Hamashima, H., Sasatsu, M., Arai, T. (1999). The antibacterial activities of peppermint oil and green tea polyphenols, alone and in combination, against enterohemorrhagic Escherichia coli. *Biocontrol science*, 4, 1-7.

23. Imai, H., Osawa, K., Yasuda, H., Hamashima, H., Arai, T., Sasatsu, M. (2001). Inhibition by the essential oils of peppermint and spearmint of the growth of pathogenic bacteria. *Microbios*, 106, 31-39.

24. Ertürk, R., Çelik, C., Kaygusuz, R., Aydın, H. (2010). Ticari olarak satılan kekik ve nane uçucu yağlarının antimikrobiyal aktiviteleri. Cumhuriyet Tıp Dergisi, 32, 281-286.

25. Singh, G., Kapoor, I.P.S., Panday, S.K., Singh, U.K., Singh, R.K. (1998). Studies on essential oils, Part-11: Antibacterial investigation on volatile oils of some higher plants. *Indian Drugs*, 35, 591-593.

26. Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weigand, H., Weis, N. (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. Journal of Essential Oil Research, 1, 119-128.

27. Başbağ, S. (1993). *Halk Hekimliğinde Kullanılan ve Halk Ağzından Derlemeler Sözlüğünde Yer Alan Tıbbi Bitkiler*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

28. Conner, D.E., Beuchat, L.R. (2006). Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *Journal of Food Science*, 49, 429-434.

29. Nolkemper, S., Reichling, j., Stintzing, F., Carle, R., Schnitzler, P. (2006). Antiviral Effect of Aqueous Extracts from Species of the Lamiaceae Family against Herpes simplex Virus Type 1 and Type 2 in vitro. *Planta Medica*, 72(15), 1378-1382.

30. Gobel H, Schmidt G, Dworschak M, Stolze H, Heuss D. Essential plant oils and headache mechanisms. *Phytomedicine*, 2 (1995) 93-102.

31. Baytop, A. (1991). *Farmasotik Botanik Ders Kitabı*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi yayınları Üniversite Yayın No: 3637, Eczacılık Fakültesi Yayın No: 58.

32. Gürkan, E., Öndersev, D.V., Ulusoylu, M., Göztaş, Z., Dinçşahin, N.(Editörler). (2003). *Bitkisel Tedavi*, İstanbul: Marmara Üniversitesi Yayın No: 699, Eczacılık Fakültesi Yayın No: 19, M. Ü. Döner sermaye İşletmesi, Teknik Eğitim Fakültesi Matbaa Birimi.

33. Baliga, M.S., Rao, S. (2010). Radioprotective potential of mint: a brief review. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 6(3), 255-262.

34. Merkezefendi Geleneksel Tıp Derneği .(2010). *Bitkilerle tedavi sempozyumu* (5-6 Haziran 2010). İstanbul: İklim Ofset Matbaacılık, 62.

35. Naito, K., Ohoka, E., Kato, R., Kondo, Y., Iwata, S. (1991). The effect of L-menthol stimulation of the major palatine nerve on nasal patency. *Auris Nasus Larynx*, 18 221-226.

36. Naito, K., Komori, M., Kondo, Y., Takeuchi, M., Iwata, S. (1997). The effect of L-menthol stimulation of the major palatine nerve on subjective and objective nasal patency. *Auris Nasus Larynx*, 24, 159-162.

37. Eccles, R. (1994). Menthol and related cooling compounds. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 46, 618-630.

38. Arumugam, P., Gayatri Priya, N., Subathra, M., Ramesh, A. (2008). Anti-inflammatory activity of four solvent fractions of ethanol extract of Mentha spicata L. investigated on acute and chronic inflammation induced rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 26, 92–95.

39. Karimian, P., Kavoosi, G., Amirghofran, Z. (2013). Anti-inflammatory effect of Mentha longifolia in lipopolysaccharidestimulated macrophages: Reduction of nitric oxide production through inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Journal of Immunotoxicology*, 10(4), 393-400.

40. Juergens, U.R., Stober, M., Vetter, H. (1998). The anti-inflammatory activity of L-menthol compared to mint oil in human monocytes in vitro: a novel perspective for its therapeutic use in inflammatory diseases. *European Journal of Medical Research*, 3, 539-545.

41. Rajesh, K., Swamy A.H.M.V., Inamdar S.S., Joshi V., Kurnool A. (2013). Hepatoprotective And Antioxidant Activity Of Ethanol Extract Of Mentha arvensis Leaves Against Carbon Tetrachloride Induced Hepatic Damage In Rats. International Journal of PharmTech Research,5(2), 426-430.

42. Villasenor, I.M, Catalon, Ma. L.N.D., Chua, C.C.S., Edu, D.A., Nakar, J.P. (1995). Preliminary bioactivity studies on Mentha cordifolia Opiz. leaf extracts. *The Philippine journal of science*, 124, 333-343.

43. Sousa, A.A., Soares, P.M., Almeida, A.N., Maia, A.R., Souza, E.P., Assreuy, A.M. (2010). Antispasmodic effect of Mentha piperita essential oil on tracheal smooth muscle of rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(2), 433-436.

44. Hawthorn, M., Ferrante,J., Luchowski, E., Rutledge, A., Wei, X.Y., Triggle, D.J. (1998) The actions of peppermint oil and menthol on calcium channel dependent processes in intestinal, neuronal and cardiac preparations. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 2, 101-118.

45. Futami, T. (1984). Actions of counterirritants on the muscle contractile mechanism and nervous system. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 83, 207-218.

46. Villasenor, I.M., Catalon, Ma. L.N.D., Chua, C.C.S., Edu, D.A., Nakar,J.P. (1995). Preliminary bioactivity studies on Mentha cordifolia Opiz. leaf extracts. *Philippine Journal of Science*, 124, 333-343.

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

48. Kour, H., Perkins, M.J. (1991). The free radical chemistry of food additives., O.I Aruoma and B. Halliwell (Editors). *Free radicals and food additives*. London. Taylor and Francis Ltd, pp. 17–35.

49. McCord, J. (1993). Human disease, free radicals and the oxidant /antioxidant balance. *Clinical Biochemistry*, 26, 351-357.

50. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1992). Free Radicals, Antioxidants And Human Disease: Where Are We Now?. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 119, 598-620

51. Halliwell, B. (1989). Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions. *Acta neurologica Scandinavica*, 126, 23-33.

52. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1989). Metabolism of transition metals in the human body. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon, 111-150.

53. Akkuş, İ. (1995).Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri.(1.Baskı). Konya: Mimoza Yayınları.

54. Larson, RA. (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27(4), 969-978.

55. Sigel, H., Sigel, A. (1999). I*nterrelations Between Free Radicals and Metal Ions in Life Processes*. (2nd edition). Boca Raton FL: CRC Press.

56. Pryor, W.A. (Editors). (1982). Free Radicals in Biology, New York: Academic Press.

57. Genestra, M. (2007). Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular Signalling*, 19(9), 1807-1819.

58. Temür, N. (2006). *Çam, kavak, söğüt ve armut ağaçları üzerinde yetişen ökse otu (Viscum album L.) bitkilerinin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Tokat.

59. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. *Methods in Enzymology*. 186, 1-85.

60. Duthie, G.G., Wahle, KWJ., James, WPT. (1989). Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease. *Nutrition Research Reviews*. 2, 51-62.

61. Miller, D.D. (1996). Minerals. In Food Chemistry, New York: Marcel Dekker.

62. Meydani, M. (2001). Antioxidants and cognitive function. *Nutrition Reviews*, 59(8), 75-82.

63. Lee, J.D. (1991). *Concise Inorganic Chemistry*, (4th edition). New York: Hapman&Hall

64. Pryor, W.A. (1982). Free radical biology: Xenobiotics, cancer and aging. Annals of the New York Academy of Sciences, 393, 1-22.

65. Murray, R.K, Granner, D.K, Mayes, P.A, Rodwell, V.W. (1996). *Harper'ın Biyokimyası.* (çev. Dikmen, N., Özgünen, T.) İstanbul:Barış Kitabevi. (Eserin orijinali 1982'de yayımlandı.)

66. Carroll, EC. (1987). Oxygen radicals and human disease. *Annals of Internal Medicine*, 107, 526-545.

67. Serafini, M., Del Rio, D. (2004). Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool?. *Redox Report* 9(3), 145-152.

68. Diplock, A. (1998). *Healty lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients.* ILSI Europe concise monograph series, 59.

69. Cadenas, E., Packer, L. (2002). *Handbook of Antioxidants.* (2nd. Edition). New York-Basel: Marcel Dekker.

70. Cheeseman, KH., Slater, TF. (1993).An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49, 481- 493.

71. Gutteridge, J.M.C., Hailiwell, B. (1990). The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends in Biochemical Sciences,* 15, 129-135.

72. Young, I.S., Woodside, J.V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54, 176-186.

73. Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., Noguchi, N. (2005). Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338, 668–676.

74. Şekeroğlu, M.R., Şahin, H., Dülger, H., Algün, E. (2000). The effect of dietary treatment on erythrocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and serum lipid peroxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clinical Biochemistry,* 33, 669-674.

75. Onat, T., Emerk, K., Sözmen, EY. (Editors). (2002). *İnsan Biyokimyası*, Ankara: Palme Yayıncılık.

76. Schuessler, H., Schilling, K. (1984). Oxygen effect in radiolysis of proteins. Part 2. Bovine serum albumin. *International Journal of Radiation Biology*, 45, 267–281.

77. Van Der Vlıet, A., O'neıll. CA.. Halliwell. B., Cross. C., Kaur, H. (1994). Aromatic hydroxylation and nitration of phenylalanine and tyrosine by peroxynitrite. *FEBS Letters*, 339, 89-92.

78. Pollack, M., Leeuwenburgh, C. (1999). Molecular mechanisms of oxidative stress in aging: free radicals, aging, antioxidants and disease. *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*, 30, 881-923.

79. Çatalgöl, B., Grune, T. (2008). Oxidized Proteins As A Biomarker Of Oxidative Stress In Aging And Diseases. *Türkiye Klinikleri, Journal of Medical Sciences*, 28, 141-145.

80. Mishto, M., Santoro, A., Bellavista, E., Bonafe, M., Monti, D., Franceschi, C. (2003). Immunoproteasomes and immunosenescence. *Ageing research reviews*, 2, 419-432.

81. Fraker, P.J, Lill-Elghanian, DA. (2004). The many roles of apoptosis in immunity as modified by aging and nutritional status. *The Journal of Nutrition Health and Aging*, 8, 56-63.

82. Liu, RH. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American Journal of Clinical Nutrition,* 78, 517-520.

83. Prior, RL. (2003). Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 570-578.

84. Weindruch, R. (1996). Caloric restriction an aging. *Scientific American,* 274, 46-52.

85. Dizdaroglu, M. (1992). Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutation Research,* 75, 331-342.

86. Bagchı, K., Putı, S. (1998). Free radicals and antioxidants in health and disease. *Eastern Mediterranean Health Journal*. 4(2), 350-360.

87. Vincent, A.M., Russell, JW., Low, P., Feldman, EL. (2004). Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. *Endocrine Reviews*, 25, 612–628

88. Nıshıkawa, M., Youdou, K., Kobayashı, Y., Umeyama, Y., Takakura, Y., Hashıda, M. (2005). Inhibition of metastatic tumor growth by targeted delivery of antioxidant enzyme. *journal of controlled release,* 109, 101–107.

89. Fantel, A.G. (1996). Reactive oxygen species in developmental toxicity:Review and hypotesis.*Teratology,* 53,96-217.

90. Fridovich, I., (1995). Superoxide Radical And Superoxide Dismutases. *Annual Review of Biochemistry,* 64, 97.

91. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1999). *Free Radicals In Biology And Medicine* (Third Edition). New York: Oxford University Press, 936.

92. Bertini, I., Mangani, S., Viezzoli, M.S. (1998). Structure And Properties Of CuZnSODs. *Advances in Inorganic Chemistry*. 45, 127.

93. Akkuş, I., Kalak, S., Vural, H., Çağlayan, O., Menekşe, E., Can, G., Durmuş, B. (1996). Leukocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and serum and leukocyte vitamin c levels of patients with type II diabetes mellitus. *Clinica Chimica Acta*, 244, 221-227.

94. Demirsoy, A., Türkan, İ., Gündüz, G. (2003). Genel Biyoloji. (5. Baskı). Ankara:Palme Yayıncılık, 382-383.

95. Chao, J.C., Huang, C.H., Wu, S.J., Yang, S.C., Chang, N.C., Shieh, M.J., Lo, P.N. (2002). Effects of beta-carotene, vitamin C and E on antioxidant status in hyperlipidemic smokers. *The Journal of Nutritional Biochemistry,* 13, 427-434.

96. Jialal, I., Grundy, S.M. (1993). Effect of combined supplementation with alpha-tocopherol, ascorbate, and beta carotene on low-density lipoprotein oxidation. *Circulation*, 88, 2780-2786.

97. Seven, A., Candan, G. (1996). Antioksidan savunma sistemleri. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 27(1), 41-50.

98. Yalçın, A.S. (1998). Antioksidanlar. *Klinik Gelişim*, 11, 342-346.

99. Hardeland, R., Reiter, R.J., Poeggeler, B., Tan, D.X. (1993). The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: Antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 17, 347-357.

100. Reiter, R.J., Tan, D.X., Osuna, C., Gitto, E. (2000). Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *Journal of Biomedical Science* ,7, 444-458.

101. Arendt, J. (1988). *Melatonin. Clinical Endocrinology*, 29, 205-229.

102. Reiter, R.J. (1993). Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review. *Brazilian Journal Of Medical and Biological Research*, 26, 1141-1155.

103. Dündar, Y., Aslan, R. (1999). Hücre moleküler statüsünün anlaşılması ve fizyolojik önem açısından radikaller-antioksidanlar. *Cerrahi Tıp Bilimleri Dergisi insizyon*, 2(2), 134-142.

104. Aslan, R., Şekeroğlu, M.R., Bayiroğlu, F. (1995). Serbest radikal türlerin membran lipit peroksidasyonuna etkileri ve hücresel antioksidan savunma. Sağlık Bilimleri Dergisi, 2:137-142.

105. Bandoniene, D., Venskutonis, P.R., Gruzdiene, D., Murkovic, M. (2002). Antioxidative activity of sage (Salvina officinalis L.) savory (Satureja hortensis L.) and borage (Borage officinalis L.) extracts in rapeseed oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 286-292.

106. Saad, B., Sing, Y.Y., Nawi, M.A., Hashim, N., Mohamed Ali, A.S., Saleh, M.I., Sulaiman, S.F.,Talib, K.M., Ahmad, K. (2007). Determination of synthetic phenolic antioxidants in food items using reversed-phase HPLC. *Food Chemistry,* 105, 389-394.

107. Dziezak, J.D. (1986). Antioxidants. Journal of Food Technology, 40(9), 94-102.

108. Hamama, A.A., WW, Nawaf. (1991). Tftenuai Decotnposition of Some Pbenolic AiMoxic. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39(6), 1063.

109. Riemenschneider, R.W. (1955). Oxidative Rancidity and Antioxıdan. In F.C. Blanck (Editor). Handbook of Food ard Agriculture. New York. Reinhold Publishing.

110. Keskin, H. (1981). *Besin Kimyası*.(4.baskı). İstanbul: Fatih Yayınevi ve Matbaası, 1.Cilt.

111. Dinçer, A. (1987). Gıdalarda Kullanılan Antioksidantlar ve Fonksiyonları. *Gıda Sanayii*, 1, 40-42.

112. Stuckey, B.N. (1972). Antioxidants as Food Stabilizers.In T.E Furia(Editor) *CRC Handbook of Food Additives,* Second edition. Cleveland, Ohio, USA. The Chemical Rubber, chapter 3, p 115.

113. Buck, DF. (1984). Food Antioxidants-Application and Uses in Snack Foods. *Cereal Foods World*, 29(5), 301-303.

114. Saldamlı, İ. (1985). *Gıda Katkı Maddeleri ve İngrediyenler*. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları.

115. Singh, U., Jialal, I. (2004). Anti-inflammatory effects of alpha-tocopherol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1031, 195-203.

116. Bjornebo, A., Bjornebo, GE., Drevon, CA. (1990). Absorption, transport and distribution of vitamin E. *The Journal of Nutrition*, 120, 233-242.

117. Brıgelius-Flohe, R., Traber, M.G. (1999). Vitamin E: function and metabolism. *FASEB Journal*, 13, 1145-1155.

118. Ong, A.S.H. (1993). *Natural sources of tocotrienols, Vitamin E in Health and Disease*. New York: Markel Dekker, 3-8.

119. Sheppard, A.J., Pennington, J.A.T., Weihrauch. J.L. (1993). *Analysis and distribution of vitamin E in vegetable oils and foods, Vitamin E in Health and Disease*. New York: Markel Dekker.

120. Fuchs, J., Packer, L. (1999). Antioxidant protection from solar-simulated radiation-induced suppression of contact hypersensitivity to the recall antigen nickel sulfate in human skin. *Free Radical Biology and Medicine*, 27, 422-427.

121. Podda, M., Grundmann- Kollmann, M. (2001). Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing. *Clinical and Experimental Dermatology*, 26, 578-582.

122. Fusco, D., Colloca, G., Lo Monaco, M.R., Cesari, M. (2007). Effects of antioxidant supplementation on the aging process. Clinical Interventions in Aging, 2(3), 377-387.

123. Krinsky, N.I. (1993). Actions of carotenoids in biological systems. *AnnualReview of Nutrition*, 13, 561-587.

124. Sies, H., Stahl, W. (1995). Vitamins E and C, β- carotene, and other carotenoids as antioxidants. American Journal of Clinical Nutrition, 62, 1315-1321.

125. Ebadi, M. (2002). *Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine.* New York: CRC Press, 491.

126. Wheeler, G.L., Jones, M.A., Smirnoff, N. (1998). The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*, 393, 365-369.

127. Woodall, A.A., Ames, B.N. (1997). *Diet and oxidative damage to DNA:The importance of ascorbate as an antioxidant, Vitamin C in Health and Disease*. New York: Markel Dekker, 193-203.

128. Van Haaften, R.I., Evelo, C.T., Penders, J., Eijnwachter, M.P., Haenen, G.R., Bast, A. (2001).Inhibition of human glutathione S-transferase P1-1 by tocopherols and alpha-tocopherol derivatives. *Biochim Biophys Acta*, 1548, 23-28.

129. Halliwell, B. (1996). Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo?. *Free Radical Research*, 25, 439-454.

130. Buettner, G.R. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants:lipid peroxidation, -tocopherol, and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300, 535-543

131. Buettner, G.R., Jurkiewicz, B.A. (1996). Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiation Research*, 145, 532-541.

132. Cherubini, A., Ruggiero, C., Polidori, M.C., Mecocci, C. (2005). Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology and Medicine*, 39, 841-852.

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

134. Brown, J.A., Khodr, H., Hider, R.C., Rice Evans, C. (1998). Structural dependence of flavonoid interactions with Cu^{2+} ions: implications for their antioxidant properties. *Biochemical Journal*, 330, 1173-1178.

135. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2, 152-159.

136. Cotelle, N., Bernier, J.L., Catteau, J.P., Pommery, J., Wallet, J.C., Gaydou, E.M. (1996). Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(1), 35-43.

137. Çimen, M.B.Y. (1999). Flavonoidler ve antioksidan özellikleri. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 19, 296-304.

138. Rice Evans, C. (1999). Screening of phenolics and flavonoids for antioxidant activity. In L. Packer, M.Hiramatsu and T. Yoshikawa.(Editors), In: *Antioxidant Food Supplements in Human Health*. Elsevier , Chapter 16, 239-253.

139. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., (1996). Structureantioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956.

140. Dziedzic, S.Z., Hudson, B.J.F., (1983). Polyhydroxychalcones and flavanones as antioxidants for edible foods. *Food Chemistry*, 12, 205-212.

141. Rhodes, M., Wooltorton, L., (1976). The enzymic conversion of hydroxycinnamic acids to p-coumarylquinic and cholorogenic acids in tomato fruits. *Phytochemistry*, 18, 929-933.

142. Ulbrıch, B., Zenk, M., (1979) Partial purification and properties of hydroxycinnamoyl-CoA: quinate hydroxycinnamoyl transferase from higher plants. *Phytochemistry*, 18, 929-933.

143. Brune, M., Rossander, L., Hallberg, L., (1989). Iron absorption and phenolic compound: Importance of different phenolic structures. *European Journal of Clinical Nutrition*, 43, 547-558.

144. Middleton, E., Kandaswami, C., (1993). The impact of plant flavanoids on mammalian biology: Implications for ımmunity, in flammation and cancer, The Flavonoids: Advances in Research Since 1986, London: Chapman and Hall.

145. Sıngleton, V.L., Rossı, J.A., (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

146. Sıngleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants bymeans of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymolology*, 299, 152-178.

147. Miser, E., Akaydin, G., Can, E., Akaydin, S. (2013). Evalution of Antioxidant Activity of Various Herbal Folk Medicines. *Journal of Nutrition and Food Sciences*, 3, 1-9.

148. Apak, R.,Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E. (2004). Anovel total antioxidant capacitiy index for dietary polyphenols, vitamin C and E, using theircupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981.

149. Sanchez, M. C., Larraurı, J.A., Saura, C. F. (1998). A procedure tomeasure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 270-276.

150. Matthaus, B. (2002). Antioxidant activity of extracts obtained fromresudies of different oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50,3444-3452.

151. Miller, N.J., Rice Evans, C.A., Davies, M.J, Gopinathan, V., Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84, 407-412.

152. Miller, N.J., Rice Evans C.A. (1994). Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods in Enzymology*, 234, 279-293.

153. Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., Ritieni, A. (1999). Method for measuring antioksidant activity and its appliction to monitoring antioxidant capacity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1035-1040.

154. Duh, P.D., Yen, G.C. (1999). Antioxidant activity of water exract of Harng Jyur varieties in soybean oil emulsion. *Food Chemistry*, 66, 471-476.

155. Kulkarni, S.D., Tilak, J.C., Acharya, R., Rajurkar, N.S., Devasagayam, T.P.A., Eddy, A.V.R. (2006). Evaluation of the antioxidant activity of wheatgrass (Triticum aestivum L.) as an aunction of growth under different conditions. *Phytotherapy Research*, 20, 218-227.

156. Önenç S.S., Açıkgöz, Z. (2005). Aromatik Bitkilerin Hayvansal Ürünlerde Antioksidan Etkileri. *Hayvansal Üretim*, 46(1), 50-55.

157. Andarwulan, N., Fardiaz, D., Wattimena, G. A., Shetty, K., 1999. Antioxidant activity associated with lipid and phenolic mobilization during seed germination of Pangium edule Reinw. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3158-3163.

158.Tsaliki, E., Lagouri, V., Doxastakis, G., (1999). Evaluation of the antioxidant activity of lupin seed flour and derivatives. *Food Chemistry*,65, 71-75.

159. Holozmanova, V.(1996). Rosmarinic acid and its biological activity. *Chem Listy Journal*, 90, 486-496. ile Petersen, M., Sımmınds, M.S.J. (2003). Rosmarinic acid. Phytochemistry, 62, 121-125.)

160. Shan, B., Cai, Y.Z., Sun, M., Corke, H. (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 7749-7759.

161. Wang, H., Provan, G.J., Helliwell, K. (2004). Determination of Rosmarinic Acid and Caffeic Acid in Aromatic Herbs by HPLC. *Food Chemistry*, 87, 307–311.

162. Zheng, W., Wang, S.Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 49, 5165-5170.

163. Tuncel, N.B., Yılmaz, N. (2010). Kaz Dağları'ndan Toplanan Bazı Bitkilerin Fenolik Asit Kompozisyonlarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Belirlenmesi. *Akademik Gıda,* 8(3), 18-23.

164. Diken, M.E. (2009). Bazı Şifalı Bitkilerin Antioksidan İçerikleri, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.

165. Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M., Adiguzel, A., Ozkan, H. (2007). Antimicrobial and Antioxidant Properties of the Essential Oils and Methanol Extract from Mentha longifolia L. ssp. Longifolia. *Food Chemistry*, 103, 1449–1456.

166. Ahmad,N., Faza, H., Ahmad, I., Abbasi B.H. (2013). Free radical scavenging (DPPH) potential in nine Mentha species. *Toxicology and Industrial Health*, 29(5), 460-467.

167. Yang, S.A., Jeon, S.K., Lee, E.J. Shim, C.H., Lee, I.S. (2010). Comparative study of the chemical composition and antioxidant activity of six essential oils and their components. *Natural Product Research,* 24(2), 140-151.

168. Arumugam, P., Ramamurthy, P., Santhiya S.T., Ramesh, A. (2006). Antioxidant activity measured in different solvent fractions obtained from Mentha spicata Linn.: An analysis by $ABTS^{\cdot+}$ decolorization assay. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 119-124.)

169. Hall, III. C. (2001). Source of natural antioxidants:oilseeds, nuts, cereals, legumes, animal products and microbial sources. In J. Pokorny, N. Yanislhlieva and M. Gordon (Editors) *Antioxidants in Food. Practical Applications*. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd, 169-219.

170. Lemanska, K., Szymusiak, H., Tyrakowska. B., Zielinski, R., Soffers, A.E.M.F., Rietjens, I.M.C.M. (2001). The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Biology and Medicine*, 31, 869-881.

171. Osman, A.M., Wong, K.K.Y., Hill, S.J., Fernyhough, A. (2006). Isolation and the characterization of the degradation products of the mediator ABTS-derived radicals formed upon reaction with polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340, 597-603.

172. Becker, E.M., Nissen, L.S., Skibsted, L.H. (2004). Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Techonology*, 10, 217

173. Huang, D., Ou, B., Prior, R., (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı	: ÇAYIR Erdoğan
Uyruğu	: T.C.
Doğum yeri ve tarihi	: Ankara, 22.09.1978
Medeni hali	: Evli
Telefon	:05058033271

Eğitim Derecesi	**Okul/Program**	**Mezuniyet yılı**
Lisans	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2000
Lise	Ankara Yenimahalle Teknik Lisesi	1996
Orta Öğrenim	Ankara Yalçın Eskiyapan Ortaokulu	1992
İlk Öğrenim	Ankara Etlik İlkokulu	1989

İş Deneyimi, yıl

2000-2004	Ankara, Serbest Eczacılık
2004- devam ediyor	Ankara, Sosyal Güvenlik Kurumu-Eczacı

Yabancı Dil : İngilizce