

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇİTLEMBİK (*Celtis australis* L.) VE KARAYEMİŞ (*Prunus laurocerasus*)
MEYVELERİNİN ANTİOKSİDAN KAPASİTESİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Seda BABACAN

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

Mayıs 2014

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇİTLEMBİK (*Celtis australis* L.) VE KARAYEMİŞ (*Prunus laurocerasus*)
MEYVELERİNİN ANTİOKSİDAN KAPASİTESİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Seda BABACAN
(509101076)**

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Birsen DEMİRATA ÖZTÜRK

Mayıs 2014

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 509101076 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Seda BABACAN** ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “**ÇİTLEMBİK (*Celtis australis L.*) VE KARAYEMİŞ (*Prunus laurocerasus*) MEYVELERİNİN ANTİOKSİDAN KAPASİTESİNİN İNCELENMESİ**” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Birsen DEMİRATA ÖZTÜRK**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Doç. Dr. Gülçin GÜMÜŞ YILMAZ**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. İkbal KOYUNCU
Yıldız Teknik Üniversitesi

Teslim Tarihi : **5 Mayıs 2014**
Savunma Tarihi : **27 Mayıs 2014**

Halil Onur KARAPINAR' a

ÖNSÖZ

Kendisiyle çalışabilme avantajına sahip olduğum, bu çalışmamda bana yön veren değerli hocam Prof. Dr. Birsen DEMİRATA ÖZTÜRK'e, tez çalışmamla ilgili her konuda benden bilgisini, deneyimini ve yardımlarını esirgemeyen hocam Dr. Işıl BERKER'e teşekkür ederim. Ayrıca laboratuvar çalışmalarımda bana yardımcı olan Uzman Dilek ÖZYURT'a ve Ayça ÖZDEMİR'e de teşekkürü bir borç bilirim.

Tüm eğitim ve öğretim hayatımda benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

Mayıs 2014

Seda BABACAN
(KİMYAGER)

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
KISALTMALAR.....	xiii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xv
ŞEKİL LİSTESİ.....	xvii
ÖZET.....	xix
SUMMARY.....	xxiii
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BÖLÜM.....	3
2.1 Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres.....	3
2.2 Antioksidanlar.....	6
2.3 Antioksidanların Etki Mekanizmaları.....	7
2.4 Antioksidanlar Sınıflandırılması.....	8
2.4.1 Antioksidanların doğal ve sentetik olarak sınıflandırılması.....	9
2.4.1.1 Doğal antioksidanlar.....	9
2.4.1.2 Sentetik antioksidanlar.....	12
2.4.2 Antioksidanların etki mekanizmasına göre sınıflandırılması.....	15
2.4.3 Antioksidanların kimyasal bileşimlerine göre sınıflandırılması.....	18
2.4.3.1 Fenolik yapıdaki antioksidanlar.....	18
2.4.3.2 Aromatik amino antioksidanlar.....	19
2.4.3.3 Organik sülfür bileşikleri.....	19
2.5 Toplam Antioksidan Tayin Yöntemleri.....	19
2.5.1 Ferrisiyanür Yöntemi.....	20
2.5.2 TEAC / ABTS Yöntemi.....	21
2.5.3 DPPH Yöntemi.....	21
2.5.4 Folin – Ciocalteu Yöntemi.....	22
2.5.5 CUPRAC Yöntemi.....	22
2.5.6 CERAC Yöntemi.....	23
2.6 <i>Celtis Australis L. (ulmaceae)</i>	24
2.6.1 <i>Celtis Australis L. (Çitlembik)</i> 'in genel özellikleri.....	24
2.7 <i>Prunus Laurocerasus L.</i>	25
2.7.1 <i>Prunus Laurocerasus L. (Karayemiş)</i> 'in genel özellikleri.....	25
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	29
3.1 Kullanılan Cihazlar.....	29
3.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	29
3.3 Kullanılan Ana Çözeltilerin Hazırlanması.....	29

3.4 Çitlembik Ekstraktlarının ve İnfüzyonlarının Hazırlanması.....	30
3.5 Karayemiş Ekstraktlarının Hazırlanması.....	31
3.6 Uygulanan Toplam Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri.....	32
3.6.1 CERAC yöntemi.....	32
3.6.2 CUPRAC yöntemi.....	33
3.6.3 Ferrisiyanür yöntemi.....	33
3.6.4 Folin – Ciocalteu yöntemi.....	34
3.7 İstatiksel Analiz.....	34
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	37
4.1 Kalibrasyon Grafiklerin Çizimi.....	37
4.1.1 CERAC yöntemi.....	37
4.1.2 CUPRAC yöntemi.....	38
4.1.3 Ferrisiyanür yöntemi.....	39
4.1.4 Folin – Ciocalteu yöntemi.....	40
4.2 Toplam Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemlerinin Gerçek Örneklerle Uygulanması.....	41
4.2.1 Çitlembik meyvesi ve çekirdek kısmının antioksidan kapasitesinin belirlenmesi.....	41
4.2.2 Çitlembik meyvesi ekstraksiyonu için uygun çözücü cinsinin belirlenmesi.....	42
4.2.3 Çitlembik meyvesi ekstraksiyonu için çözücü optimizasyonu.....	42
4.2.4 Yeşil, sarı, siyah çitlembik meyvelerinin antioksidan kapasitesinin belirlenmesi.....	43
4.2.4.1 Yeşil, sarı, siyah çitlembik meyvelerinin %50 metanollü ekstaklarının antioksidan kapasitesinin CUPRAC yöntemi ile belirlenmesi.....	44
4.2.4.2 Yeşil, sarı, siyah çitlembik meyvelerinin %50 metanollü ekstaklarının antioksidan kapasitesinin CERAC yöntemi ile belirlenmesi.....	44
4.2.4.3 Yeşil, sarı, siyah çitlembik meyvelerinin %50 metanollü ekstaklarının antioksidan kapasitesinin Ferrisiyanür yöntemi ile belirlenmesi.....	45
4.2.4.4 Yeşil, sarı, siyah çitlembik meyvelerinin %50 metanollü ekstaklarının antioksidan kapasitesinin Folin – Ciocalteu yöntemi ile belirlenmesi.....	46
4.2.5 Yeşil, sarı, siyah çitlembik meyvesi infüzyonlarının antioksidan kapasitesinin belirlenmesi.....	47
4.2.5.1 Yeşil, sarı, siyah çitlembik meyvesi infüzyonlarının antioksidan kapasitesinin CUPRAC yöntemi ile belirlenmesi.....	47
4.2.5.2 Yeşil, sarı, siyah çitlembik meyvesi infüzyonlarının antioksidan kapasitesinin CERAC yöntemi ile belirlenmesi.....	48
4.2.5.3 Yeşil, sarı, siyah çitlembik meyvesi infüzyonlarının antioksidan kapasitesinin Ferrisiyanür yöntemi ile belirlenmesi.....	49
4.2.5.4 Yeşil, sarı, siyah çitlembik meyvesi infüzyonlarının antioksidan kapasitesinin Folin – Ciocalteu yöntemi ile belirlenmesi.....	50
4.2.6 % 50 metanollü yeşil çitlembik meyvesi ekstraktı ve infüzyonunun	

antioksidan kapasitesinin karşılaştırılması.....	51
4.2.6.1 Çitlembik meyvesi ekstraktı ve infüzyonunun antioksidan kapasitesinin CUPRAC yöntemi ile karşılaştırılması.....	51
4.2.6.1 Çitlembik meyvesi ekstraktı ve infüzyonunun antioksidan kapasitesinin CERAC yöntemi ile karşılaştırılması.....	52
4.2.6.1 Çitlembik meyvesi ekstraktı ve infüzyonunun antioksidan kapasitesinin Ferrisiyanür yöntemi ile karşılaştırılması.....	53
4.2.6.1 Çitlembik meyvesi ekstraktı ve infüzyonunun antioksidan kapasitesinin Folin – Ciocalteu yöntemi ile karşılaştırılması.....	54
4.2.7 Çitlembik meyvesi ve çekirdek kısmının antioksidan kapasitesinin belirlenmesi.....	55
4.2.8 Farklı kurutma yöntemlerinin karayemiş meyvesinin antioksidan kapasitesi üzerine etkisinin belirlenmesi.....	56
4.2.9 Karayemiş meyvesi için farklı ekstraksiyonların veriminin belirlenmesi.....	57
4.2.10 Karayemiş meyvesi ekstraksiyonu için uygun çözücü cinsinin belirlenmesi.....	58
4.2.11 Karayemiş meyvesi ekstraksiyonu için çözücü optimizasyonu.....	59
4.2.11.1 Trabzon menşeli karayemiş ekstraktları için çözücü optimizasyonu.....	59
4.2.11.2 İstanbul menşeli karayemiş ekstraktları için çözücü optimizasyonu.....	60
4.2.12 Trabzon ve İstanbul menşeli karayemişlerin antioksidan kapasitesinin karşılaştırılması.....	61
4.2.12.1 Trabzon ve İstanbul menşeli karayemişlerin antioksidan kapasitesinin CERAC yöntemi ile karşılaştırılması.....	61
4.2.12.2 Trabzon ve İstanbul menşeli karayemişlerin antioksidan kapasitesinin CUPRAC yöntemi ile karşılaştırılması.....	62
4.2.12.1 Trabzon ve İstanbul menşeli karayemişlerin antioksidan kapasitesinin Ferrisiyanür yöntemi ile karşılaştırılması.....	63
4.2.12.1 Trabzon ve İstanbul menşeli karayemişlerin antioksidan kapasitesinin Folin – Ciocalteu yöntemi ile karşılaştırılması.....	64
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	67
KAYNAKLAR.....	73
ÖZGEÇMİŞ.....	77

KISALTMALAR

ABTS	: 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfat)
ABTS.⁺	: ABTS radikal katyonu
BHA	: Bütillenmis Hidroksianisol
BHT	: Bütillenmis Hidroksitoluen
CERAC	: Seryum İyonunu İndirgeme Antioksidan Kapasite Yöntemi
Cu(II)-Nc	: Bakır(II)-Neokuproin
CUPRAC	: Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite Yöntemi
DFCH-DA	: (Diklorofloresin-diasetat) Yöntemi
DHA	: Dihidroksiaskorbik Asit
DPPH	: 2,2-difenilpikrilhidrazil(DPPH: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil)
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
FCR	: Folin Ciocalteu Reaktifi
FRAP	: Demir(III) İndirgeme Antioksidan Gücü
GSHPx	: D-Glutatyon Peroksidaz
İST KRY	: İstanbul Menşeli Karayemiş
NDGA	: Nordihidroguareyetik Asit
ORAC	: Oksijen Radikali Absorbans Kapasitesi
PG	: Propil Gallat
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TAC	: Toplam Antioksidan Kapasitesi
TBHQ	: Tersiyerbutil Hidrokinon
TEAC/ABST	: Trolox Eşdeğer Antioksidan Kapasite Yöntemi
TOSC	: Toplam Oksiradikal Yöntemi
TPTZ	: (2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine)
TRAP	: Toplam Radikal Yakalama Parametresi
TR KRY LİYO	: Trabzon Menşeli Karayemiş Liyofilize Edilmiş
TR KRY ODA SICAĞINDA	: Trabzon Menşeli Oda Şartlarında Kurutulmuş Karayemiş
TR KRY YAŞ	: Trabzon Menşeli Kurutma İşlemi Görmemiş Karayemiş

ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1 : Oksidan kaynakları ve antioksidan savunma sistemleri.....	2
Çizelge 2.1 : Reaktif oksijen türleri.....	4
Çizelge 5.1 : Yeşil, sarı, siyah çitlembik meyvelerinin % 50 metanollü Ekstraktlarının CUPRAC, CERAC, Folin-Ciocalteu ve SDS ile modifiye edilmiş Ferrisiyanür yöntemleri korelasyon katsayıları.....	68
Çizelge 5.2 : Yeşil, sarı, siyah çitlembik meyvelerinin % 50 metanollü Ekstraktlarının CUPRAC, CERAC, Folin-Ciocalteu ve SDS ile modifiye edilmiş Ferrisiyanür yöntemleri korelasyon katsayıları.....	69

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Serbest radikallerin kaynakları.....	5
Şekil 2.2 : Oksidatif stresin hücre içerisinde neden olduğu hasarlar.....	5
Şekil 2.3 : Antioksidanların hücresel etki mekanizmasının şematik gösterimi.....	8
Şekil 2.4 : Dihidroksiaskorbik asit (DHA).....	10
Şekil 2.5 : α - tokoferolün kimyasal yapısı.....	11
Şekil 2.6 : β -karotenin kimyasal yapısı.....	11
Şekil 2.7 : NHA ve BHT'nin kimyasal yapıları.....	13
Şekil 2.8 : TBHQ'nun kimyasal yapısı.....	14
Şekil 2.9 : NDGA' nın kimyasal yapısı.....	14
Şekil 2.10: Propil gallatın kimyasal yapısı.....	15
Şekil 2.11: EDTA, C vitamini, A vitamininin kimyasal yapısı.....	17
Şekil 2.12: Hidrokinon, kinon. Pirogallol ve pirokateşinin kimyasal yapısı.....	18
Şekil 2.13: Sesamolun kimyasal yapısı.....	18
Şekil 2.14: β , β' - ditiyo propiyonik asitin kimyasal yapısı.....	19
Şekil 2.15: ABTS ⁺ radikal katyonunun yapısı.....	21
Şekil 2.16: Cu(1)-neokuproin kelatının kimyasal yapısı.....	23
Şekil 4.1 : Troloksun CERAC yönteminden elde edilen kalibrasyon grafiği.....	37
Şekil 4.2 : Troloksun CUPRAC yönteminden elde edilen kalibrasyon grafiği.....	38
Şekil 4.3 : Troloksun Ferrisiyanür yönteminden elde edilen kalibrasyon grafiği....	39
Şekil 4.4 : Troloksun Folin-ciocalteu yönteminden elde edilen kalibrasyon grafiği.....	40
Şekil 4.5 : Çitlembik meyve ve Çitlembik çekirdek ekstraktlarının CUPRAC toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TR/g).....	41
Şekil 4.6 : Çitlembik meyvesinin farklı çözücülerde hazırlanan ekstraktlarının CUPRAC toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TR/g).....	42
Şekil 4.7 : Çitlembik meyvesinin farklı oranlardaki metanolde hazırlanan ekstraktlarının CUPRAC toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TR/g).....	43
Şekil 4.8 : Yeşil, sarı, siyah çitlembik meyvelerinin %50 metanollü ekstraktlarının CUPRAC toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TR/g).....	44
Şekil 4.9 : Yeşil, sarı, siyah çitlembik meyvelerinin %50 metanollü ekstraktlarının CERAC toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TR/g).....	45
Şekil 4.10: Yeşil, sarı, siyah çitlembik meyvelerinin %50 metanollü ekstraktlarının Ferrisiyanür toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TR/g).....	46
Şekil 4.11: Yeşil, sarı, siyah çitlembik meyvelerinin %50 metanollü ekstraktlarının Folin- ciocalteu toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TR/g).....	47

Şekil 4.12 : Yeşil, sarı, siyah çitlembik meyvelerinin infüzyonlarının CUPRAC yöntemi toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TR/g)	48
Şekil 4.13 : Yeşil, sarı, siyah çitlembik meyvelerinin % 50 metanollü ekstraktlarının Ferrisiyanür toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TR/g).....	49
Şekil 4.14 : Yeşil, sarı, siyah çitlembik meyvelerinin infüzyonlarının Ferrisiyanür yöntemi toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TR/g)	50
Şekil 4.15 : Yeşil, sarı, siyah çitlembik meyvelerinin infüzyonlarının Folin-ciocalteu yöntemi toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TR/g)	51
Şekil 4.16 : Yeşil çitlembik meyvesi % 50 metanol ekstrakt ve infüzyonlarının CUPRAC yöntemi toplam antioksidan kapasiteleri (mmolTR/g)	52
Şekil 4.17 : Yeşil çitlembik meyvesi % 50 metanol ekstrakt ve infüzyonlarının CERAC yöntemi toplam antioksidan kapasiteleri (mmolTR/g)	53
Şekil 4.18 : Yeşil çitlembik meyvesi % 50 metanol ekstrakt ve infüzyonlarının Ferrisiyanür yöntemi toplam antioksidan kapasiteleri (mmolTR/g)	54
Şekil 4.19 : Yeşil çitlembik meyvesi % 50 metanol ekstrakt ve infüzyonlarının Folin-ciocalteu yöntemi toplam antioksidan kapasiteleri (mmolTR/g)	55
Şekil 4.20 : CUPRAC yönteminin karayemiş çekirdek ve karayemiş meyve ekstraktlarına uygulanması ve toplam antioksidan kapasiteleri (mmolTR/g)	56
Şekil 4.21 : Farklı kurutma yöntemleri ile hazırlanan karayemiş meyvesi ekstraktlarının CUPRAC toplam antioksidan kapasiteleri (mmolTR/g)	57
Şekil 4.22 : Farklı ekstrakte yöntemleri ile hazırlanan karayemiş meyvesi ekstraktlarının CUPRAC toplam antioksidan kapasiteleri (mmolTR/g)	58
Şekil 4.23 : Karayemiş meyvesinin farklı çözücülerde hazırlanan ekstraktlarının CUPRAC toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TR/g)	59
Şekil 4.24 : Farklı oranlardaki metanol ile hazırlanan Trabzon menşei karayemiş meyvesi ekstraktlarının CUPRAC yöntemi toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TR/g)	60
Şekil 4.25 : Farklı oranlardaki metanol ile hazırlanan İstanbul menşei karayemiş meyvesi ekstraktlarının CUPRAC yöntemi toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TR/g)	61
Şekil 4.26 : Trabzon ve İstanbul menşei karayemiş ekstraktlarının CUPRAC yöntemi toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TR/g)	62
Şekil 4.27 : Trabzon ve İstanbul menşei karayemiş ekstraktlarının CERAC yöntemi toplam antioksidan kapasiteleri (mmolTR/g)	63
Şekil 4.28 : Trabzon ve İstanbul menşei karayemiş ekstraktlarının Ferrisiyanür yöntemi toplam antioksidan kapasiteleri (mmolTR/g).....	64
Şekil 4.29 : Trabzon ve İstanbul menşei karayemiş ekstraktlarının Folin-ciocalteu yöntemi toplam antioksidan kapasiteleri (mmolTR/g)	65

ÇİTLEMBİK (*Celtis australis* L.) VE KARAYEMİŞ (*Prunus laurocerasus*) MEYVELERİNİN ANTİOKSİDAN KAPASİTESİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Serbest Radikaller, üzerinde elektron fazlalığı veya eksikliği nedeniyle yüklü olan kimyasal olarak aktif atom veya moleküllerdir. Biyolojik sistemlerde en çok önem teşkil eden serbest radikal olarak oksijen kaynaklı radikaller gösterilebilir. Vücuttaki virüs ve bakterileri etkisiz hale getirmek için bağışıklık sistemi içine konulan mekanizmalardan biri de serbest radikallerin üretimidir. Her şeyde bir denge olduğu gibi bu mekanizmaların sağlıklı işletilmesinde de dengeli üretim çok önemlidir. Eğer serbest radikal üretimi fazlaysa ve koruyuculukla vazifeli antioksidan gibi moleküller de yoksa veya yeterli değilse, bu durum canlı hücrelerde tahribata neden olmaktadır. Serbest radikaller hem vücudun içinde hem de dışındaki etkenler tarafından meydana gelir. Oksijenli solunum, metabolizma ve enfeksiyon gibi vücut içinden kaynaklanan olayların yanında; sigara, alkol, x-ışınları, güneş ışını ve kirlilik gibi dış kaynaklı çevresel faktörlerin etkisiyle de serbest radikaller oluşur. Sigara ve alkol yanında strese bağlı olarak da vücutta bu moleküllerin üretimi gerçekleşmektedir. İnsanlar ister gıda maddeleri vasıtası ile olsun ister metabolik olaylar sonucu olsun, her zaman bu dejeneratif moleküllerle karşı karşıya bulunur. Serbest radikaller vücudun her yerinde elektron verir yada alabilirler. Böylelikle hücreler, proteinler ve DNA'ya zarar verebilirler. Serbest radikaller DNA moleküllerine bağlanıp onda zararlı değişikliklerin ortaya çıkmasını tetikleyerek kansere sebep olabileceği gibi pankreasta yoğunlaşarak şeker hastalığına, gözde katarakta, kanda ise kalp ve dolaşım sistemi hastalıklarına sebep olabilir. Alınacak önlemler bunların vücuttaki zararlı tesirlerini en aza indirilebilir veya önleyebilir.

Antioksidanlar serbest radikallerle reaksiyona girerek (onlarla bağ kurarak) hücrelere zarar vermelerini önler. Bu özellikleriyle hücrelerin anormalleşme ve sonuç olarak tümör oluşturma risklerini azalttıkları gibi, hücre yıkımını da azalttıkları için, daha sağlıklı ve yaşlılık etkilerinin minimum olduğu bir hayat yaşama şansını yükseltirler.

Antioksidanlar; serbest radikalleri etkisiz hale getirerek oksidasyon prosesini engelledikleri esnada kendileri okside olurlar. Bu sebeple vücudumuzun antioksidanlara sürekli olarak ihtiyacı vardır. Antioksidan özelliği keşfedilen birçok farklı madde vardır. Bu maddelerin bir kısmını diyetimizde (özellikle bitkilerden) alırken, bir kısmını vücut kendisi, serbest radikallere karşı bir savunma sistemi olarak üretir. Vücudun serbest radikallere karşı savunma olarak ürettiği antioksidanlar; katalaz, glutatyon peroksidaz, ve SOD (süperoksit dismutaz) gibi enzimlerdir.

Bu çalışmamızda Çitlembik ve Karayemiş meyvelerinin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çitlembik meyvesinin antioksidan kapasitesi ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır. Daha önce yapılan çalışmalar daha çok çitlembik yapraklarının hava kalitesi üzerine etkileri, çitlembik ağacı kabuk ve yapraklarının

havadaki ağır metal konsantrasyonunun belirlenmesinde biyomonitör olarak kullanılması ile ilgilidir. Çitlembik meyvesinin antioksidan kapasitesi ile ilgili çalışmaların çok az olması ve çitlembik türlerinin ülkemiz coğrafyasında geniş yayılım göstermesi bu çalışmanın hayata geçirilmesinde etkili olmuştur. Antioksidan tayin yöntemleri çitlembik meyvesinin olgunlaşma evresi boyunca dönüştüğü yeşil, sarı ve siyah hallerine uygulanarak çitlembiğin gelişimi boyunca antioksidan kapasitesindeki değişimi ve mevcut değişimin sebeplerini belirlemek amaçlanmıştır. Bunun yanında Karayemiş meyvesi antioksidan kapasitesi de analiz edilmiştir. İstanbul Teknik Üniversitesi ve Trabzon'un Araklı ilçesinden aynı tarihte karayemiş örnekleri toplanarak farklı yörelerde yetişen aynı türlerin kapasiteleri kıyaslanmıştır. Karayemiş meyvesinin antioksidan kapasitesi ile ilgili daha önce yapılan çalışmalar mevcuttur ancak bu çalışmada kullanılan farklı antioksidan tayin yöntemleri ile Karayemiş antioksidan kapasite sonuçları desteklenmiştir.

Çalışmamızda CUPRAC, CERAC, Folin-Ciocalteu ve SDS ile modifiye edilmiş Ferrisiyanür antioksidan kapasite tayin yöntemleri kullanılmıştır. Bu yöntemleri uygulamak amacıyla öncelikle Çitlembik meyvesinin ekstraktları ve infüzyonu ile Karayemiş meyvesinin ekstraktları hazırlanmıştır. CUPRAC yöntemi hazırlanan ekstraktlara uygulanırken; toplamda 4,1 mL olacak şekilde numune ekstraktlarına saf su, 1 mL $1,0 \times 10^{-2}$ M CuCl_2 , 1 mL $7,5 \times 10^{-3}$ M neokuproin ve 1 mL NH_4Ac olmak üzere reaktif çözeltileri eklenerek reaksiyonun gerçekleşmesi için 30 dakika beklenmiştir. Cu(I) neokuproin kelatının maksimum absorbans yaptığı 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri alınmış ve 3 kez tekrarlanmıştır. CERAC yöntemi ile yapılan analizlerde; 1×10^{-3} M troloks çözeltisinden değişik miktarlarda alınıp 1 mL 2×10^{-3} M Ce(IV) çözeltisi, 7 mL 1 M Na_2SO_4 çözeltisi ve toplam hacim 10 mL olacak şekilde saf su ve numune ekstraktları ilave edilip reaksiyonun gerçekleşmesi için 30 dakika beklenmiştir. Ce(IV)'ün maksimum absorbans yaptığı 320 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri alınmış ve ölçümler 3 kez tekrarlanmıştır. Folin-Ciocalteu yöntemi ile yapılan analizlerde; x mL numune çözeltisi + (2-x) mL su + 2,5 mL Lowry C eklenerek karışım 10 dakika bekletildikten sonra üzerine 1:3 oranında seyreltilmiş 0,25 mL Folin reaktifi ilave edilerek oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Diğer yöntemlerde olduğu gibi ölçümler 3 kez tekrarlanmıştır. SDS ile modifiye edilmiş Ferrisiyanür yönteminde ise x mL antioksidan + (1-x) mL mutlak EtOH + 6,3 mL H_2O + 0,2 mL 1 M HCl + 1,5 mL 1% (w/v) $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ + 0,5 mL 1% (w/v) SDS + 0,5 mL 0,2 % (w/v) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; toplam hacim 10 mL olacak şekilde karıştırılmış ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra 750 nm de (A_{750}) köre karşı absorbansları ölçülmüştür. Ölçümler 3 kez tekrarlanmıştır.

Çitlembik ekstraktlarını hazırlamak amacıyla çitlembik meyve numuneleri İTÜ Ayazağa Kampüsünden toplanmıştır. Çitlembik çekirdek ve meyve kısmı birbirinden ayrılmış ve havanda toz haline getirilmiştir. Çözücü olarak % 80'lik (v/v) metil alkol kullanılmış ve çalkalayıcıda (toplam 2 saat olmak üzere çitlembik meyve ve çekirdek kısımları ayrı ayrı) 350 rpm' de çalkalanarak ekstrakte edilmiştir. Daha sonra yapılan tüm çitlembik meyvesi ekstraksiyon ve infüzyon işlemleri bu şartlar altında (toplam 2 saat ve 350 rpm hızda) gerçekleştirilmiştir. CUPRAC yöntemi kullanılarak elde edilen sonuçlara göre Çitlembik çekirdek kısmında Çitlembik meyve kısmına nazaran çok daha düşük antioksidan kapasite gözlemlenmiş ve daha sonraki çalışmalara Çitlembik meyve kısmıyla devam edilmiştir.

Çitlembik meyvesi ekstraksiyonu için uygun çözücü cinsi belirlenmeye çalışılmış bu amaçla ekstraksiyon çözücüsü olarak etanol, metanol ve aseton seçilmiştir. Ekstraktlar hazırlanmadan önce Çitlembik meyvesi kısmı çekirdeğinden ayrılarak 3 gün oda sıcaklığında kurumaya bırakılmış ve kuruduktan sonra havanda toz haline

getirilerek numune hazırlanmıştır. Etanol, metanol ve aseton çözücülerini kullanarak hazırlanan Çitlembik ekstraktlarına CUPRAC yöntemi uygulanmıştır. Antioksidan kapasite sırasına göre sonuçlar %70'lik (v/v) aseton > %80'lik (v/v) metanol > %80'lik (v/v) etanol > mutlak metanol > mutlak etanol şeklindedir. Çözücü optimizasyonu çalışmalarında mutlak, %80, %70, %50, %40 ve %25'lik (v/v) metanol kullanılarak çitlembik ekstraktları hazırlanmış ve bu ekstraktlara CUPRAC yöntemi uygulanarak en yüksek antioksidan kapasiteye 0,072 (mmol TR/g) değeriyle %50' lik (v/v) metanol ile hazırlanan ekstraktların sahip olduğu görülmüştür. Çitlembik meyvesinin olgunlaşma evresi boyunca dönüştüğü yeşil, sarı ve siyah halleri için %50' lik (v/v) metanol ile ekstraktlar hazırlanmış bununla beraber yeşil, sarı ve siyah çitlembik meyvelerinin infüzyonları da hazırlanmıştır. %50' lik (v/v) metanol ekstraktları ve infüzyonlarına CUPRAC, CERAC, Folin-Ciocalteu ve SDS ile modifiye edilmiş Ferrisiyanür yöntemleri uygulanmış ve her yöntem sonucunda antioksidan kapasite miktarları mmol TR/g olmak üzere yeşil > sarı > siyah şeklinde belirlenmiştir. Bunun yanında uygulanan 4 yöntem için de antioksidan kapasite miktarları mmol TR/g olmak üzere çitlembik % 50 metanol ekstratı > çitlembik infüzyon olduğu görülmüştür.

Karayemiş meyvesi antioksidan kapasitesi belirlenmesinde İstanbul Teknik Üniversitesi Ayazağa kampüsünden (İST KRY) ve Trabzon'un Araklı ilçesinden (TR KRY) toplanan karayemiş meyveleri kullanılmıştır. Karayemiş meyveleri İST KRY ve TR KRY ayrı ayrı çekirdeklerinden ayrılarak parçalayıcıdan (blender) geçirilmiş, çekirdekler havanda toz haline getirilmiştir. Çözücü olarak % 80'lik (v/v) metil alkol kullanılmış ve sheaker toplam 2 saat olmak üzere karayemiş meyve ve çekirdek kısımları ayrı ayrı 350 rpm' de çalkalanarak ekstrakte edilmiştir. CUPRAC yöntemi kullanılarak elde edilen sonuçlara göre Karayemiş çekirdek kısmında Karayemiş meyve kısmına nazaran çok daha düşük aktivite gözlemlenmiş ve daha sonraki çalışmalara Karayemiş meyve kısmıyla devam edilmiştir.

Farklı kurutma yöntemlerinin, karayemiş meyvesinin antioksidan kapasitesi üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmış ve numune olarak TR KRY meyveleri kullanılmıştır. TR KRY çekirdeklerinden ayrılıp meyvesi parçalayıcı ile homojenize edilmiş ve her biri 2 g örnek içermek üzere 3 ayrı seri oluşturulmuştur. 3 numune liyofilizasyon işlemi için liyofilizere konulmuş (LİYO), 3 numune üzerine yaşken çözücü eklenmiş ve ekstrakte edilmiş (YAŞ), 3 numune gün ışığında kurutulmak üzere saat camı üzerine yayılmıştır. (Kurutma işlemi oda şartlarında 3 gün sürdü.)(ODA SICAKLIĞI) Her bir TR KRY meyve örneği ayrı ayrı ekstrakte edilmiştir. Bu ekstraksiyon işleminde her seri için çözücü olarak %70'lik (v/v) aseton, %80'lik (v/v) metanol ve %80'lik (v/v) etanol kullanılmıştır. CUPRAC yöntemiyle belirlenen sonuçları, kurutma yönteminin antioksidan kapasite üzerine etkisi açısından, antioksidan kapasiteleri mmol TR/g cinsinden YAŞ > LİYO > ODA SICAKLIĞI şeklinde sıralayabiliriz. Aynı testlerin sonucundan yola çıkarak çözücü seçimi de yapılmış % 70 aseton > %80 metanol > % 80 etanol sıralamasının yanı sıra aseton kullanımının yapılacak diğer çalışmalarda kısıtlayıcılığının olabileceği düşüncesiyle çözücü olarak metanol kullanılmasına karar verilmiştir.

Farklı ekstraksiyon yöntemlerinin verimliliğini belirlemek amacıyla da çalışmalar yapılmıştır. Tüm çalışmamız boyunca kullandığımız standart ekstraksiyon yöntemi (ekstraksiyon 1) ile birlikte TR KRY meyvesine farklı bir ekstraksiyon yöntemi (ekstraksiyon 2) uygulanmıştır. Bu yöntemde çekirdeğinden ayrılan parçalayıcı ile homojenize edilmiş 5 g TR KRY alınmış ve 25 mL %80'lik (v/v) metanol ekenerek bir gece boyunca ağzı kapaklı şiliftli erlen içerisinde bekletilmiştir. 16 saat beklemiş olan karayemiş ekstraktı 10 dk. vortekslenerek siyah bant süzgeç kağıdından

süzülmüş ve bu işlem 3 kez 25 mL %80 (v/v)'lik metanol ile tekrarlamıştır. Son hacim çözücüsüyle 100 mL'ye tamamlanarak farklı ekstraksiyon yöntemleri ile hazırlanmış iki ekstrakta da CUPRAC yöntemi uygulanmıştır. Antioksidan kapasite sırasına göre sonuçlar ekstraksiyon 2 > ekstraksiyon 1 şeklindedir.

Karayemiş meyvesi ekstraksiyonu için uygun çözücü cinsi belirlenmeye çalışılmış bu amaçla ekstraksiyon çözücüsü olarak etanol, metanol ve aseton seçilmiştir. TR KRY ile hazırlanan ekstraklara CUPRAC yöntemi uygulanmıştır. Antioksidan kapasite sırasına göre sonuçlar %70 (v/v)'lik aseton > %80 (v/v)'lik metanol > mutlak metanol > mutlak etanol > %80 (v/v)'lik etanol şeklindedir. Daha sonra yapılacak farklı çalışmalarda kullanılacak cihazlarda kullanım açısından herhangi bir kısıtlama ya da sorunla karşılaşılmasını amacıyla çözücü olarak metanol kullanılmasına karar verilmiştir. Çözücü optimizasyonu çalışmalarında ise mutlak, %80, %70, %50, %40 ve %25'lik (v/v) metanol kullanılarak ayrı ayrı İST KRY ve TR KRY ekstraktları hazırlanmış ve bu ekstraktlara CUPRAC yöntemi uygulanarak İST KRY ekstraktlarından en yüksek antioksidan kapasiteye %50' lik (v/v) metanol TR KRY ekstraktlarından % 70' lik (v/v) metanol ile hazırlanan ekstraktların sahip olduğu belirlenmiştir. Aynı testlerin sonuçlarından yola çıkarak kıyaslama yapabilmek amacıyla %50'lik (v/v) metanol kullanılarak TR KRY ve İST KRY ekstraktları tekrar hazırlanmış ve bu ekstraktlara CUPRAC, CERAC, Folin-Ciocalteu ve SDS ile modifiye edilmiş Ferrisiyanür yöntemleri uygulanmıştır. Her yöntem sonucunda antioksidan kapasite miktarları mmol TR/g olmak üzere İST KRY > TR KRY şeklinde belirlenmiştir.

INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY OF HACKBERRY (*Celtis australis* L.) AND LAUREL (*Prunus laurocerasus*) FRUITS

SUMMARY

Free radicals, as charged chemicals due to excess or deficiency of electrons, are chemically active atoms or molecules. Oxygen sourced radicals can be represented as the most important free radicals in biological systems. One of the mechanisms put into immune system to neutralize viruses and bacteria in the body is production of free radicals. As so most of the stable systems, balanced production is substantial for these mechanisms to be runned healthy. If the production of free radicals is excessive and molecules that liable for defensiveness are not exist or not sufficient then this circumstance causes destruction in living cells. Free radicals consist of both the interbody and in-vitro factors. Besides interbody sourced instances as aerobic respiration, metabolism and infection free radicals also consist of under the influence of external environmental factors as tobacco, alcohol, x-rays, sunlight and pollution. In addition to smoking and alcohol these molecules also occurs in the body due to stress. Produced by either through eatables or metabolic reactions people are always faced with these degenerative molecules. Free radicals anywhere in the body can gives up or get electrons. Thus, cells, proteins and DNA can be damaged. As well as free radicals may cause cancer by binding and so triggering on the occurrence of harmful changes in DNA molecules they may also cause diabetes concentrating in the pancreas, cataract, heart and circulatory system diseases. Measures to be taken can minimize the deleterious effects or avoid it.

Antioxidants prevents damaging the cells by reacting with free radicals (by linking to them). With these features, by the reason of reducing the risk of forming abnormal cells and thus tumor formation as well as reducing cell destruction they increase the chance of a healthy life with minimum aging effects.

Antioxidants become oxidized while preventing the oxidation process by deactivating the free radicals. Therefore, our body has a continuous need for antioxidants. There are many different substances whose antioxidant properties have discovered. Whereas getting a portion of these substances in our diet (especially from plants) a part of them is produced by the body itself as a defence system against free radicals. Antioxidants, produced in defense of the body against free radicals are the enzymes such as catalase, glutathione peroxidase and SOD (superoxide dismutase).

In this study, determination of the antioxidant capacity of the fruits Hackberry and Laurel is aimed. Studies on the antioxidant capacity of Hackberry fruit is limited. Earlier studies are mostly related to effects of hackberry leaves on air quality and the use of hackberry bark and leaves as biomonitor on determination of heavy metal concentrations in the air. Scarce studies on the antioxidant capacity of hackberry fruit and the case that hackberry species are widespread in the geography of our country have been influential to actualize this study. Antioxidant determination methods by being applied to green, yellow and black cases of hackberry fruit during the ripening stage, it is aimed to determine the change of the antioxidant capacity of hackberry along the growing process and the causes of the current changes.

Furthermore, antioxidant capacity of the Laurel fruit was also analyzed. By collecting Laurel samples from Araklı county of Trabzon and Istanbul Technical University at the same time, capacities of the same species grown in different regions were compared. There have been earlier studies regarding the antioxidant capacity of Laurel fruit yet with different antioxidant assay methods used in this study Laurel antioxidant capacity results have been supported.

In our study, antioxidant capacity measurement methods of CUPRAC, CERAC, Folin-Ciocalteu and SDS modified ferricyanide are used. In order to apply these methods, Hackberry fruit extracts and infusion and the Laurel fruit extracts were primarily prepared. While CUPRAC method was being applied to extracts, by adding pure water and reactive solutions of 1 mL $1,0 \times 10^{-2}$ M CuCl_2 , 1 mL $7,5 \times 10^{-3}$ M neocuproin and 1 mL NH_4Ac to 4.1 ml in total, it is waited for 30 minutes for the reaction to take place. Absorbance measurements were taken at 450 nm wavelength which Cu(I) chelate of neocuproin showed maximum absorbance and repeated 3 times. In analyzes carried out by CERAC method, taken varying amounts of a solution of 1×10^{-3} M trolox, 1 mL 2×10^{-3} M Ce(IV) solution, 7 mL 1 M Na_2SO_4 solution, by adding pure water and sample extracts to 10 ml total volume, it is waited for 30 minutes for the reaction to take place. Absorbance measurements were taken at 320 nm wavelength which Ce(IV) showed maximum absorbance and repeated 3 times. In analyzes carried out by Folin-Ciocalteu method, adding x mL sample solution + (2-x) mL water + 2,5 mL Lowry C and after waiting for 10 minutes, and then adding over 1:3 diluted 0,25 mL Folin reactive it is left for 30 minutes at room temperature. As with other methods, the measurements were repeated 3 times. As to SDS modified Ferricyanide method, x mL antioxidant + (1-x) mL absolute EtOH + 6,3 mL H_2O + 0,2 mL 1 M HCl + 1,5 mL 1% (w/v) $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ + 0,5 mL 1% (w/v) SDS + 0,5 mL 0,2 % (w/v) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ mixed to 10 ml total volume and thereafter keeping waited 30 minutes absorbances were measured at 750 nm (A_{750}) against blank absorbance. Measurements were repeated 3 times.

Hackberry fruit samples were collected from İTÜ Ayazağa Campus in order to prepare hackberry extracts. Kernel and fruit parts of hackberry was seperated and triturated in a mortar. As the solvent 80 % (v / v) methanol is used and it is extracted by shaking at 350 rpm in the shaker (hackberry's kernel and fruits parts seperately for 2 hours at total). All subsequent hackberry fruit extraction and infusion operations were conducted under these conditions ((a total of 2 hours and 350 rpm). According to the results obtained using CUPRAC method, in the kernel part of hackberry, much lower antioxidant capacity than the fruit part of hackberry was observed and further studies were proceeded with the fruit fraction of hackberry.

Appropriate type of solvent were tried to determine for the extraction of hackberry and for this purpose ethanol, methanol and acetone were selected as extraction solvents. Before preparing extracts, hackberry fruit was separated from its kernel part and allowed to dry at room temperature for 3 days, after then drying the sample was prepared by trituration. CUPRAC method was conducted to prepared hackberry extracts using ethanol, methanol and acetone solvents. The results according to antioxidant capacity are as follows: 70 % (v / v) acetone > 80 % (v / v) methanol > 80 % (v / v) ethanol > absolute methanol > absolute ethanol. It was decided to use methanol as the solvent instead of acetone in consequence of not to be encountered with any restriction or problem for use in different studies to be performed later. In solvent optimization studies, hackberry extracts were prepared using absolute, 80 %, 70 %, 50 %, 40 % and 25 % (v / v) methanols and applying CUPRAC method to these extracts it was found that the extracts prepared with 50 % (v / v) with methanol had the highest antioxidant capacity with the value of 0,072 (mmol TR/g). Extracts with 50 % (v / v) methanol were prepared for the green, yellow and black cases of hackberry fruit which turns into during the ripening stage nevertheless green, yellow and black hackberry fruit infusions were also prepared. Modified Ferricyanide methods by CUPRAC, CERAC, Folin-Ciocalteu and SDS are applied to 50 % (v / v) methanol extracts and infusions and, as the results of each method, antioxidant capacity amounts were determined in that: green > yellow > black as mmol TR/g.. Besides, antioxidant capacity amounts for all 4 methods were seen that 50 % hackberry methanol extract > hackberry infusion as mmol TR/g.

Laurel fruits collecting from İstanbul Technical University Ayazağa Campus (İST KRY) and the Araklı county of Trabzon (TR KRY) were used on determination of the antioxidant capacity of Laurel fruit. Laurel fruits of İST KRY and TR KRY were peeled from their kernels separately, passed through blender and kernels were pulverized in a mortar. As the solvent, 80 % (v / v) methyl alcohol was used and fruit and kernel parts of Laurel fruit were separately extracted with 350 rpm agitation for 2 hours in shaker. According to the results obtained using CUPRAC method, much lower activity was observed on the kernel part of Laurel as compared with fruit part and further studies were conducted with the fruit fraction.

Examination of the effect of different drying methods on antioxidant capacity of Laurel fruit is aimed and TR KRY fruits were used as the sample. TR KRY is separated from its kernels, fruit part is homogenized with shredder and each containing 2 g of sample 3 separate series are composed. 3 samples were placed in a lyophilizer for lyophilization (LİYO), 3 samples were extracted adding over solvent while they are wet (YAŞ), 3 samples were spreaded onto watch glass to dry in the daylight. (The drying process took 3 days at room conditions.)(ODA SICAKLIĞI) Each TR KRY fruit samples were extracted separately. In this extraction process, 70% (v / v) acetone, 80% (v / v) methanol and 80% (v / v) ethanol were used as the solvent for each batch. The results determined by CUPRAC method, in terms of the effect of drying process on antioxidant capacity, antioxidant capacities range as YAŞ > LİYO > ODA SICAKLIĞI in mmol TR/g. Solvent choice was also constructed based on the results of the same test and right along with 70% acetone > 80% methanol > 80% ethanol ranking, it was decided to use methanol as the solvent with the idea that acetone use could be restrictive in other studies.

Studies were also performed on the purpose of determining the efficiency of different extraction methods. Along with the standart extraction method (extraction 1) used during all our study, a different extraction method (extraction 2) is also applied to TR KRY fruit. In this method, 5 g TR KRY seperated from its kernel and homogenised with shredder was taken and adding over 25 ml of 80% (v / v) methanol it was kept in a capped erlenmayer flask overnight. Laurel extract that has waited 16 hours was vortexed for 10 minutes thereafter filtered through a black band filter paper and this operation was repeated 3 times with 25 ml of 80% (v / v) methanol. CUPRAC method was applied to both two extracts prepared by different extraction methods completing final volume to 100 ml with its solvent. The results according to antioxidant capacity are as follows: extraction 2 > extraction 1.

It was attempted to identify the appropriate solvent type for Laurel fruit extraction and for this purpose ethanol, methanol and acetone were selected as extraction solvents. CUPRAC method was applied to extracts prepared with TR KRY. Results according to antioxidant capacity are as follows like: 70% (v / v) acetone > 80% (v / v) a methanol > absolute methanol > absolute ethanol > 80% (v / v) ethanol. It was decided to use methanol as the solvent with the intend of avoid any restriction or problem for usage in the devices which will be used for further different studies. At the solvent optimization studies, TR KRY and IST KRY extracts were prepared seperately by using absolute 80%, 70%, 50%, 40% and 25% (v / v) methanols and CUPRAC method was applied to these extracts. It was determined that İST KRY extracts had the highest antioxidant capacity in 40 % (v/v) methanol with the value of 0, 2123 (mmol TR/g) and TR KRY extracts had the highest antioxidant capacity in 70 % (v/v) methanol with the value of 0,1428 (mmol TR/g). Based on the results of the same test, in order to make comparisons TR KRY and IST KRY extracts were prepared by using 50 % (v/v) methanol and CUPRAC, CERAC, Folin-Ciocalteu and SDS modified Ferricyanide methods were applied to these extracts. Antioxidant capacity results for each method were determined in that: İST KRY > TR KRY as mmol TR/g.

1. GİRİŞ

Oksijen insan yaşamı için çok elzem olmasına karşın, normal metabolizma sırasında üretilen bazı reaktif oksijen türleri vücuda yoğun bir zarar verme potansiyeline sahiptir (Diplock, 1998). Çoğunu serbest radikallerin oluşturduğu reaktif oksijen türleri normal oksijen molekülüyle karşılaştırıldığında, kimyasal reaktivitesi daha yüksek olan oksijen formlarıdır (Nawar, 1996).

Serbest radikaller, dış atomik orbitallerinde bir veya daha fazla çift oluşturmamış elektron içeren yüksek enerjili, stabil olmayan bileşiklerdir. Bu çiftlenmemiş elektron serbest radikallere büyük reaktivlik kazandırırken protein, lipid, DNA ve nükleotid koenzimler gibi birçok biyolojik materyale zarar vermelerine neden olmaktadır. Bu zararın yaşlanmayı teşvik ettiği ve ayrıca kalp damar hastalıkları, çeşitli kanser türleri katarakt, bağışıklık sisteminde zayıflama sinir sistemi dejeneratif hastalıkları gibi birçok hastalığa sebep olduğuna dair bilgiler bulunmaktadır (Diplock 1998). Canlı hücrelerdeki oksijen metabolizması, çevre kirleticileri radyasyon, pestisitler, çeşitli tıbbi tedavi yolları ve kontamine sular gibi birçok etmen kaçınılmaz bir şekilde oksijen türevi serbest radikallerin oluşumuna yol açmaktadır. Bu radikallerin başlıcaları; tekli oksijen ($\cdot^1\text{O}_2$), süperoksit anyonu ($\cdot\text{O}_2^-$), hidroksi ($\cdot\text{OH}$), peroksi ($\text{ROO}\cdot$) ve alkoksi ($\text{RO}\cdot$) radikalleridir (Kaur and Kapoor 2001).

Reaktif oksijen türlerinin zararlarına karşılık vücuttaki farklı doğal savunma sistemleri serbest radikalleri kontrol altında tutmaktadır. Bu sistemler farklı hücrelerde ve farklı serbest radikaller üzerinde rol oynadıkları için birbirlerini tamamlayıcı niteliktedir (Diplock 1998). Çizelge 1’de prooksidan faktörler ve antioksidan savunma sistemleri arasındaki denge gösterilmektedir:

Çizelge 1.1 : Oksidan kaynakları ve antioksidan savunma sistemleri (Diplock, 1998)

Oksidan	Antioksidan savunma
Sigaradumanı	Süperoksitdismutaz
Egzersiz	Katalaz
Çevre kirleticiler	Glutatyon peroksidaz
Ateşli hastalıklar	Glutatyon
Radyasyon	Ubikinon
Çoklu doymamış yağ asitleri ile zengin bir diyet	Selenyum
İskemi	Ürik asit
Karsinojenler	E vitamini
	C vitamini
	β- karoten ve diğer karotenoidler

Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddelere “antioksidan” adı verilir (Elliot 1999). Antioksidanlar mekanizmalarına göre, birincil ve ikincil antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Birincil antioksidanlar; mevcut radikallerle reaksiyona girerek bunların daha zararlı formlara dönüşmelerini ve yeni serbest radikal oluşumunu önleyen bileşiklerdir. Birincil antioksidan kategorisinde yer alan süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSHPx) ve katalaz gibi enzim sistemleri serbest radikalleri yok etme yeteneğindedir. Bu enzimler genel olarak serbest radikallerin DNA, proteinler ve lipidler gibi hücresel bileşenlere zarar vermesini sınırlandırmak suretiyle bir hücresel bölgeden diğerine geçişini de önleyebilmektedirler (Diplock 1998). İkincil antioksidanlar ise; oksijen radikalini yakalayan ve radikal zincir reaksiyonlarını kıran C vitamini, E vitamini, ürik asit, bilirubin ve polifenoller gibi bileşiklerdir (Ou et al. 2002).

2. GENEL BÖLÜM

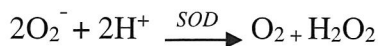
2.1 Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Serbest radikaller bir veya birden fazla eşleşmemiş elektronlara sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük veya oldukça aktif moleküller olarak tanımlanır.

(Scheibmeir ve diğ., 2005). Oksijen molekülleri biyolojik hayatın sürekliliği için vazgeçilmez olmakla birlikte, metabolizmanın doğal işleyişi sürecinde son derece reaktif olan serbest radikallerin de kaynağını oluşturlar (Zempleni ve Dakshinamurti, 2005).

Biyolojik sistemlerde en çok önem teşkil eden serbest radikal olarak oksijen kaynaklı radikaller gösterilebilir. Bu serbest oksijen kaynaklı radikaller, metabolik işleyişin doğal bir yan ürünü olup oldukça reaktif ve zararlı maddelerdir (Zempleni ve Dakshinamurti, 2005). Reaktif oksijen türleri (ROT) olarak da bilinen bu moleküller protein, lipid ve nükleik asit gibi hücrelerin ana bileşenlerine zarar verir (Bissenbaev ve diğ., 2007) En çok rastlanan serbest radikaller hidroksil radikali, süperoksit radikali, nitrik oksit radikali ve lipid peroksit radikalidir. Hücrelerde farklı kimyasal yapılara sahip reaktif oksijen türleri Çizelge 2.1’de görülmektedir (Halliwell ve Whiteman, 2004).

Oksijen, demir ve kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimlerinin ve flavoproteinlerin etkisiyle süperoksit radikaline indirgenir. Oldukça aktif olan ve hücrede hasara neden olan süperoksit radikali, bakır ihtiva eden bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) sayesinde hidrojen peroksit'e çevrilir. Etkisi daha az olan hidrojen peroksit, hücrelerde katalaz veya glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi enzimlerle oksijen molekülü ve su gibi zararsız maddelere dönüştürülerek etkisiz hale getirilir.



Hidrojen peroksit hücre zarından kolaylıkla geçip hücreler üzerinde bazı fizyolojik etkilere neden olabilir, ancak çiftlenmemiş elektrona sahip olmadığından dolayı radikal olarak adlandırılmaz. Oksijen molekülünün kendisi de bir radikaldir ancak orbitaline çiftlenmemiş elektron bulunduruyor ise süperoksit radikali olarak adlandırılır. Bu sebepten dolayı reaktif oksijen türleri; hidroksil, süperoksit, ve peroksil gibi radikaller ve hidrojen peroksit ve singlet oksijen gibi radikal olmayanlar için ortak olarak kullanılan bir terimdir.

Çizelge 2.1 : Reaktif oksijen türleri (Halliwell ve Whiteman, 2004).

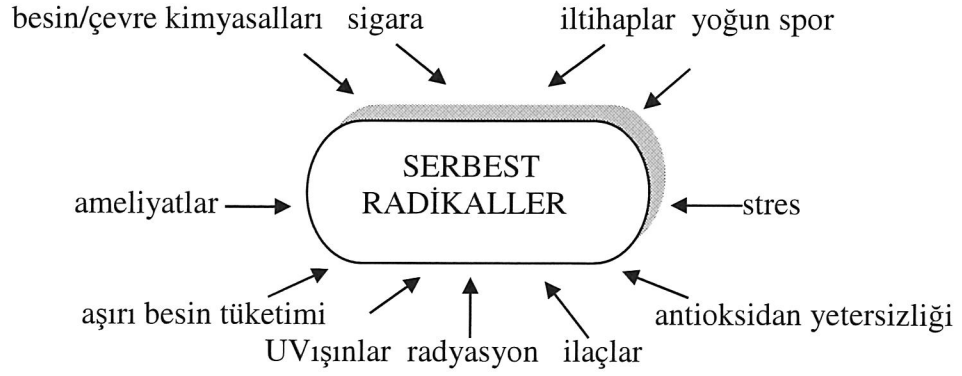
Serbest Radikaller	Radikal Olmayanlar
*Süperoksit	*Hidrojen peroksit
*Hidroksil	*Hipobromik asit
*Hidroperoksil	*Hipoklorik asit
*Peroksil	*Ozon
*Alkoksil	*Singlet oksijen
*Karbonat	*Organik peroksit
*Karbondioksit	*Peroksinitril
	*Peroksinitirk asit

Radikal olmayan ROT grubunda normal oksijenden çok daha reaktif bir biyolojik molekül olan “singlet oksijen” bulunmaktadır. Singlet oksijen molekülü yapısında çiftlenmemiş elektron bulundurmaz ve radikal olarak adlandırılmaz. Ancak singlet oksijen, hücre zarındaki çoklu doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girer ve lipid peroksitlerin oluşumuna neden olur (Halliwell ve Gutteridge, 1984).

Hücrelerde serbest radikaller endojen ve eksojen kaynaklı faktörlere bağlı olarak meydana gelirler (Pham-Huy ve diğ., 2008). Şekil 2.1’de hücre hasarına neden olan serbest radikallerin kaynakları şematik olarak gösterilmiştir.

Endojen etmenler organizmada doğal olarak oluşan oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları ile oluşurlar (Williams ve Jeffrey. 2000).

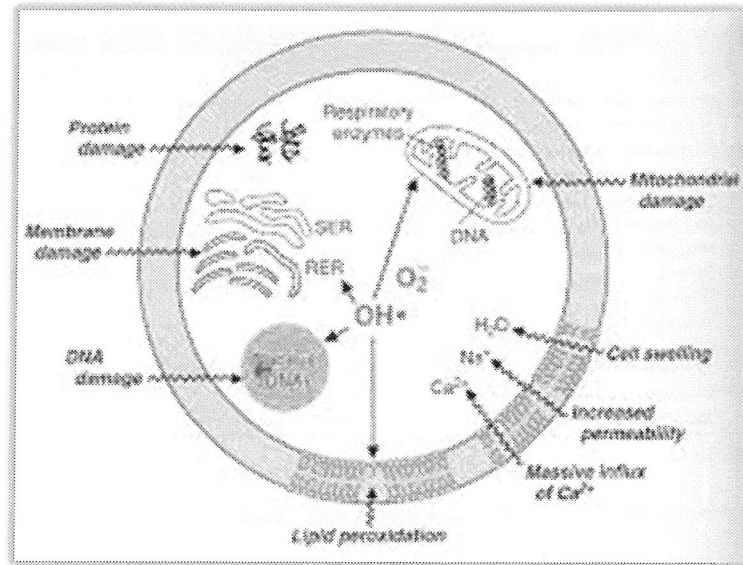
Eksojen kaynaklı etmenler ise stres, virüsler, enfeksiyon, çeşitli kimyasalların etkisi altında kalma, pestisitler, ilaç toksikasyonları, iyonize ve ultraviyole radyasyon, hava kirliliği, sigara dumanı ve çevresel faktörler şeklinde sıralanabilir (Pham-Huy ve diğ., 2008).



Şekil 2.1 : Serbest radikallerin kaynakları.

Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri ile canlı organizmadan bunları uzaklaştıran savunma sistemi arasındaki dengenin savunma sistemi aleyhine bozulmuş olmasıdır (Gill ve Tuteja, 2010). Oksidatif stresin çoğalması sonucunda büyük proteinler, nükleik asitler ve lipidler gibi moleküllerde hasar meydana gelir, kalp hastalıkları ve kanser riski artar.

Oksidatif hasar DNA zedelenmesine, onarılmazsa mutasyona sebep olur. Ayrıca farklı mekanizmalar ile tümör oluşumunda da etkilidir. Şekil 2.2’de oksidatif stresin hücre içerisinde sebep olduğu hasarlar görülmektedir.



Şekil 2.2 : Oksidatif stresin hücre içerisinde neden olduğu hasarlar

Oksidatif stres kanser ve ateroskleroz başta olmak üzere pek çok hastalığa sebep olmakta ve bunun yanında pek çok hastalık ve fizyolojik durum da oksidatif stres nedeniyle olabilmektedir. Hipertansiyon, kardiyolojik hastalıklar, nörolojik

hastalıklar, astım, diyabet, ramatolojik hastalıklar, osteoproz ve yaşlanma dahil daha birçok hastalığın oksidatif stres ile alakalı olduğu bildirilmiştir.

Serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stresin engellenmesi ve etkisinin minimuma indirgenmesi için yeterli miktarda antioksidan tüketilmelidir. Çeşitli antioksidan bileşikler içeren sebze ve meyveler, hücreleri oksidatif stresten koruyarak kronik hastalık risklerini en aza indirir. Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların neden olduğu hasarı önlemek maksadıyla memeli metabolizması bazı savunma sistemleri geliştirmiştir. Bunlara antioksidan savunma sistemleri denir.

Antioksidan etki mekanizması en basit şekilde aşağıdaki gibi gösterilebilir.

Başlama: $ROO\cdot + AH \rightarrow ROOH + A\cdot$

Gelişme: $ROO\cdot + A\cdot \rightarrow ROOA$

Sonlanma: $A\cdot + A\cdot \rightarrow A-A$

Antioksidanlar hidrojen atomu verme eğilimine sahip kimyasal bileşenlerdir. Böylelikle, birincil radikalleri radikal olmayan türlere çevirerek, okside olmuş antioksidan radikallere dönüşürler. Hidrojenini vererek antioksidan radikali oluşturan antioksidan, lipidlerle reaksiyona girme yeteneğini kaybeder. Antioksidanların molekül yapısı sadece hidrojen atomu verme açısından değil, aynı zamanda radikallerin düşük reaktiviteli hale getirip lipidler ile reaksiyona girmesini engellemesi açısından da oldukça uygundur.

Antioksidan aktivitesi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterir. Bunlar, fiziksel faktörler, substrat faktörleri, gıdanın fizikokimyasal durumu gibi çeşitli faktörler olabilmektedir. Fiziksel faktörler sıcaklık, oksijen ve konsantrasyon şeklinde sıralanabilir. Antioksidan aktivitesi konsantrasyonun artması ile artar. Oksidasyonun yeterli bir seviyede önlenebilmesi için konsantrasyon belli bir kritik değerin üzerinde olmalıdır.

2.2 Antioksidanlar

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların neden olduğu hasarı önlemek maksadıyla memeli metabolizması bazı savunma sistemleri geliştirmiştir. Bunlara antioksidan savunma sistemleri denir.

Geleneksel tanım olarak antioksidan oksidasyona karşı koyan, oksijen yada peroksitlerle ilerleyen reaksiyonları engelleyen maddedir. Bu maddelerin çoğu çeşitli

ürünlerde koruyucu olarak kullanılmaktadır. Daha biyolojik olarak ise antioksidan madde, havanın oksijeni ile bozulan ürünlere ilave edilerek bu bozulmayı engelleyen veya geciktiren sentetik veya doğal madde olarak tanımlanmaktadır. Gıda endüstrisinde antioksidanlar geniş bir alana sahiptir. Oksijen ve nitrojen gibi reaktif türlerin insanlardaki normal fizyolojik fonksiyonları üzerindeki ters etkilerini oldukça önemli şekilde azaltan diyetel antioksidanlardan, yağların bozunmasını engelleyen maddeler içeren antioksidanlara kadar geniş bir kullanıma sahiptirler

Temel antioksidan kaynakları dörde ayrılmıştır;

- 1- Enzimler; Süperoksit dismutaz, peroksidaz, katalaz
- 2- Büyük moleküller; Albumin, Ferritin ve diğer proteinler
- 3- Küçük moleküller; Askorbik asit, urik asit, tokoferol, karetonoidler, polifenoller (Epigallokateşin, epigallokateşingallat, epikateşin, kateşin, kafeik asit, klorojenik asit, gallik asit, ferulik asit, kumarik asit vb.)
- 4- Bazı hormonlar; Östrojen, melatonin vb.

2.3 Antioksidanların Etki Mekanizmaları

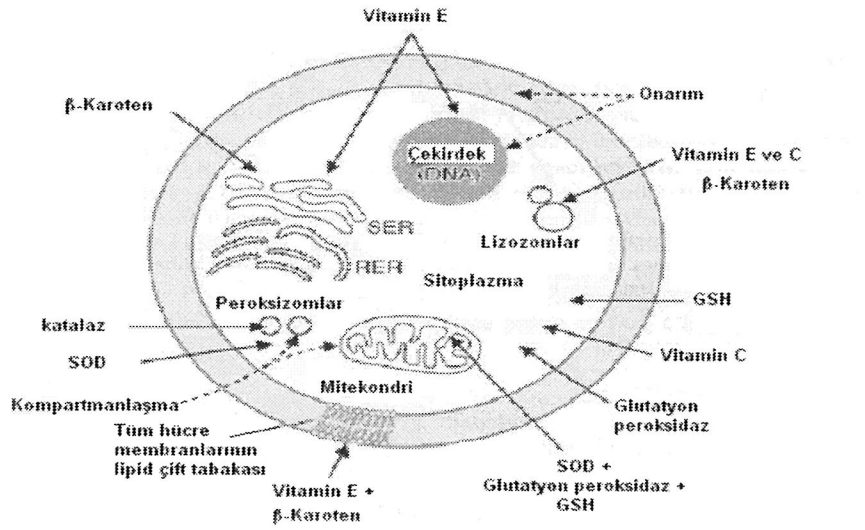
Antioksidanlar dört farklı biçimde etki ederler:

- ✓ Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha az reaktif yeni bir moleküle çevirmeye 'toplayıcı' etki denir.
- ✓ Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürmesi 'bastırıcı' etkidir.
- ✓ Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincir reaksiyonlarını kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye 'zincir kırıcı' etki denir.
- ✓ Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması ise 'onarıcı' etkidir.

Antioksidanların kendileri de yükseltgenerek bozundukları için yalnız sınırlı bir zaman için yükseltgenebilen maddeyi bu olaydan koruyabilir ve tüm antioksidan molekülleri kaybolunca madde de hiç antioksidan yokmuş gibi yükseltgenmeye devam eder. Metal katalizörler de antioksidanın etkisini, onu yükseltgemek suretiyle azaltır.

Belli bir sınır içinde antioksidanın miktarı arttıkça koruma özelliği de artmaktadır. Bununla birlikte belirli bir noktadan sonra katılan antioksidanın etkisi azalmaya baslar. Bu belki de antioksidanın kendisinin zincirleme tepkimeye girmeksizin yükseltgenebilmesinden ileri gelmektedir.

Otooksidasyonun metal ve serbest radikallerle katalizlenmesini önlemek için, ışık (özellikle UV ışık) koruyucu bazı kimyasal maddeler tarafından soğurulmalıdır. Bazı antioksidanlar, radikal oluşturmada radyasyonu soğurabilir. Aktif karbon, fenil salisilat ve hidroksibenzofenon UV deaktivatörlerine örnektir.



Şekil 2.3 : Antioksidanların hücresel etki mekanizmasının şematik gösterimi.

2.4 Antioksidanların Sınıflandırılması

Günümüzde kullanılan antioksidanlar, gıdaları raf ömrünün yanı sıra serbest radikallerin olumsuz etkilerine karşı vücudun savunma mekanizmasına yardımcı olmaları nedeniyle sağlık açısından da büyük önem arz etmektedir.

Çoğu sentetik antioksidan fenolik yapıdadır. Antioksidan aktivitesi arasındaki farklılık kimyasal yapı ile alakalıdır. Ticari olarak mevcut olan ve günümüzde kullanılan sentetik antioksidanlar butillenmiş hidroksianisol (BHA), butillenmiş hidroksitoluen (BHT), tersiyerbutil hidrokinon (TBHQ) ve propil gallat (PG) dir.

Doğal antioksidanlar, bitki ve hayvan dokularında bulunan ve ekstrakte edilebilen ya da gıdanın işlenmesi sırasında açığa çıkan bileşenlerdir. En önemli doğal antioksidanlar, tokoferoller, flavonoidler, fenolik asitler, vitamin C, karotenoidler, polifenoller ve selenyumdur. Son zamanlarda gıda kimyası ve koruyucu tıbbın bitki kaynaklı doğal antioksidanlara karşı ilgisi artmaktadır. Bunu nedeni sentetik antioksidanların (BHA, BHT, gibi) kanserojen olduklarının düşünülmesidir.

2.4.1 Antioksidanların doğal ve sentetik olarak sınıflandırılması

Antioksidanları sınıflandırmanın bir yöntemi de doğal ve yapay olarak sınıflandırmaktır.

2.4.1.1 Doğal antioksidanlar

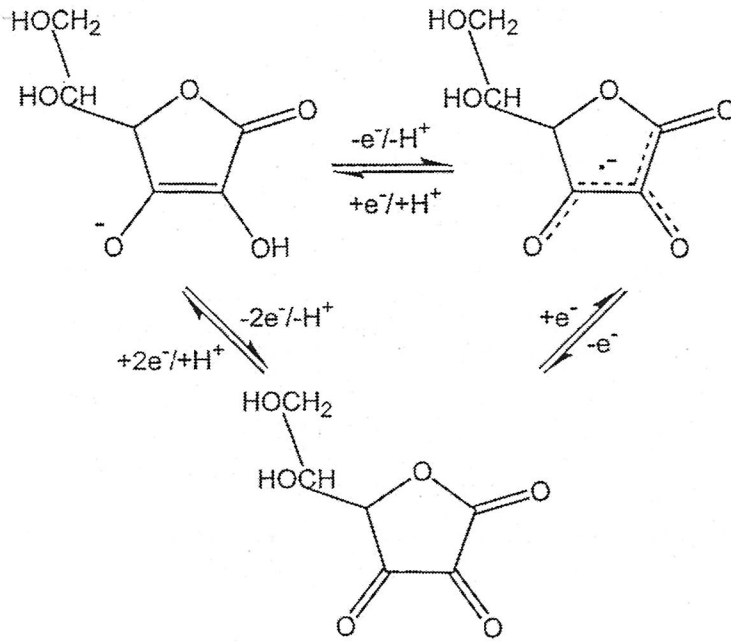
C Vitamini; C vitamini (askorbik asit, askorbat) bitkilerde yaygın olarak bulunan, suda çözünen bir vitamindir. Altı karbonlu lakton yapısına sahiptir. Çoğu hayvanın karaciğer veya böbreklerinde glikozdan, bitkilerde ise yaprak kısımlarında özellikle kloroplastlarında sentezlenir. İnsanlar bu vitamini vücutta sentezleyemezler. Bundan dolayı bu ihtiyaçlarını taze meyve ve sebzelerden karşılarlar. Özellikle lahana, patates, portakal, kivi, çilek, greyfurt, kavun gibi meyvelerde, brüksel lahanası, brokoli, kırmızı veya yeşil biber, domates, karnabahar, lahana domates gibi sebzelerde, portakal suyu, domates suyu gibi meyve sularında bol miktarda bulunmaktadır.

C vitamini, reaktif oksijen (süperoksit, peroksil radikalleri, singlet oksijen, ozon), reaktif azot (peroksinitrit, azot dioksit) ve reaktif klor (hipoklorik asit) türlerini kolayca süpürür ve bu suretle diğer substratları oksidatif hasardan korur.

Hem askorbik asit hem de bunun bir elektron yükseltgenmiş hali olan askorbil radikali düşük redüksiyon potansiyeline sahiptir. Böylece ilgili radikal ve oksidantlarla reaksiyona girebilir. Askorbil radikali, eşleşmemiş elektronun rezonans kararlılığı nedeniyle düşük redüksiyon potansiyeli gösterir ve kolayca askorbat ve dehidroaskorbik aside dönüşür. 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.

Askorbat (AH^-)

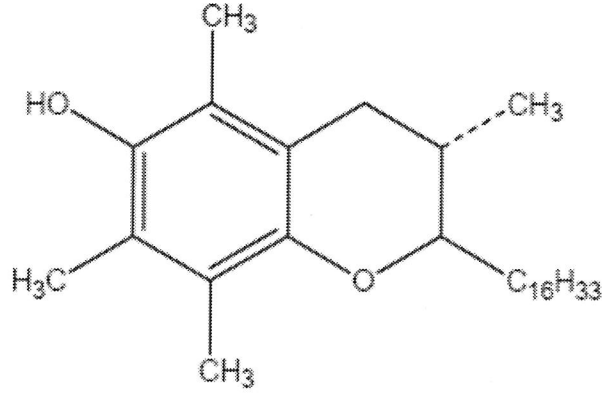
Askorbil Radikali ($A^{\bullet-}$)



Şekil 2.4 : Dihidroaskorbik Asit (DHA).

E Vitamini; E vitamini α -, β -, δ -, γ - tokoferolleri ve tokotrienolleri içeren grubu kapsamaktadır. D- α -tokoferol, en yüksek biyolojik aktiviteye sahip tokoferoldür. E vitamini dokularda önemli zincir kırıcı bir antioksidandır ve lipid peroksidasyonuna karşı savunma etkisinin olduğu, hücre membranlarını serbest radikal saldırısına karşı koruduğu düşünülmektedir. Yağca zengin bitkiler, E vitaminin temel doğal kaynaklarıdır.

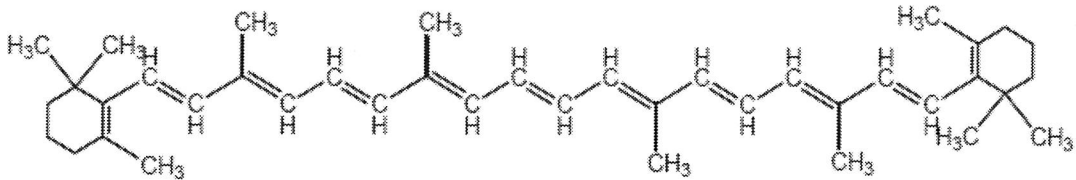
Tokotrienoller, palm yağında ve pirinç kepeğinde yüksek miktarda, hindistan cevizi yağı, kakao yağı, soya fasulyesi, arpa, buğday, kırmızı et ve yumurtada bulunmaktadır. Ayçiçeği, yer fıstığı, ceviz, susam ve zeytinyağı ise sadece tokoferol içermektedir.



α -tokoferol

Şekil 2.5 : α - tokoferol'ün kimyasal yapısı.

Karotenoidler; Bitkilerde ve hayvansal dokularda bulunan kırmızı-sarı pigmentlerdir. Yağda çözünen bileşiklerdir. Karotenoidler sarı ve koyu yeşil renkli sebze ve meyvelerde bulunurlar. Kayısının, kavunun, havucun domatesin renkleri karotenoidlerden kaynaklanır. Karoten, karotendioksigenaz enziminin merkezdeki çift bağı koparmasıyla A vitaminine dönüşür. Gıdalarda bulunan karotenoidler, sekiz izoprenoid biriminin bir araya gelmesiyle oluşan likopen türevi polienlerdir. Karotenoidler, özellikle likopen, güçlü singlet oksijen süpürücü rol oynarlar; hücre ve diğer vücut komponentlerini serbest radikallerin saldırılarından korurlar ve zincir reaksiyonlarını keserler. Gıdalarda bulunan en önemli karotenoidler β -karoten, α -karoten, likopen, lutein ve β -kriptoksantindir.



Şekil 2.6 : β -karotenin kimyasal yapısı

Doğal kaynaklı antioksidanlar tahıl ve baklagillerde, meyvelerde, şifalı bitkilerde ve bitki kaynaklı içeceklerde bulunurlar. Bunlarda bulunan antioksidanlar, fenolik bileşikler (tokoferoller, flavonoidler, fenolik asitler), azotlu bileşikler (alkaloitler, klorofil türevleri, proteinler, aminler), polifonksiyonlu organik asitler ve karotenlerdir. Maliyet nedeniyle doğal kaynaklı antioksidanlar yerine sentetik

antioksidanlar 20. yüzyılın başlarından beri kullanılmaktadır. Ancak sentetik antioksidanların toksik olabileceği ve kansere yol açabileceğini ortaya koyan çalışmalar sonucunda bazı ülkelerde kullanılmalarına sınırlama ya da yasak getirilmiştir. Sentetik antioksidanlar hakkındaki bu şüpheler etkili, ekonomik olan doğal antioksidanlara olan ihtiyacı artırmış ve bu alandaki çalışmalar bitki kaynaklı antioksidanlar üzerinde yoğunlaşmıştır. Doğal kaynaklı E ve C vitamini uzun yıllardır besinlerde ayrı ayrı veya sinerjik etkiden dolayı birlikte antioksidan olarak kullanılmaktadır. Ancak tokoferol ve askorbik asidin antioksidan aktivitesi sentetik antioksidanlardan daha düşüktür. Doğal antioksidanlar, reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimi sonucu organizmanın istilaya uğradığı ve oksidatif stres durumu oluştuğunda organizmayı savunurlar.

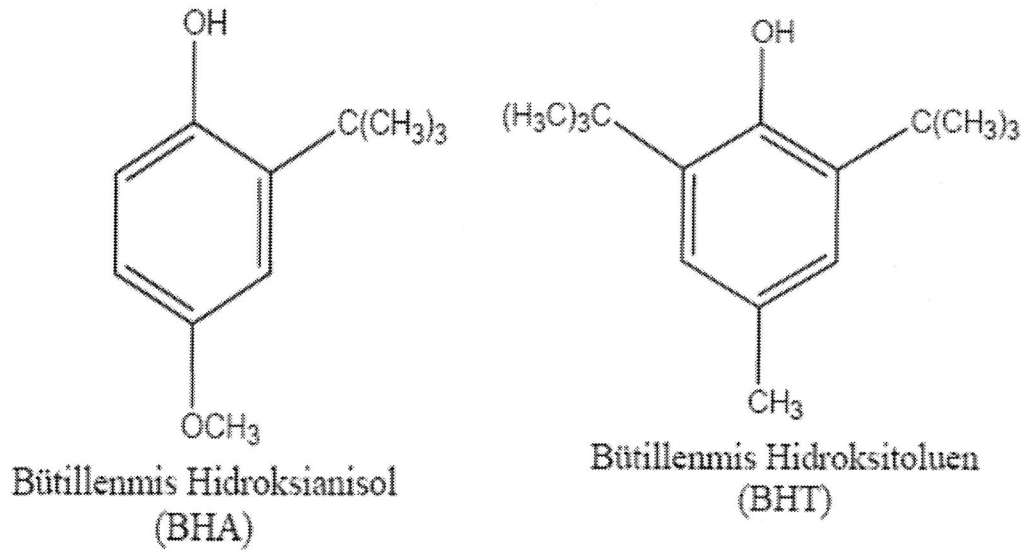
Fenolik Bileşikler; En az bir aromatik halka ve buna bağlı bir veya daha fazla hidroksil grubu içeren kimyasal yapılardır. Bu maddeler bitkilerde yaygındırlar ve bitki metabolizmasında ikincil metabolit olarak ortaya çıkarlar. Bu bileşikler ve özellikle bir alt sınıf olan flavonoidler sahip oldukları ekolojik rol, antioksidan, antikarsinojenik aktivite ve gıda kalitesine olan katkılarından dolayı önemlidirler. Polifenolik bileşikler potansiyel antioksidan bileşiklerdir ve serbest radikalleri önleyerek, metalleri tutuklayarak ve lipid peroksidasyonunu önleyerek işlev görürler. Bitki fenoliklerinin antioksidan etkileri bilhassa redoks özelliklerinden ötürüdür ve bu yüzden indirgeyici ajanlar, hidrojen vericiler, tekli oksijen önleyiciler ve metal şelatlayıcılar olarak etki ederler.

2.4.1.2 Sentetik antioksidanlar

Besinlerdeki sıvı ve katı yağların oksitlenerek bozunması istenmeyen koku ve tatların oluşmasını takiben sekonder olarak besin kalitesinde ve güvenliğinde azalmaya neden olan toksik potansiyel taşıyan bileşiklerin oluşmasına neden olur. Besinlerin tat, renk ve vitamin değerlerinin korunması için antioksidan ilavesi gerekir. Besinlere doğal antioksidanlar (baharat veya diğer katkı maddeleri) da eklenebilirse de endüstride daha çok aşağıda açıklanan sentetik antioksidanlar kullanılır.

Bütillenmiş hidroksianisol (BHA) ve Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT); BHA, kimyasal olarak iki izomerin karışımıdır (3-terciyer butil-4-hidroksianisol ve 2-terciyer butil-4-hidroksianisol) ve beyaz mumsu parçacıklar halindedir. BHT ise, beyaz kristal görünümündedir. İki bileşik de, yağda çözünür fakat suda çözünmezler.

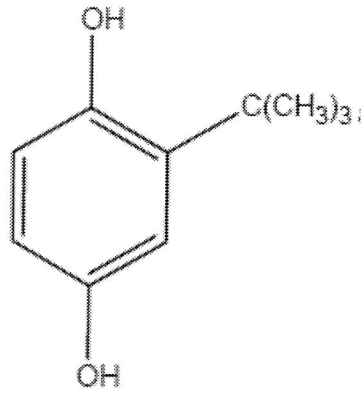
BHA'nın gıda içinde taşınması BHT'den daha iyidir. Genellikle gıdanın yağ içeriğinin ağırlığı üzerinden, tek başına veya antioksidan karışımı olarak % 0,02 (200ppm) oranında kullanılırlar. BHA özellikle uçucu yağların renk, tat ve kokularının korunmasında, bilhassa kısa zincirli yağ asitlerinin oksidasyonunu kontrol etmede etkilidir. Genellikle tahıl ve şekerli ürünlerde kullanılır. BHA ve BHT birlikte kullanıldığında sinerjik etkiden bahsedilmektedir. Bu antioksidanların fazla tüketimi, vücutta aşırı hassasiyete ve alerjiye yol açabilmektedir. Günümüzde kanserojenik etkileri üzerinde de araştırma yapılmaktadır. İkisinin de, *National Research Council, Food Additive Committee*'nin verilerine göre gıdalarda kullanımında 1970'den beri azalma olmasına rağmen, halen 23 büyük gıda kategorisinde en fazla kullanılan antioksidanlar olduğu bilinmektedir.



Şekil 2.7 : BHA ve BHT'nin kimyasal yapıları.

Tersiyer bütillhidrokinon (TBHQ) ; Kızartma yağlarını oksidasyona karşı korumak için en iyi antioksidan olarak bilinmektedir. Kızartma işlemi bitmiş ürünleri de korumaktadır. Bej renkli bir toz olan TBHQ, katı ve sıvı yağlarda çözünür. Diğer sentetik antioksidanların aksine bitkisel yağlar için en etkili sentetik antioksidandır. Yüksek sıcaklıklara dayanıklıdır.

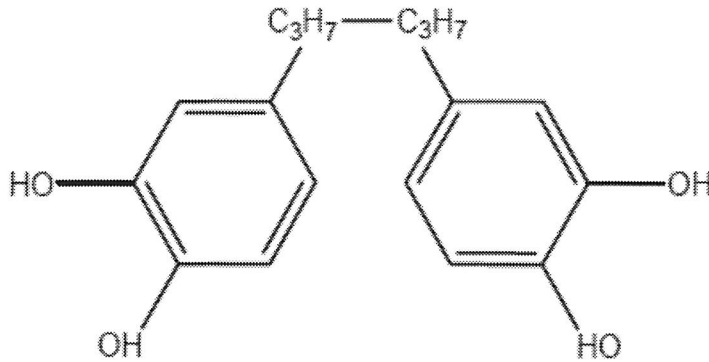
Tek başına veya BHA ve/veya BHT ile birlikte kullanımı vardır. Sitrik asit ile karıştırıldığında, kararlı kılıcı özellik kazanmaktadır. Avrupa Birliği ülkelerinde kullanımı yasaklanmıştır.



Tersiyer Bütıl Hidrokinon
(TBHQ)

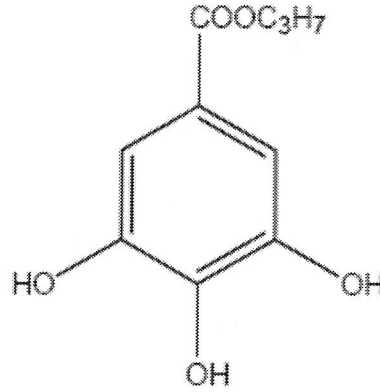
Şekil 2.8 : TBHQ'nun kimyasal yapısı.

Nordihidroguareyetik asit (NDGA) ; NDGA, toksik etkisi yüksek, yağdaki çözünürlüğü az olan bir antioksidandır. Gıdalara % 0,01 oranında katılır, pişirilmiş besinlerde bile etkisini korur.



Şekil 2.9 : NDGA'nın kimyasal yapısı.

Galatlar; Gallik asitin en fazla kullanılan esterleri, propil gallat (PG), oktil gallat, dodesil galat ve lauril gallattır. Bunlar suda çözünmezler, yağda yalnız oktil ve dodesil gallatlar iyi çözünür. PG, yaygınlaşmış sentetik bir antioksidandır. Gallatların kullanılmasında toplum sağlığı ve beyaz kristal toz olarak satılır ve suda çok az çözünür. Erime noktası 148°C olup, bu derecenin üzerinde etkisini kaybeder. FDA'nın izniyle gıdalarda 1947'den beri kullanımı giderek gıda hijyeni açısından olumsuz hiçbir bilgi ileri sürülmemektedir.



Propil gallat

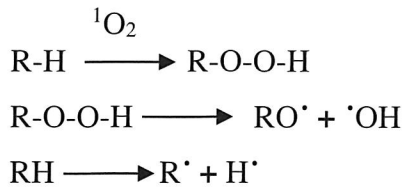
(3,4,5-trihidroksi-benzoik asit propil ester)

Şekil 2.10 : Propil gallat'ın kimyasal yapısı.

2.4.2 Antioksidanlar etki mekanizmasına göre sınıflandırılması

Primer Antioksidanlar; Birincil antioksidanlar (tip-1 veya zincir kırıcı antioksidanlar) elektron vererek, serbest radikal zincir reaksiyonunu kıran ve çoğunlukla fenolik yapıdaki bileşiklerdir. Bu bileşikler serbest radikaller ile reaksiyona girerek, daha kararlı ürünler oluşturarak hidroperoksit oluşumunu engellerler. Sentetik ve/veya doğal yapıda olabilirler. Tokoferoller, flavonoidler, alkil gallatlar, bütillenmiş hidroksi anizol (BHA), bütillenmiş hidroksi tolueen (BHT) ve tersiyer bütillhidrokinon (TBHQ) en önemlileridir.

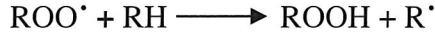
Otooksidasyonun başlangıç aşamasını erteler, engeller ya da otooksidasyonun ileri aşamasını yarıda keserler. Bir lipit (alkil) radikali (R.) oluşturmak için, doymamış yağdan alfa-metilenik hidrojen ayrıldığında otooksidasyon başlar.



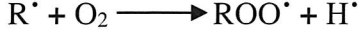
Oluşan lipit radikali çok reaktiftir, ilerleyen aşamalarda peroksit radikali (ROO.) oluşturmak için oksijenle reaksiyona girer.



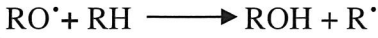
Reaksiyonun ilerleyen aşamalarında peroksi radikalleri lipitle reaksiyona girerek hidroperoksit ve yeni bir kararsız lipit radikali oluştururlar.



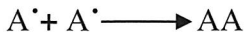
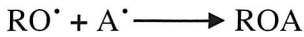
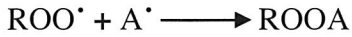
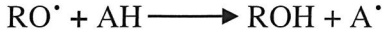
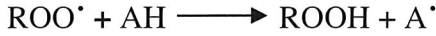
Daha sonra bu lipid radikali başka peroksi radikali oluşturmak üzere oksijen ile reaksiyona girecektir. Bu oksidatif mekanizma kendiliğinden katalizlenir ve böylece otooksidasyon devam eder.



Hidroperoksitler (ROOH) kararsızlardır ve bozunarak radikaller oluştururlar. Bu da reaksiyonun hızlanmasına neden olur.



Birincil antioksidanlar (AH) lipid radikali (R.) ve peroksi radikaller (ROO.) reaksiyona girerler ve onları daha kararlı, radikal olmayan ürünlere çevirirler. Birincil antioksidanlar lipid radikallerine hidrojen atomları verirler ve lipid türevleri ile antioksidan radikaller meydana getirirler (A.). hidrojen verici olarak birincil antioksidanlar peroksi radikallerine lipidlerden daha çok ilgi gösterirler. Bu yüzden otooksidasyon reaksiyonunda oluşan peroksi(ROO.) ve oks(RO.) serbest radikalleriyle doğrudan da etkileşebilirler.

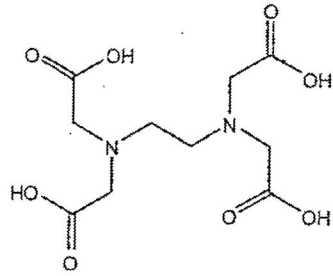


Hidrojenin verilmesiyle oluşan antioksidan radikali lipidlerle çok az reaksiyona girer. Oksijen veya lipidlerle antioksidan radikalinin reaksiyonu çok yavaş olduğundan reaksiyon hızı azalır. Kararlı rezonans hibritler oluşturmak için fenol halkasının çevresindeki ortaklanmamış elektronun delokalizasyonu ile antioksidan radikali kararlı hale getirilir. antioksidan radikaller peroksi, oks ve diğer antioksidan radikaller ile sonlandırma reaksiyonlarına katılabilme yeteneğine sahiptirler.

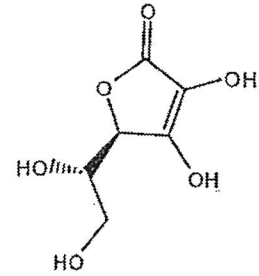
Katı ve sıvı yağlardan antioksidan dimerlerin oluşumu göze çarpar ve bu oluşum fenolik antioksidan radikallerin kolayca sonlandırma reaksiyonlarına uğradığını gösterir. Antioksidan, radikal olmayan şekilde ne kadar uzun süre kalırsa antioksidan dimerler otokatalitik serbest radikal zincir mekanizmasını o kadar etkili şekilde durdururlar.

Sekonder Antioksidanlar; Bazı durumlarda iki antioksidan birlikte kullanıldığında, yalnız olarak gösterdikleri etkiden daha çok etkili olurlar. Bazen de, tek başınayken antioksidan özelliği göstermeyen bileşen, ikili karışım içinde ikinci bileşiğin antioksidan etkisini artırır. Böyle antioksidan etkisi arttıran maddelere sinerjistler denir.

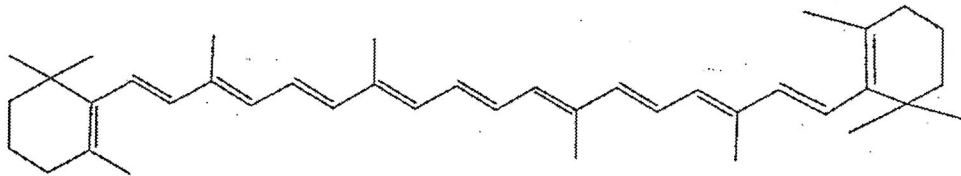
Antioksidan sinerjistleri olarak da bilenen bu grup antioksidanlar, oksidasyon hızını azaltan bileşikler olup etki mekanizmaları, metal iyonlarını bağlamak, hidroperoksitleri radikal olmayan bileşiklere parçalamak, UV ışınlarını absorblamak veya oksijen atomunu etkisiz hale getirmek şeklindedir. Antioksidanların sinerjist etkileri, ortamda bulunan diğer primer antioksidanlara bağlıdır. Ortamda primer antioksidanlar bulunmadığı durumlarda sinerjistlerin antioksidan aktiviteleri çok düşüktür veya antioksidan aktivite göstermezler. Askorbik asit, sitrik asit, etilen diamin tetraasetik asit, bir çok amino asitler, polifosfatlar ve tartarik asit gibi asidik bileşikler fenollü antioksidanların etkilerini arttırırlar



Etilendiamintetraasetikasit (EDTA)



Askorbik asit (C Vitamini)



β -Karoten (A Vitamini)

Şekil 2.11 : EDTA, C vitamini, A vitamini'nin kimyasal yapısı.

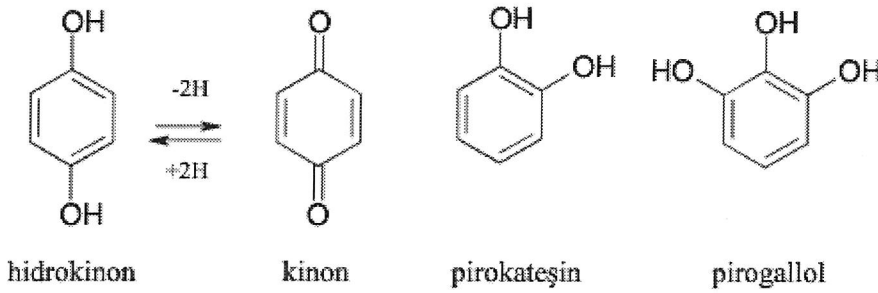
İkincil antioksidanlar en önemli etki mekanizmalarına göre 3 gruba ayrılabilir:

- Kelat yapıcılar: Sitrik asit, fosforik asit, etilendiamintetraasetik asit(EDTA), tartarik asit
- Oksijen gidericiler ve indirgeme ajanları: Askorbik asit, askorbii palmitat, eritorbik asit, sodyum eritorbal, sülfidler.
- Singlet oksijen gidericiler: Karotenoitler (β -karoten, likopen ve lutein)

2.4.3. Antioksidanların kimyasal bileşimlerine göre sınıflandırılması

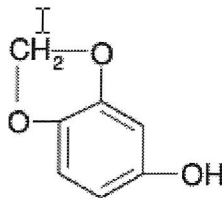
2.4.3.1 Fenolik yapıdaki antioksidanlar

Antioksidanların en önemlileri fenollü olanlar ve bunların dihidroksi türevleridir. Bunların temel örneği hidrokinon olup reversibi olarak kinon'a yükseltgenir.



Şekil 2.12 : Hidrokinon, kinon, pirogallol ve pirokateşin'in kimyasal yapısı.

Sadece orto ve para polifenoller antioksidan özelliğe sahiptir. Fenolün kendisi de antioksidan değilken yerdeğişimli benzenler, birden fazla benzen halkası içeren aromatik bileşikler veya heterosiklik bileşikler, yapıları orto ve para bileşiklerine benziyorlarsa antioksidan olabilirler. Örneğin, susam yağında bulunan sesamol (3,4 – metilendioksifenol) bir tek serbest hidroksi grubuna sahip olduğu halde, bu grup, oksijenlerden birine göre para konumunda olduğundan dolayı antioksidan etki göstermektedir.



Şekil 2.13 : Sesamol'un kimyasal yapısı.

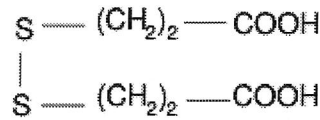
Sentetik antioksidanlardan bu gruba girenler galatlar, nordihidroguayaretik asit (NDGA), bütillenmiş hidroksianizol (BHA) ve bütillenmiş hidroksi tolue (BHT) dir.

2.4.3.2 Aromatik amino antioksidanlar

Bu gruptaki antioksidanlar fenollü antioksidanlara benzerler. Yalnız yapıdaki hidroksi grupları kısmen veya tamamen amino grupları ile yer değiştirmişlerdir. Para izobutil amino fenol bu gruba örnektir.

2.4.3.3 Organik sülfür bileşikleri

Güçlü antioksidanlar arasında kükürtlü organik bileşikler de yer almaktadır. β , β' -ditiyo propiyonik asit ve esterleri, özellikle dilauril ve distearil ditiyopropiyonatlar çok etkili antioksidanlar olup %0.01 oranında kullanılırlar.



Şekil 2.14 : β , β' -ditiyo propiyonik asit'in kimyasal yapısı

2.5 Toplam Antioksidan Tayin Yöntemleri

Antioksidanların kimyasal aktiviteleri, diğer bir deyişle hidrojen veya elektron donör olarak indirgeme potansiyelleri onların serbest radikal yutucu olarak göstermiş oldukları potansiyel ile ifade edilir. Bir antioksidanın aktivitesi şu esaslara bağlıdır:

- ✓ Radikal süpürme yeteneği
- ✓ Hidrojen veya elektron donör olarak göstermiş olduğu reaktivite (redüksiyon potansiyeline bağlı olan)
- ✓ Metal kelatlama potansiyeli
- ✓ Diğer antioksidanlarla olan iletişim şekli

Antioksidan aktivite tayininde kullanılan metodlar ise iki temel başlıkta incelenmektedir:

- 1) Elektron transferine dayanan yöntemler
- 2) Hidrojen atomu transferine dayanan yöntemler

1)Elektron transferine dayanan yöntemler : Oksidan maddenin indirgenmesi sonucu oluşan rengin değişiminin ölçülmesi ile antioksidan maddenin ölçümü yapılır. Renk değişiminin derecesi örnekteki antioksidan maddenin konsantrasyonuna bağlıdır.

Elektron transferine dayanan yöntemler :

- ✓ DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) Serbest radikal giderim yöntemi
- ✓ FRAP - ferric reducing antioxidant power - Demir iyonu indirgeme gücü metodu
- ✓ CUPRAC – Cupric reducing antioxidant capacity – yöntemi
- ✓ TEAC/ABTS – Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi

2)Hidrojen atomu transferine dayanan yöntemler : Antioksidan ve substrat arasında rekabete dayalı reaksiyonlar gerçekleşir. Genelde azotlu grup taşıyan maddelerin bozulup peroksil radikalleri oluşumu esasına dayanır.

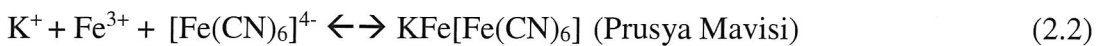
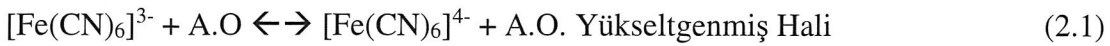
Hidrojen atomu transferine dayanan yöntemler :

- ✓ Düşük densiteli lipoprotein otooksidasyonunun neden olduğu inhibisyon
- ✓ ORAC - Oksijen radikali absorbans kapasitesi
- ✓ TRAP – Toplam radikal yakalama parametresi
- ✓ Luminol yöntemi
- ✓ Fikoeritrin esaslı yöntemler
- ✓ DCFH – DA (Diklorofloresin – diasetat) yöntemi
- ✓ Krosin yöntemi
- ✓ TOSC (Toplam oksiradikal) yöntemi

2.5.1 Ferrisiyanür yöntemi

Bu yöntemin temeli $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 'ün antioksidanlarla etkileşip $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 'e indirgenmesi, oluşan $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 'ün de Fe(III) ilavesiyle prusya mavisi oluşturmasına dayanmaktadır. Oluşan Prusya mavisi bir yük transfer kompleksidir.

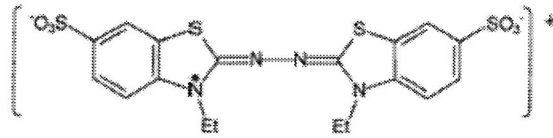
Bu yöntemin temelini oluşturan reaksiyonlar ise;



Diğer yöntemlerde olduğu gibi antioksidanların sentetik karışım çalışılarak troloks eşdeğer cinsinden karşılaştırma yapılır. Bu yöntemde Fe(III) çözeltisi ilave edildikten sonra oluşan rengin kararlılığı incelenir.

2.5.2 TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity; troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi) / ABTS yöntemi

Troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi olarak ifade edilen TEAC/ABTS yöntemi, ilk olarak Miller ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem; 2,2'- azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat) (ABTS) kromojen radikal katyonunun absorpsiyonunun, antioksidanlar tarafından inhibisyonunu temel alır. Antioksidanlar varlığında ABTS^{•+} radikal katyonunun (Şekil 2.15) absorpsiyonunda belirli bir süre içindeki azalmadan yararlanarak toplam antioksidan kapasitesi troloks cinsinden bulunur. Bu nedenle bu yöntem "troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi"(ABTS/TEAC) adı da verilir.



Şekil 2.15: ABTS^{•+} radikal katyonunun yapısı

660, 734 ve 820 nm'de maksimum veren ABTS^{•+} radikal katyonu metmiyoglobinin H₂O₂ ile aktivasyonu ile üretilen ferrilmiyoglobin radikal türlerinin ABTS ile etkileşiminden meydana gelmektedir.

Miller ve arkadaşları tarafından modifiye edilmiş ve geliştirilmiş TEAC yönteminde potasyum persülfatla ABTS'in oksidasyonu sonucu üretilen ABTS^{•+} radikal katyonları kullanılır. Üretilen bu ABTS radikalleri oda sıcaklığında karanlıkta beklediği zaman 2 gün kararlıdır. Gelistirilen bu yöntem, hem lipofilik hem de hidrofilik sistemlerde kullanılabilir.

2.5.3 DPPH yöntemi

Bu yöntem; antioksidanların kararlı bir organik azot radikali olan DPPH (1,1-difenil 2- pikrilhidrazil) radikalini süpürücü etkilerini ölçmeye dayalı bir yöntemdir. Bu radikal hidrojen donörlerle etkileştiğinde hidrazine indirgenir. Kırmızı renkli DPPH radikali 515 nm'de maksimum absorpsiyon verir. DPPH çözeltisine antioksidanın

ilave edilmesiyle absorbansta düşüş meydana gelir ve antioksidanların varlığıyla radikalin rengi kırmızıdan sarıya döner. Bu yöntem antioksidanların radikal süpürme kabiliyetlerini değerlendiren kolay ve geçerli bir yöntem olarak bilinmektedir.

2.5.4 FOLİN-CİOCALTEU yöntemi ile toplam fenolik bileşik tayini

Bu yöntem Singleton ve arkadaşları tarafından antioksidanların toplam fenolik içeriğini ölçmek için geliştirilmiştir. Yöntemde kullanılan CuSO_4 (bakır(II) sülfat) alkali ortamda protein veya antioksidanlarla kompleks yapar. Folin reaktifi (fosfomolibdik-fosfotungstik asit) eklendiğinde, folin reaktifi proteine bağlanır. Protein veya antioksidanla Cu(II) 'nin reaksiyonundan açığa çıkan Cu(I) olasılıkla molibdatotungstat reaktifini heteropoli mavisine indirger ve rengi sarıdan maviye dönüştür. Reaksiyon tamamlanınca 750 nm'de örnek absorbansları ölçülür.

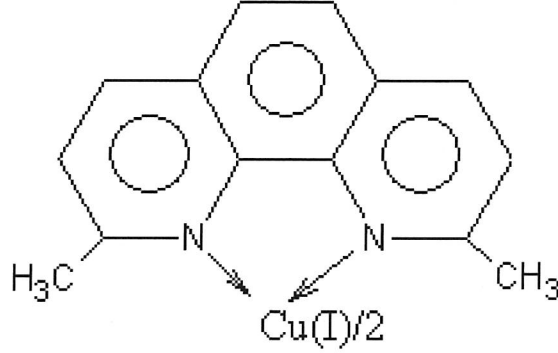
Bu denemede, ard arda geri dönüşümlü bir veya iki elektron indirgeme reaksiyonları, $\text{P(MoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}$ olması muhtemel mavi türlerin oluşumunu sağlar. Esasen, molibdenin kompleks içinde indirgenmesinin daha kolay olduğuna ve elektron-transfer reaksiyonunun indirgenler ve Mo(VI) arasında gerçekleştiğine inanılır.

Fenolik bileşikler FCR (Folin Ciocalteu reaktifi) ile sadece bazik ortamlarda reaksiyon verirler. (Sodyum karbonat çözeltisi ile pH 10'a ayarlanır). Fenolik protonun dissosiasyonu, reaktifi indirgeme yeteneği bu nedenle artan fenolat anyonunun oluşumunu sağlar.

2.5.5 CUPRAC (Cu(II) indirgeyici antioksidan kapasite) yöntemi

Cu(II) indirgeme kapasitesine dayalı toplam antioksidan kapasite ölçüm yöntemlerinden biride CUPRAC yöntemidir. Kromojenik bir redoks reaktifi olan bis(neokuproin)-bakır(II) klorürü kullanan CUPRAC yöntemi (CUPRAC: Bakır(II) indirgeyici antioksidan kapasite) ile hem hidrofilik hem de lipofilik toplam antioksidan miktarı kolaylıkla tayin edilebilmektedir. Bu yöntemde sırasıyla Cu(II) klorür çözeltisi, %96'lık etil alkolde hazırlanmış neokuproin çözeltisi, amonyum asetat tamponu (pH=7) ve analiz çözeltileri son çözelti hacmi 4,1 mL olacak şekilde ilave edilir. Oda sıcaklığında yarım saat süre sonunda 450 nm'de reaktif körüne karşı absorbans değerleri ölçülür. Tepkime sonunda 2 proton açığa çıkmakta ve Ar(OH)_n grubu antioksidan bileşikler kinon formlarına dönüşmektedir. Cu(II)-Nc ise 450 nm'de maksimum gösteren şiddetli renk oluşumuyla birlikte Cu(I)-Nc kelatına

dönüşmektedir. Bu reaksiyonda, n-OH grubu içeren antioksidan karakterli bileşikler, 2n-e donör olarak hareket etmektedir.

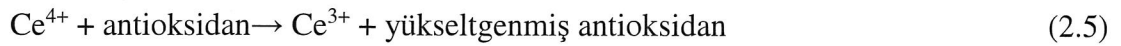


Şekil.2.16 : Cu(I)- neocuproin kelatının kimyasal yapısı

2.5.6 CERAC (seryum iyonunu indirgeme antioksidan kapasite) yöntemi

CERAC yönteminin temelini, Ce(IV) ile antioksidanlar arasındaki redoks reaksiyonu oluşturmaktadır. Sülfat asitli ortamda başlangıçtaki Ce(IV) un maksimum soğurma dalgaboyundaki (320 nm) absorpsiyon değeri, Ce(IV)'un antioksidanlar ile reaksiyonu sonucu azalmaktadır. Ce(IV)'un absorpsiyonundaki bu azalmadan yararlanarak dolaylı olarak toplam antioksidan miktarı hesaplanmıştır. CERAC yönteminde gıda maddelerine katkı maddesi olarak katılan sitrik asidin Ce(IV) ile reaksiyona girerek indirgendiği ve Ce(III) oluşumuna neden olarak interfere ettiği tespit edilmiştir. Bu amaçla Ce(IV)'ün, hidroliz kompleksleri Ce(OH)^{3+} ve Ce(OH)_2^{2+} ve sülfat kompleksleri $\text{Ce(SO}_4\text{)}^{2+}$ oluşturularak redoks potansiyeli düşürülerek modifiye CERAC yöntemi geliştirilmiştir.

$$E_{\text{Ce}} = E^{\circ}_{\text{Ce}} + 0.059 \text{ Log } ([\text{Ce}^{4+}] / [\text{Ce}^{3+}]) \quad (2.4)$$



2.6 Celtis Australis L. (Ulmaceae)

Aşağıda öncelikle çalışmamızın konusu olan *Celtis australis* L. ile ilgili bilgiler verilmiş sonra da *Celtis australis* L.'in antioksidan olarak seçilmesinin nedenleri belirtilmiştir.

2.6.1 Celtis australis L. (Çitlembik)' in genel özellikleri

Karaağaçgiller (Ulmaceae) familyası içerisinde bulunan *Celtis* bir cinsli bir evcikli, her yıl yaprağını döken ve genellikle orta boylu ağaçları içeren bir cinstir. (Yaltırık, 1998). Yöresel olarak dağın, dağdağın, dardahan, çitemik veya çitlik olarak da bilinen *Celtis*, tarım alanları içinde veya etrafında yem, yakacak odun ve farklı kullanım amaçlarıyla yetiştirilmekte ve yine meyvelerinin çok lezzetli, besleyici ve tanensiz olmasından dolayı özellikle kış döneminde çiftlik hayvanlarına yeşil yem olması bakımından kırsal alandaki insanların sosyoekonomik yapısında hayati bir önem taşımaktadır (Subba ve ark.,1996).

Ülkemizde doğal olarak yetişen dört çitlembik türünden birisi adi çitlembik (*Celtis australis* L.)'dir. Adi çitlembik güney Avrupa, kuzey Afrika, batı Asya ve ülkemizin güney, kuzey, ve kuzey batı bölgelerinde geniş bir yayılışa sahiptir. Adi çitlembiğin çekirdekli sulu meyvesi önce yeşil, sonra parlak portakal sarısı ve olgunlaştığında da koyu siyaha yakın bir renk alır. Nohut büyüklüğünde ve fistic tadında olan adi çitlembik meyvelerinin çapı ortalama 9-12 mm' dir (Kayacık, 1981; Davis, 1982; Anşın ve Özkan, 1993; Baytop, 1994; Yaltırık, 1998; Yaman, 2005; Yücel, 2005). *Celtis australis*, %14.9 protein, % 45.8 azotsuz organikler, % 4.1 eter özü, %20.2 ham lif, % 14.25 kalsiyum ve fosfor içermektedir (Samant, 1997).

Öte yandan adi çitlembik insanlara sağladığı ekonomik ve kolektif - kültürel yararlar açısından son derece önemlidir. Bu bağlamda, adi çitlembiğin odunu dayanıklı ve elastiki olmasından kasnak, yayık sopası, kaşık, baston, kürek, tarım aletleri gibi çeşitli malzemelerin ve binaların yapımı ile oymacılıkta, yine bu türün kerestesi kağıt yapımında kullanılmaktadır. Bunların yanında adi çitlembik diğer türlere kıyasla kuraklığa ve parazitlere karşı daha dayanıklıdır. Kazık köke sahip olduğundan kurakçıl yerlerin ağaçlandırılmasında kullanılabilir, yaprakları mızrak şeklinde ve gri yeşil renkte, taçlarının zarif, dekoratif ve gölge sağlar nitelikte olmasından, özellikle kent alanlarının park ve bahçelerinde süs bitkisi olarak kullanılmaktadır. (Kayacık

,1981; Anşin ve Özkan, 1993; Demir ve ark.,2002; Doygun ve Ok,2006; Singh ve ark.,2006; Gültekin, 2007). Ayrıca aynı yazarlar türlerin iyi bir yakacak odun olduğunu işaret etmektedirler.

Türlerin bütün bu yararlarına ek olarak, tıp alanında değişik sağlık sorunlarını gidermesinde meyve, yaprak, tohum ve sakızlarının kullanılması ve son yıllarda güzel kokulara artan ilgi nedeniyle kozmetikte yararlanılması insanlar için önem arz eden başka yararlarıdır (Chevallier, 1996; Mir - Babayev ve Waigh, 1997; Hernandez Bermejo ve Garcia Sanchez, 1998; Tardio ve ark., 2006).

2.7 Prunus Laurocerasus L.

Aşağıda öncelikle çalışmamızın konusu olan *Prunus Laurocerasus* L. ile ilgili bilgiler verilmiş sonra da *Prunus Laurocerasus* L.'in antioksidan olarak seçilmesinin nedenleri belirtilmiştir

2.7.1 Prunus Laurocerasus L. (Karayemiş)' in genel özellikleri

Bitkiye ülkemizde değişik yöresel adlar verilir. Bunlar arasında en yaygın olarak kullanılan "Taflan"dır. *Laurocerasus officinalis*'e "taflan" dışında, özellikle Ordu'nun doğusunda "gürcü kirazı", "karayemiş", "laz kirazı", "laz üzümü", "laz yemişi", Giresun'da "tanal", Artvin'de "tçkoo" gibi yöresel adlar verilir. (Alpınar ve Yazıcıoğlu, 1991).

Karayemiş ilk olarak 1546 yılında Fransız Pierre Belon tarafından Trabzon'dan toplanmış ve *Cerasus trapezontina* (Trabzon Kirazı) olarak adlandırılmıştır. Bitki aynı yıl, İstanbul üzerinden İtalya'ya; 1574 'te de Clusius tarafından Viyana'ya getirilmiş, oradan da Fransa ve İngiltere'ye gönderilmiştir. Budanarak şekil verilebilmesi, dökülmeyen parlak koyu yeşil yaprakları ve kokulu beyaz çiçekleri ile karayemiş, 1600 yılından itibaren tüm Avrupa'da park ve bahçelerde yetiştirilmeye başlanmıştır. Günümüzde büyüme biçimi, yaprak boyut ve şekli, kışa dayanıklılık açısından farklı 20 kadar karayemiş kültürvarı vardır (Alpınar ve Yazıcıoğlu, 1991).

Yapraklı ağaç ormanlarının, bilhassa Kayın meşcerelerinin altında yer alır. Ormancılık bakımından zararlı bir alt flora fakat parkçılıkta makbul bir süs bitkisidir (Kayacık, 1961).

Karayemiş (*Prunus Laurocerasus* L.) bitkisinin anavatanı Karadeniz'in doğu kıyıları, Balkanlar (Eski Yugoslavya, Bulgaristan), Batı Kafkasya ve Kuzey İran gösterilmektedir. Tür hem doğal hem de kültür bitkisi olarak Karadeniz dağlarının kuzeye bakan ve deniz seviyesinden 20-1700m'ye kadar olan yüksekliklerinde yetişmektedir. Ülkemizde doğal olarak İstanbul, İzmit, Zonguldak, Sinop, Kastamonu, Giresun, Trabzon, Rize ve Hatay'da yetişmektedir. Şuana kadar ülkemizde yapılan morfolojik ve sitolojik karakterizasyon çalışmalarında *Prunus Laurocerasus* 'un üç kültürvar ve bir de yaban formunun varlığı tespit edilmiştir.

Altı metreye kadar boylanan çalı veya küçük ağaç şeklinde bitkilerdir. Yapraklar dikdörtgensel - elips, dikdörtgensel - yumurta, 20x8 ebatlarında, kenarları dişli veya düz, yaprakların üstü koyu yeşil, altı ise soluk yeşildir. Yaprak sapı 15 mm'ye kadar uzunlukta, çiçek durumu başaktır. Genellikle yaprakları daha kısa olan çiçekler beyaz, çiçek sapları 8 mm'ye kadar uzunlukta, çiçek tablası loblara kadar genişleyen çan şeklinde olup petaller 4mm'dir. Çekirdekli sulu meyvalar zeytin büyüklüğünde olup oval şekillerde ve 8 mm çapındadır (kültür formlarında 12 mm çapa kadar erişebilir). Meyvalar koyu mavi veya siyah renktedir (Sandallı, 2002).

Meyve verimi 5-10 yıllık bitkilerde başlar ve yılda birkez meyve verimi gerçekleşir. Yaprakları çiçek açma döneminde yani Nisan - Mayıs aylarında genç, fakat tamamen gelişmiş yapraklar elle toplanır. Yaşlı ve kışın toplanan yaprakların etken maddece fakir olduğu yapılan araştırmalar sonucunda anlaşılmıştır (OGM, 1991).

Ülkemizde dağılım gösteren kültürvarların meyvelerinde 23 farklı karboksilik asidin varlığı ve temel karbonhidratlardan hepsinin bol miktarda varlığı tespit edilmiştir. Karboksilik asitlerden bazıları bazı kültürvarlarda mevcut olup diğerleinde olmazken; hidroksisüksinik asid, benzoik asit bütün kültürvarlarda temel bileşen olarak tespit edilmiştir. Karbonhidratlardan ise fruktoz, glukoz ve alkol şekerlerinden sorbitol tüm kültürvar meyvelerde bol miktarda bulunmakta iken kültürvar meyveleri az miktarda sukroz içermektedir (Sandallı, 2002).

Yapraklarında ise zehirli bir glikozit olan syagenetik glikozitler sınıfındaki Syandrikasit bulunmaktadır. İnsanlarda görülen zehirlenmeler genellikle tohumlarında syagenetik glikozitler bulunan bitkilerin tohumlarının yenmesi sonucu meydana gelir. Bu asitler insan vücudu içine birkaç dakika- birkaç saat içinde yayılarak ölümler meydana getirdiği için syagenetik glikozit türlerinden Syagenetikasid içeren yaprakların bilinçsiz bir şekilde kullanılmaması gerekir

(Sandallı, 2002). Karayemiş yapraklarının su buharı destilasyonu sonucunda tanen, şeker, yağ, emülsin isimli bir ferment (bu ferment glikozite tesir ederse onu benzaldehit, siyanhidrin ve glikoza parçalar) ve pralavrosin isimli bir glikoza ihtiva eder. Bu glikozit renksiz, kokusuz ve acı lezzetlidir. Yapraklarda bulunan siyanhidrik asit miktarı 100g yaprakta 120-180 mg arasında değişmektedir (OGM, 1991).

Yapraklarının destile edilmesi ile eczacılıkta kullanılan aqua laurocerasi veya laurocerasin elde edilir (Kayacık, 1961).

Taze yapraklardan su buharı destilasyonu ile elde edilen ve 0,1 oranında siyandhidrik asit ihtiva eden su (günde 2-10 g arası) birçok sinir hastalıklarının tedavisinde kullanılan preperatların yapımında kullanılır. Ayrıca bazı gıda maddelerine ve bazı galernik preperatlara koku vermede de kullanılır (OGM, 1991).

Doğu Karadeniz bölgesinde meyveleri yenir ve pazarlarda satılır. Ayrıca meyvelerinden likör yapılır (Anşin ve Özkan, 1993). Halk arasında Karayemiş meyveleri meyve olarak yenmekte olup, yaprakları çay gibi demlenerek sinir bozukluklarına karşı, öksürük dindirici ve spazm kesici olarak kullanılmaktadır (OGM, 1991).

Karayemiş meyvelerinin sindirimi kolaydır ve taze olarak kurutulduktan veya kavrulduktan sonra yenir. İnsanı tok tutar. Tek başına veya fındık ve cevizle birlikte çerez olarak yenen karayemiş meyveleri, pasta, kek ve özellikle hoşaf ve kompostolara koku ve tad kazandırmak için ilave edilir. Reçel ve turşuda hazırlanmaktadır. Meyveler genellikle yetiştiriciler tarafından tüketilirse de bazen semt pazarlarında veya yakın şehirlerde manavlarda satılır (Alpınar ve Yazıcıoğlu, 1991).

Yaprakları Folia lauracersi recens TK adı altında taze olarak kullanılır. Yapraklarında Prurasin adlı siyogenetik bir glikozit vardır. Bu glikozit hidroliz ile siyanhidrikasit verir, bu asit zehirlidir. Kısılmış taze yapraklar su buharı ile destile edilirse Aqua Laurocerasi TK (taflan suyu) elde edilir. Bu su % 1 oranında sulandırıldıktan sonra yatıştırıcı, öksürük dindirici ve koku dindirici olarak kullanılır (Baytop, 1991).

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Kullanılan Cihazlar

UV- VIS ölçümleri için Varian Cary 100 spektrofotometresi, Manyetik Karıştırıcı II Camag RH, Edmund Bühler 7400 Tübingen KL2 Çalkalayıcı, Eppendorf marka 100-1000 µL mikro pipet, Magic Bullet Blender, Knick Ph-Meter 766 Calimatic marka pH-metre kullanıldı.

3.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Merck marka Seryum (IV) sülfat tetrahidrat [$\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$], Merck marka sülfürik asit, Merck marka metil alkol, Merck marka hidroklorik asit, Merck marka potastum ferrisiyanür [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$], SDS, Merck marka etil alkol, Merck marka bakır(II)klorür, Merck marka sodyum sülfat, Aldrich marka bakırsülfat, troloks, neokuproin, Merck marka amonyum asetat analitik saflıktaki kimyasallar kullanıldı.

3.3 Kullanılan Ana Çözeltilerin Hazırlanması

$2.0 \times 10^{-3} \text{ M}$ seryum(IV) sülfat; 0,08086 g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ tartılıp üzerine bir miktar saf su eklendikten sonra 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Daha sonra üzerine 16 mL %98'lik H_2SO_4 eklendi ve 100 mL'ye saf su ile tamamlandı. 1 M Na_2SO_4 (sodyum sülfat); 35,5 g Na_2SO_4 tartılıp saf suda çözülüp, 250 mL balon jojeye aktarıldı ve saf su ile 250 mL tamamlandı. $1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$ Troloks; 0,0062 g troloks ($\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$) tartılıp 25 mL'lik balon jojeye etanol ile tamamlandı. $1.0 \times 10^{-2} \text{ M}$ $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,4262 g CuCl_2 tartılıp suda çözülüp, 250 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve saf su ile 250 mL'ye tamamlandı. $7,5 \times 10^{-3} \text{ M}$ Neokuproin; 0,078 g Nc tartılıp bir miktar etanol ile çözüldükten sonra 50 mL'lik balon jojeye aktarılıp etanol ile 50 mL'ye tamamlandı. 1 M CH_3CONH_4 ; 19,27 g CH_3CONH_4 tartılıp bir miktar su ile çözülüp 250 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve 250 mL'ye saf su ile tamamlandı.

%2 'lik Na_2CO_3 ; 2 g Na_2CO_3 tartıp 100 mL'ye 0,1 M NaOH çözeltisi ile tamamlandı. %1'lik $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$; 1 g $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ tartılıp 100 mL'ye saf su ile

tamamlandı. %0,5 'lik CuSO_4 ; 0,125 g CuSO_4 alınıp 25 mL balonjojeye Natartarat (%1) ile tamamlandı. *Folin reaktifi*; Folin reaktifi 1:3 oranında saf su ile 25 mL balon joje de seyreltilip kullanıldı. 0,1 M NaOH ; 1 g NaOH alınıp 250 mL'lik balonjojede saf su ile tamamlandı. %0,2 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ alınıp üzerine 1 mL 1M HCl ile beraber 50 mL saf su ile tamamlandı. %1 *SDS (sodyum dodesil sülfat)*; 0,5 g alınıp 50 mL'ye saf su ile tamamlandı. %1 'lik $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$; 0,5 g $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ alınıp 1 mL 1 M HCl ile 50 mL'ye saf suyla tamamlandı.

3.4 Çitlembik Ekstraktlarının ve İnfüzyonlarının Hazırlanması

Çitlembik bitkisi çekirdeklerinden ayrılıp çekirdek ve meyve olarak iki kısma ayrıldı. Çitlembik meyvesi 3 gün oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Örnekler porselen havanda toz haline gelinceye kadar öğütüldü ve her ekstraksiyon öncesinde çitlembik numuneleri bu şekilde taze hazırlandı. Bu işlem çitlembik örneklerine çitlembik meyvelerinin olgunlaşmasının her aşamasında (yeşil, sarı ve siyah haldeyken) aynı şekilde uygulandı.

Öğütülmüş çitlembik örneklerinin metanol, etanol ve aseton ekstraksiyonları ile sulu infüzyonları hazırlandı. Tüm ekstraktlar hazırlanırken, çitlembik örnekleri ağzı kapaklı şilifli erlenler içerisinde çalkalayıcıda ekstrakte edildi. İlk aşamada 1 g çitlembik örneği tartılarak 20 mL metanol ile 60 dk, ikinci aşamada 20 mL metanol ile 45 dk ve üçüncü aşamada ise 10 mL metanol ile 15 dk çalkalayıcıda 350 rpm hızla karıştırıldı. Her üç aşama sonrasında ekstraktlar süzüldü ve süzüntüler birleştirilerek metanol ile 50 mL ye tamamlandı. Bu işlem %100, %80, %70, %50, %40 ve %25 (v/v)' lık metanol ; %100 ve %80 (v/v)' lık etanol ; %100' lük aseton ile ayrı ayrı gerçekleştirildi.

Çitlembik meyvesi ile çekirdeği arasındaki antioksidan kapasite farkını belirlemek amacıyla yapılacak olan testler için ekstraktlar şu şekilde hazırlandı; çitlembik meyvesi ve çekirdeği birbirinden ayrıldı. Çitlembik çekirdekleri ve meyvesi ayrı ayrı yaş halde havanda ufak parçalara ayrıldı. İlk aşamada ayrı ayrı 1 g çitlembik meyvesi ve çitlembik çekirdek örneği tartılarak 20 mL %80'lik metanol ile 60 dk, ikinci aşamada 20 mL % 80' lik metanol ile 45 dk ve üçüncü aşamada ise 10 mL %80'lik metanol ile 15 dk çalkalayıcıda 350 rpm hızla karıştırıldı. Her üç aşama sonrasında ekstraktlar süzüldü ve süzüntüler birleştirilerek %80' lik metanol ile 50 mL'ye tamamlandı.

İnfüzyon çözeltisi hazırlanırken, çitlembik örneğinden 1 g tartılıp bir erlene aktarıldı, üzerine kaynamış 50 mL saf su ilave edilerek 5 dk bekletildi. Erleninde demlenen çözelti whatman siyah bantlı süzgeç kağıdıyla 50 mL' lik balon jojeye süzüldü ve 50 mL'ye saf su ile tamamlandı. Hazırlanan infüzyon her gün taze hazırlandı.

3.5 Karayemiş Ekstraktlarının Hazırlanması

Karayemiş bitkisi çekirdeklerinden ayrılıp çekirdek ve meyve olarak iki kısma ayrıldı.

Karayemiş meyvesi ve karayemiş çekirdeği arasındaki antioksidan kapasite farkını belirlemek amacıyla yapılacak olan testler için ekstraktlar şu şekilde hazırlandı; Karayemiş çekirdek örnekleri havanda dövülerek ufak parçacıklar haline getirildi, karayemiş meyvesi blender ile homojenize edildi. Karayemiş çekirdek ve karayemiş meyve örnekleri ağzı kapaklı şilifli erlenler içerisinde çalkalayıcıda ekstrakte edildi. İlk aşamada 0,5 g karayemiş çekirdek ve 2 g karayemiş meyve örneği tartılarak ayrı ayrı 20 mL %80'lik metanol ile 60 dk, ikinci aşamada 20 mL %80'lik metanol ile 45 dk ve üçüncü aşamada ise 10 mL %80'lik metanol ile 15 dk çalkalayıcıda 350 rpm hızla karıştırıldı. Her üç aşama sonrasında ekstraktlar süzüldü ve süzüntüler birleştirilerek %80'lik metanol ile karayemiş çekirdek ekstraktı 50 mL' ye karayemiş meyvesi ekstraktı 100 mL'ye tamamlandı.

Farklı kurutma yöntemlerinin ekstraksiyon verimi üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla yapılacak olan testler için ekstraktlar şu şekilde hazırlandı; Trabzon'dan toplanan karayemişler çekirdeklerinden ayrılıp meyvesi blender ile homojenize edildi ve her biri 2 g örnek içermek üzere 3 ayrı seri oluşturuldu. 3 numune liyofilizasyon işlemi için liyofilizere konuldu. 3 numune üzerine yaşken çözücü eklendi ve ekstrakte edildi, 3 numune gün ışığında kurutulmak üzere saat camı üzerine yayıldı (kurutma işlemi oda şartlarında 3 gün sürdü.) Her bir karayemiş meyve örneği ayrı ayrı ilk aşamada 20 mL %80'lik metanol ile 60 dk, ikinci aşamada 20 mL %80'lik metanol ile 45 dk ve üçüncü aşamada ise 10 mL %80'lik metanol ile 15 dk çalkalayıcıda 350 rpm hızla karıştırıldı. Her üç aşama sonrasında ekstraktlar süzüldü ve süzüntüler birleştirilerek %80'lik metanol ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu işlem, %80' lik etanol ve %70 (v/v)' lık aseton ile ayrı ayrı gerçekleştirildi.

Farklı ekstraksiyon yöntemlerinin verimlerinin belirlenmesi amacıyla yapılacak olan testler için ekstraktlar şu şekilde hazırlandı; Trabzondan toplanan karayemişler çekirdeğinden ayrıldı, karayemiş meyvesi blender ile homojenize edildi, 5 g alındı ve

25 mL %80'lik metanol ekenerek bir gece boyunca ağzı kapaklı şilifli erlen içerisinde bekletildi. 16 saat beklemiş olan karayemiş ekstraktı 10 dk. vortekslenerek siyah bant süzgeç kağıdından süzüldü. Bu işlem 3 kez 25 mL %80 (v/v)'lik metanol ile tekrarlandı. Son hacim çözücüsüyle 100 mL'ye tamamlandı.

Farklı çözücülerin ve bu çözücülerin farklı oranlarının ekstraksiyon verimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılacak olan testler için ekstraktlar şu şekilde hazırlandı; karayemiş meyvesi ve çekirdeği birbirinden ayrıldı. Karayemiş meyvesi blender ile homojenize edildi. Karayemiş meyve örnekleri ağzı kapaklı şilifli erlenler içerisinde çalkalayıcıda ekstrakte edildi. İlk aşamada 5 g karayemiş örneği tartılarak 40 mL %80'lik metanol ile 60 dk, ikinci aşamada 40 mL %80'lik metanol ile 45 dk ve üçüncü aşamada ise 20 mL %80'lik metanol ile 15 dk çalkalayıcıda 350 rpm hızla karıştırıldı. Her üç aşama sonrasında ekstraktlar süzüldü ve süzüntüler birleştirilerek %80'lik metanol ile 100 mL ye tamamlandı. Bu işlem %100, %80, %70, %50 ve %40 (v/v)'lik metanol; %70 (v/v)'lik aseton ve % 80 (v/v)'lik etanol ile ayrı ayrı gerçekleştirildi. Ayrıca İTÜ Ayazağa Kampüsünden toplanan karayemişler içinde aynı işlem %100, %80, %70, %50 ve %40 (v/v)'lik metanol ile uygulandı.

3.6 Uygulanan Toplam Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri

Bölüm 3.4 ve 3.5' te anlatıldığı şekilde hazırlanan Çitlembik ekstraktları ve infüzyonları ile Karayemiş ekstraktlarına CERAC, CUPRAC, Ferrisiyanür ve Folin Ciocalteu yöntemleri uygulanarak antioksidan kapasiteleri belirlendi.

3.6.1 CERAC (seryum indirgeme antioksidan kapasite) yöntemi

1×10^{-3} M troloks çözeltisinden değişik miktarlarda alınıp 1mL 2×10^{-3} M Ce(IV) çözeltisi, 7 mL 1 M Na_2SO_4 çözeltisi ve toplam hacim 10 mL olacak şekilde saf su ve numune ekstraktları ilave edilip reaksiyonun gerçekleşmesi için 30 dakika beklendi. Ce(IV)'ün maksimum absorbands yaptığı 320 nm dalga boyunda absorbands ölçümleri alındı. Ölçümler 3 kez tekrarlandı.

Ce(IV)'ün başlangıçtaki absorbandsı, numune ekstraktları ile etkileşimi sonrasında azaldığından dolayı Ce(IV)'ün başlangıç ve reaksiyon sonrası ölçülen absorbandsları arasındaki fark, numunedeki toplam antioksidan miktarının bir ölçüsüdür. Numune örneklerinin toplam antioksidan kapasitesinin (TAC) hesaplanmasında kullanılan denklem aşağıda belirtilmiştir.

$$\text{TAC (mmol Troloks/g): } [(A_0 - A_1) / \epsilon_{\text{Troloks}}] \times V_s / V_0 \times \text{SF} \times V_E / m \quad (3.1)$$

A_0 : Ce(IV)'ün başlangıçtaki absorpsiyonu ($\lambda = 320 \text{ nm}$)

A_1 : Ce(IV)'ün çeti ilave edildikten sonra ölçülen absorpsiyonu ($\lambda = 320 \text{ nm}$)

$\epsilon_{\text{Troloks}}$: Troloksun molar absorpsiyon katsayısı ($\text{mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$)

V_s : Absorpsiyonun ölçüldüğü son hacim (mL)

V_0 : Örnek hacmi (mL)

SF: Seyreltme faktörü

V_E : Ekstraksiyon hacmi (mL)

m: Örnek ağırlığı (g)

3.6.2 CUPRAC (Cu(II) iyonu indirgeme antioksidan kapasite) yöntemi

Seyreltilmiş çitlembik ekstraktlarından değişik miktarlarda alınıp $1,0 \times 10^{-2} \text{ M}$ CuCl_2 , 1 mL $7,5 \times 10^{-3} \text{ M}$ neokuproin ve 1 mL NH_4Ac eklendi ve toplam hacim 4,1 mL olacak şekilde saf su ilave edilip reaksiyonun gerçekleşmesi için 30 dakika beklendi. Cu(I) neokuproin kelatinin maksimum absorpsiyon yaptığı 450 nm dalga boyunda absorpsiyon ölçümleri alındı. Ölçümler 3 kez tekrarlandı.

CUPRAC yönteminde, örnek çözeltisinin toplam antioksidan kapasite hesabı için aşağıdaki denklem kullanıldı.

$$\text{TAC (mmol troloks/g)}: [A/\epsilon_{\text{Troloks}}] \times V_s/V_0 \times \text{SF} \times V_E/m \quad (3.2)$$

A: Cu(II)- neokuproin çözeltisine örnek ilave edildikten sonra ölçülen absorpsiyon ($\lambda = 450 \text{ nm}$)

$\epsilon_{\text{Troloks}}$: Troloksun molar absorpsiyon katsayısı ($\text{mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$)

V_s : Absorpsiyonun ölçüldüğü son hacim (mL)

V_0 : Örnek hacmi (mL)

SF: Seyreltme faktörü

V_E : Ekstraksiyon hacmi (mL)

m: Örnek ağırlığı (g)

3.6.3 Ferrisiyanür yöntemi

x mL antioksidan + (1-x) mL mutlak EtOH + 6,3 mL H_2O + 0,2 mL 1 M HCl + 1,5 mL 1% (w/v) $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ + 0,5 mL 1% (w/v) SDS + 0,5 mL 0,2 % (w/v) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; toplam hacim = 10 mL, oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra 750 nm de (A_{750}) köre karşı absorpsiyonları ölçüldü. Oluşan prusya mavisi kompleksinin 30 dakika sonunda 750 nm dalga boyunda absorpsiyon ölçümleri yapıldı. Ölçümler 3 kez tekrarlandı.

$$\text{TAC (mmol Troloks/g): } [A/\epsilon_{\text{Troloks}}] \times V_s/V_0 \times \text{SF} \times V_E/m \quad (3.3)$$

A: Örnek ilave edildikten sonra ölçülen absorbans ($\lambda = 450 \text{ nm}$)

$\epsilon_{\text{Troloks}}$: Troloksun molar absoprsiyon katsayısı ($\text{mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$)

V_s : Absorbansın ölçüldüğü son hacim (mL)

V_0 : Örnek hacmi (mL)

SF: Seyreltme faktörü

V_E : Ektraksiyon hacmi (mL)

m: Örnek ağırlığı (g)

3.6.4 Folin yöntemi

Lowry A çözeltisi; 2,0 g Na_2CO_3 'nin 100 mL 0,1 M NaOH çözeltisi içinde çözünmesi ile hazırlanır. Lowry A çözeltisi; 0,025 g CuSO_4 'ün 5 mL % 1'lik $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ çözeltisi içinde çözünmesi ile hazırlandı. Hazırlanan 100 mL Lowry A çözeltisinin üzerine 2 mL Lowry B çözeltisi ilave edilerek Lowry C çözeltisi hazırlanmış olur.

x mL AO + (2-x) mL su + 2,5 mL Lowry C; karışım 10 dakika bekletildi. Üzerine 0,25 mL Folin reaktifi ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi; $V_T = 4,75 \text{ mL}$. Folin reaktifi, Folin çözeltisinin 1: 3 (v/v) oranında su ile seyreltilmesiyle hazırlandı.

$$\text{TAC (mmol Troloks/g): } [A/\epsilon_{\text{Troloks}}] \times V_s/V_0 \times \text{SF} \times V_E/m \quad (3.4)$$

A: Örnek ilave edildikten sonra ölçülen absorbans ($\lambda = 450 \text{ nm}$)

$\epsilon_{\text{Troloks}}$: Troloksun molar absoprsiyon katsayısı ($\text{mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$)

V_s : Absorbansın ölçüldüğü son hacim (mL)

V_0 : Örnek hacmi (mL)

SF: Seyreltme faktörü

V_E : Ektraksiyon hacmi (mL)

m: Örnek ağırlığı (g)

3.7 İstatistiksel Analiz

Deneysel analiz sonuçlarının ortalamaları ve ortalamaların standart sapmaları Microsoft Ofise 2010 Excel programı ile hesaplanmıştır. Sonuçlar, “ortalama değer $\pm$ standart sapma” şeklinde verilmiştir. Korelasyon katsayıları (r) (0.00-0.25 Çok zayıf

ilişki; 0.26-0.49 Zayıf ilişki; 0.50-0.69 Orta ilişki; 0.70-0.89 Yüksek ilişki; 0.90-1.0 Çok yüksek ilişki) programları kullanılarak (Microsoft Excel 2010 Ofis) hesaplandı

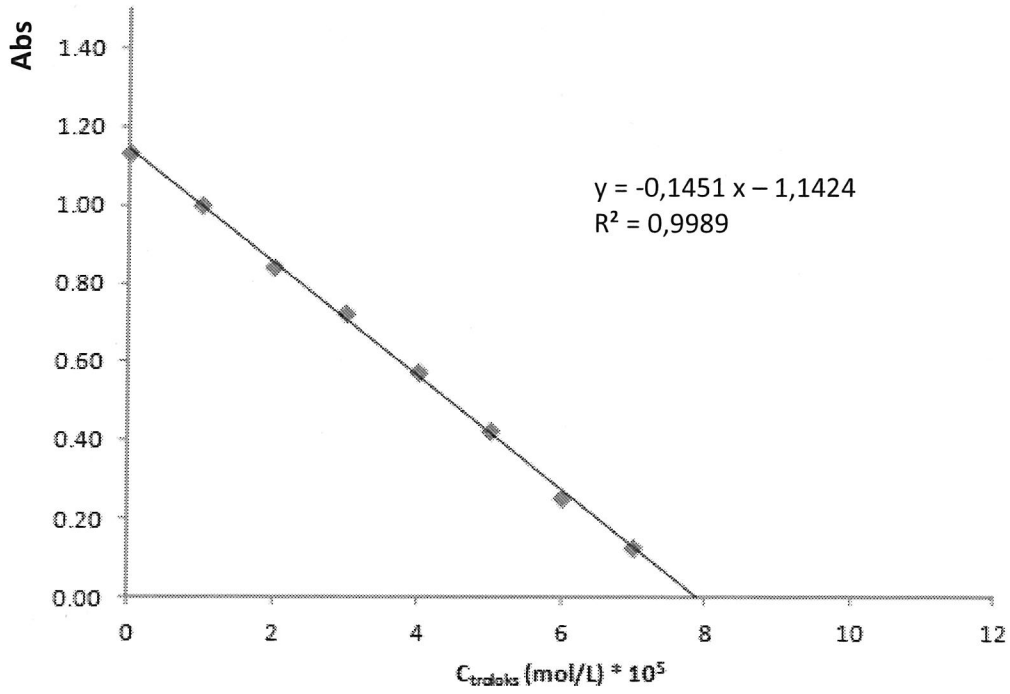
4.ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Kalibrasyon Grafiklerin Çizimi

Ölçülen absorbans değerleriyle troloks derişimleri arasında kalibrasyon grafikleri çizildi. Bu grafikler CERAC, CUPRAC, FERRİSİYANÜR ve FOLİN-Ciocalteu yöntemleri için ayrı ayrı çizildi.

4.1.1 CERAC yöntemi

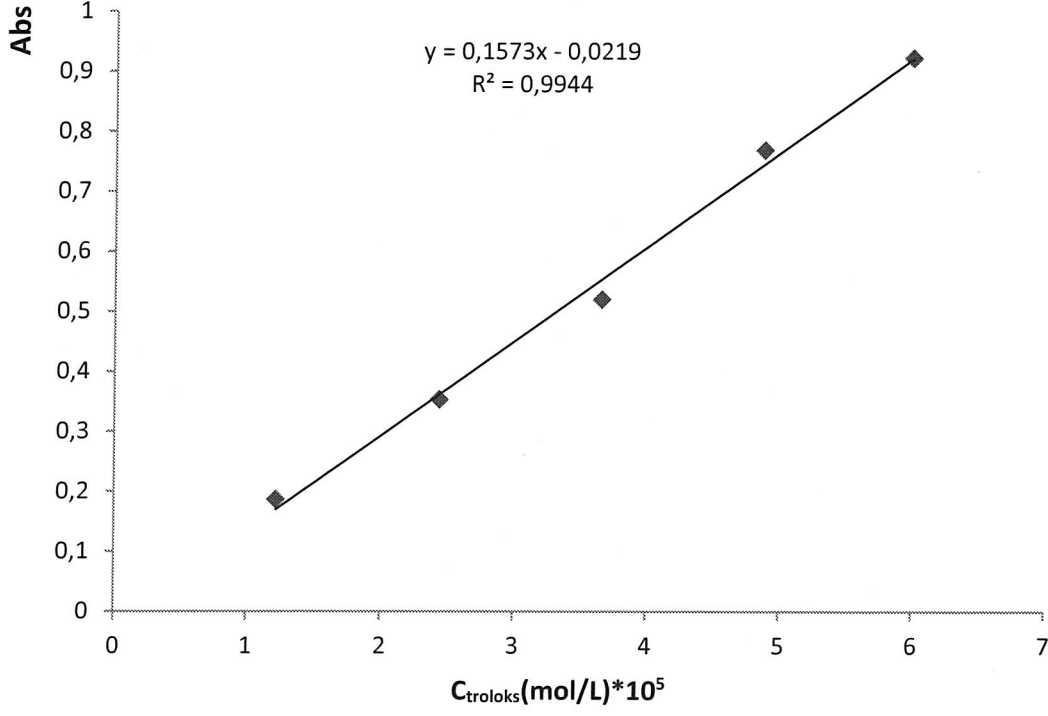
CERAC yönteminde troloksun kalibrasyon grafiğı şekil 4.1' de görölmektedir. Troloks dan $1 \times 10^{-5} - 8 \times 10^{-5} \text{ M}$ arasında değışen derişimlerden alındı.



Şekil 4.1: Troloks' un CERAC yönteminden elde edilen kalibrasyon grafiğı.

4.1.2. CUPRAC Yöntemi

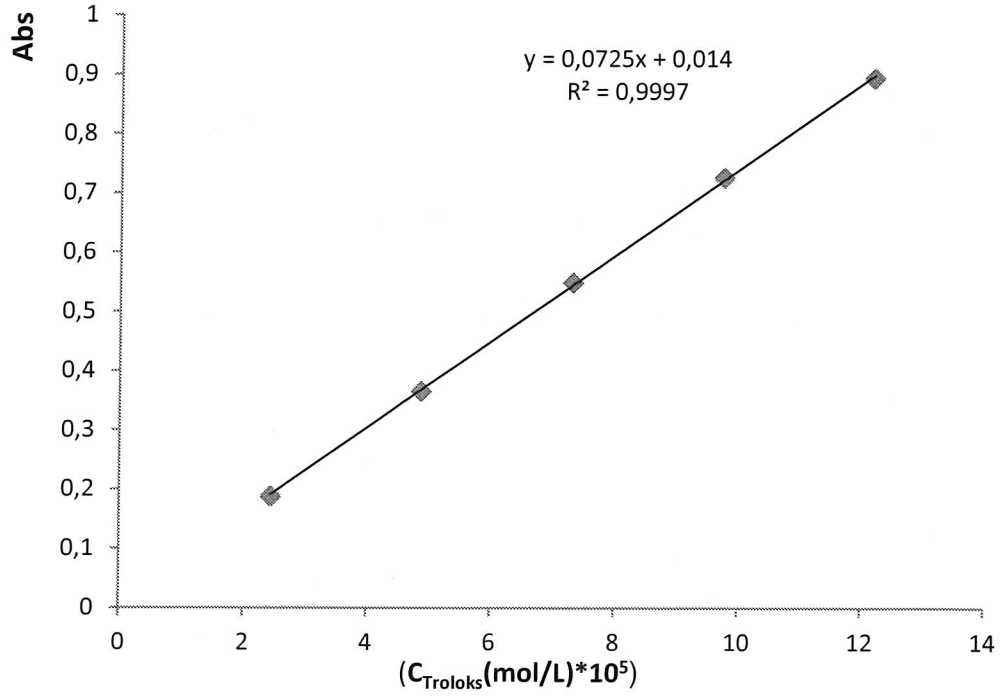
CUPRAC yönteminde troloksun kalibrasyon grafiği şekil 4.2’ de görülmektedir. Troloks dan $1,22 \times 10^{-5} - 6,00 \times 10^{-5}$ M arasında değişen derişimlerden alındı.



Şekil 4.2: Troloks’ un CUPRAC yönteminden elde edilen kalibrasyon grafiği.

4.1.3 Ferrisiyanür yöntemi

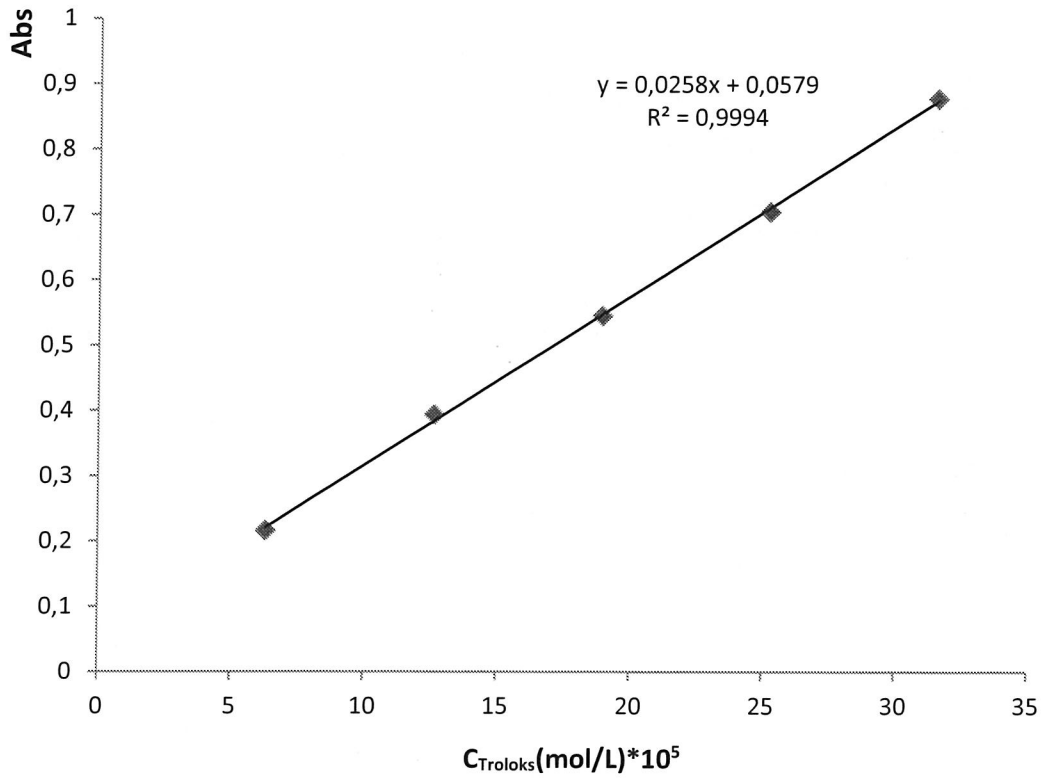
Ferrisiyanür yönteminde troloksun kalibrasyon grafiği şekil 4.3' de gör÷lmektedir. Troloks dan $2,44 \times 10^{-5}$ – $12,2 \times 10^{-5}$ M arasında değişen derişimlerden alındı.



şekil 4.3: Troloks'un Ferrisiyanür yönteminden elde edilen kalibrasyon grafiği.

4.1.4 Folin-ciocalteu yöntemi

Folin-ciocalteu yönteminde troloksun kalibrasyon grafiği şekil 4.4 de görülmektedir. Troloks dan $6,3 \times 10^{-5} - 2,95 \times 10^{-4}$ M arasında değişen derişimlerden alındı.



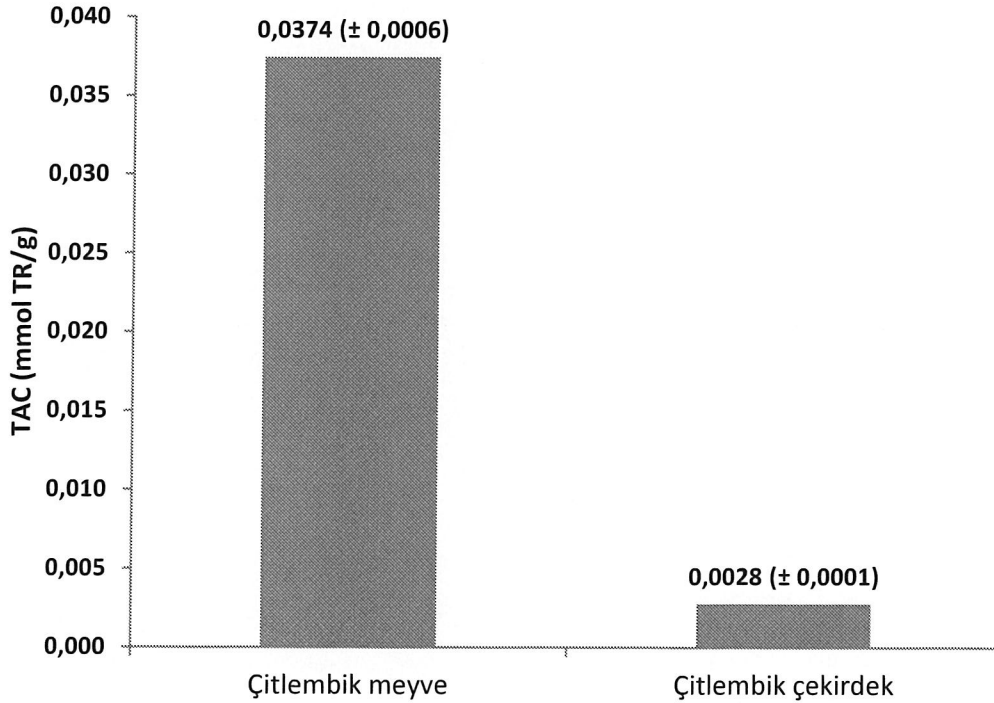
Şekil 4.4: Troloks'un Folin-ciocalteu yönteminden elde edilen kalibrasyon grafiği.

4.2 Toplam Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemlerinin Gerçek Örneklerle Uygulanması

CERAC, CUPRAC, Ferrisiyanür ve Folin-ciocalteu yöntemleri kullanılarak çitlembik bitkisinin sırasıyla meyvesinde ve çekirdeğinde; meyvesinin olgunlaşma dönemi boyunca dönüştüğü yeşil, sarı ve siyah renkli hallerinde uygun çözücü ile içindeki toplam antioksidan miktarı tayin edildi. Ayrıca aynı yöntemler ile çitlembik bitkisinin infüzyon içindeki toplam antioksidan miktarı da tayin edildi.

4.2.1 Çitlembik Meyvesi ve Çekirdek Kısımının Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi

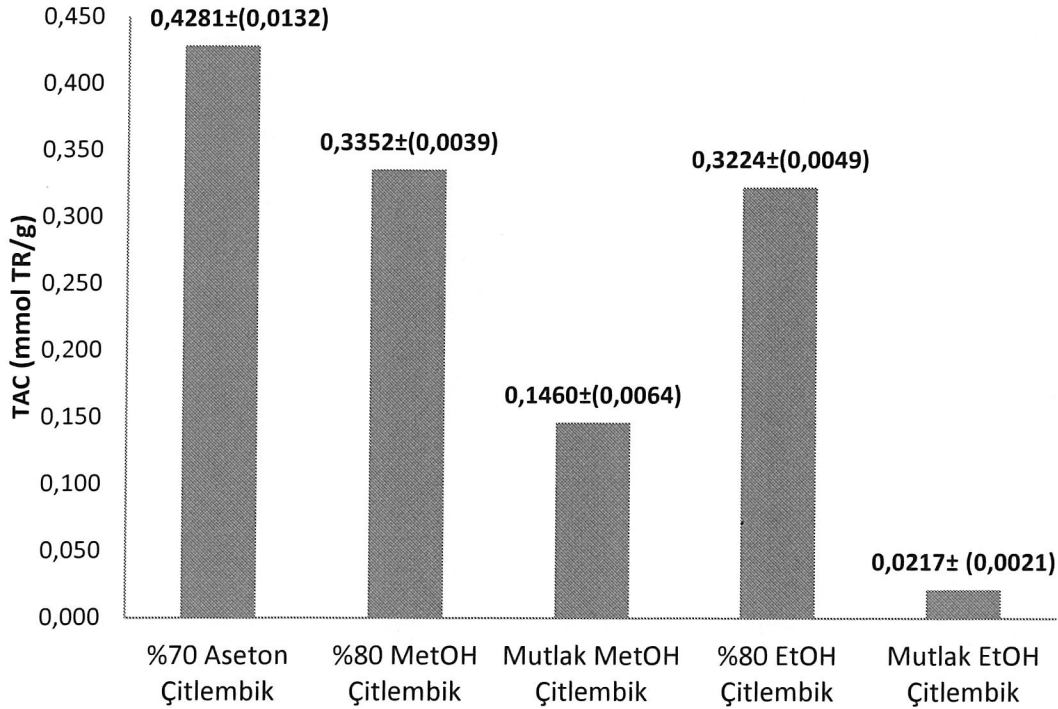
Bölüm 3.4' te anlatıldığı gibi hazırlanan %80 metanollü çitlembik meyve ve çitlembik çekirdek ekstraktları CUPRAC yöntemi ile analiz edilmiştir. CUPRAC yöntemi çitlembik meyve ekstraktlarına uygulanırken; deney tüplerine toplam 3 mL olacak şekilde reaktif çözeltilerinden alındı (1mL bakır klorür çözeltisi + 1mL neokuproin çözeltisi + 1mL amonyum asetat çözeltisi). Üzerlerine önce saf su daha sonra yeşil çitlembik ekstraktları ayrı ayrı (0,1-1mL) toplam hacim 4,1 mL olacak şekilde eklendi. Örnekler yarım saat bekletildikten sonra 450 nm'de reaktif körüne karşı absorbans değerleri ölçüldü. Bu işlem için 6 ölçüm yapılarak ortalama değeri alındı. Sonuçlar şekil 4.5' de verilmiştir.



Şekil 4.5 : Çitlembik meyve ve Çitlembik çekirdek ekstraktlarının CUPRAC toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TR/g).

4.2.2 Çitlembik Meyvesi Ekstraksiyonu İçin Uygun Çözücü Cinsinin Belirlenmesi

Bölüm 3.4 te anlatıldığı gibi hazırlanan mutlak metanol, %80 metanol, mutlak etanol, %80 etanol ve %70 asetonlu çitlembik meyve ekstraktları CUPRAC yöntemi ile analiz edilmiştir. CUPRAC yöntemi çitlembik meyve ekstraktlarına uygulanırken; deney tüplerine toplam 3 mL olacak şekilde reaktif çözeltilerinden alındı (1mL bakır klorür çözeltisi + 1mL neokuproin çözeltisi + 1mL amonyum asetat çözeltisi). Üzerlerine önce saf su daha sonra yeşil çitlembik ekstraktları ayrı ayrı (0,1-1mL) toplam hacim 4,1 mL olacak şekilde eklendi. Örnekler yarım saat bekletildikten sonra 450 nm’de reaktif körüne karşı absorbands değerleri ölçüldü. Bu işlem için 6 ölçüm yapılarak ortalama değeri alındı. Sonuçlar şekil 4.6’ da verilmiştir.

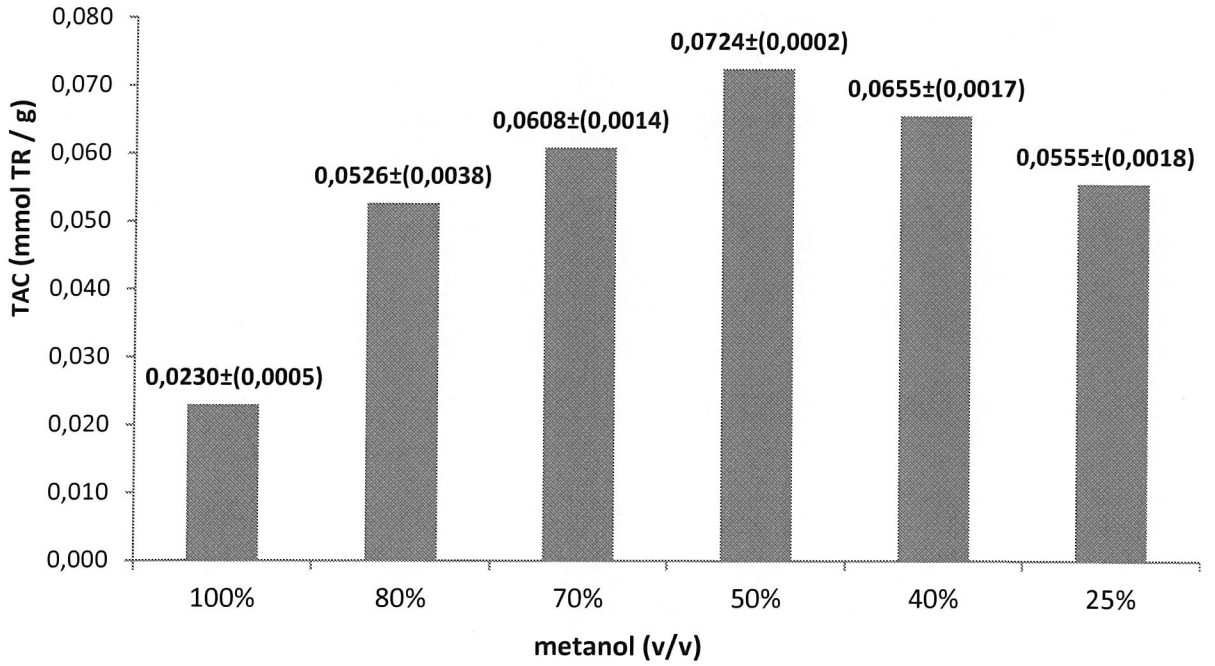


Şekil 4.6 : Çitlembik meyvesinin farklı çözücülerde hazırlanan ekstraktlarının CUPRAC toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TR/g).

4.2.3 Çözücü Optimizasyonu

Çözücü olarak kullanılacak metanolün çitlembik meyvesinin ekstraksiyonunun verimi açısından en uygun oranını belirlemek amacıyla, bölüm 3.4 te anlatıldığı şekilde ekstraktlar %100, %80, %70, %50, %40 ve %25 (v/v)’lik metanol ile

hazırlanmıştır. Çitlembik meyve ekstraktları CUPRAC yöntemi ile analiz edilmiştir. CUPRAC yöntemi çitlembik meyve ekstraktlarına uygulanırken; deney tüplerine toplam 3 mL olacak şekilde reaktif çözeltilerinden alındı (1mL bakır klorür çözeltisi + 1mL neokuproin çözeltisi + 1mL amonyum asetat çözeltisi). Üzerlerine önce saf su daha sonra yeşil çitlembik ekstraktları ayrı ayrı (0,1-1mL) toplam hacim 4,1 mL olacak şekilde eklendi. Örnekler yarım saat bekletildikten sonra 450 nm’de reaktif körüne karşı absorbans değerleri ölçüldü. Bu işlem için 6 ölçüm yapılarak ortalama değeri alındı. Sonuçlar şekil 4.7’ de verilmiştir.



Şekil 4.7 : Çitlembik meyvesinin farklı oranlardaki metanolde hazırlanan ekstraktlarının CUPRAC toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TR/g).

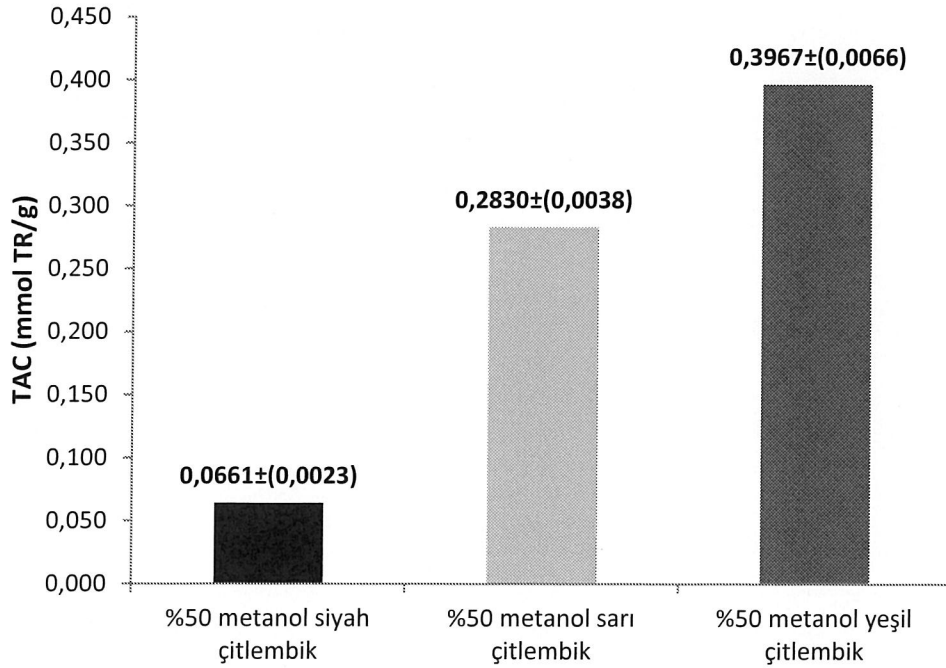
4.2.4 Yeşil, sarı ve siyah çitlembik meyvelerinin % 50 metanol ekstraktlarının antioksidan kapasitesinin belirlenmesi

Çitlembik meyvesinin olgunlaşma evresi boyunca dönüştüğü yeşil, sarı ve siyah halleri ile hazırlanan % 50 metanol ekstraktlarına CUPRAC, CERAC, Ferrisiyanür ve Folin-ciocalteu yöntemleri uygulanarak meyvenin olgunlaşma süresi boyunca antioksidan kapasitesindeki değişimler gözlemlendi.

4.2.4.1 Yeşil, sarı ve siyah çitlembik meyvelerinin % 50 metanol ekstraktlarının antioksidan kapasitesinin CUPRAC yöntemi ile belirlenmesi

Bölüm 3.4 te anlatıldığı gibi hazırlanan %50 metanol siyah, % 50 metanol sarı, % 50 metanol yeşil çitlembik meyve ekstraktları CUPRAC yöntemi ile analiz edilmiştir. CUPRAC yöntemi çitlembik meyve ekstraktlarına uygulanırken; deney tüplerine toplam 3 mL olacak şekilde reaktif çözeltilerinden alındı .

(1mL bakır klorür çözeltisi + 1mL neokuproin çözeltisi + 1mL amonyum asetat çözeltisi). Üzerlerine önce saf su daha sonra siyah, sarı, yeşil çitlembik ekstraktları ayrı ayrı (0,1-1mL) toplam hacim 4,1 mL olacak şekilde eklendi. Örnekler yarım saat bekletildikten sonra 450 nm’de reaktif körüne karşı absorban değerleri ölçüldü. Bu işlem için 6 ölçüm yapılarak ortalama değeri alındı. Sonuçlar şekil 4.8’ de verilmiştir

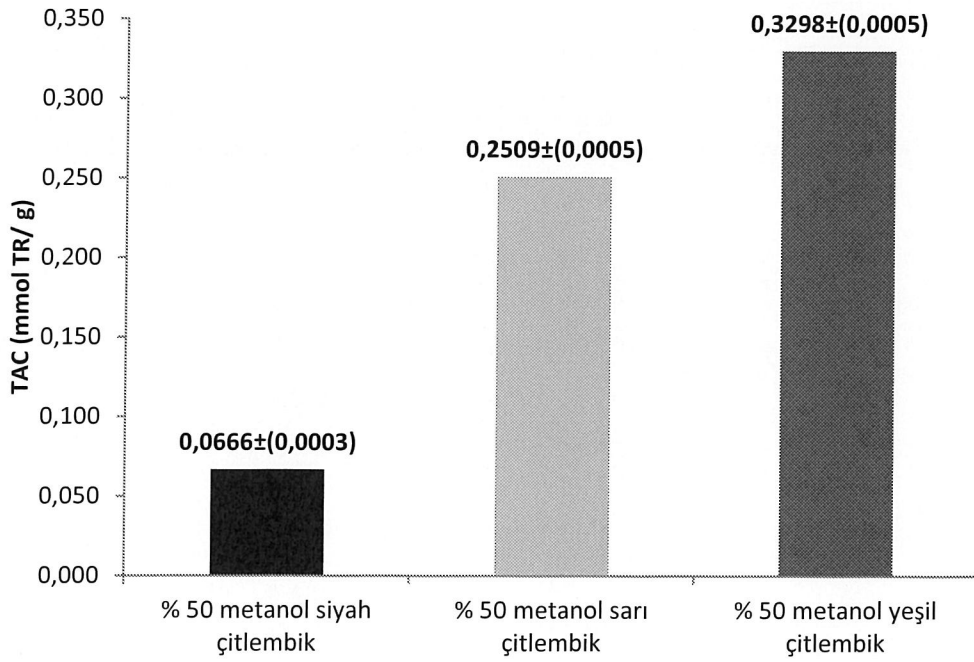


Şekil 4.8 : Yeşil, sarı, siyah çitlembik meyvelerinin % 50 metanollü ekstraktlarının CUPRAC toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TR/g).

4.2.4.2 Yeşil, sarı ve siyah çitlembik meyvelerinin % 50 metanol ekstraktlarının antioksidan kapasitesinin CERAC yöntemi ile belirlenmesi

Bölüm 3.4 te anlatıldığı gibi hazırlanan mutlak %50 metanol siyah, % 50 metanol sarı, % 50 metanol yeşil çitlembik meyve ekstraktları CERAC yöntemi ile analiz edilmiştir. CERAC yöntemi çitlembik meyve ekstraktlarına uygulanırken; deney

tuplerine 0-2 mL arasında değişen saf su ve % 50 metanolde hazırlanan siyah, sarı ve yeşil itlembik ekstraktları ayrı ayrı konuldu. Üzerine 1 mL 2×10^{-3} mL $\text{Ce(IV)SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ve 7 mL Na_2SO_4 özeltisi ekleyip 10 mL'ye saf su ile tamamlandı. Ağzı kapalı olarak yarım saat bekletildi. Absorbans değerleri 320 nm'de saf suya karşı ölçüldü. Örneklerin her biri için troloks cinsinden antioksidan miktarı hesaplandı. Bu işlem için 3 ölçüm yapılarak ortalama değeri alındı. Sonuçlar şekil 4.9' de verilmiştir

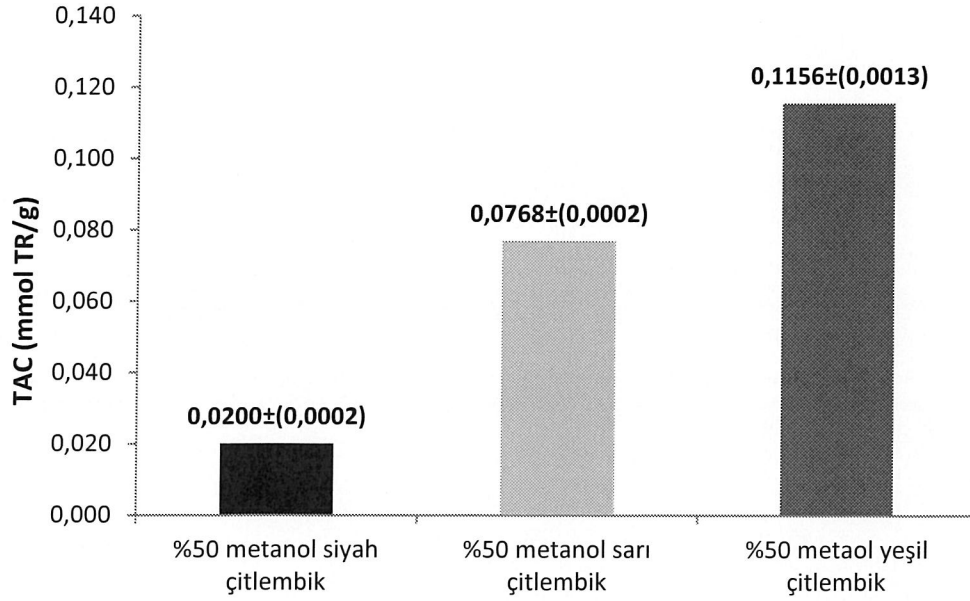


Şekil 4.9 : Yeşil, sarı, siyah itlembik meyvelerinin % 50 metanollü ekstraktlarının CERAC toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TR/g).

4.2.4.3 Yeşil, sarı ve siyah itlembik meyvelerinin % 50 metanol ekstraktlarının antioksidan kapasitesinin Ferrisiyanür yöntemi ile belirlenmesi

Bölüm 3.4 te anlatıldığı gibi hazırlanan %50 metanol siyah, % 50 metanol sarı, % 50 metanol yeşil itlembik meyve ekstraktları Ferrisiyanür yöntemi ile analiz edilmiştir. Ferrisiyanür yöntemi itlembik meyve ekstraktlarına uygulanırken; deney tüplerine siyah, sarı, yeşil itlembik ekstraktları ayrı ayrı konuldu ve hacim % 50 metanol ile 1 mL' ye tamamlandı. Üzerlerine 6,3 mL saf su + 0,2 mL 1M HCl + 1,5 mL (%1) Fe(CN)_6 + 0,5 mL (%1) SDS + 0,5 mL (%0,2) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ eklenerek hacim 10 mL' ye tamamlandı. Örnekler yarım saat bekletildikten sonra 750 nm'de reaktif

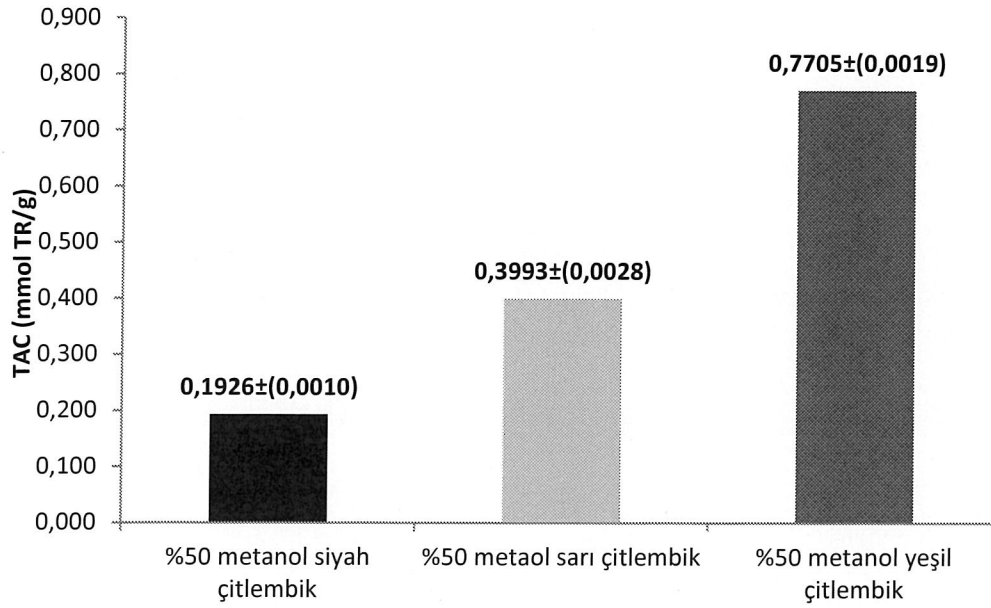
körüne karşı absorbands değerleri ölçüldü. Bu işlem için 6 ölçüm yapılarak ortalama değeri alındı. Sonuçlar şekil 4.10' da verilmiştir.



Şekil 4.10 : Yeşil, sarı, siyah çitlembik meyvelerinin % 50 metanollü ekstraktlarının Ferrisiyanür toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TR/g).

4.2.4.4 Yeşil, sarı ve siyah çitlembik meyvelerinin % 50 metanol ekstraktlarının antioksidan kapasitesinin Folin-ciocalteu yöntemi ile belirlenmesi

Bölüm 3.4 te anlatıldığı gibi hazırlanan %50 metanol siyah, % 50 metanol sarı, % 50 metanol yeşil çitlembik meyve ekstraktları Folin-ciocalteu yöntemi ile analiz edilmiştir. Folin- ciocalteu yöntemi çitlembik meyve ekstraktlarına uygulanırken; deney tüplerine hazırlanan siyah, sarı, yeşil çitlembik ekstraktlarından konuldu ve hacim saf su ile 2 mL'ye tamamlandı. 2,5 mL Lowry C reaktifi ilave edildikten sonra 10 dk. bekletildi. Süre sonunda 0,25 mL Folin reaktifi eklenip oluşan mavi rengin stabil kalması için 30 dakika beklendi. 750 nm'de referans çözeltiye karşı absorbandslar ölçüldü. Bu işlem için 6 ölçüm yapılarak ortalama değeri alındı. Sonuçlar şekil 4.11' da verilmiştir



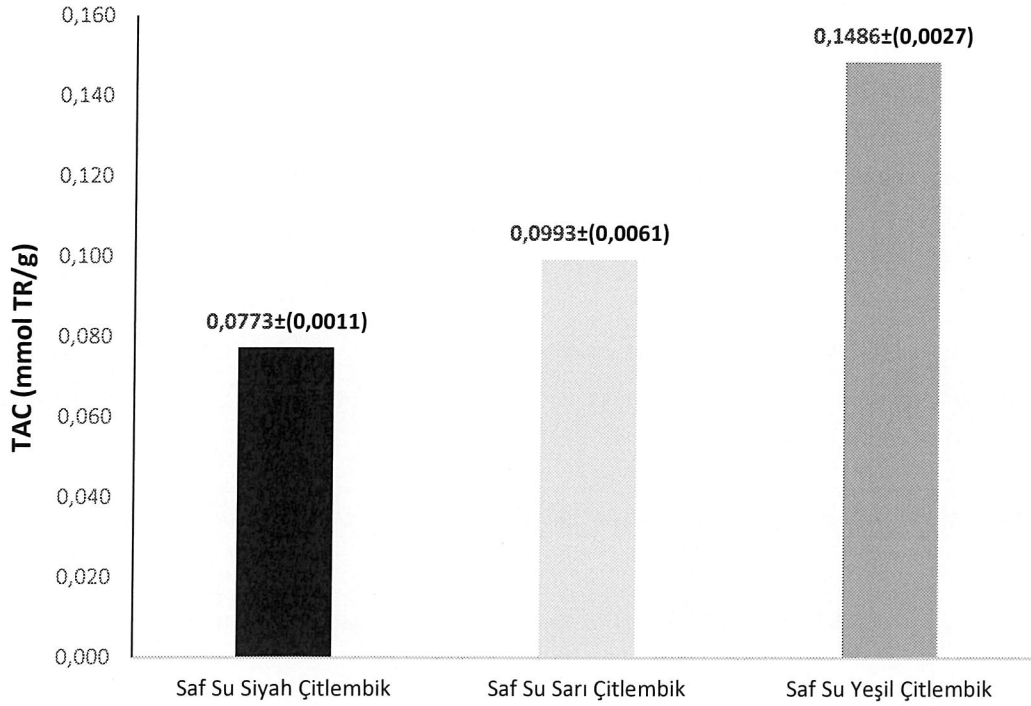
Şekil 4.11: Yeşil, sarı, siyah çitlembik meyvelerinin % 50 metanollü ekstraktlarının Folin Ciocalteu toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TR/g).

4.2.5 Çitlembik meyvesi infüzyonlarının antioksidan kapasitesinin belirlenmesi

Çitlembik meyvesinin olgunlaşma evresi boyunca dönüştüğü yeşil, sarı ve siyah halleri ile hazırlanan infüzyonlarına CUPRAC, CERAC, Ferrisiyanür ve Folin-ciocalteu yöntemleri uygulanarak meyvenin olgunlaşma süresi boyunca antioksidan kapasitesindeki değişimler gözlemlendi.

4.2.5.1 Çitlembik meyvesi infüzyonlarının antioksidan kapasitesinin CUPRAC yöntemi ile belirlenmesi

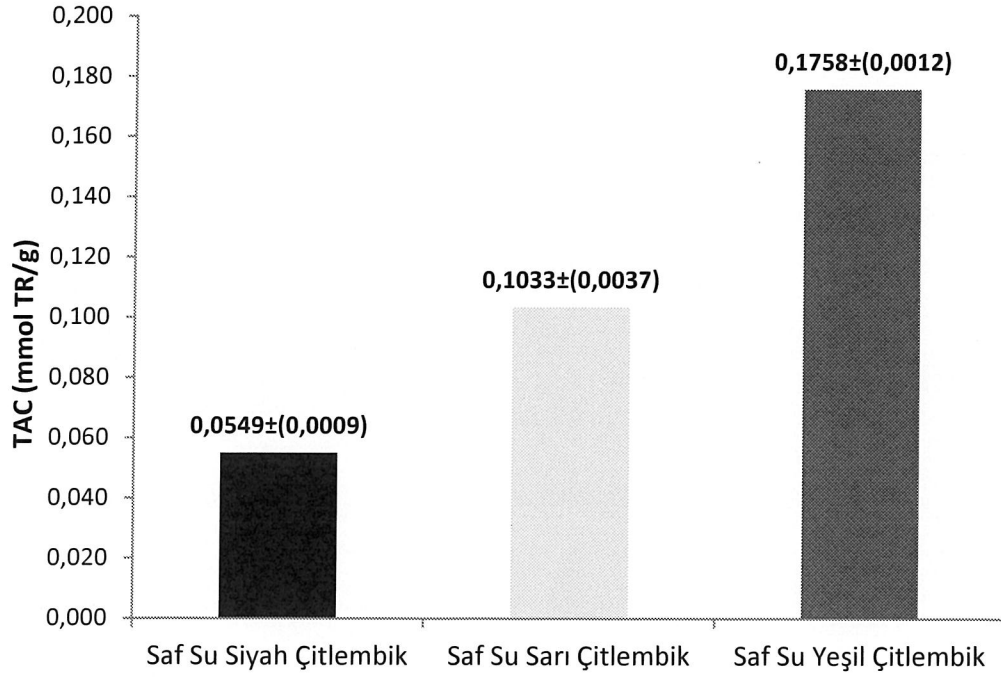
Bölüm 3.4 te anlatıldığı gibi hazırlanan siyah, sarı, yeşil çitlembik infüzyonları CUPRAC yöntemi ile analiz edilmiştir. CUPRAC yöntemi çitlembik meyve infüzyonlarına uygulanırken; deney tüplerine toplam 3 mL olacak şekilde reaktif çözeltilerinden alındı (1mL bakır klorür çözeltisi + 1mL neokuproin çözeltisi + 1mL amonyum asetat çözeltisi). Üzerlerine önce saf su daha sonra siyah, sarı, yeşil çitlembik infüzyonları ayrı ayrı (0,1-1mL) toplam hacim 4,1 mL olacak şekilde eklendi. Örnekler yarım saat bekletildikten sonra 450 nm’de reaktif körüne karşı absorbans değerleri ölçüldü. Bu işlem için 6 ölçüm yapılarak ortalama değeri alındı. Sonuçlar şekil 4.12’ de verilmiştir



Şekil 4.12: Yeşil, sarı, siyah çitlembik meyvelerinin infüzyonlarının CUPRAC yöntemi toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TR/g)

4.2.5.2 Çitlembik meyvesi infüzyonlarının antioksidan kapasitesinin CERAC yöntemi ile belirlenmesi

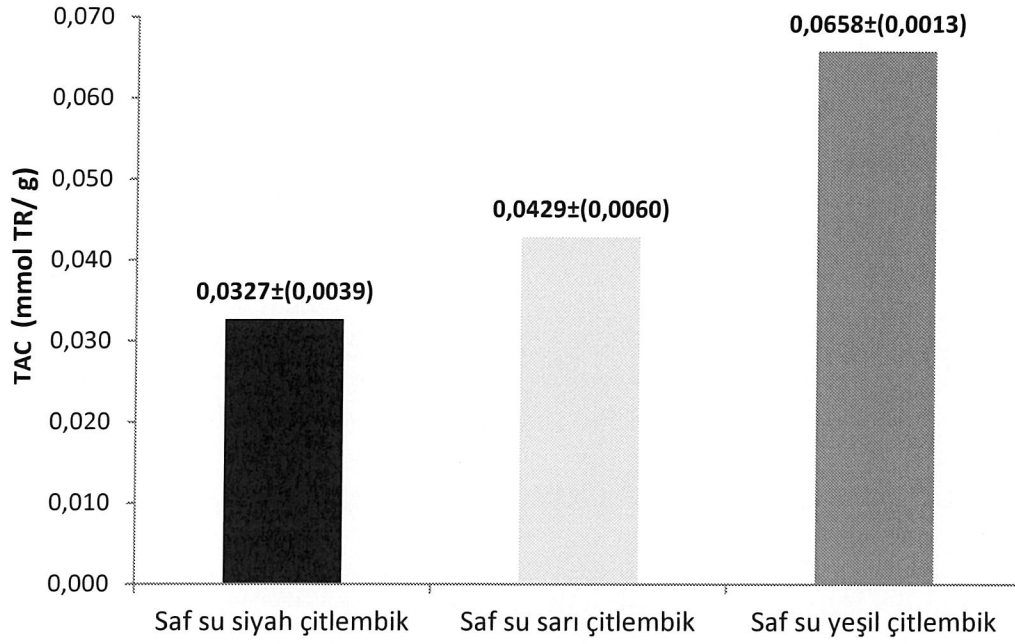
Bölüm 3.4 te anlatıldığı gibi hazırlanan siyah, sarı ve yeşil çitlembik meyve infüzyonları CERAC yöntemi ile analiz edilmiştir. CERAC yöntemi çitlembik meyve infüzyonlarına uygulanırken; deney tuplerine 0-2 mL arasında değişen saf su ve % 50 metanolde hazırlanan siyah, sarı ve yeşil çitlembik ekstraktları ayrı ayrı konuldu. Üzerine 1 mL 2×10^{-3} mL Ce(IV)SO₄.6H₂O ve 7 mL Na₂SO₄ çözeltisi ekleyip 10 mL'ye saf su ile tamamlandı. Ağzı kapalı olarak yarım saat bekletildi. Absorbans değerleri 320 nm'de saf suya karşı ölçüldü. Örneklerin her biri için troloks cinsinden antioksidan miktarı hesaplandı. Bu işlem için 3 ölçüm yapılarak ortalama değeri alındı. Sonuçlar şekil 4.13' de verilmiştir



Şekil 4.13 : Yeşil, sarı, siyah çitlembik meyvelerinin infüzyonlarının CERAC yöntemi toplam antioksidan kapasiteleri (mmolTR/g)

4.2.5.3 Çitlembik meyvesi infüzyonlarının antioksidan kapasitesinin Ferrisiyanür yöntemi ile belirlenmesi

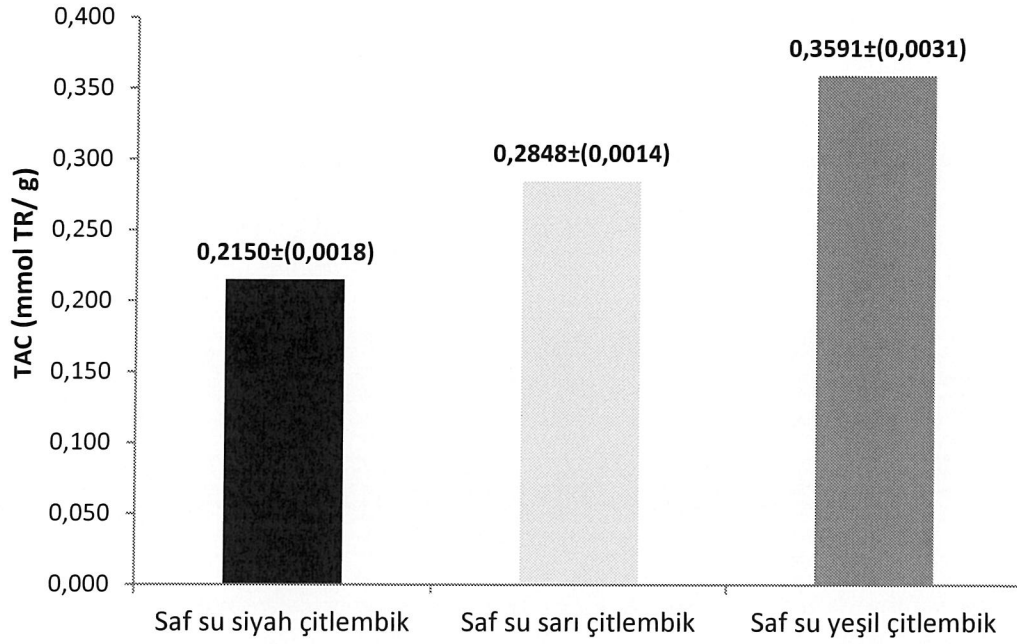
Bölüm 3.4 te anlatıldığı gibi hazırlanan siyah, sarı ve yeşil çitlembik meyve infüzyonları Ferrisiyanür yöntemi ile analiz edilmiştir. Ferrisiyanür yöntemi çitlembik meyve ekstraktlarına uygulanırken; deney tüplerine siyah, sarı, yeşil çitlembik infüzyonları ayrı ayrı konuldu ve hacim % 50 metanol ile 1 mL' ye tamamlandı. Üzerlerine 6,3 mL saf su + 0,2 mL 1M HCl + 1,5 mL (%1)Fe(CN)₆ + 0,5 mL (%1) SDS + 0,5 mL (%0,2) FeCl₃.6H₂O eklenerek hacim 10 mL' ye tamamlandı. Örnekler yarım saat bekletildikten sonra 750 nm'de reaktif körüne karşı absorbands değerleri ölçüldü. Bu işlem için 6 ölçüm yapılarak ortalama değeri alındı. Sonuçlar şekil 4.14' de verilmiştir



Şekil 4.14 : Yeşil, sarı, siyah çitlembik meyvesi infüzyonlarının Ferrisiyanür yöntemi toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TR/g).

4.2.5.4 Yeşil, sarı ve siyah çitlembik meyvelerinin infüzyonlarının antioksidan kapasitesinin Folin-ciocalteu yöntemi ile belirlenmesi

Bölüm 3.4 te anlatıldığı gibi hazırlanan siyah, sarı, yeşil çitlembik meyve infüzyonları Folin-ciocalteu yöntemi ile analiz edilmiştir. Folin- ciocalteu yöntemi çitlembik meyve infüzyonlarına uygulanırken; deney tüplerine hazırlanan siyah, sarı, yeşil çitlembik infüzyonlarından konuldu ve hacim saf su ile 2 mL'ye tamamlandı. 2,5 mL Lowry C reaktifi ilave edildikten sonra 10 dk. bekletildi. Süre sonunda 0,25 mL Folin reaktifi eklenip olusan mavi rengin stabil kalması için 30 dakika beklendi. 750 nm'de referans çözeltiye karşı absorbanslar ölçüldü. Bu işlem için 6 ölçüm yapılarak ortalama değeri alındı. Sonuçlar şekil 4.15' te verilmiştir.



Şekil 4.15 : Yeşil, sarı, siyah çitlembik meyvelerinin infüzyonlarının Folin-ciocalteu yöntemi toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TR/g).

4.2.6 Çitlembik meyvesi ekstraktı ve infüzyonunun antioksidan kapasitesinin karşılaştırılması

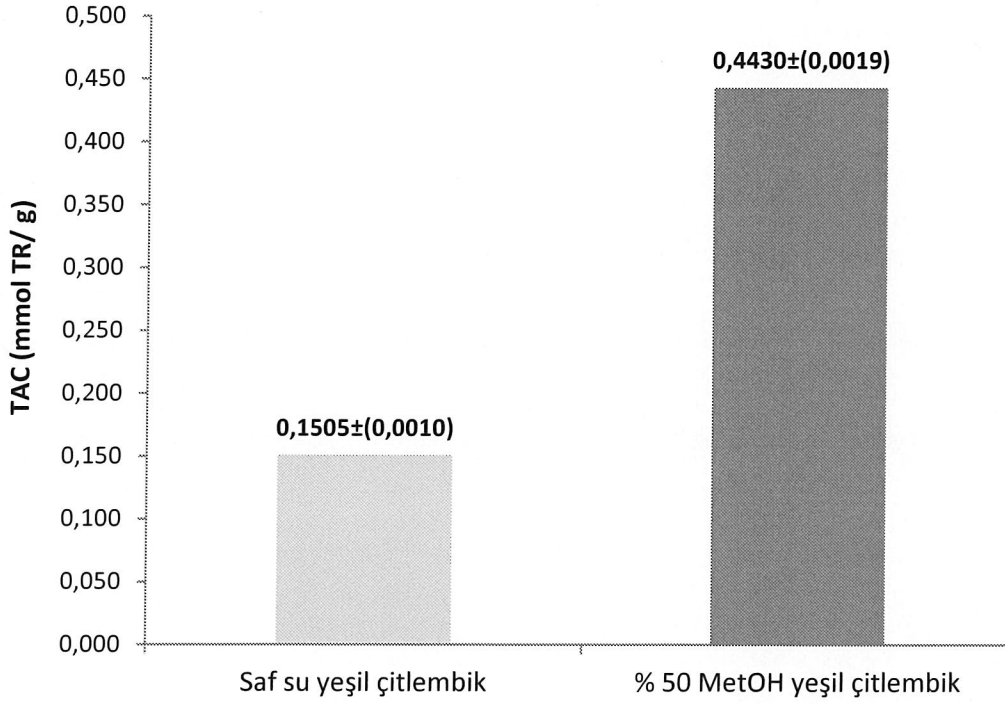
Önceki çalışmalarla yeşil çitlembik ekstraktlarının ve infüzyonlarının sarı ve siyah çitlembik ekstrakt ve infüzyonlarına nazaran daha yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu belirlendi. Bu sebeple % 50 metanol yeşil çitlembik ekstraktı ve yeşil çitlembik infüzyonu antioksidan kapasitelerinin karşılaştırmaları yapıldı.

Bölüm 3.4 te anlatıldığı gibi hazırlanan siyah, sarı, yeşil çitlembik infüzyonları CUPRAC yöntemi ile analiz edilmiştir.

4.2.6.1 Çitlembik meyvesi ekstraktı ve infüzyonunun antioksidan kapasitesinin CUPRAC yöntemi ile karşılaştırılması

Bölüm 3.4 te anlatıldığı gibi hazırlanan % 50 metanol yeşil çitlembik ekstrakt ve infüzyonları antioksidan kapasitesi CUPRAC yöntemi ile analiz edilmiştir. CUPRAC yöntemi yeşil çitlembik meyve ekstrakt ve infüzyonlarına uygulanırken; deney tüplerine toplam 3 mL olacak şekilde reaktif çözeltilerinden alındı (1mL bakır klorür çözeltisi + 1mL neokuproin çözeltisi + 1mL amonyum asetat çözeltisi). Üzerlerine önce saf su daha sonra siyah, sarı, yeşil çitlembik infüzyonları ayrı ayrı (0,1-1mL) toplam hacim 4,1 mL olacak şekilde eklendi. Örnekler yarım saat bekletildikten

sonra 450 nm’de reaktif körüne karşı absorbans değerleri ölçüldü. Bu işlem için 6 ölçüm yapılarak ortalama değeri alındı. Sonuçlar şekil 4.16’ de verilmiştir

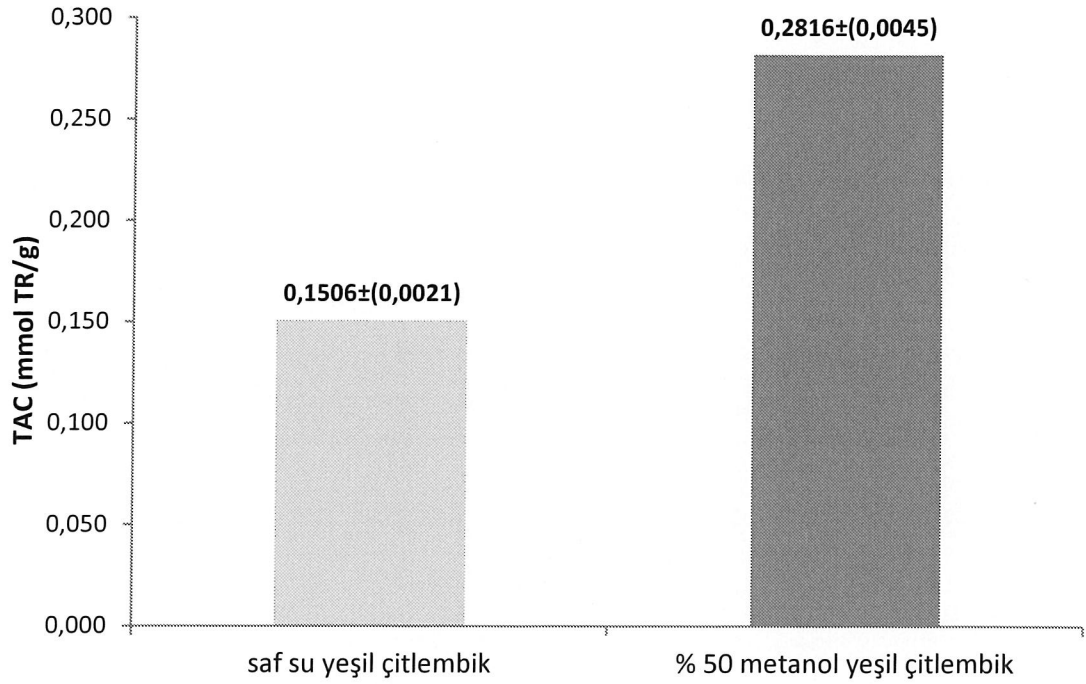


Şekil 4.16 : Yeşil çitlembik meyvesi % 50 metanol ekstrakt ve infüzyonlarının CUPRAC yöntemi toplam antioksidan kapasiteleri (mmolTR/g).

4.2.6.2 Çitlembik meyvesi ekstraktı ve infüzyonunun antioksidan kapasitesinin CERAC yöntemi ile karşılaştırılması

Bölüm 3.4 te anlatıldığı gibi hazırlanan % 50 metanol yeşil çitlembik ekstrakt ve infüzyonları antioksidan kapasitesi CERAC yöntemi ile analiz edilmiştir.

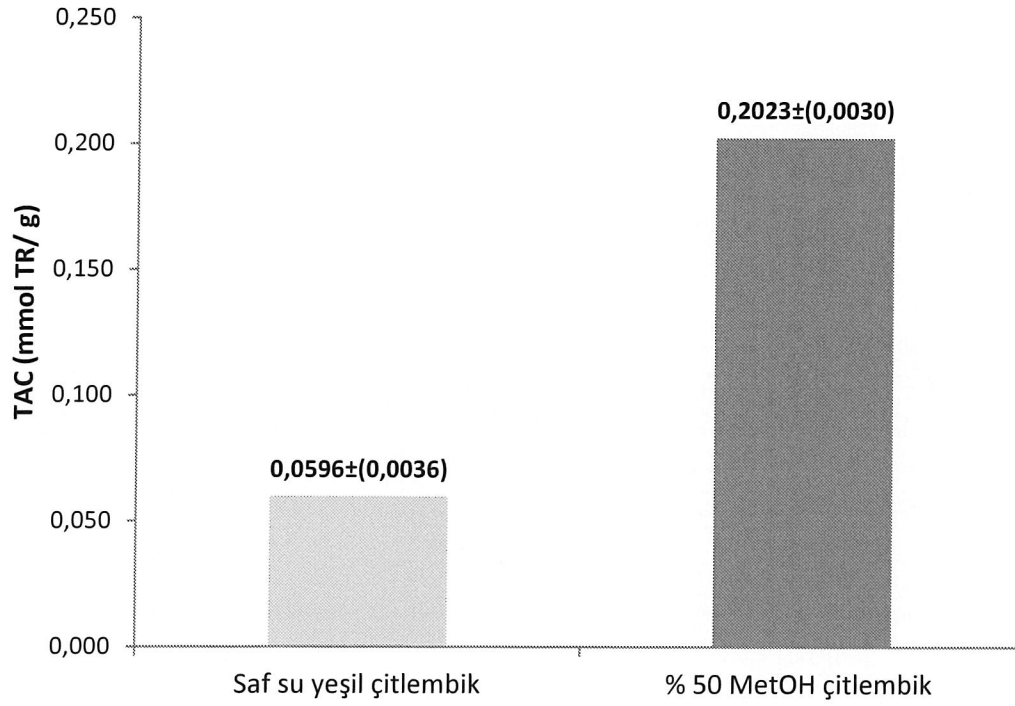
CERAC yöntemi çitlembik meyve infüzyonlarına uygulanırken; deney tüplerine 0-2 mL arasında değişen saf su ve % 50 metanolde hazırlanan siyah, sarı ve yeşil çitlembik ekstraktları ayrı ayrı konuldu. Üzerine 1 mL 2×10^{-3} mL Ce(IV)SO₄.6H₂O ve 7 mL Na₂SO₄ çözeltisi ekleyip 10 mL’ye saf su ile tamamlandı. Ağzı kapalı olarak yarım saat bekletildi. Absorbans değerleri 320 nm’de saf suya karşı ölçüldü. Örneklerin her biri için troloks cinsinden antioksidan miktarı hesaplandı. Bu işlem için 3 ölçüm yapılarak ortalama değeri alındı. Sonuçlar şekil 4.17’ de verilmiştir



Şekil 4.17 : Yeşil çitlembik meyvesi % 50 metanol ekstrakt ve infüzyonlarının CERAC yöntemi toplam antioksidan kapasiteleri (mmolTR/g).

4.2.6.3 Çitlembik meyvesi ekstraktı ve infüzyonunun antioksidan kapasitesinin Ferrisiyanür yöntemi ile karşılaştırılması

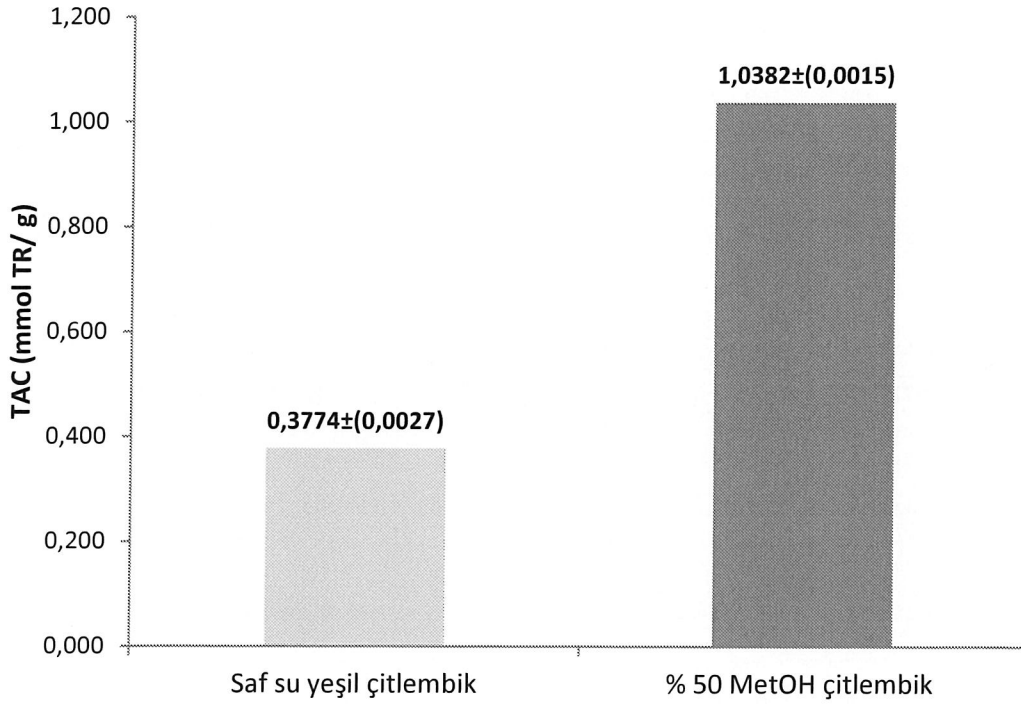
Bölüm 3.4 te anlatıldığı gibi hazırlanan % 50 metanol yeşil çitlembik ekstrakt ve infüzyonları antioksidan kapasitesi Ferrisiyanür yöntemi ile analiz edilmiştir. Ferrisiyanür yöntemi yeşil çitlembik meyve ekstrakt ve infüzyonlarına uygulanırken; deney tüplerine yeşil çitlembik ekstrakt ve infüzyonları ayrı ayrı konuldu ve hacim çözücülerini ile 1 mL' ye tamamlandı. Üzerlerine 6,3 mL saf su + 0,2 mL 1M HCl + 1,5 mL (%1)Fe(CN)₆ + 0,5 mL (%1) SDS + 0,5 mL (%0,2) FeCl₃.6H₂O eklenerek hacim 10 mL' ye tamamlandı. Örnekler yarım saat bekletildikten sonra 750 nm'de reaktif körüne karşı absorbans değerleri ölçüldü. Bu işlem için 6 ölçüm yapılarak ortalama değeri alındı. Sonuçlar şekil 4.18' da verilmiştir



Şekil 4.18 : Yeşil çitlembik meyvesi % 50 metanol ekstrakt ve infüzyonlarının Ferrisiyanür yöntemi toplam antioksidan kapasiteleri (mmolTR/g).

4.2.6.4 Çitlembik meyvesi ekstraktı ve infüzyonunun antioksidan kapasitesinin Folin-ciocalteu yöntemi ile karşılaştırılması

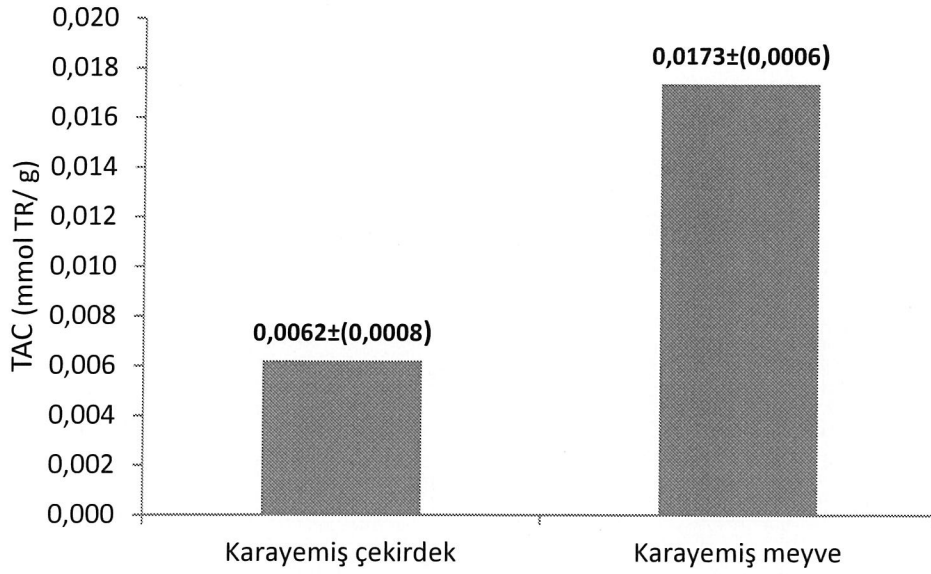
Bölüm 3.4 te anlatıldığı gibi hazırlanan % 50 metanol yeşil çitlembik ekstrakt ve infüzyonları antioksidan kapasitesi Ferrisiyanür yöntemi ile analiz edilmiştir. Folin-ciocalteu yöntemi çitlembik yeşil çitlembik meyve ekstrakt ve infüzyonlarına uygulanırken; deney tüplerine hazırlanan yeşil çitlembik ekstrakt ve infüzyonlarından konuldu ve hacim saf su ile 2 mL'ye tamamlandı. 2,5 mL Lowry C reaktifi ilave edildikten sonra 10 dk. bekletildi. Süre sonunda 0,25 mL Folin reaktifi eklenip oluşan mavi rengin stabil kalması için 30 dakika beklendi. 750 nm'de referans çözeltiye karşı absorbanslar ölçüldü. Bu işlem için 6 ölçüm yapılarak ortalama değeri alındı. Sonuçlar şekil 4.19' da verilmiştir.



Şekil 4.19 : Yeşil çitlembik meyvesi % 50 metanol ekstrakt ve infüzyonlarının Folin-ciocalteu yöntemi toplam antioksidan kapasiteleri (mmolTR/g).

4.2.7 Karayemiş meyvesi ve çekirdek kısmının antioksidan kapasitesinin belirlenmesi

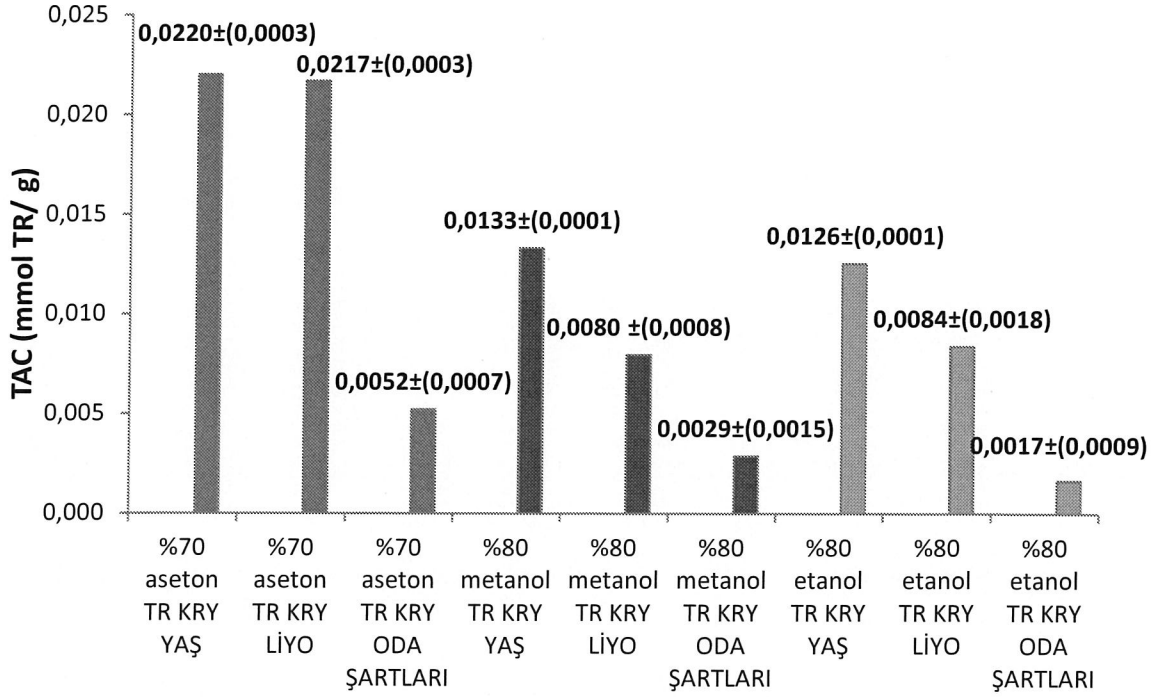
Bölüm 3.5’ te anlatıldığı gibi hazırlanan %80 metanollü karayemiş meyve ve karayemiş çekirdek ekstraktları CUPRAC yöntemi ile analiz edilmiştir. CUPRAC yöntemi karayemiş meyve ve çekirdek ekstraktlarına uygulanırken; deney tüplerine toplam 3 mL olacak şekilde reaktif çözeltilerinden alındı (1mL bakır klorür çözeltisi + 1mL neokuproin çözeltisi + 1mL amonyum asetat çözeltisi). Üzerlerine önce saf su daha sonra karayemiş meyve ve çekirdek ekstraktları ayrı ayrı (0,1-1mL) toplam hacim 4,1 mL olacak şekilde eklendi. Örnekler yarım saat bekletildikten sonra 450 nm’de reaktif körüne karşı absorbans değerleri ölçüldü. Bu işlem için 6 ölçüm yapılarak ortalama değeri alındı. Sonuçlar şekil 4.20’ de verilmiştir.



Şekil 4.20 : Karayemiş meyve ve Karayemiş çekirdek ekstraktlarının CUPRAC toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TR/g).

4.2.8 Farklı kurutma yöntemlerinin karayemiş meyvesinin antioksidan kapasitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

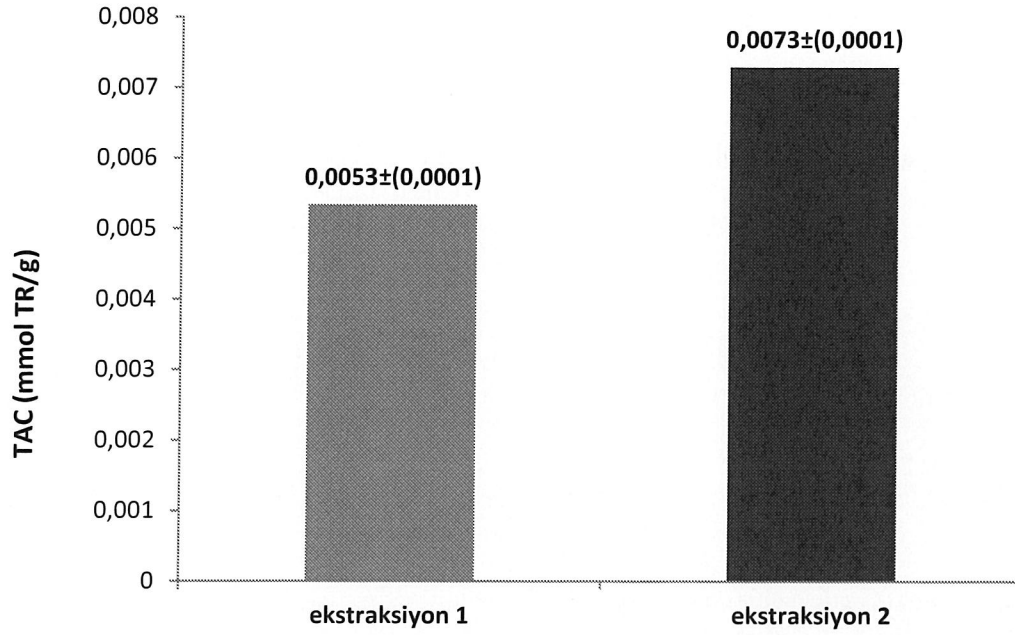
Farklı kurutma yöntemlerinin karayemiş meyvesinin antioksidan kapasitesi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla, bölüm 3.5'te anlatıldığı gibi hazırlanan Trabzon menşeli karayemiş ekstraktlarına CUPRAC yöntemi uygulandı. CUPRAC yöntemi farklı şekillerde kurutulmuş karayemiş meyve ekstraktlarına uygulanırken; deney tüplerine toplam 3 mL olacak şekilde reaktif çözeltilerinden alındı (1mL bakır klorür çözeltisi + 1mL neokuproin çözeltisi + 1mL amonyum asetat çözeltisi). Üzerlerine önce saf su daha sonra karayemiş meyve ekstraktları ayrı ayrı (0,1-1mL) toplam hacim 4,1 mL olacak şekilde eklendi. Örnekler yarım saat bekletildikten sonra 450 nm'de reaktif körüne karşı absorbands değerleri ölçüldü. Bu işlem için 6 ölçüm yapılarak ortalama değeri alındı. Sonuçlar şekil 4.21' de verilmiştir.



Şekil 4.21 : Farklı kurutma yöntemleri ile hazırlanan karayemiş meyvesi ekstraktlarının CUPRAC toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TR/g).

4.2.9 Farklı ekstraksiyonların veriminin belirlenmesi

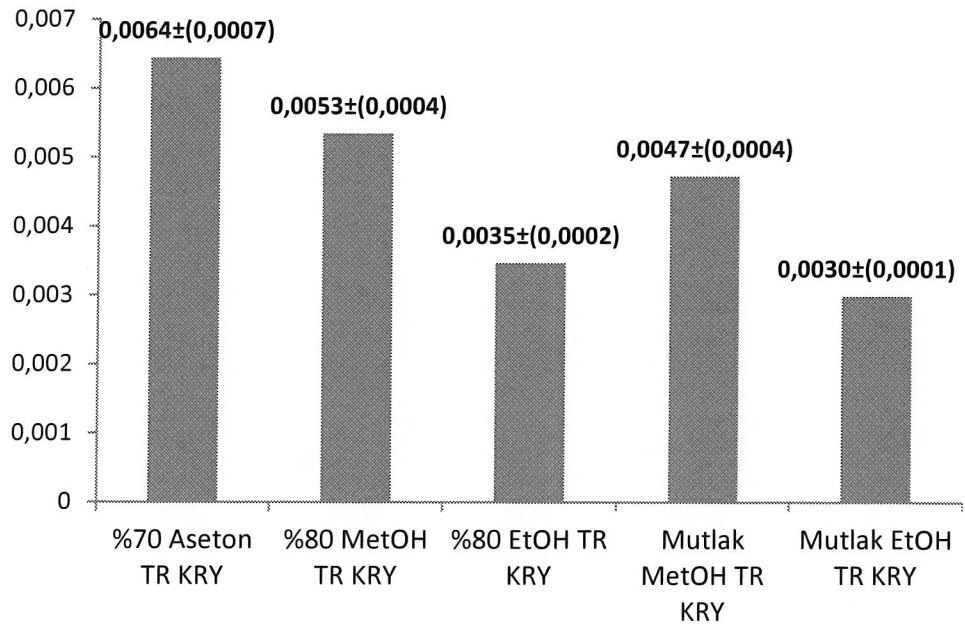
Farklı ekstrakte yöntemlerinin Karayemiş antioksidan kapasitesi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla Bölüm 3.5' te anlatıldığı gibi hazırlanan Trabzon menşeli Karayemiş ekstraktlarına CUPRAC yöntemi uygulandı. CUPRAC yöntemi farklı şekillerde ekstrakte edilmiş karayemiş meyve ekstraktlarına uygulanırken; deney tüplerine toplam 3 mL olacak şekilde reaktif çözeltilerinden alındı (1mL bakır klorür çözeltisi + 1mL neokuproin çözeltisi + 1mL amonyum asetat çözeltisi). Üzerlerine önce saf su daha sonra karayemiş meyve ekstraktları ayrı ayrı (0,1-1mL) toplam hacim 4,1 mL olacak şekilde eklendi. Örnekler yarım saat bekletildikten sonra 450 nm'de reaktif körüne karşı absorbans değerleri ölçüldü. Bu işlem için 6 ölçüm yapılarak ortalama değeri alındı. Sonuçlar şekil 4.22' de verilmiştir.



Şekil 4.22 : Farklı ekstrakte yöntemleri ile hazırlanan karayemiş meyvesi ekstraktlarının CUPRAC toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TR/g).

4.2.10 Karayemiş meyvesi ekstraksiyonu için uygun çözücü cinsinin belirlenmesi

Bölüm 3.5' te anlatıldığı gibi hazırlanan mutlak metanol, %80 metanol, mutlak etanol, %80 etanol ve %70 asetonlu Trabzon menşeli karayemiş meyve ekstraktları CUPRAC yöntemi ile analiz edilmiştir. CUPRAC yöntemi karayemiş meyve ekstraktlarına uygulanırken; deney tüplerine toplam 3 mL olacak şekilde reaktif çözeltilerinden alındı (1mL bakır klorür çözeltisi + 1mL neokuproin çözeltisi + 1mL amonyum asetat çözeltisi). Üzerlerine önce saf su daha sonra Trabzon menşeli karayemiş ekstraktları ayrı ayrı (0,1-1mL) toplam hacim 4,1 mL olacak şekilde eklendi. Örnekler yarım saat bekletildikten sonra 450 nm'de reaktif körüne karşı absorbans değerleri ölçüldü. Bu işlem için 6 ölçüm yapılarak ortalama değeri alındı. Sonuçlar şekil 4.23'de verilmiştir.



Şekil 4.23 : Karayemiş meyvesinin farklı çözücülerde hazırlanan ekstraktlarının CUPRAC toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TR/g).

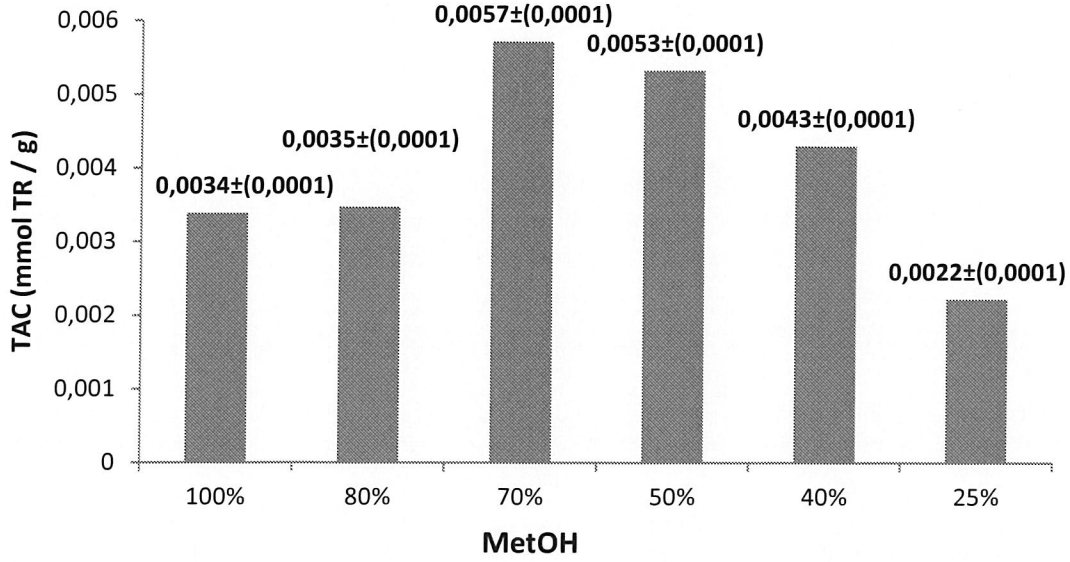
4.2.11 Çözücü optimizasyonu

Çözücü olarak kullanılacak metanolün karayemiş meyvesinin ekstraksiyonunun verimi açısından en uygun oranını belirlemek amacıyla, bölüm 3.5 te anlatıldığı şekilde ekstraktlar %100, %80, %70, %50, %40 ve %25 (v/v)'lik metanol ile hazırlanmıştır. Trabzon ve İstanbul menşeli karayemiş meyve ekstraktları CUPRAC yöntemi ile analiz edilmiştir.

4.2.11.1 Trabzon menşeli karayemiş ekstraktları için çözücü optimizasyonu

Çözücü olarak kullanılacak metanolün Trabzon menşeli Karayemiş meyvesinin ekstraksiyonunun verimi açısından en uygun oranını belirlemek amacıyla, bölüm 3.5' te anlatıldığı şekilde ekstraktlar %100, %80, %70, %50, %40 ve %25 (v/v)'lik metanol ile hazırlanmıştır. Karayemiş meyve ekstraktları CUPRAC yöntemi ile analiz edilmiştir. CUPRAC yöntemi karayemiş meyve ekstraktlarına uygulanırken; deney tüplerine toplam 3 mL olacak şekilde reaktif çözeltilerinden alındı (1mL bakır klorür çözeltisi + 1mL neokuproin çözeltisi + 1mL amonyum asetat çözeltisi). Üzerlerine önce saf su daha sonra karayemiş ekstraktları ayrı ayrı (0,1-1mL) toplam hacim 4,1 mL olacak şekilde eklendi. Örnekler yarım saat bekletildikten sonra 450

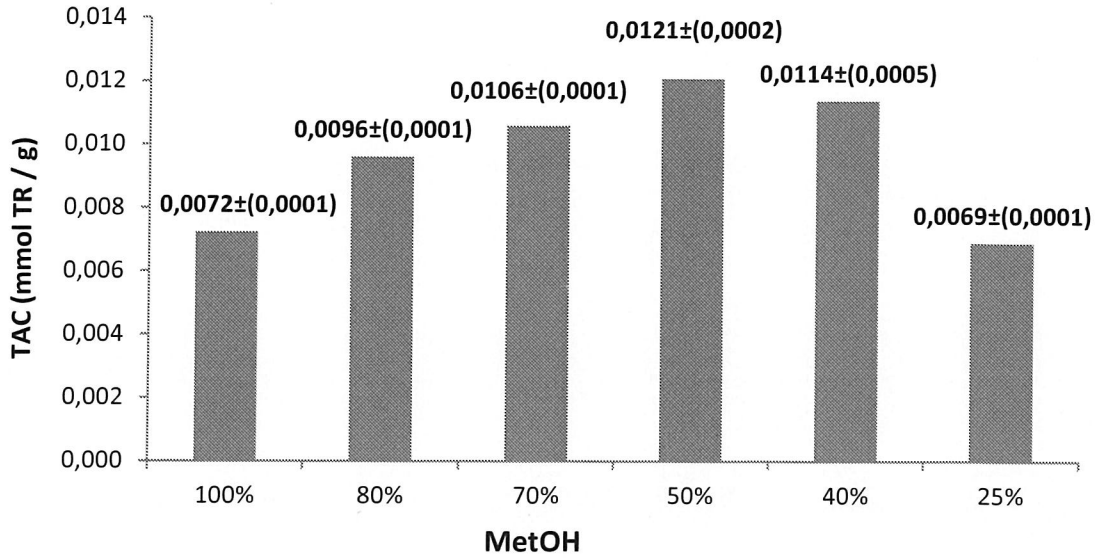
nm’de reaktif körüne karşı absorbands değerleri ölçüldü. Bu işlem için 6 ölçüm yapılarak ortalama değeri alındı. Sonuçlar şekil 4.24’ de verilmiştir.



Şekil 4.24 : Farklı oranlardaki metanol ile hazırlanan Trabzon menşeli karayemiş meyvesi ekstraktlarının CUPRAC yöntemi toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TR/g).

4.2.11.2 İstanbul menşeli karayemiş ekstraktları için çözücü optimizasyonu

Çözücü olarak kullanılacak metanolün İstanbul menşeli Karayemiş meyvesinin ekstraksiyonunun verimi açısından en uygun oranını belirlemek amacıyla, bölüm 3.5’ te anlatıldığı şekilde ekstraktlar %100, %80, %70, %50, %40 ve %25 (v/v)’lik metanol ile hazırlanmıştır. Karayemiş meyve ekstraktları CUPRAC yöntemi ile analiz edilmiştir. CUPRAC yöntemi karayemiş meyve ekstraktlarına uygulanırken; deney tüplerine toplam 3 mL olacak şekilde reaktif çözeltilerinden alındı (1mL bakır klorür çözeltisi + 1mL neokuproin çözeltisi + 1mL amonyum asetat çözeltisi). Üzerlerine önce saf su daha sonra karayemiş ekstraktları ayrı ayrı (0,1-1mL) toplam hacim 4,1 mL olacak şekilde eklendi. Örnekler yarım saat bekletildikten sonra 450 nm’de reaktif körüne karşı absorbands değerleri ölçüldü. Bu işlem için 6 ölçüm yapılarak ortalama değeri alındı. Sonuçlar şekil 4.25’ de verilmiştir.



Şekil 4.25 : Farklı oranlardaki metanol ile hazırlanan İstanbul menşeli karayemiş meyvesi ekstraktlarının CUPRAC yöntemi toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TR/g).

Farklı oranlarda metanol çözücülerile hazırlanan İstanbul menşeli karayemiş meyve ekstraktlarıyla yapılan antioksidan kapasite tayinlerinde en yüksek verimin % 50 (v/v)'lık metanol ile hazırlanan ekstraktlarda olduğu belirlendi.

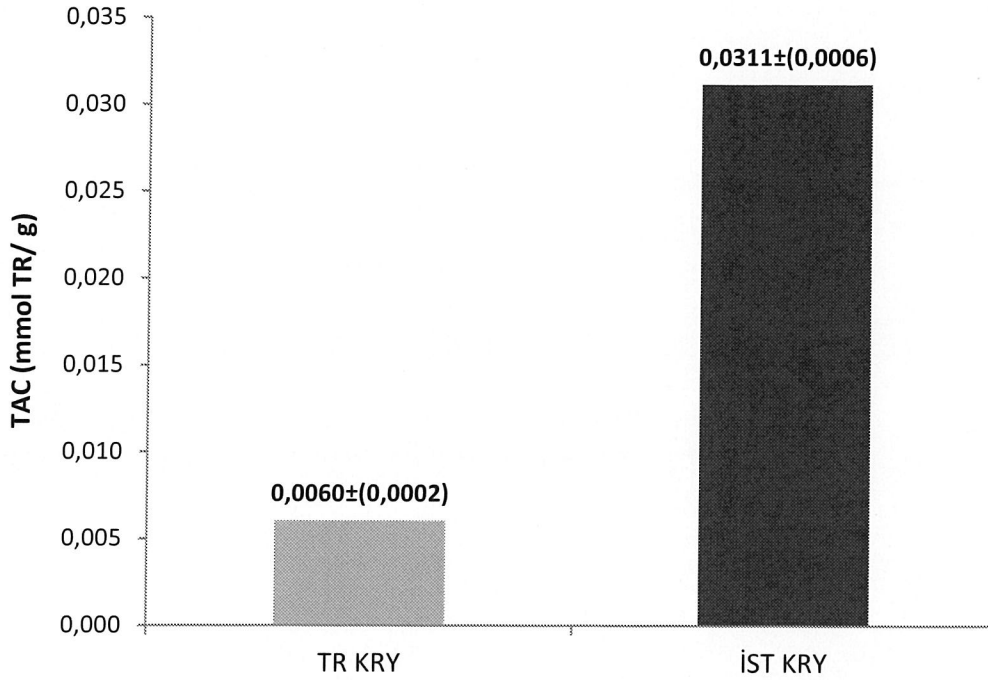
4.2.12 Trabzon ve İstanbul menşeli karayemişlerin antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması

Trabzon ve İstanbul menşeli karayemişlerin antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması amacıyla % 50 metanol ile hazırlanan karayemiş ekstraktlarına CUPRAC, CERAC, Ferrisiyanür ve Folin-ciocalteu yöntemleri uygulandı.

4.2.12.1 Trabzon ve İstanbul menşeli karayemişlerin antioksidan kapasitelerinin CUPRAC yöntemi ile karşılaştırılması

Bölüm 3.5' te anlatıldığı gibi hazırlanan %50 metanollü Trabzon ve İstanbul menşeli karayemiş meyve ekstraktları CUPRAC yöntemi ile analiz edilmiştir. CUPRAC yöntemi karayemiş meyve ekstraktlarına uygulanırken; deney tüplerine toplam 3 mL olacak şekilde reaktif çözeltilerinden alındı (1mL bakır klorür çözeltisi + 1mL neokuproin çözeltisi + 1mL amonyum asetat çözeltisi). Üzerlerine önce saf su daha sonra % 50 metanollü Trabzon ve İstanbul menşeli karayemiş ekstraktları ayrı ayrı (0,1-1mL) toplam hacim 4,1 mL olacak şekilde eklendi. Örnekler yarım saat bekletildikten sonra 450 nm'de reaktif körüne karşı absorban değerleri ölçüldü. Bu

işlem için 6 ölçüm yapılarak ortalama değeri alındı. Sonuçlar şekil 4.26’da verilmiştir.

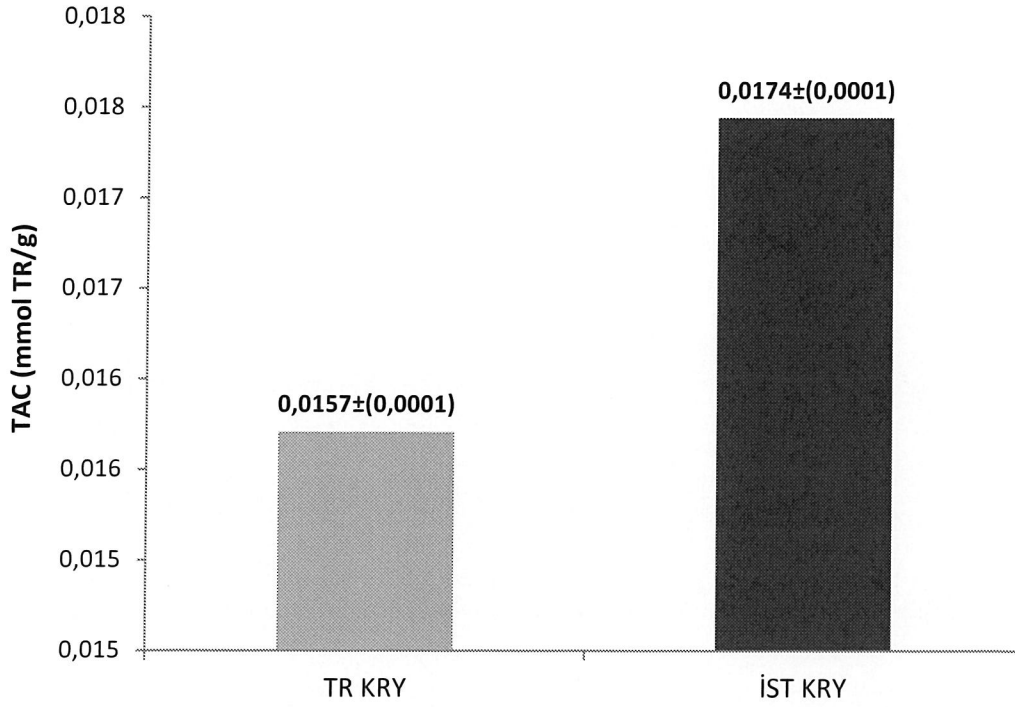


Şekil 4.26 : Trabzon ve İstanbul menşeli karayemiş ekstraktlarının CUPRAC yöntemi toplam antioksidan kapasiteleri (mmolTR/g).

4.2.12.2 Trabzon ve İstanbul menşeli karayemişlerin antioksidan kapasitelerinin CERAC yöntemi ile karşılaştırılması

Bölüm 3.5’ te anlatıldığı gibi hazırlanan %50 metanollü Trabzon ve İstanbul menşeli karayemiş meyve ekstraktları CERAC yöntemi ile analiz edilmiştir.

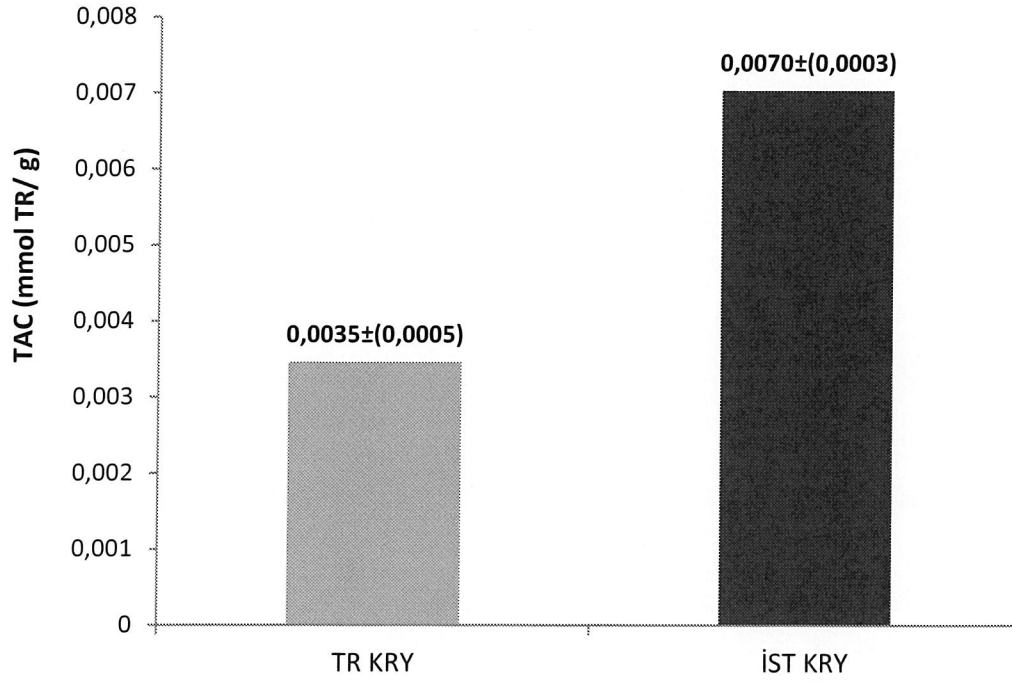
CERAC yöntemi karayemiş meyve infüzyonlarına uygulanırken; deney tuplerine 0-2 mL arasında değişen saf su ve % 50 metanolde hazırlanan Trabzon ve İstanbul menşeli karayemiş meyve ekstraktları ayrı ayrı konuldu. Üzerine 1 mL 2×10^{-3} mL $\text{Ce(IV)SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ve 7 mL Na_2SO_4 çözeltisi ekleyip 10 mL’ye saf su ile tamamlandı. Ağzı kapalı olarak yarım saat bekletildi. Absorbans değerleri 320 nm’de saf suya karşı ölçüldü. Örneklerin her biri için troloks cinsinden antioksidan miktarı hesaplandı. Bu işlem için 3 ölçüm yapılarak ortalama değeri alındı. Sonuçlar şekil 4.27’ de verilmiştir



Şekil 4.27 : Trabzon ve İstanbul menşeli karayemiş ekstraktlarının CERAC yöntemi toplam antioksidan kapasiteleri (mmolTR/g).

4.2.12.3 Trabzon ve İstanbul menşeli karayemişlerin antioksidan kapasitelerinin Ferrisiyanür yöntemi ile karşılaştırılması

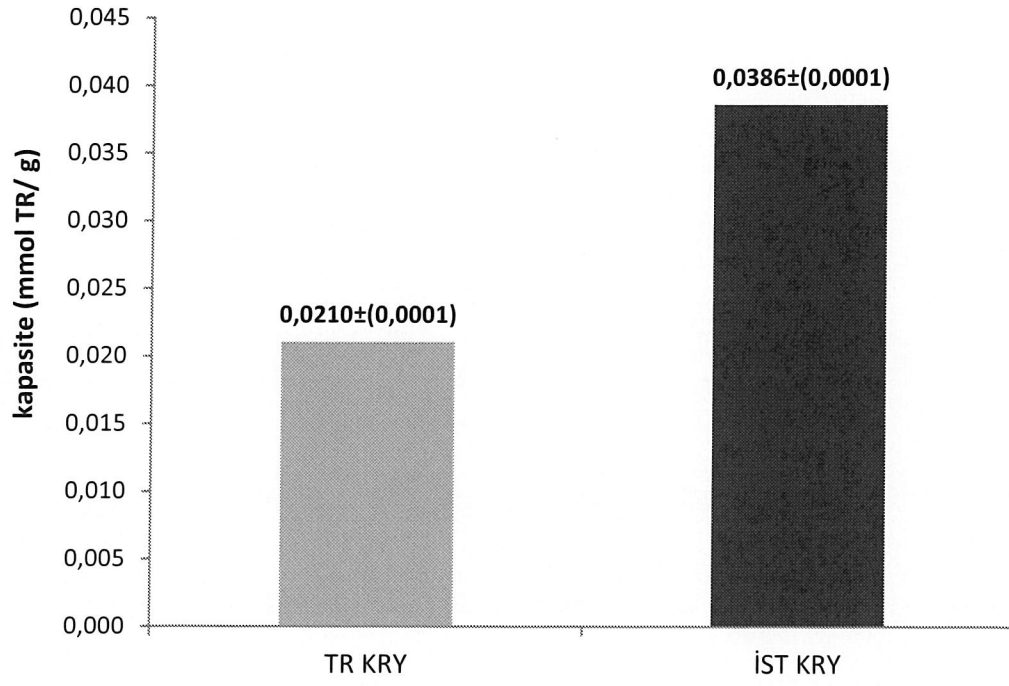
Bölüm 3.5' te anlatıldığı gibi hazırlanan %50 metanollü Trabzon ve İstanbul menşeli karayemiş meyve ekstraktları Ferrisiyanür yöntemi ile analiz edilmiştir. Ferrisiyanür yöntemi karayemiş meyve ekstraktlarına uygulanırken; deney tüplerine % 50 metanol ile hazırlanan Trabzon ve İstanbul menşeli karayemiş ekstraktları ayrı ayrı konuldu ve hacim % 50 metanol ile 1 mL' ye tamamlandı. Üzerlerine 6,3 mL saf su + 0,2 mL 1M HCl + 1,5 mL (%1)Fe(CN)₆ + 0,5 mL (%1) SDS + 0,5 mL (%0,2) FeCl₃.6H₂O eklenerek hacim 10 mL' ye tamamlandı. Örnekler yarım saat bekletildikten sonra 750 nm'de reaktif körüne karşı absorpsiyon değerleri ölçüldü. Bu işlem için 6 ölçüm yapılarak ortalama değeri alındı. Sonuçlar şekil 4.28' de verilmiştir



Şekil 4.28 : Trabzon ve İstanbul menşei karayemiş ekstraktlarının Ferrisiyanür yöntemi toplam antioksidan kapasiteleri (mmolTR/g).

4.2.12.4 Trabzon ve İstanbul menşei karayemişlerin antioksidan kapasitelerinin folin-ciocalteu yöntemi ile karşılaştırılması

Bölüm 3.5’ te anlatıldığı gibi hazırlanan %50 metanollü Trabzon ve İstanbul menşei karayemiş meyve ekstraktları Folin-ciocalteu yöntemi ile analiz edilmiştir. Folin-ciocalteu yöntemi karayemiş meyve ekstraktlarına uygulanırken; deney tüplerine hazırlanan %50 metanol ile hazırlanan Trabzon ve İstanbul menşei karayemiş ekstraktlarından konuldu ve hacim saf su ile 2 mL’ye tamamlandı. 2,5 mL Lowry C reaktifi ilave edildikten sonra 10 dk. bekletildi. Süre sonunda 0,25 mL Folin reaktifi eklenip oluşan mavi rengin stabil kalması için 30 dakika beklendi. 750 nm’de referans çözeltiye karşı absorbanslar ölçüldü. Bu işlem için 6 ölçüm yapılarak ortalama değeri alındı. Sonuçlar şekil 4.29’ da verilmiştir



Şekil 4.29 : Trabzon ve İstanbul menşeli karayemiş ekstraktlarının Folin ciocalteu yöntemi toplam antioksidan kapasiteleri (mmolTR/g).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmamızda Çitlembik ve Karayemiş meyvelerinin toplam antioksidan kapasiteleri belirlenmiştir. Antioksidan tayin yöntemleri, çitlembik meyvesinin olgunlaşma evresi boyunca dönüştüğü yeşil, sarı ve siyah hallerine uygulanarak çitlembik meyvesinin antioksidan kapasitesindeki değişim ve sebepleri belirlenmek istenmiştir. Ayrıca, Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan (İstanbul Teknik Üniversitesi Ayazağa kampüsünden (İST KRY) ve Trabzon'un Araklı ilçesinden (TR KRY) aynı türdeki karayemiş meyveleri kullanılarak toplam antioksidan kapasiteleri belirlenmiştir.

CUPRAC yöntemi kullanılarak elde edilen sonuçlara göre Çitlembik çekirdek (0,0082 (mmol TR/g)) kısmında Çitlembik meyve 0,0374 (mmol TR/g)) kısmına nazaran çok daha düşük antioksidan kapasite gözlenmiştir. Bu nedenle Çitlembik meyve kısmıyla deneysel çalışmalar yapılmıştır.

Çitlembik meyvesi ekstraksiyonu için uygun çözücü cinsi belirlenmesi çalışmalarında antioksidan kapasite sırasına göre sonuçlar %70' lik (v/v) aseton > %80' lik (v/v) metanol > %80' lik etanol (v/v) > mutlak metanol > mutlak etanol şeklinde belirlenmiştir (şekil 4.6). Fenolik asitler ve polifenoller bol miktarda hidroksil grubu içeren bileşikler olup polar yapıdadırlar ve bu nedenle de polar çözücülerde çözünürler. Metanol polaritesi sudan daha düşük olmasına rağmen organik moleküller için çok ideal bir çözücüdür. Polar molekülleri çözebildiği gibi nisbeten düşük polariteli molekülleri de sudan daha iyi çözmektedir. Ancak zehirli olduğundan dolayı gıdaların hazırlanmasında ve gıda endüstrisinde kullanılmamaktadır. Fakat yapılan bilimsel araştırmalarda antioksidan kapasitenin belirlenmesinde en çok kullanılan ekstraksiyon çözücülerinden biridir. Bu sebeple yapılan deneylerde aseton ile daha fazla verim alınmasına rağmen çözücü olarak metanol tercih edilmiştir.

Çözücü optimizasyonu çalışmalarında mutlak, %80, %70, %50, %40 ve %25' lik (v/v) metanol kullanılarak çitlembik ekstraktları hazırlanmış ve bu ekstraktlara CUPRAC yöntemi uygulanarak en yüksek antioksidan kapasiteye 0,072 (mmol

TR/g) değeriyle %50' lik (v/v) metanol ile hazırlanan ekstraktların sahip olduğu görülmüştür (şekil 4.7).

Çitlembik meyvesinin olgunlaşma evresi boyunca dönüştüğü yeşil, sarı ve siyah halleri için %50' lik (v/v) metanol ile ekstraktları ve infüzyonları hazırlanmıştır. %50' lik (v/v) metanol ekstraktları ve infüzyonlarına CUPRAC, CERAC, Folin-Ciocalteu ve SDS ile modifiye edilmiş Ferrisiyanür yöntemleri uygulanmış ve her yöntem sonucunda toplam antioksidan kapasite miktarları mmol TR/g cinsinden belirlenmiş ve en yüksek toplam antioksidan kapasite yeşil renkli çitlembik meyvesinde belirlenmiştir. Çitlembik meyvesinin yeşil (olgunlaşmamış) hali siyah (olgunlaşmış) haline nazaran daha sulu ve etli bir yapıdadır. Çitlembik meyvesi olgunlaştıkça suyunu kaybetmekte ve etli sert yapı yerini daha gözenekli ve kuru bir yapıya bırakmaktadır. Çitlembik meyvesindeki bu yapısal değişiklikler, siyah çitlembik meyvesinin yeşil çitlembik meyvesine nazaran daha fazla ısı ve ışığa maruz kalması toplam antioksidan kapasitesindeki azalmaya sebep olabilir.

Çitlembik meyvesinin yeşil, sarı ve siyah halleri için %50' lik (v/v) metanol ile ekstraktları ve infüzyonlarının deneysel analiz sonuçlarına ait korelasyon katsayıları (r) (0.00-0.25 Çok zayıf ilişki; 0.26-0.49 Zayıf ilişki; 0.50-0.69 Orta ilişki; 0.70-0.89 Yüksek ilişki; 0.90-1.0 Çok yüksek ilişki) programları kullanılarak (Microsoft Excel 2010 Ofis) hesaplanmıştır. Korelasyon katsayıları çizelge 5.1 ve çizelge 5.2 de verilmiştir.

Çizelge 5.1: Yeşil, sarı, siyah çitlembik meyvelerinin % 50 metanollü ekstraktlarının CUPRAC, CERAC, Folin-Ciocalteu ve SDS ile modifiye edilmiş Ferrisiyanür yöntemleri korelasyon katsayıları

	CUPRAC	CERAC	Ferri	Folin
CUPRAC	1			
CERAC	0,994702	1		
Ferri	0,997193	0,984214	1	
Folin	0,980159	0,995342	0,962567	1

TAC istatistiksel karşılaştırmaları	Korelasyon katsayıları	CERAC ve CUPRAC	$TAC_{CERAC} = 1.6578TAC_{CUPRAC} + 0,6840$ ($r = 0,9947$)
		CERAC ve FERRİSİYANÜR	$TAC_{CERAC} = 0,2542TAC_{FERRİ} + 0,0198$ ($r = 0,9842$)
		CERAC ve FOLİN-CIOCALTEU	$TAC_{CERAC} = 1,1788TAC_{FOLİN} + 0,1551$ ($r = 0,9953$)
		CUPRAC ve FERRİSİYANÜR	$TAC_{CUPRAC} = 0,4293TAC_{FERRİ} + 0,0016$ ($r = 0,9972$)
		CUPRAC ve FOLİN-CIOCALTEU	$TAC_{CUPRAC} = 1,9346TAC_{FOLİN} + 0,0766$ ($r = 0,9801$)
		FERRİSİYANÜR ve FOLİN-CIOCALTEU	$TAC_{FERRİ} = 4,4132TAC_{FOLİN} + 0,0739$ ($r = 0,9625$)

Çizelge 5.2: Yeşil, sarı, siyah çitlembik meyvelerinin infüzyonlarının CUPRAC, CERAC, Folin-Ciocalteu ve SDS ile modifiye edilmiş Ferrisiyanür yöntemleri korelasyon katsayıları

	CUPRAC	CERAC	Ferri	Folin
CUPRAC	1			
CERAC	0,998924	1		
Ferri	0,999956	0,998446	1	
Folin	0,941587	0,924956	0,9447	1

TAC istatistiksel karşılaştırmaları	Korelasyon katsayıları	CERAC ve CUPRAC	$TAC_{CERAC} = 0,7979TAC_{CUPRAC} + 0,0180$ ($r = 0,9989$)
		CERAC ve FERRİSİYANÜR	$TAC_{CERAC} = 0,3586TAC_{FERRİ} + 0,0048$ ($r = 0,9984$)
		CERAC ve FOLİN-CIOCALTEU	$TAC_{CERAC} = 2,0055TAC_{FOLİN} + 0,0214$ ($r = 0,9249$)
		CUPRAC ve FERRİSİYANÜR	$TAC_{CUPRAC} = 0,2869TAC_{FERRİ} + 0,0015$ ($r = 0,9999$)
		CUPRAC ve FOLİN-CIOCALTEU	$TAC_{CUPRAC} = 1,6306TAC_{FOLİN} + 0,0499$ ($r = 0,9415$)
		FERRİSİYANÜR ve FOLİN-CIOCALTEU	$TAC_{FERRİ} = 5,703TAC_{FOLİN} + 0,0402$ ($r = 0,9447$)

CERAC ve CUPRAC, SDS katkılı pH'sı belirli Fe(III)-ferrisiyanür ve Folin-Ciocalteu yöntemine göre elde edilen değerler ile korelasyon katsayıları kıyaslandığında korelasyon gücünün çok yüksek ilişkili olduğu söylenebilir.

Çitlembik meyvesi için yapılan benzer çalışma Karayemiş için de yapılmıştır. CUPRAC yöntemi kullanılarak elde edilen sonuçlara göre Karayemiş çekirdek kısmında Karayemiş meyve kısmına nazaran çok daha düşük aktivite gözlemlenmiş Karayemiş meyve [0,0173 (mmol TR/g)] > Karayemiş çekirdek [0,0061 (mmol TR/g)] ve daha sonraki çalışmalara Karayemiş meyve kısmıyla devam edilmiştir.

Farklı kurutma yöntemlerinin (YAŞ, LİYO, ODA SICAKLIĞI), karayemiş meyvesinin antioksidan kapasitesi üzerine etkisi incelenmiştir (Şekil 4.21). Örnekler kurutuldukça antioksidan kapasitelerinin azaldığı en düşük antioksidan kapasitesinin ise oda sıcaklığında (25°C'de) olduğu belirlenmiştir. Karayemiş ekstraktlarının hazırlanmasında çözücü türü ve oranlarının etkisi incelenmiştir (Şekil 4.23). Karayemiş meyvesi ekstraksiyonu için uygun çözücü cinsi belirlenmesi amacı ile etanol, metanol ve aseton ile çalışılmıştır. Antioksidan kapasite sırasına göre sonuçlar %70' lik (v/v) aseton > %80' lik (v/v) metanol > mutlak metanol > mutlak etanol > %80' lik etanol (v/v) şeklindedir. Elde edilen sonuçlar çitlembik meyvesi için yapılan çözücü seçimi deneyleriyle paraleldir. Metanol polaritesi yüksek, polar bileşenleri iyi çözmesinin yanı sıra non – polar bileşenleri de az miktarda da olsa çözebilme kapasitesine sahip bir çözücüdür ve biyomoleküllerin ekstraksiyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır. Karayemiş meyvesinin suda çözünen polifenol, antosiyanin gibi antioksidanlar açısından zengin olduğu düşüncesiyle çözücü olarak metanol tercih edilmiştir. Farklı ekstraksiyon yöntemlerinin verimliliğini belirlemek amacıyla da çalışmalar yapılmıştır. Tüm çalışmamız boyunca kullandığımız standart ekstraksiyon yöntemi (ekstraksiyon 1) ile birlikte TR KRY meyvesine farklı bir ekstraksiyon yöntemi (ekstraksiyon 2) uygulanmıştır. Antioksidan kapasite sırasına göre sonuçlar ekstraksiyon 2 [0,0072 (mmol TR/g)] > ekstraksiyon 1 [0,0053 (mmol TR/g)] şeklindedir (Şekil 4.22).

Çözücü oranın optimizasyonu çalışmalarında ise mutlak, %80, %70, %50, %40 ve %25'lik (v/v) metanol kullanılarak ayrı ayrı İST KRY ve TR KRY ekstraktları hazırlanmış ve bu ekstraktlara CUPRAC yöntemi uygulanarak İST KRY ekstraktlarından en yüksek antioksidan kapasiteye 0,2123 (mmol TR/g) değeriyle %40' lık (v/v) metanol TR KRY ekstraktlarından ise 0,1428 (mmol TR/g) değeriyle % 70' lik (v/v) metanol ile hazırlanan ekstraktların sahip olduğu belirlenmiştir.

Aynı testlerin sonuçlarından yola çıkarak kıyaslama yapabilmek amacıyla %50'lik (v/v) metanol kullanılarak TR KRY ve İST KRY ekstraktları tekrar hazırlanmış ve bu ekstraktlara CUPRAC, CERAC, Folin-Ciocalteu ve SDS ile modifiye edilmiş

Ferrisiyanür yöntemleri uygulanmıştır. Her yöntem sonucunda antioksidan kapasite miktarları mmol TR/g olmak üzere İST KRY > TR KRY şeklinde belirlenmiştir.

Sonuç olarak ; bu çalışmalar ile çitlembik ve karayemiş meyvelerinin toplam antioksidan kapasitesi dört farklı yöntem ile incelenmiştir ancak bitkilerde çok farklı antioksidanlar mevcuttur ve her bir antioksidan bileşeni ayrıca ölçmek çok zordur. Bu nedenle her özütün antioksidan potansiyelini değerlendirmek için birkaç farklı test kullanmak daha bilgilendirici olacaktır bunun yanında meyvelerin yapılarındaki antioksidan bileşenleri belirleme çalışmaları sıvı kromatografisi (HPLC, LC-MS vb.) yöntemler ile de yürütülebilir.

Genel anlamda siyah haliyle tüketilen çitlembik meyvesinin toplam antioksidan kapasitesinin yeşil haldeyken daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bu sebeple antioksidan etkisini daha fazla gösterebilmesi açısından çitlembik meyvesi yeşil haldeyken tüketilebilir.

Karayemiş meyvesinin toplam antioksidan kapasitesi incelenirken sadece olgunlaşmış hali ile çalışmalar yapılmıştır. Çitlembik meyvesiyle yaptığımız çalışmalar gibi Karayemiş meyvesinin de olgunlaşma dönemi boyunca toplam antioksidan kapasitesindeki değişim incelenebilir.

Karayemiş farklı şekillerde tüketilen bir meyvedir. Özellikle Karadeniz Bölgesi halkı tarafından reçeli, turşusu ve kavurması yapılmaktadır. Karayemişin işlem görmüş formları ile çalışmalar yapılarak bu işlemlerin karayemişin toplam antioksidan kapasitesi üzerine etkileri incelenebilir.

Karayemiş meyvesi antioksidan potansiyelini değerlendirmek için farklı testlerin kullanımının yanısıra meyvelerin yapılarındaki antioksidan bileşenleri belirleme çalışmaları için sıvı kromatografisi (HPLC, LC-MS vb.) yöntemleri de uygulanabilir.

KAYNAKLAR

- Alpınar, K., Yazıcıoğlu, E.** (1991). (9.Bitkisel ilaç hammaddeleri toplantısı bildirisi)
- Anşın, R., Özkan, Z.C.** (1993). Tohumlu Bitkiler (Spermatophyta) Odunsu Taksonlar. KTÜ Orman Fak. Yayın No: 19, Trabzon.
- Apak, R., Guçlu, K., Ozyurek, M., Kardemir, S.E.** (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamin C and E using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuprione: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 7970-7981.
- Baytop, A.** (1991). Farmasötik Botanik, İ.Ü. Ecz. Fak. Yayınları.
- Baytop, T.** (1994). Türkçe Bitki Adları Sözlüğü. Türk Dil Kurumu Yayınları No: 5678, Ankara
- Bissenbaev, A. K., Altybaeva, N. A., Kolbaeva, G.A.** (2007) Role of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in hormone regulating programmed cell death of wheat aleurone layer. *Journal of Cell and Molecular Biology* 6(1): 41-48
- Chevallier, A.** (1996). The encyclopedia of medicinal plants. Dorling Kindersly, London.
- Davis, P.H.** (1982). Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol. 7, Edinburgh.
- Demir, F., Doğan, H., Özcan, M., Haciseferoğulları, H.** (2002). Nutritional and Physical Properties of Hackberry (*Celtis australis* L.). *Journal of Food Engineering*, 54 (3): 241-247.
- Diplock, A.** (1998). Healty lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. ILSI Europe concise monograph series, 59 p. Belgium
- Doygun, H., Ok, T.** (2006). Kahramanmaraş Kenti Açık-Yeşil Alanlarında Ağaçlandırma Çalışmalarının Değerlendirilmesi ve Öneriler. *KSÜ Fen ve Mühendislik Derg.*, 9(2): 94-103.
- Elliot, J.G.** (1999). Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Tech.* 53(2); 46-48.
- Gill, S.S. and Tuteja, N.** (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiol. Biochem.*, 48: 909-930

Gültekin, H.C. (2007). Yabani Meyveli Ağaç Türlerimiz ve Fidan Üretim Teknikleri. T.C. Çevre ve Orman Bak., AGM, Fidanlık ve Tohum İşleri Daire Başkanlığı, Ankara, 52 s.

Halliwell, B. and Gutteridge, JMC (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219: 1–14

Halliwell, B. and Whiteman, M. (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 142: 231–255

Hernandez Bermejo, J. E. and Garcia Sanchez, E. (1998). Economic Botany and Ethnobotany in Al-Andalus (Iberian Peninsula: Tenth--Fifteenth Centuries), an Unknown Heritage of Mankind. *Economy Botany* 52(1): 15-26.

Kaur, C. and Kapoor, H.C. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables-the millennium's health. *Int. J. Food Sci. Tech.* 36; 703-725.

Kayacık, H., (1961). Orman ve Park Ağaçlarının özel sistematığı , İ.Ü. Orman Fak. Yayınları.

Kayacık, H. (1981). Orman ve Park Ağaçlarının Özel Sistematığı II. Cilt (Angiospermae). İ.Ü. Orman Fak. Yayın No: 287, İstanbul

Mir-Babaye, N. F., Waigh, R. D. (1997). Plants of the Republic of Azerbaijan with Potential Medicinal Applications Part II. *International Journal of Pharmacognosy*, 35 (3): 190–193.

Nawar, W.W. (1996). Lipids. In "Food Chemistry", O.R. Fennema (Ed), pp: 225-319. Marcel Dekker, New York

OGM,(1991). Ülkemizdeki bazı önemli orman tali ürünlerinin teşhis ve tanım klavuzu; yayın no: 659, seri no: 18; İşletme ve Pazarlama Dairesi Başkanlığı.

Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., and Deemer, E.K. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *J. Agric. Food Chem.* 50(11); 3122-3128.

Pham-huy LA, He H, Pham-huy C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci.*;4(2):89-96

Sandall, C. (2002). Karayemiş (*Laurocerasus officinalis* Roem.) bitkisinin RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) tekniği ile moleküler karakterizasyonu, KTÜ Fen- Edb Fakültesi

Scheibmeir, H.D., Christensen, K., Whitaker, S.H., Jegaethesan, J., Clancy, R., Pierce, J.D. (2005) *Intensive Crit Care Nurs.* Feb; 21(1):24-8.

Singh, B., Bhatt, B.P., Prasad, P. (2006). Variation in seed and seedling traits of *Celtis australis*, a multipurpose tree in Central Himalaya, India. *Agroforestry Systems* 67:115-122.

Subba D.B., Gurung H.B., Tamang B.B. (1996). Seasonal variation of polyphenolic compounds in nine important tree fodder in the eastern hills of Nepal. *Vet. Rev.* 11(1): 8-10.

Tardío, J., Pardo-de-Santayana, M., Morales, R. (2006). Ethnobotanical review of wild edible plants in Spain. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 152, 27–71.

Williams, G.M., and Jeffrey, A.M. (2000) Oxidative DNA damage: endogenous and chemically induced. *32(3):283-92*

Yaltırık, F. (1998). Dendroloji Ders Kitabı II, Angiospermae (Kapalı Tohumlular), İÜ Orman Fak. Yayın No: 4104/420, İstanbul.

Yaman, Ö. (2005). Türkiye’de doğal olarak yetişen çitlembiğin (*Celtis australis* L.) morfolojik, anatomik ve palinolojik özellikleri. Yüksek lisans tezi, Zonguldak Karaelmas Üniv. FBE, Bartın, 83 s.

Yücel, E. (2005). Ağaçlar ve çalılar I, Eskişehir, 301 s.

Zempleni, J. and Dakshinamurti, K. (2005) *Nutrients and Cell Signaling*

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: SEDA BABACAN

Doğum Yeri ve Tarihi: ARAKLI / 19.09.1986

E-Posta: babacanseda@gmail.com

Lisans: KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ