

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEMEL ECZACILIK BİLİMLERİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Yeşim YEŞİLOĞLU

ÜVEZ (*Sorbus domestica* L.) EKSTRAKTLARININ
ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN
BELİRLENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Burhan CEYLAN

Referans No: 10119254

EDİRNE-2017

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEMEL ECZACILIK BİLİMLERİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Yeşim YEŞİLOĞLU

ÜVEZ (*Sorbus domestica* L.) EKSTRAKTLARININ
ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN
BELİRLENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Burhan CEYLAN

Destekleyen Kurum: TÜBAP-2017/74

EDİRNE-2017

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

ONAY

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Eczacılık Bilimleri Anabilim dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Prof. Dr. Yeşim YEŞİLOĞLU danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Burhan CEYLAN tarafından tez başlığı “Üvez (*Sorbus domestica* L.) ekstraktlarının antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi” olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 25/12/2017 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından “**Yüksek Lisans Tezi**” olarak kabul edilmiştir.

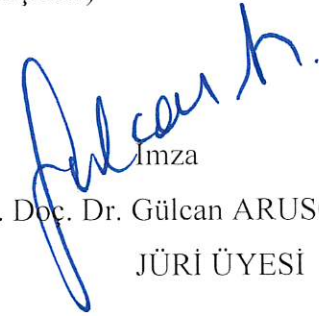

İmza

Prof. Dr. Yeşim YEŞİLOĞLU
JÜRİ BAŞKANI (Danışman)

İmza


Yrd. Doç. Dr. Hakan KOLANCILAR
JÜRİ ÜYESİ

İmza


Yrd. Doç. Dr. Gülcan ARUSOĞLU
JÜRİ ÜYESİ

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Tammam SİPAHİ

Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca yardımını ve desteğini hiç bir zaman esirgemeyen değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Yeşim YEŞİLOĞLU'na, Temel Eczacılık Bilimleri Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Gülay ŞEREN'e, her zaman yanımda olan ablam Burcu CEYLAN'a, laboratuvar çalışmalarını beraber yürüttüğümüz arkadaşım Derya ALTINTAŞ'a ve bugünlere gelmemi sağlayan, her zaman yanımda olan aileme, desteklerinden dolayı NABİLTEM ve TÜBAP birimine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLERİ	3
SERBEST RADİKALLER	3
GEREÇ VE YÖNTEM	26
BULGULAR	38
TARTIŞMA	71
SONUÇLAR	81
ÖZET	85
SUMMARY	87
KAYNAKLAR	89
ŞEKİLLER LİSTESİ	96
ÖZGEÇMİŞ	101

SİMGE VE KISALTMALAR

ABAP:	2,2'-azobis(2-amidinopropan) hidroklorit
ABTS:	2,2'-Azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat)
APPH:	2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorit
ATP:	Adenozin tri fosfat
BHA:	Bütillendirilmiş hidroksianisol
BHT:	Bütillendirilmiş hidroksitoluen
CAT:	Katalaz
Ç.A.:	Çiçek-aseton ekstraktı
DPPH:	1,1'-Difenil-2-pikrilhidrazil
EDTA:	Etilen diamin tetra asetik asit
FCR:	Folin-Ciocalteu reaktifi
FRAP:	Demir(II) iyonu indirgeme gücü
FTC:	Ferrik tiyosiyanat
GAE:	Gallik asit eşdeğeri
GSH:	Glutatyon
GSH-Px:	Glutatyon peroksidaz
GSH-Red:	Glutatyon redüktaz
GSSG:	Okside glutatyon
HEM:	Hemoglobin
M.A.:	Meyve-aseton ekstraktı
M.S.:	Meyve-su ekstraktı

NADPH:	Nikotinamidadeninidinükleotid fosfat
NAS:	N-asetil sistein
NBT:	Nitrotetrazolium blue klorür
ORAC:	Oksijen radikalini absorplama kapasitesi
PKE:	Pirokateşol eşdeğeri
PMS:	Fenazin metasülfat
RNS:	Reaktif nitrojen türleri
ROT:	Reaktif oksijen türleri
RSS:	Reaktif sülfür türleri
SOD:	Süperoksit dismutaz
SR:	Serbest radikal
TBHQ:	t-bütil hidroksikinon
TEAC:	Trolox ekivalenti antioksidan kapasite
TPC:	Toplam fenolik madde
TRAP:	Toplam radikal tutma parametresi
Trolox:	6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilikasit
QUE:	Quersetin eşdeğeri
XOD:	Ksantinoksidaz

GİRİŞ VE AMAÇ

Antioksidanlar, serbest radikallerin sebep olduğu oksidasyonu engelleyen, serbest radikalleri yakalama ve dengeleme özelliğine sahip olan maddeler olarak tanımlanırlar. Antioksidanlar, serbest radikallerle reaksiyona girerek onların hücrelere zarar vermelerini engellerler (28).

Vücudun antioksidan aktivitesi, serbest radikallerin (SR) aktivitesinden daha az yoğun ise vücutta bir dengesizlik meydana gelir ve hücrelerde oksidatif hasar oluşumu başlar. Yaşın da ilerlemesi ile birlikte vücut daha fazla serbest radikale maruz kalır. Antioksidanlar SR hasarına karşı ilk savunma mekanizmasıdır.

Serbest radikalleri oluşturan nedenler temelde 2 gruba ayrılır. Endojen (bazı küçük moleküllerin otooksidasyonu, solunumsal patlama, peroksizomlar ve mitokondriyal elektron transferi) ve ekzojen (hava kirliliği, aşırı beslenme, ozon, radyasyon, UV ışınları, enfeksiyon, sigara dumanı, travma ve stres gibi faktörler) kaynaklar olarak sınıflandırılmaktadır.

Serbest radikaller, dış atomik orbitallerinde bir veya birden daha fazla eşleşmemiş elektron içeren enerji bakımından yüksek ve sabit olmayan bileşiklerdir. Eşleşmemiş elektronlar, serbest radikalleri oldukça reaktif bileşikler yaparak lipid, protein, DNA gibi birçok biyolojik materyale zarar vermelerine olanak sağlar (39).

Oksijen molekülü aerob organizmalar için son derece önemli bir elementtir. Yeryüzünde oksijensiz bir yaşam mümkün değildir. Fakat yüksek oranda yoğunlaşan bu element aerob organizmalar için toksik etki gösterebilir. Oksijen molekülünü bünyelerinde barındıran reaktif oksijen türleri, eşleşmemiş elektronlarından dolayı kimyasal olarak oldukça reaktif moleküllerdir.

Reaktif oksijen türleri olarak da bilinen en önemli serbest radikal türleri (ROT), süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikali ($\bullet OH$), singlet oksijen, radikalik olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) ve peroksinitrit ($ONOO^-$)'dir.

Bitkilerden elde edilen doğal antioksidanlar ROT'un zararlı etkilerini azaltmak için kullanılabilirler. Sentetik antioksidan olan bütillendirilmiş hidroksianisol ve bütillendirilmiş hidroksitoluen gibi maddeler de kullanılabilir ancak bu moleküllerin kullanımı risklidir. Bundan dolayı sentetik antioksidanların kullanımında son yıllarda birçok ülkede sınırlamalar getirilmiştir. Bu yüzden doğal antioksidanlara olan ilgi artmış ve doğal antioksidanlar ile ilgili araştırmalar hız kazanmıştır.

Çalışmamızda serbest radikalleri gidermede kullanılan sentetik antioksidanlara alternatif olabilecek üvezin, aseton ve su ekstraktlarının toplam antioksidan aktiviteleri farklı metodlar kullanılarak incelenmiştir. Antioksidan aktiviteyi belirlemek için ekstraktların toplam flavonoid içeriği, toplam fenolik içeriği, Fe^{+2} iyonlarını şelatlama aktivitesi, DPPH \bullet (1,1'-difenil-2-pikrilhidrazil) radikali giderme aktivitesi, H_2O_2 giderme aktivitesi, Fe^{+3} iyonlarını indirgeme kapasitesi, ABTS \bullet^+ (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfat)) radikali giderme aktivitesi, süperoksit radikali giderme aktivitesi, klorofil içeriği, antosiyanin içeriği, fosfomolibden metoduyla toplam antioksidan aktivitesi ve ferrik tiyosiyanat (FTC) metodu ile toplam antioksidan aktivitesi, hidroksil radikali giderme aktivitesi, bakır iyonlarını indirgeme potansiyeli (CUPRAC metodu), LC-MS/MS ile fenolik madde içeriği tayin edilmiştir. Sonuçlar standart olarak kullanılan α -tokoferol, kateşol, askorbik asit, gallik asit, kuersetin, gallik asit, BHA, BHT ve kateşin gibi antioksidan maddelerle ve literatürdeki veriler ile karşılaştırılarak yorumlanmıştır.

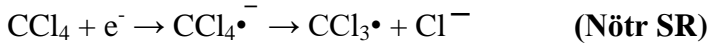
GENEL BİLGİLER

SERBEST RADİKALLER

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren oldukça yüksek reaktif moleküller olarak tanımlanırlar. Bir bileşik bir elektron kaybederek ya da bir elektron alarak serbest radikal oluşturabilir. Serbest radikaller genellikle kararsızdırlar ve oksijen (reaktif oksijen türleri: ROT), azot (reaktif azot türleri: RNT) ve sülfür (reaktif sülfür türleri: RST) kaynaklıdır (7).

Bir atom veya molekülün tek elektronunu göstermek için sağ önüne bir nokta konur (X•). Kimyasal bir bağ oluşması için iki elektron gereklidir. Serbest radikallerin oluşumu, bağ kopması sırasında bu iki elektrondan biri bir atomda, diğeri ise başka bir atomda kaldığı zaman serbest radikaller oluşur.

Serbest radikaller pozitif yüklü, nötral veya negatif yüklü olabilirler (40).



Serbest radikaller başlıca oluşum mekanizmalarına göre üç tiptir (2,10,21).

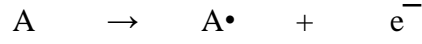
1) Kovalent bağların homolitik kırılması ile:

Homolitik kırılma, kırılması esnasında bağ yapısındaki iki elektrondan her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa böyle bir kırılma gerçekleşir. Homolitik kırılma sonucunda radikaller oluşur ve “serbest radikal reaksiyonları” adını alır.



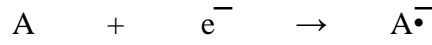
2) Normal bir molekülün elektron kaybetmesi ile:

Kararlı halde bulunan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa molekülün radikal hali oluşur.



3) Normal bir moleküle elektron tranferi ile:

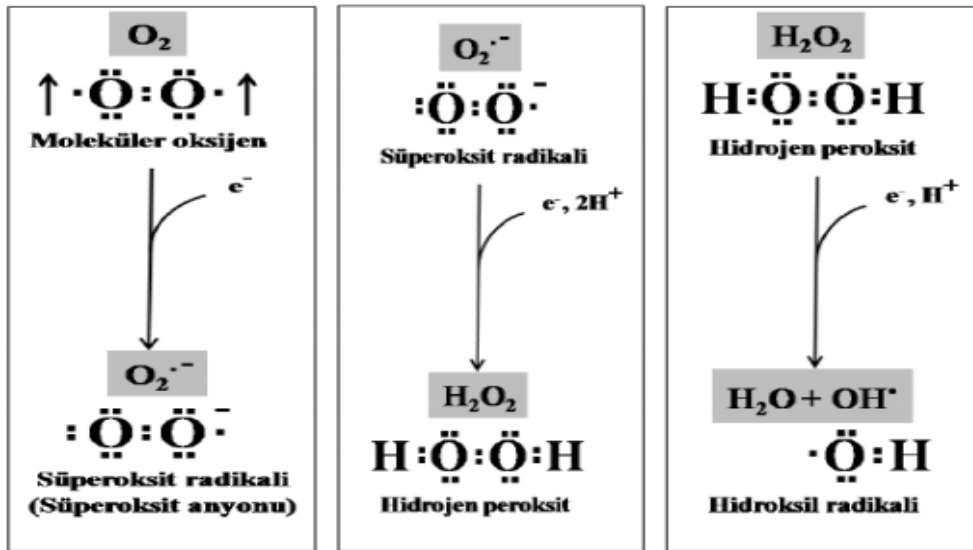
Kararlı halde bulunan bir moleküle tek bir elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluyorsa bu tür radikal oluşumuna sebep olabilir.



Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Reaktif oksijen türleri; normal metabolik faaliyetler, çevresel faktörler, normal fizyolojik ve patolojik aşamalar tarafından meydana gelebilir. Reaktif oksijen türlerinin başlatmış olduğu oksidasyon, ölümün ve hücre hasarının başlıca nedeni olarak görülür ve aynı zamanda kanser, damar tıkanıklığı, nörodejeneratif hastalıklar, DNA hasarı gibi birçok hastalıklarda rol oynarlar (7,16).

Moleküler oksijen, kendi radikal doğasının gereği büyük ölçüde ROT oluşturma eğilimindedir. (Şekil 1). Bunlar oldukça reaktif olan süperoksit radikali, hidroksil radikali ve radikal olmayan hidrojen peroksittir.



Şekil 1. Moleküler oksijenden ROT üretimi

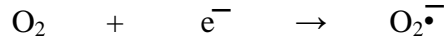
Reaktif oksijen türleri, serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatarak çeşitli radikalik olan ve olmayan yüksek aktiviteye sahip bileşiklerde vardır (Tablo 1).

Tablo 1. Serbest radikal türleri

Adı	Formülü	Özellikleri
Hidrojen radikali	H•	Bilinen en basit radikal
Süperoksit radikali	O ₂ • ⁻	Oksijen metabolizmasının ilk ana ürünü
Hidroksil radikali	HO•	En toksik oksijen metaboliti
Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂	Moleküler hasar yeteneği çok zayıf
Perhidroksi radikali	HO ₂ •	Lipid peroksidasyonunu artırır
Peroksil radikali	ROO•	Perhidroksile oranla daha zayıf etkili
Alkoksil	RO•	Organik peroksitlerin yıkımı ile üretilir

Süperoksit radikali (O₂•⁻)

Moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu, reaktif süperoksit radikali oluşur.

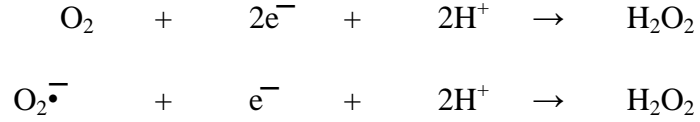


O₂•⁻ radikali uzun bir yarı ömre sahiptir, bu yüzden katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimleri inaktif hale getirip, glutatyon oksidasyonuna sebep olur. Ksantin oksidaz (XOD), siklooksigenaz, lipogenaz, NADPH oksidaz ve peroksidaz gibi enzimlerin aktivitesi O₂•⁻ üretmeye neden olur. Buna ek olarak, adrenalin, flavin nükleotidleri, tiyol bileşikleri ve glukoz gibi spesifik moleküllerin oksijen varlığında yükseltgenmesi ile O₂•⁻ oluşabilir. Demir ve bakır gibi geçiş metallerinin varlığı bu reaksiyonları oldukça fazla hızlandırabilir (7).

Hidrojen peroksit (H₂O₂)

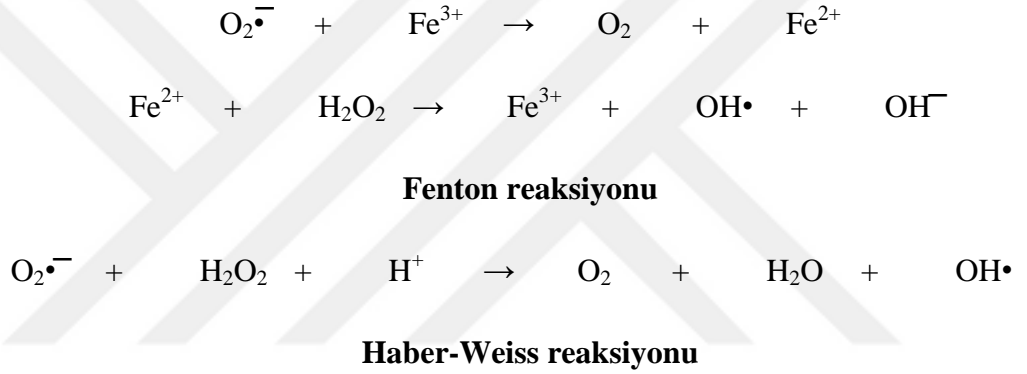
Hidrojen peroksit, biyolojik sistemlerde asıl olarak süperoksidin dismutasyona uğraması sonucunda oluşur. Burada görev alan enzim süperoksid dismutazdır. Ayrıca D-amino asit oksidaz tarafından da meydana gelebilmektedir (29).

Hidrojen peroksit süperokside bir elektron eklenmesi ve moleküler oksijene iki elektron eklenmesiyle oluşmaktadır (35).



Eşleşmemiş elektron içermediğinden dolayı radikal olarak kabul edilmez. Fakat reaktif oksijen türü olarak adlandırılır. Hücrenin plazma membranlarından kolayca geçebilir ve HEM proteinlerinin yapısını bozabilir. Bu bozunma sonucunda demir açığa çıkar (35).

Hidrojen peroksidin Fe^{2+} ve diğer geçiş elementleri (Cu, Zn, Mn, Cr, Co, Ni, Mo) varlığında indirgenmesi ile hidroksil radikali oluşturması **Fenton Reaksiyonu**, süperoksit radikali ile reaksiyonu sonucunda hidroksil radikali oluşması **Haber-Weiss Reaksiyonu** olarak bilinir (25).



Hidroksil radikali ($\bullet\text{OH}$)

Bilinen en reaktif ve en radikal tür olup, biyolojik sistemlerde üretilen bu radikal canlılarda iki temel mekanizma ile oluşabilir (18).

Bunlar; moleküler oksijene üç elektron eklenmesiyle ve H_2O_2 'nin UV ışığıyla etkileşmesi sonucu oluşur. Lipidlere, polipeptidlere, proteinlere ve DNA'ya zarar verebilmektedir.

Bu zararları şöyle sıralayabiliriz; DNA'da pürin ve primidin bazlarını kırar, amino asit kalıntılarını okside eder, lipid peroksidasyonlarında zincir başlatıcı olarak görev alır. Ayrıca DNA'da timin ve guanozin ile de reaksiyona girme özelliğine sahiptir (24).

Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$)

Oksijende bulunan elektronlardan birinin enerji alması sonucunda yörünge değiştirmesiyle oluşan singlet oksijen, radikal olarak kabul edilmez.

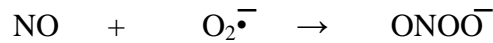
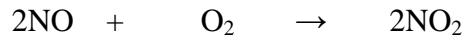
Çünkü yapısında eşleşmemiş elektron içermez bu nedenle reaktif oksijen molekülü olarak tanımlanır. Serbest radikal reaksiyonlarında başlatıcı olarak görev alan singlet oksijen H₂O₂'nin hipoklorit ile tepkimeye girmesiyle de oluşabilir.

Lipid peroksidlerinin oluşumuna neden olur ve kolesterolün oksidasyonunda görev alır. Singlet oksijen, delta ve sigma olmak üzere iki farklı şekilde bulunmaktadır. Singlet oksijenin inaktive olmasında görev alan moleküller; tokoferol, karotenoid, fenolik bileşikler ve askorbik asittir (22).

Nitrik oksit (NO•)

Azot merkezli bir radikal olan nitrik oksit, bünyesinde bir adet eşleşmemiş elektron içermektedir. Bu eşleşmemiş elektron bir adet azot atomuyla bir adet oksijenin birleşmesiyle ortaya çıkmıştır (38).

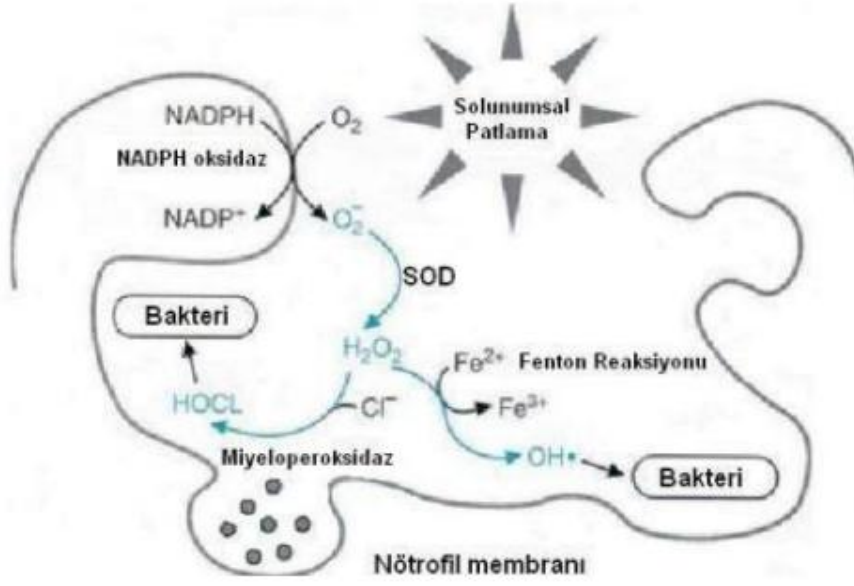
Vücutta nitrik oksit sentaz enziminin katalizörlüğünde L-arginin tarafından oluşturulur. Bu oluşum damarlarda bulunan endotel hücrelerde gerçekleşir ve damar gevşemesini sağlar. NO'ya oksijen bağlanması ile oluşan NO₂ daha da zehirli etkiye sahiptir. Ayrıca NO, ROS'lar ile tepkimeye girer ve peroksinitriti oluşturur.



Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynakları

Serbest radikallerin hücre içi kaynakları

Metabolizmanın işleyişi esnasında farklı basamaklarda serbest radikal yapısı içeren çeşitli ara ürünler meydana gelebilir (31). Bunlar; küçük moleküllerin otooksidasyonu, mitokondriyal elektron transport zinciri, mikrozomal membran elektron transferi zincirleri, çözünür enzimler ve proteinler, geçiş metallerinin görev aldığı indirgenme-yükseltgenme reaksiyonları, endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transfer sistemleri, peroksizomlar, plazma membranı ve solunumsal patlamadır (Şekil 2).



Şekil 2. Solunumsal patlama sırasında serbest radikal oluşumu

Serbest radikallerin hücre dışı kaynakları

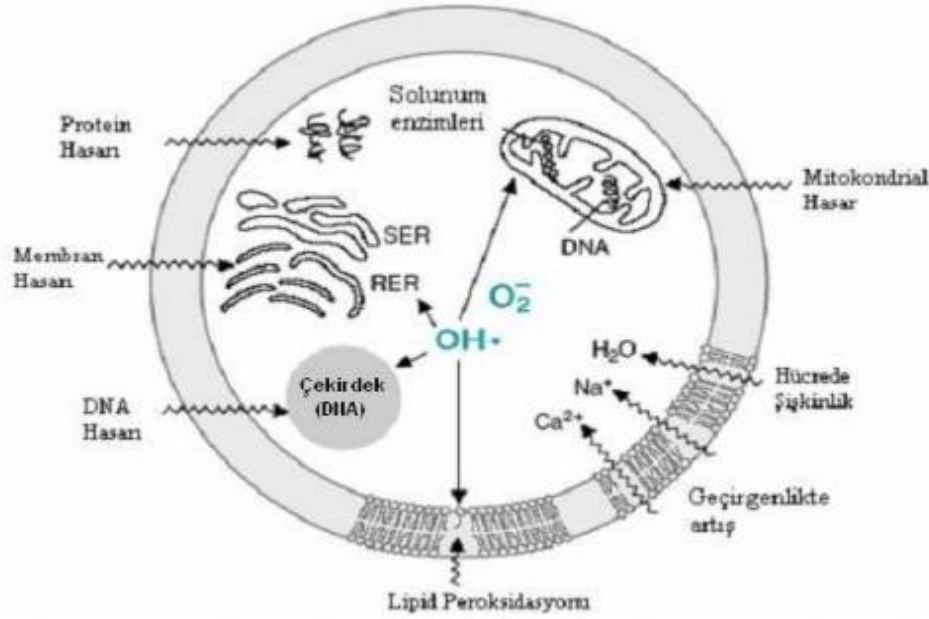
Normal metabolizmanın doğal yapısından kaynaklanmayan, sadece çeşitli dış etkenlerin etkisiyle oluşan reaksiyonlar sonucunda da serbest radikaller oluşur. Bu serbest radikalleri şu şekilde sınıflandırabiliriz; antineoplastik ajanlar, radyasyon, bağımlılık yapan maddeler, çevresel ajanlar ve stres.

Serbest Radikallerin Etkileri

Endoplazmik ve nükleer elektron transport sistemlerinde, peroksizomlarda, monosit ve nötrofillerin fagositozu gibi normal metabolik olaylarda bol miktarda serbest radikal üretilir. Yüksek konsantrasyonlarda serbest radikaller oksidatif strese sebep olur, bu durum proteinler, enzimler, amino asitler, lipitler, DNA ve karbonhidratlar da dahil olmak üzere vücudumuzda bulunan biyomoleküllerin her çeşidine zarar verebilecek bir süreçtir (7).

Zehirli atık durumda olan SR'ler, solunum ve sindirim gibi normal vücut faaliyetleri sırasında meydana gelirler. Eğer serbest radikaller nötralize edilmezlerse; hücre membranı proteinlerini yıkarak hücreleri öldürebilir, protein ve kükürt içeren enzimlerde hasara, denatürasyona, inaktivasyona ve çapraz bağlanmaya sebep olabilir. Amino asitlerin oksidasyonuna da sebep olduğu amino asitlerden kükürtlü olanların metiyonin, sistein gibi gereksede aromatik halkaya sahip olanların fenilalanin, triptofan ve trozin gibi, çoğunlukla reaktif oksijen metabolitleri tarafından oksitlenmeye eğilimli oldukları bilinmektedir (7).

Oksidasyonla modifiye edilmiş proteinler normal olarak hücrelere taşınır ve parçalanır, ancak bazıları zamanla aşamalı olarak birikebilir ve hücresel işlev bozukluğuna neden olabilir. Buna ek olarak, serbest radikaller membran protein ve lipitlerini yok edip hücrenin fonksiyonunu hücre membranını sertleştirerek yok eder ve dahası genetik kodu taşıyan hücrelerin büyümesini ve devamlılığını sağlayan DNA'ya da etki ederek bağışıklık sistemi hücrelerini yok etmeye neden olabilir (18).



Şekil 3. Serbest radikallerin neden olduğu hasarlar

ANTIOKSİDANLAR

Biyolojik sistemler serbest radikalleri nötralize etmek ve hücreleri zararlı etkilerden korumak için yeterince etkili olan yüksek oranda koruyucu sistemler ile donatılmıştır. Bunlar “antioksidanlar” veya “antioksidan savunma sistemleri” olarak adlandırılır.

Antioksidanlar dört şekilde etki ederler;

1.) Toplayıcı etki: Serbest oksijen radikallerine etki edip, onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle dönüştürme etkisi gösterir.

2.) Bastırıcı etki: Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya aktif olmayan forma dönüştürme etkisidir.

3.) Kırıcı etki: Serbest oksijen radikallerini bağlayarak, zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyerek etki gösterir.

4.) Onarıcı etki: Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılmasıdır.

Antioksidanların Sınıflandırılması

Antioksidanlar iki sınıfa ayrılır; enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar. Enzimatik antioksidanlar birincil veya ikincil enzimlerdir. Birincil enzimler olarak da bilinen en etkili antioksidan enzimler, glutatyon peroksidaz, katalaz, süperoksit dismutazdır, bunlar serbest radikallerin oluşumunu önler (7).

Benzer şekilde, peroksiredoksinler az miktarda peroksitleri nötralize etmede rol oynayan birincil enzim ailesindedir. Peroksiredoksinler, enzimatik aktiviteleri için kofaktöre bağımlı olmak yerine, hedef moleküllerin indirgenmesi için aktif sistein kalıntılarını kullanırlar (7).

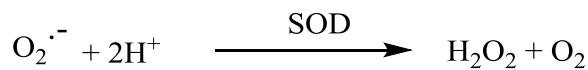
Enzimatik olmayan antioksidanlar, metabolik antioksidanlar veya besleyici antioksidanlardır. Metabolik antioksidanlar, melatonin, koenzim Q10, ürik asit, bilirubin, metal şelatlama proteinleri şeklinde sıralanabilir. Metabolik yollarla vücutta endojen olarak üretilenlerdir.

Besin antioksidanları, doğal gıdalardan veya vitamin C, vitamin E, karotenoidler, eser elementler gibi besinsel takviyeden elde edilen eksojen bileşiklerdir.

Enzimler

1-Süperoksit dismutaz (SOD) (Süperoksit Oksidoredüktaz, EC:1.15.1.1): Süperoksit dismutaz bir metalloenzimdir ve endojen olarak üretilmektedir. İnsanlarda iki izoenzimi bulunur bunlar; (Cu/Zn-SOD) ve (Mn-SOD) olup bakır, çinko ve mangan içerirler.

Vücudun en etkili antioksidan enzimlerinden biri ve canlı hücrelerde ROT'a karşı savunmanın ilk adımı olarak düşünülür. SOD, $O_2^{\cdot-}$ 'nin H_2O_2 'ye ve O_2 'ye dönüşümünü sağlar. Oluşan H_2O_2 daha sonra katalaz veya glutatyon peroksidaz aktivitesi ile uzaklaştırılabilir (34).



2-Glutatyon peroksidaz (GPx) (H_2O_2 Oksidoredüktaz, EC:1.11.1.9): Eritrosit ve dokularda bulunup bu enzim karşımıza iki formda çıkar; selenyum bağımlı (GPx) ve selenyum bağımsız (Glutatyon-S-transferaz GST).

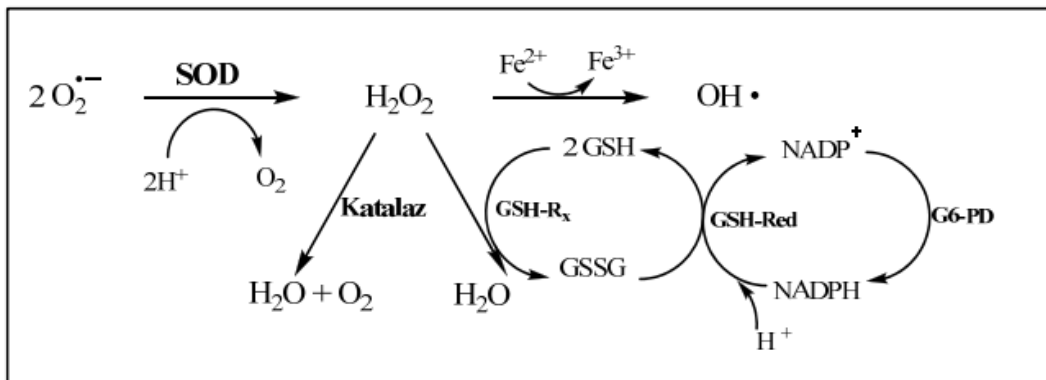
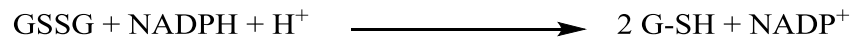
Bu antioksidan enzimler, alt birim sayısı, katalitik mekanizma ve aktif bölgelerindeki selenyumun bağlanması bakımından farklıdır. GPx H_2O_2 veya organik peroksidin suya veya alkole indirgenmesini katalize eder. Aynı zamanda hemoglobini ve hücre membranında bulunan lipitleri oksidatif strese karşı korur (33).



Bu işlemler GPx'in katalitik reaksiyonu sırasında GSSG'ye dönüştürülen, hücrelerde bol miktarda bulunan ve bir tripeptit olan GSH varlığında gerçekleşmektedir.

İnsanlarda dört glutatyon peroksidaz izoenzimi vardır.

3-Glutatyon redüktaz (GSH-Red) (EC:1.8.1.7): Hidroperoksitlerin glutatyon redüktaz etkisiyle indirgenmesinden meydana gelen okside glutatyonun (GSSG) indirgenmiş glutatyon (GSH) dönüşmesini gerçekleştirir ve bu reaksiyon NADPH tarafından sağlanır (2).



Şekil 4. Glutatyonun indirgenmesi

4-Glutatyon-S-Transferaz (GST) (EC:2.5.1.18): GST, iki alt birimden oluşan bir enzim ailesi olup, lipit peroksitlerine karşı özellikle araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitlerine karşı selenyum bağımsız glutatyon aktivitesi göstererek antioksidan savunma mekanizması oluşturur.



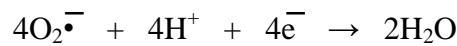
5-Katalaz (CAT) (H_2O_2 Oksidoredüktaz, EC: 1.11.1.6): Katalaz esas olarak peroksizomlarda bulunan tetramerik porfirin içeren enzimdir. Metalloenzim olarak da bilinmektedir (42).

H_2O_2 'nin suya ve moleküler oksijene iki aşamada dönüşümünü katalize eder. H_2O_2 süperoksit dismutaz enzim faaliyetleri sonucunda oluşmaktadır. Başlıca bulunduğu yerler mitokondri, peroksizom ve sitozoldür (32).



Katalaz, bilinen tüm enzimler arasında en büyük devir hızlarından (sayısından) birine sahiptir, dakikada yaklaşık 6 milyon H_2O_2 molekülünü H_2O ve O_2 'ye dönüştürebilir.

6-Mitokondriyal sitokrom oksidaz: Süperoksiti detoksifiye eder ve solunum zincirinin en son enzimidir.

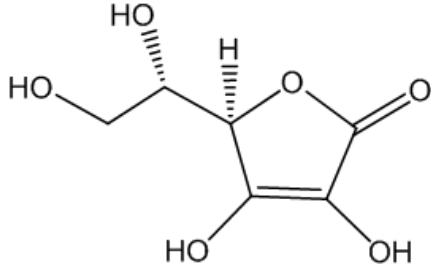


Fizyolojik şartlarda sürekli gerçekleşen bu reaksiyon normal bir reaksiyondur. Bu reaksiyon sayesinde yakıt maddelerinin oksidasyonu sona erer ve bol miktarda enerji üretimi (ATP) gerçekleşir.

7-Peroksiredoksinler: Peroksiredoksinler, peroksidaz ailesinden olup, H_2O_2 ve farklı alkil hidroperoksitler gibi peroksitleri doğrudan indirgeyebilen evrimsel olarak korunmuş antioksidan proteinlerdir. İzofromlarının bazıları oksidatif strese karşı koruyucu rol oynamakta, diğerleri ise H_2O_2 miktarını kontrol ederek sinyal vermeye devam etmektedir.

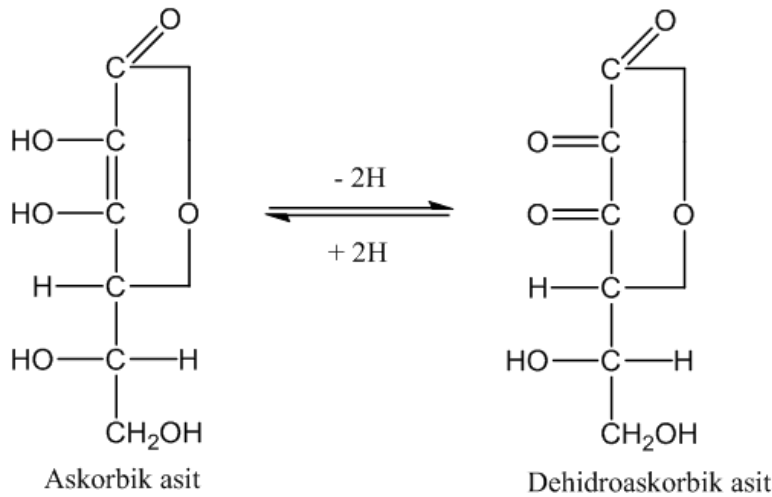
Yağda ve suda çözünen radikal tutucular

1-Askorbik asit (C Vitamini): Askorbik asit olarak da adlandırılan C vitamini, taze meyve ve sebzelerde doğal olarak bulunan, güçlü ve suda çözünebilir bir antioksidandır. İnsan organizması L-glukolakton oksidaz enzim eksikliğinden dolayı C vitaminini sentezleyemez, bu nedenle gıda ya da takviye yoluyla alınması gerekir.



Şekil 5. Askorbik asidin yapısı

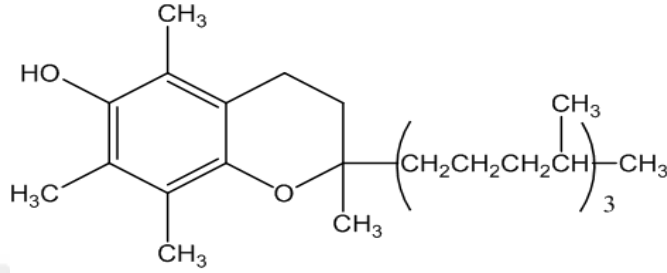
C vitamininin biyolojik açıdan en aktif hali, yüksek elektron verici gücü ve aktif indirgenmiş formuna dönüşüme hazır olması nedeniyle potansiyel bir antioksidan olan indirgenmiş formundaki L-askorbik asittir. Çok güçlü bir indirgeyici olan askorbik asit semihidroaskorbat radikal ara ürünü aracılığıyla kolaylıkla dehidroaskorbik aside okside olur (46).



Şekil 6. Askorbik asidin oksidasyonu

Bunlara ek olarak, hücre içi glutatyon miktarını arttıran bir role sahiptir. Proteinlerin tiyol gruplarını oksidasyona karşı korur. C vitaminin, E vitaminini yenileme özelliği de vardır (53).

2- α -tokoferol (E Vitamini): Vitamin E yağda çözünebilen, hücre membranlarında bol miktarda bulunan, lipid fazında zincir kırıcı önemli bir antioksidandır. Doğada sekiz farklı stereoizomerde bulunur; α , β , γ , δ tokoferol ve α , β , γ , δ tokotrienol. α tokoferol hücreler tarafından alınan ana membrana bağlı antioksidan olduğuna inanılan, yüksek antioksidan potansiyelli insanlardaki E vitamininin temel biyoaktif formudur (56).

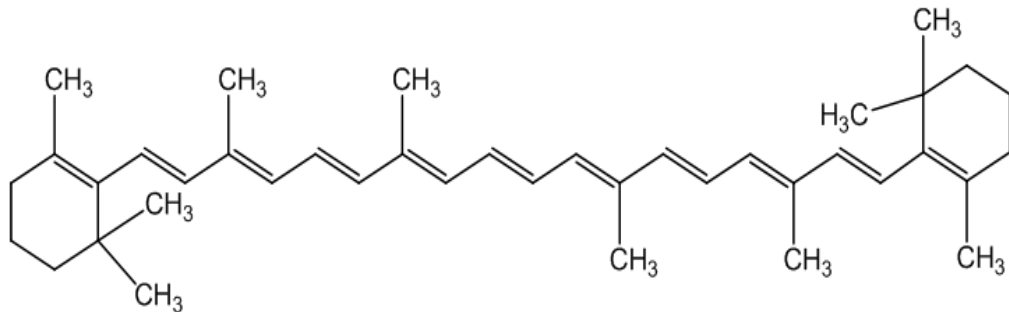


Şekil 7. α -tokoferolün yapısı

Tokoferol çeşitlerinin antioksidan aktivitelerinin sıralanması yapıldığında en başta α -tokoferol yer almaktadır. Hayati özelliği, peroksit, oksijen ve süperoksit anyon radikallerini süpürerek, lipid peroksidasyonuna karşı koruma yeteneğidir.

E vitamininin dışarıdan alınması gerekli olduğundan vücuda yüksek dozlarda alındığında, ne kadar alınırsa o kadar yüksek koruyucu etki gösterdiği ifade edilmiştir (58).

3-Karotenoidler: Karotenoidler yağda çözünen isoprenoid pigmentli bileşikler olup taze meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunur ve bunların sarı, turuncu, kırmızı renklerinden sorumludurlar. A vitamini öncüsü olan β -karoten (Şekil 8 ve Şekil 9) ve likopen en yaygın karotenoittir (26).

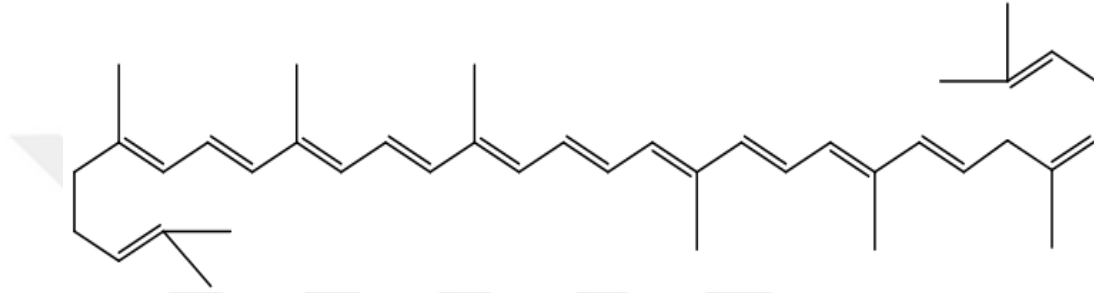


Şekil 8. β -karoten yapısı

Bu molekül 3-15 konjüge çift bağ içeren uzun polien zincirine sahiptir. Buradaki çift bağ sayısı arttıkça antioksidan özelliği de artmaktadır (41).

Karotenoidler ksantofiller ve hidrokarbonlar olmak üzere iki grupta incelenebilir. Karotenoidlerin ROT'un güçlü bir temizleyicisi olduğu bilinmektedir. Ayrıca singlet oksijeni fiziksel ve kimyasal olarak bastırabildiği bilinmektedir.

Alfa-tokoferol gibi β karotenin de biyolojik membranlarda etkili radikal tutucu antioksidan olarak görev yapabileceği bildirilmiştir. Düşük oksijen varlığında bile β -karoten peroksil radikalleriyle tepkimeye girerek onların hasarını azaltmaktadır. Bir diğer özelliği ise proteazları aktif hale getirmesidir (9).

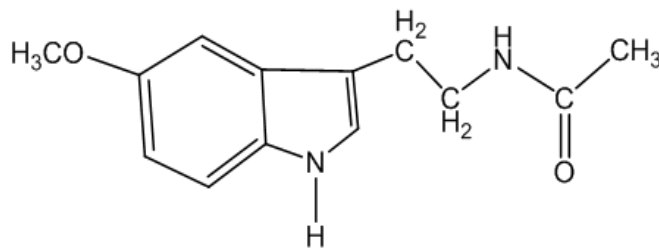


Şekil 9. Likopen yapısı

Likopen, serbest radikalleri etkili bir şekilde temizleyip, *in vitro* koşullarda H_2O_2 ve NO_2 'yi inaktif hale getirebilmektedir.

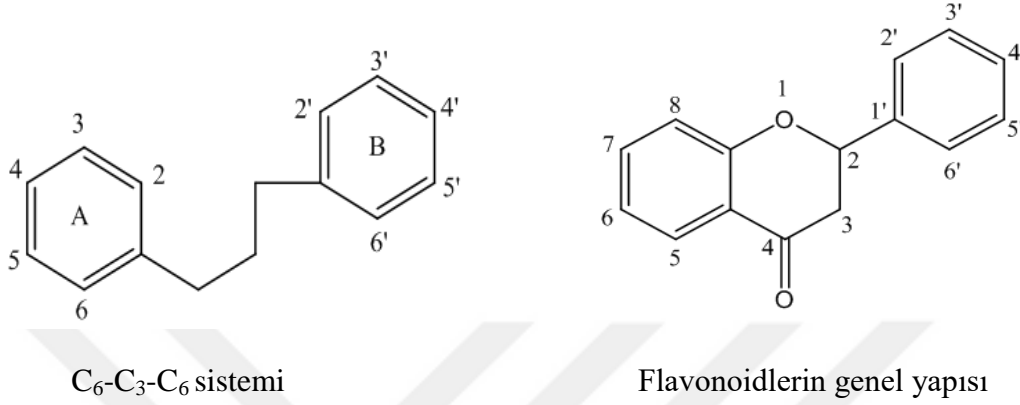
4-Melatonin (MLT): Oksidatif hasara karşı mücadele eden çok güçlü bir antioksidandır. Aynı zamanda endojen bir hormon olarak da görev yapmaktadır. Antioksidan aktivitesini, hidroksil radikalleri ile girdiği reaksiyon sonucu oluşan indol katyon radikalının ortamdaki süperoksit radikalini tutarak göstermektedir (2,57).

Günümüze kadar bilinen en güçlü antioksidan olarak kabul edilen melatonin, ayrıca vücudun biyolojik saatini korur, Alzheimer ve Parkinson hastalıklarında etkili bir hasar önleyicidir.



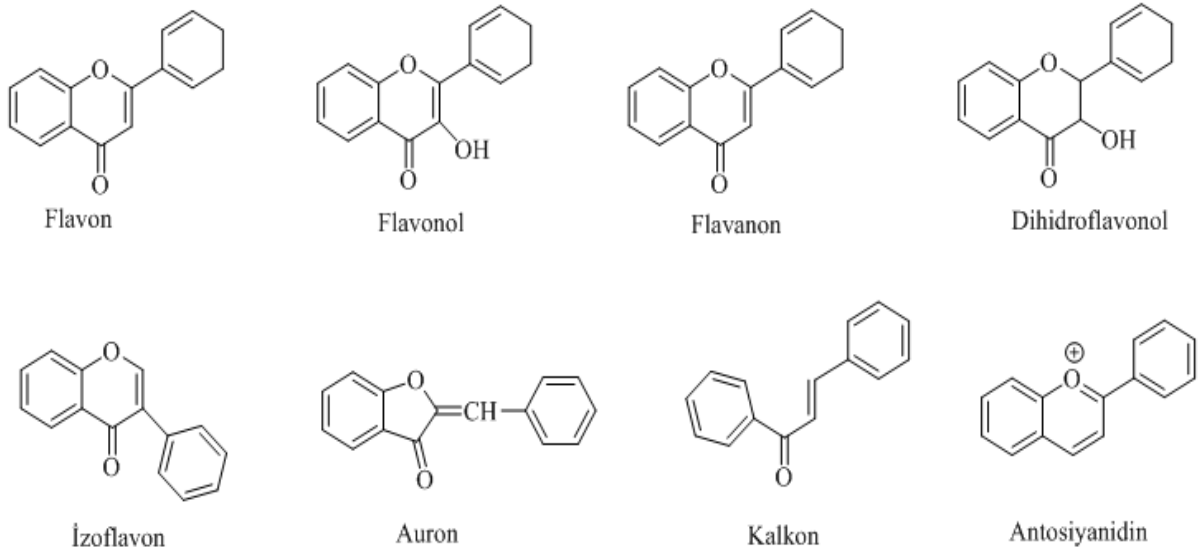
Şekil 10. Melatonin yapısı

5-Flavonoidler: Flavonoidler önemli bir fenolik bileşik grubudur. Yapılarında halka ve hidroksil grubu içerirler. Bu halka fenil halkası olup propan zinciri ile birleşmesinden oluşan, C₆-C₃-C₆ flavon iskeleti (Şekil 11) üzerine kurulmuştur. Bunlara ek olarak yapısında 15 tane karbon atomu bulundurmaktadır (51).



Şekil 11. C₆-C₃-C₆ sistemi ve flavonoidlerin genel yapısı

Bitkilerde gözümüze beyaz-sarı pigment olarak çarpan flavonoidler çeşitli sınıflandırmalara tabi tutulmuştur. Bunlar; flavon, flavonol, flavanon, dihidroflavonol, izoflavon, auron, kalkon, antosiyanidinlerdir. Flavonoid iskeletleri Şekil 12’de gösterilmiştir.



Şekil 12. Flavonoid iskeletleri

Flavonoidlerin güçlü antioksidan özellikleri vardır. Eğer bir flavonoid yapısında ne kadar çok OH grubu barındırıyorsa o kadar çok güçlü antioksidan etkinliği vardır. Flavonoidler reaktif oksijen türlerini inhibe edebilirler. Bu inhisyon yetenekleri metal şelatlama kapasitesi olan yapısal grupları sayesinde. Flavonoidler bitkisel kaynaklıdır ve ayrıca polifenoller grubuna da dahildirler. Lipidlerin peroksidasyonunu önleyebilmektedirler. En çok bilinen flavonoidler kuersetin ve kateşindir (50).

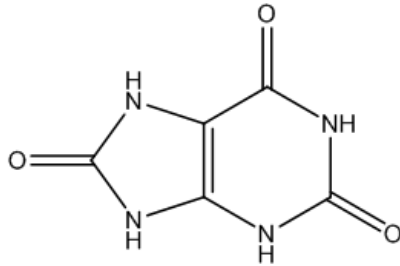
6-Glutatyon (GSH): Glutatyon, glutamik asit, sistein ve glisinden meydana gelen bir tripeptid olan glutatyon (Şekil 13) çok önemli bir antioksidandır. Tiyol grubunun sağladığı glutatyon, hidroksil ve singlet oksijen gibi daha birçok reaktif oksijen türlerinin temizleyicisi olmakla kalmayıp, diğer serbest radikallerle de reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korurlar.



Şekil 13. Glutatyon yapısı

7-Ürik asit: İnsan pürin metabolizmasının son ürünüdür ve antioksidan olarak davranır. Ürik asit singlet oksijen radikalının etkili bir temizleyicisidir (Şekil 14).

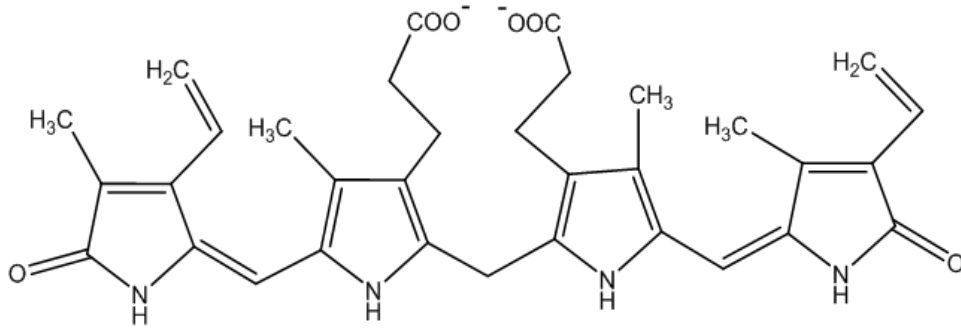
İnsan organizmasında bulunan miktarı yaklaşık 0,5 mmol/L'dir. Ürik asidin lipid radikalleri üzerine etkisi yoktur. Geçiş metalleri ile bağ yaparak C vitaminin oksitlenmesini engeller (7,44).



Şekil 14. Ürik asit yapısı

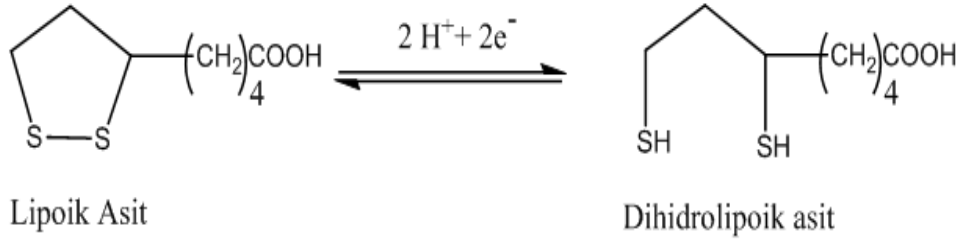
8-Bilirubin: HEM proteinlerinin parçalanması ile oluşan üründür. Peroksit radikallerinin toplayıcısı ve aktif bir süpürücüdür. OH radikali ve H₂O₂'ye karşı güçlü antioksidan etkiye sahiptir (Şekil 15).

Hücre içinde lipid peroksidasyonunda da bir antioksidan görevi vardır. Askorbat ve ürat antioksidanları gibi hücre plazmasında bulunur (64).



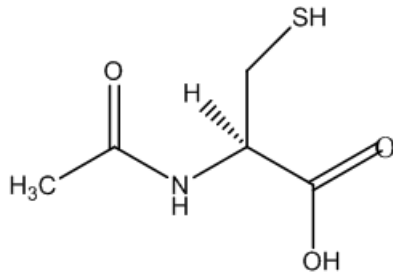
Şekil 15. Bilirubin yapısı

9-Lipoik Asit: Lipoik asit, dihidrolipoik asite indirgenirken serbest radikalleri temizleyip, ağır metal iyonlarıyla şelat oluşturarak antioksidan özelliği göstermektedir. (Şekil 16).



Şekil 16. Lipoik asidin dihidrolipoik aside indirgenmesi

10-N-asetil Sistein (NAS): Temeli sistein aminoasidi olan NAS'ın, endojen antioksidan sisteme katkısı glutatyon peroksidaz aktivitesini arttırmaktır (Şekil 17).



Şekil 17. N-asetil sistein yapısı

Metal iyonlarını bağlayan proteinler

Bu gruptaki proteinler albümin, transferin, ferritin ve seruloplazmindir. Bu proteinlerin ferrokسيداز tipi aktivitesi, demir bağımlı lipid peroksidasyonunu, hidrojen peroksit ve süperoksit iyonlarından hidroksil oluşumunu inhibe eder.

1-Albümin: Koruyucu antioksidan sisteminde görev alan albümin bakırı sıkı, demiri zayıf bağlar. Albümin moleküllerinde birer tane sülfhidril molekülü bulunmaktadır. OH radikalini etkisiz hale getirmekle görevlidir (63).

2-Transferrin: Demir transport proteinidir ve hücre plazmasında iyonik halde bulunan demirin etkinliğini azaltır (23).

3-Ferritin: Dokulardaki demiri toplayıp depolar ve kan dolaşımında bulunur.

4-Seruloplazmin: Bakır transportunda görev alır. Antioksidan özelliğe sahiptir ve bu özelliğiyle demir iyonuna bağımlı olan lipid peroksidasyonunu inaktive edip 2 değerlikli Ferro demiri (Fe^{2+}), 3 değerlikli Ferri demire (Fe^{3+}) yükseltir (23).

Eksojen antioksidanlar

Eksojen antioksidanlar üç farklı şekilde sınıflandırılırlar. Bunlar; vitamin eksojen antioksidanları, ilaç olarak kullanılan antioksidanlar ve gıdalardaki antioksidanlardır.

Besin Maddeleri ve Antioksidanlar

Çoğu gıda maddesinin bozulmasından sorumlu olan oksijen, gıdada bulunan karbohidrat, yağ ve proteinlere etki ederek gıdalarda kalite sorunlarına yol açmaktadır. Otoksidasyon olarak tanımlanan süreç, hava oksijeni ile gıda bileşenleri arasında kendiliğinden meydana gelir. Gıdalarda pek istemediğimiz lezzet ve koku oluşumlarına neden olmakta ve antioksidanlar bu durumda gıda katkı maddeleri olarak kullanılmaktadır (14).

Doğal antioksidanlar

Son yıllarda doğal antioksidanlara istek gittikçe artmakta bunun nedeni olarak sentetik antioksidanların kanserojen etkisi olduğu gösterilmektedir. Taze meyve ve sebzelerde bol miktarda doğal antioksidan bulunması nedeniyle günümüzde birçok bitkisel materyalden antioksidan elde etmek ve bunları kullanılabilir hale getirmek yaygınlaşmıştır (69).

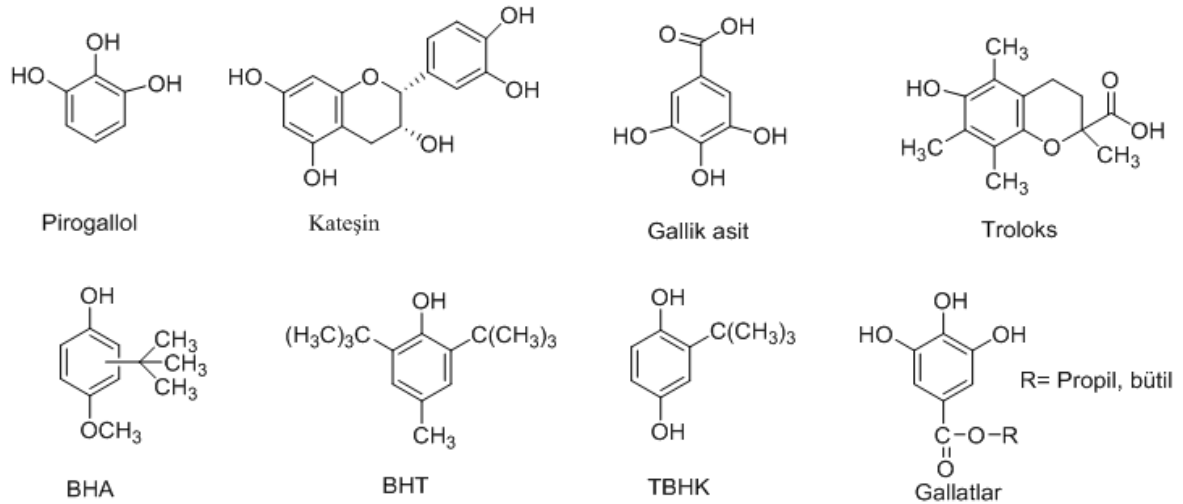
Doğal antioksidan içeren meyve ve sebzelerin tüketilmelerinin birçok hastalığa yakalanma riskini azalttığı yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Ancak doğal antioksidanlar sadece bitkisel kaynaklı olmayıp, hayvansal ürünlerde, enzimlerde ve mikroorganizmalarda da bulunmaktadır (30).

Polifenollerin bir grubu olan flavonoidler antimikrobiyal etki göstermektedir. Çünkü en güçlü antioksidanların fenolik bileşikler ve polifenolik bileşiklerden kaynaklandığı bilinmektedir. Koruyucu etki gösterdiği düşünülen bileşikler; genellikle bitkinin sekonder metabolitleridir.

Sentetik antioksidanlar

Günümüzde herhangi bir antioksidanı besinlere ilave etmemizin sebebi, o besini korumak ve raf ömrünü uzatmak istememizdir. Bu sebeplerle besinlere bütillendirilmiş hidroksitoluen, bütillendirilmiş hidroksianisol, t-butil hidroksikinin, trolox, gallatlar, sodyum benzoat, gallik asit ve kateşin gibi sentetik antioksidanlar ilave edilmektedir.

BHA yağların renk ve kokularını korumada sıklıkla kullanılan bütillenmiş hidroksianisoldur. Hem yağda hem de suda çözünebilir. BHT hayvansal yağlarda bol bulunur. Besinlere direkt eklenmesinde bir sakınca yoktur. İlaç, kozmetik sektöründe ve yağ sanayinde sıklıkla kullanılan bütillenmiş hidroksitoluendir. TBHK tersiyer butilhidrokinon olarak bilinir. Bitkisel yağlarda kullanılmasının yanı sıra gıdalarda katkı maddesi olarak da kullanılır (Şekil 18).



Şekil 18. Gıdalara ilave edilen sentetik antioksidanların yapısı

Antioksidan Aktivitesi Tayin Metodları

Son yıllarda önemli bir konu olan antioksidanlar, oksidatif stresle ilgili hastalıkları önleyebildikleri için birçok araştırmaya konu olmuşlardır. Gıdaların yapısında bulunan antioksidanların yapıları karmaşık olduğu için bu bileşiklerin ayrılması, çalışılması pahalı ve zordur.

Laboratuvar şartlarında, *in vitro* koşullarda antioksidan aktivite tayininde kullanılan yöntemler kimyasal reaksiyonlarına göre sınıflandırılacak olursa temelde ikiye ayrılır.

Hidrojen atomu transferine dayalı metodlar

1-ORAC(Oksijen radikalini absorplama kapasitesi) metodu

Oksijen radikalini absorplama kapasitesini tayin eden bir metottur. Bu metod hidrofilik zincir kırma tepkimelerinden faydalanmaktadır. Yöntemin ilerleyişi şu şekildedir; antioksidan içerdiğini varsaydığımız numune ve numuneyi içermeyen şahit için ölçüm yapılır, bu ölçüm floresans ölçümü ile kolaylıkla gerçekleştirilir. Prop olarak flurossein tercih edilir.

Peroksil radikalini başlatması için 2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorit (APPH) kullanılır ve bu APPH flurossein fluoresansında azalma gözlenir. Eğer antioksidan içerdiğini varsaydığımız numune gerçekten antioksidan içeriyorsa APPH radikali yok edilir. Yöntemin dezavantajı ısıya karşı gösterdiği hassasiyettir (37).

2-TRAP (Linoleik asit oksidasyonunun inhibisyonu) metodu

Yöntemin amacı plazma ve serum ortamında bulunan toplam antioksidanların varlığını ölçmektir. Metodun ilerleyişi şu şekildedir; radikal başlatıcısı olarak bilinen ABAP (2,2'-azobis(2-amidinopropan) hidroklorit) peroksil radikallerini üretmeye başlar. Gerçekleşen oksidasyon ile harcanan oksijen tayin edilir. Linoleik asit bir lipid substratıdır ve oksitlenebilme özelliğine sahiptir (19).

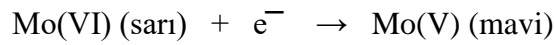
Elektron transferine dayalı metodlar

1-Folin-Ciocalteu ile Toplam Fenolik Bileşik Tayini

Bu yöntem adını Folin-Ciocalteu reaktifinden almaktadır ve toplam fenolik madde tayininde kullanılan bir yöntemdir. Bu reaktifin neden olduğu rengin konsantrasyonuna bağlı olarak absorbans ölçümü yapılmaktadır.

Metodun ilk kullanım amacı protein tayinleriydi fakat günümüze kadar daha da geliştirilerek toplam fenolik madde tayin metodu olarak kullanılmaktadır. Metodun avantajları; kolay ve tekrarlanabilir olmasıdır.

Dezavantajı ise; sadece belirli fenolik bileşiklere özgü bir yöntem olmaması, incelenen yapıda bütün fenolik maddeleri açığa çıkarmasıdır. Metodun ilerleyişi şu şekildedir; FCR bazık ortam varlığında fenolik bileşikler ile tepkimeye girer ve bu reaktifteki Mo(VI) indirgenir. Ortamda görünen renk sarı iken artık maviye döner ve 760 nm'de absorbans maksimumuna ulaşılır (27).

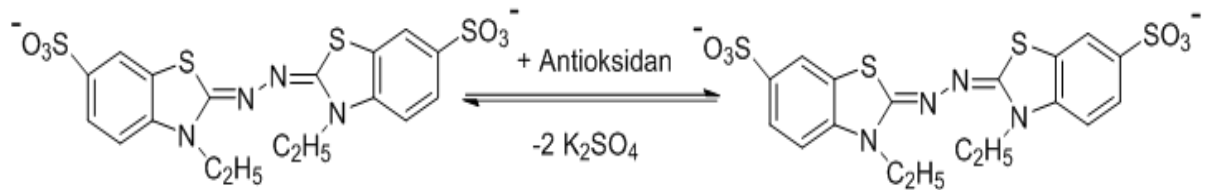


2-TEAC (Trolox ekivalenti antioksidan kapasite) metodu

Bu metod ABTS radikalinin antioksidanlar varlığında giderilmesi sonucunda renk değişiminin gözlenmesidir. ABTS radikalinin (2,2'-azinobis-(etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) ve rengi mavi-yeşildir. Dayanıklı bir radikal katyon olan ABTS⁺ radikalinin absorbansı spektrofotometrede 734 nm'de takip edilir (Şekil 19).

ABTS bileşimini potasyum persülfatla okside ettiğimizde oluşan bileşik ABTS⁺ radikalidir. Metodun ilerleyişinde ortama antioksidan ilave etmeden ilk olarak bu radikal katyonu oluşturmamız, ardından antioksidan ilave etmemiz gerekmektedir.

Tepkimeler sonucunda absorbans değeri spektrofotometrede azalma gösterir, daha sonra ise troloks eşdeğeri olarak hesaplama yapılır ve sonuç TEAC (trolox eşdeğeri antioksidan kapasite) değeri olarak verilir (5).



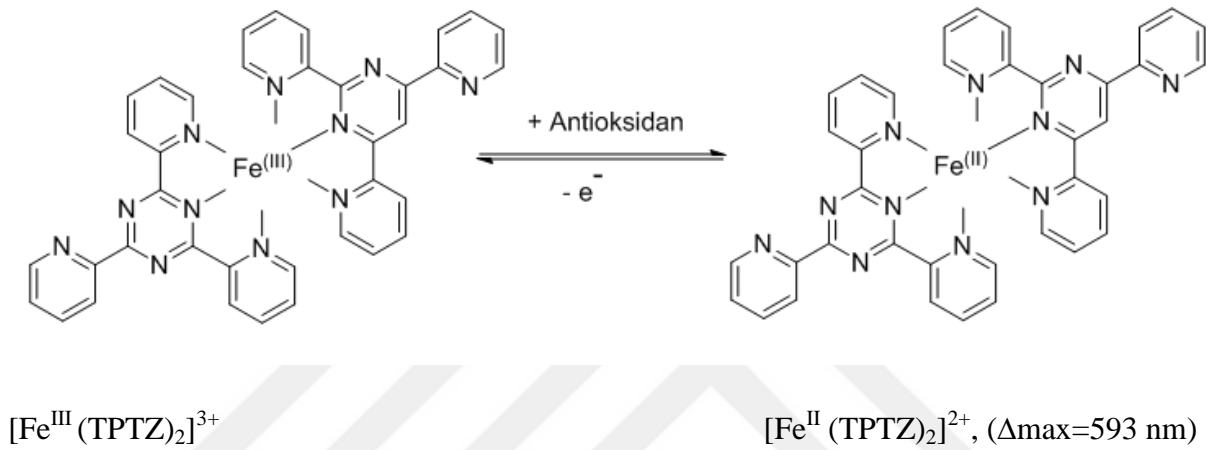
ABTS•⁺ (Δ_{max}=734 nm)

ABTS²⁺ (renksiz)

Şekil 19. ABTS radikalinin antioksidan ile etkileşimi

3-FRAP (Fe^{3+} İyonu İndirgeme Gücü) Metodu

Ferri iyonu indirgeme antioksidan potansiyeli olarak bilinen bir metottur. Yöntemin ilerleyişi şu şekildedir; düşük pH'da (Fe^{3+} -tripiridiltriazin) kompleksi antioksidanların varlığında (Fe^{2+} -tripiridiltriazin)'ye indirgenir (Şekil 20). Yöntemin hem avantajı hem dezavantajları mevcuttur. Yöntem basit ve kolay uygulanabilir ancak buna karşın koruyucu özelliğe sahip antioksidanlarla ilgili yeterli bilgi sağlayamamaktadır (15).



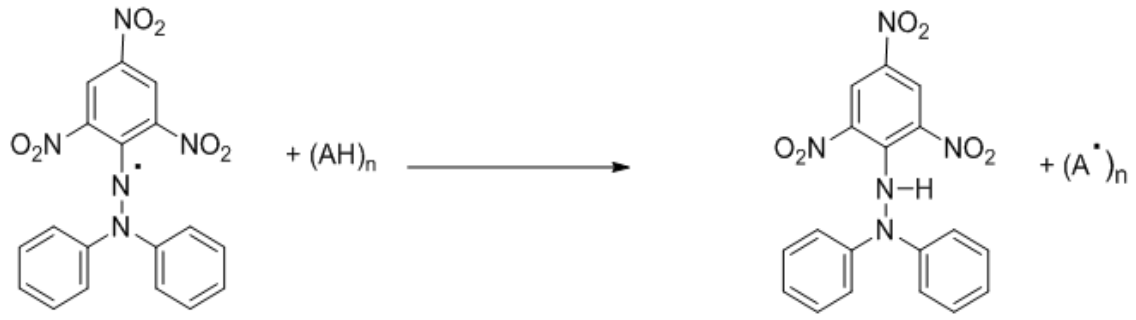
Şekil 20. Fe^{III} tuzlarının antioksidan ile etkileşimi

4-DPPH radikali giderme metodu

Bu metod radikal süpürme yeteneğine sahip antioksidanların etkinliğini tayin etmektedir. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) stabil bir serbest radikaldir. Bu radikalin ortamdaki etanol varlığında rengi mordur. (Şekil 21).

Yöntemin ilerleyişi şu şekildedir; ölçüm alınmak istenen ortama DPPH çözeltisi eklenir, eğer ortamda antioksidan madde bulunuyorsa mor olan renk artık rengini sarı renge bırakır. Bu sarı renk bize difenilpikrilhidrazine dönüşüm olduğunu gösterir ve maksimum absorban 515 nm'de ölçülür.

Tayin sonunda EC_{50} değeri elde edilir bu başlangıçta bulunan DPPH konsantrasyonunu %50 azaltabilmek için gereken antioksidan miktarıdır ve aynı zamanda antiradikal etkinlik olarak da adlandırılır. EC_{50} değeri ne kadar düşükse antioksidan kapasitesi o kadar güçlüdür diye ifade edilir (19).



Şekil 21. Antioksidan tarafından DPPH radikalinin indirgenmesi

Diğer Metodlar

In vitro şartlarda antioksidanların serbest radikalleri yakalama kabiliyetlerinin ölçümü için bazı yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar; $O_2^{\bullet-}$ radikali giderme kapasitesi, $OH^{\bullet-}$ radikali giderme kapasitesi ve peroksinitrit ($ONOO^-$) giderici kapasitedir.

Çalışmada Kullanılan Meyve ve Genel Özellikleri

Sorbus (üvez) *L.* cinsi gülgiller (*Rosaceae*) familyasında yer almaktadır. Ülkemizde doğal olarak yayılış gösteren 12 türü ve 17 taksonu vardır (33). Bunlardan en önemlileri üvez (*Sorbus domestica L.*), akçaağaç yapraklı üvez (*Sorbus torminalis*) ve kuş üvezi (*Sorbus aucuparia*)'dir. Ülkemizde yetişen *Sorbus* türleri farklı yörelerde değişik isimlerle (eyvaz, ivaz, ivez, övez gibi) anılmaktadır (12).

Sorbus domestica L. türü genel olarak 5-10 m yüksekliğinde olan, kışın yapraklarını döken, Mayıs-Haziran ayında beyaz renkli çiçekler açan bir ağaçtır (Şekil 22) ve (Şekil 23), (12).



Şekil 22. Üvez (*Sorbus domestica L.*) meyveleri

Türkiye’de Kuzey Anadolu’nun Batı bölümü, İç Anadolu’nun kuzeyi, Marmara bölgesi ve Trakya’da yabancı olarak yetiştiği gibi, meyveleri için birçok bölgede bahçe tarımı da yapılmaktadır (13). Yayılış alanı içerisinde (1000-1300 m) kuraklığa oldukça dayanıklıdır.

Üvez meyvelerinde tanenler, uçucu yağlar, organik asitler, renk pigmentleri, fenolik asitler ve bunların türevleri bulunmaktadır. Bunlardan başlıcaları; benzoik asit türevleri, sinamik asit türevleri, kafeik asit, ferulik asit ve klorojenik asittir. Meyvelerinde bunlara ilaveten kuersetin, rutin gibi flavonoidler bulunmaktadır.



Şekil 23. Üvezin (*Sorbus domestica* L.) yaprak ve çiçeği

Üvez besin değeri yüksek bir meyvedir ve geleneksel olarak anti-diyabetik ajan şeklinde kullanılmaktadır. Kurutulmuş meyveleri diyabetin semptomlarına iyi geldiği için anti-diyabetik (hipoglisemik) ajan olarak tip-2 diyabette kullanılır.

Üvezin çeşitli kısımları modern tıpta ve alternatif tıpta oldukça çok kullanılmaktadır. Meyveleri ve yaprakları konstipasyon edici etkilerinden dolayı infüzyon (çay) halinde (%5’lik), yaprakları ise infüzyon (çay) halinde (%5’lik) şeker hastalığına karşı kullanılmaktadır (13).

Bu tez çalışmasında üvez meyvelerinin ve çiçeklerinin antioksidan etkisinin olup olmadığı çeşitli metodlar kullanılarak incelenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

GEREÇ

Bitki Örnekleri

Deneyde kullanılan bitkisel materyal üvez, Kırklareli ilinin Babaeski ilçesinden Eylül ayında toplandı. Bitkilerin yaprakları, çiçekleri ve meyveleri birbirinden ayrıldıktan sonra derin dondurucuda kullanılmaya kadar bekletildi.

Kimyasal Maddeler ve Ekipmanlar

Analizlerde kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıkta olup, Merc ve Sigma-Aldrich'ten satın alındı.

Çalışmalarda analitik terazi (presica X13 220A), çalkalamalı su banyosu (Clifton 100-400 rpm;termostatlı), spektrofotometre (Shimadzu UV-1601), pH-metre (WTW pH 3L5i), santrifüj (MSE Mıstral 2000), soğutmalı santrifüj (Hettich 38 R), LC-MS/MS (Agilent Technologies 6420 Triple Quad), mikro pipetler ve eppendorflar kullanılan başlıca ekipmanlardır.

Kullanılan Kimyasal Çözeltiler

% 2'lik Na₂CO₃ Çözeltisi: 2 g Na₂CO₃ tartılarak destile su ile balon jodede 100 mL'ye tamamlandı.

Folin-Ciocalteu Reaktifi: Ticari olarak satın alındığı şekilde kullanıldı.

% 5'lik Sodyum Nitrit Çözeltisi: 5 g NaNO_2 tartılarak balon jojede destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

% 10'luk $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ Çözeltisi: 10 g $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ tartılarak balon jojede destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

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

0.1 M Fosfat Tamponu (pH=7.4): KH_2PO_4 (13.609 g/L) ve Na_2HPO_4 (14.196 g/L) çözeltilerinin pH= 7.4 olacak şekilde (yaklaşık 60/225 mL oranında) karıştırılması ile hazırlandı.

40 mM H_2O_2 Çözeltisi: 0.409 mL H_2O_2 alınarak balon jojede 0.1 M fosfat tamponu (pH=7.4) ile 100 mL'ye tamamlandı.

0.2 M Fosfat Tamponu (pH=6.6): KH_2PO_4 (27.218 g/L) ve $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (35.598 g/L) çözeltilerinin pH=6.6 olacak şekilde karıştırılması ile hazırlandı.

1 mM DPPH Çözeltisi: 0.01972 g DPPH tartılarak etanolde çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı. (Günlük hazırlanır ve ışıktan korunur.)

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

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

% 0.1'lik FeCl_3 Çözeltisi: 0.1666 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tartılarak destile suda çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

2 mM FeCl_2 Çözeltisi: 0.0398 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ tartılarak destile suda çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

5 mM Ferrozin Çözeltisi: 0.0616 g Ferrozin tartılarak destile suda çözüldü ve balon jojede 25 mL'ye tamamlandı.

156 μM NBT (Nitrotetrazoliumblue klorür) Çözeltisi: 0.0128 g NBT tartılarak 0.1 M fosfat tamponunda (pH=7.4) çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

468 µM NADH (Nikotin amid adenin di nükleotid) Çözeltisi: 0.0332 g NADH tartılarak 0.1 M fosfat tamponunda (pH=7.4) çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

60 µM PMS (Phenozinemetha sülfat) Çözeltisi: 0.0018 g PMS tartılarak 0.1 M fosfat tamponunda (pH=7.4) çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

4 mM Amonyum Molibdat Çözeltisi: 0.2964 g Amonyum molibdat tartılarak destile suda çözüldü ve balon jojede 60 mL'ye tamamlandı.

28 mM Sodyum Fosfat Çözeltisi: 0.2754 g Sodyum fosfat tartılarak destile suda çözüldü ve balon jojede 60 mL'ye tamamlandı.

0.6 M Sülfürik Asit Çözeltisi: 1.9 mL der. H₂SO₄ (18.76 M) çözeltisinden alınarak içinde bir miktar destile su bulunan 60 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve destile su ile tamamlandı.

Belirteç Çözeltisi: Eşit miktarlarda alınan amonyum molibdat, sodyum fosfat ve sülfürik asit çözeltilerinin karıştırılmasıyla hazırlandı.

% 80'lik Aseton Çözeltisi: 40 mL saf asetona alınarak destile su ile balon jojede 50 mL'ye tamamlandı.

7 mM ABTS Çözeltisi: 8 mg ABTS tartılıp 1 mL suda çözülür. 13.2 mg potasyum persülfat tartılıp 10 mL suda çözülür. Çözeltilerden 0.5'er mL karıştırılır ve 12-16 saat oda sıcaklığında karanlıkta bekletilir. ABTS çözeltisi kullanılmadan önce absorbanansı 734 nm'de 0.7 ± 0.025 olacak şekilde 0.1 M fosfat tamponuyla (pH=7.4) seyreltilir.

% 4'lük Vanilin-Metanol Çözeltisi: 2 g vanilin tartılıp 50 mL'ye metanolla tamamlandı.

0.04 M Fosfat Tamponu (pH=7): KH₂PO₄ (5.44 g/L) ve Na₂PO₄ (5.68 g/L) çözeltileri pH=7 olacak şekilde karıştırıldı.

Linoleik Asit Emülsiyonu: 175 mg Tween-20 ve 155 µL linoleik asidi fosfat tamponuyla 50 mL'ye tamamlayarak hazırlandı.

% 75'lik Etanol Çözeltisi: 375 mL saf etil alkol alınarak destile su ile balon jojede 500 mL'ye seyreltilir.

% 30'luk NH₄SCN Çözeltisi: 30 g NH₄SCN tartılarak destile suda çözüldü, balon jodede 100 mL'ye tamamlandı.

% 3.5'luk HCl Çözeltisi: 9.46 mL der. HCl (%37'lik) çözeltisinden pipetle alınarak içinde bir miktar destile su bulunan 100 mL'lik balon jodaye aktarıldı ve destile su ile tamamlandı.

20 mM FeCl₂ Çözeltisi: 0.398 g FeCl₂.4H₂O tartılarak %3.5'luk HCl ile balon jodede 100 mL'ye tamamlandı.

0.2 M Fosfat Tamponu (pH=7.4): KH₂PO₄ (27.218 g/L) ve Na₂HPO₄.2H₂O (35.598 g/L) çözeltilerinin pH=7.4 olacak şekilde karıştırılması ile hazırlandı.

10 mM 2-deoksiriboz Çözeltisi: 0.1341 g 2-deoksiriboz tartılarak destile suda çözüldü ve balon jodede 100 mL'ye tamamlandı.

10 mM FeSO₄-EDTA Çözeltisi: 0.5702 g FeSO₄-EDTA tartılarak destile suda çözüldü ve balon jodede 100 mL'ye tamamlandı.

10 mM H₂O₂ Çözeltisi: 0.102 mL H₂O₂ alınarak balon jodede 0.1 M fosfat tamponu (pH=7) ile 100 mL'ye tamamlandı.

% 2.8'lik TCA Çözeltisi: 2.8 g Trikloro asetik asit tartılarak destile suda çözüldü ve balon jodede 100 mL'ye tamamlandı.

50 mM NaOH Çözeltisi: 0.2 g NaOH tartılıp destile suda çözüldü ve balon jodede 100 mL'ye tamamlandı.

% 1'lik TBA Çözeltisi: 1 g tiyobarbitirik asit tartılıp destile suda çözüldü ve balon jodede 100 mL'ye tamamlandı.

10⁻² M CuCl₂ Çözeltisi: CuCl₂.2H₂O'den 0.4262 g tartılarak destile su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Amonyum asetat tamponu: 1 M (pH=7), NH₄Ac'den 19.27 g tartılarak destile su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Neokuproin çözeltisi: 7.5×10⁻³ M, Neokuproin (2.9 dimetil 1-10 fenantrolin)'den 0.039 g tartılarak %96'lık etil alkol ile 25 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

KULLANILAN YÖNTEMLER

Ekstraktların Hazırlanışı

Derin dondurucudan alınan taze bitki materyali blender yardımıyla öğütülerek homojenize hale getirildi, aseton ve su çözücüleri kullanılarak ekstraktlar hazırlandı.

Aseton ekstraksiyonu için 25'er g meyve ve çiçek 500 mL çözücü içinde oda sıcaklığında çalkalamalı su banyosunda 100-150 rpm'de 3 saat inkübe edildi. Elde edilen ekstraktlar, süzgeç kağıdında süzüldü ve süzüntülerin çözücüleri evaporatörde 40 °C' de uçuruldu.

Su ekstraksiyonu için 25 g meyve, 500 mL suda 30 dk boyunca manyetik karıştırıcıda ısıtılarak karıştırıldı. Elde edilen su ekstraktları süzgeç kağıdından süzüldü ve süzüntü liyofilize edildi.

Ekstrelerin susuz kalıntıları 0.001 g'lık porsiyonlara ayrılarak eppendorflara konuldu ve kullanılmaya kadar derin dondurucuda muhafaza edildi.

Toplam Fenolik Bileşik Tayini (TPC)

Üvez (*Sorbus domestica* L.) meyvesi ve çiçeklerinin su ve aseton ekstraktlarında bulunan toplam fenolik madde içerikleri Slinkard ve Singleton tarafından modifiye edilen Folin-Ciocalteu metoduna (FCR) göre belirlenmiştir (61). FC reaktifi fosfotungstik ($H_3PW_{12}O_{40}$) ve fosfomolibdik ($H_3PMo_{12}O_{40}$) asitlerin karışımı olup fenol oksidasyonu sırasında bu oksitler mavi renkli bileşiklere indirgenir. Bu renk değişimi polifenolik bileşik miktarı ile doğru orantılı olup 760 nm'de spektrofotometrede takip edilir.

Bitkilerin 1000 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan aseton ve su ekstraktlarından 1 mL alındı. Destile suyla hacimler 46 mL'ye tamamlandıktan sonra 1 mL Folin beliteci eklendi. 3 dakika sonra % 2'lik Na_2CO_3 çözeltisinden 3 mL katılarak oda şartlarında 2 saat çalkamalı su banyosunda 150 rpm'de tutuldu. Örnek yerine destile su içeren şahit denemeye karşı, 760 nm'de absorbans ölçüldü.

50-250 µg/mL olacak şekilde hazırlanan standartlar (gallik asit ve pirokateşol) için grafikler çizildi. Okunan absorbans ile konsantrasyon arasında çizilen grafiklerin denklemlerinden ekstraktların toplam fenolik madde miktarları g ekstrakt başına mg olarak hesaplandı.

Toplam Flavonoid İçeriğinin Tayini

Bitkilerin su ve aseton ekstraktların bulunan toplam flavonoid madde içeriği Zihishen ve arkadaşlarının uyguladığı metoda göre belirlendi (70).

Bitkilerin 1000 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan su ve aseton ekstraktlarından 10 mL alındı. Üzerine 1 mL %5'lik sodyum nitrit ilave edilerek 6 dk bekletildi ve flavonoid-alüminyum kompleksi oluşturmak için 1 mL %10'luk alüminyum nitrat eklendi. 6 dk sonra 10 mL %4.3'lük NaOH ilave edildi ve toplam hacim destile su ile 25 mL'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında 15 dk sonra son çözelti iyici karıştırıldı ve 510 nm'de şahite karşı absorbansı ölçüldü.

Standart olarak kullanılan 50-250 µg/mL konsantrasyondaki gallik asit ve kuersetin için de aynı deneme yapıldı. Okunan absorbans ile konsantrasyon arasında çizilen grafiklerin denklemlerinden, örneklerin toplam flavonoid madde miktarları mg gallik asit/g taze ekstrakt ve mg kuersetin/g taze ekstrakt olarak tanımlandı.

Demir (II) İyonlarını Şelatlama Aktivitesinin Tayini

Farklı konsantrasyonlardaki ekstraktların Fe²⁺ iyonlarını şelatlama aktivitesi Oyaizu ve arkadaşlarının metoduna göre yapıldı (48). Metod Fe²⁺ iyonlarını bağlamak üzere, güçlü bir demir şelatlayıcı olan ferrozin reaktifi ile ortamda bulunan metal bağlayıcı bileşiklerin yarışmasına dayanır. Şelatlama gücü yüksekse kırmızı renkli Fe²⁺/ferrozin kompleksinin oluşumu engellenir.

0.4 mL ekstrakta 0.05 mL 2 mM FeCl₂ çözeltisi eklendi. Reaksiyon 0.2 mL 5mM Ferrozin çözeltisi ilave edilerek başlatıldı. Toplam hacim etanolle 4 mL'ye ayarlandı. Sonra karışım vorteksle hızlıca karıştırılıp 10 dk oda sıcaklığında bekletildi.

Bu süre sonunda absorbansları 562 nm'de okundu. Kontrol; ferrozin ve FeCl₂ içermektedir. Standart olarak askorbik asit, EDTA, BHA ve BHT kullanıldı. Aşağıdaki denkleme göre % metal şelatlama etkisi değeri hesaplandı.

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

A_{kontrol} : Kontrolün absorbansı

A_{örnek} : Örnek ya da standartların absorbansı

DPPH• Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini

Serbest radikal yakalama etkinliği deneyi DPPH• (1,1 difenil-2-pikrilhidrazil) radikali kullanılarak Blois'in metoduna göre çalışıldı (17). Metod ekstraktların bir proton veya bir elektron verebilme yeteneğinin, mor renkli DPPH zeltisinin rengini aması esasına dayanır. Reaksiyon karışımının absorbandsının düşmesi yüksek serbest radikal giderme aktivitesinin göstergesidir.

Ekstraktlar ve standartlar 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlandı. 3 mL 0.1 mM DPPH zerine farklı konsantrasyonlardaki ekstrakt ve standart çözeltilerden 1 mL eklendi. Vorteksle karıştırdıktan sonra oda şartlarında karanlıkta 30 dk bekletildi. 517 nm'de absorbandları okundu. Kontrol olarak sadece etil alkol kullanıldı. Standart olarak askorbik asit, BHA, BHT, α-tokoferol kullanıldı. Aşağıdaki denkleme göre % DPPH• yakalama etkisi değerleri hesaplandı.

$$\text{DPPH• yakalama etkisi (\%)} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{rnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

A_{kontrol} = Kontrolün absorbandsı

$A_{\text{örnek}}$ = örnek ya da standartların absorbandsı

H₂O₂ Giderme Aktivitesinin Tayini

Ekstraktların H₂O₂ giderme aktivitesinin tayini Ruch ve arkadaşlarının belirledikleri metoda göre yapıldı (59). Reaksiyon ortamına eklenen belirli miktardaki hidrojen peroksit çözeltisinin ekstrakt tarafından giderilmesi 230 nm'deki absorbands değişimiyle ölçülür.

3.4 mL fosfat tamponu (100 mM pH=7.4) ve 0.6 mL H₂O₂ çözeltisine (100 mM, pH=7.4 fosfat tamponunda 40 mM) 1 mL ekstrakt ilave edildi. Absorbans 10 dk sonra 230 nm'de okundu. Kontrol; fosfat tamponu (100 mM, pH=7.4) ve H₂O₂ zeltisi içermektedir. Standart olarak askorbik asit, BHA, BHT ve α-tokoferol kullanıldı. Ekstraktlar ve standartlar 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlandı. Aşağıdaki denkleme göre % H₂O₂ giderme etkisi değerleri hesaplandı.

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

A_{kontrol} = Kontrolün absorbandsı

$A_{\text{örnek}}$ = örnek ya da standartların absorbandsı

Toplam Ferrik İyonlarını (Fe³⁺) İndirgeme Kapasitesinin Tayini

Ekstraktların toplam indirgeme kapasitesi tayini Oyaizu metoduna göre yapıldı (48). Ortamdaki indirgen madde, Fe³⁺ iyonlarını Fe²⁺ iyonlarına indirger ve FeCl₃ ilavesiyle oluşan Prusya mavisi renginde olan kompleksin absorbansı ölçülür. Yüksek absorbans değeri yüksek indirgeme kapasitesinin göstergesidir.

1 mL ekstrakta, 2,5 mL fosfat tamponu (0,2 M, pH=6,6) ve 2,5 mL %1'lik K₃Fe(CN)₆ eklendi. Karışım 50 °C'de 20 dk inkübe edildikten sonra 2,5 mL %10'luk TCA ilave edildi ve 2000 rpm'de 10 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası çözeltilerin üst tabakasından 2,5 mL alınarak 2,5 mL destile su ve 0,5 mL %1'lik FeCl₃ çözeltisi ile karıştırıldı. 700 nm'de absorbanslar ölçüldü. Standart olarak askorbik asit, BHA, BHT ve α-tokoferol kullanıldı.

Süperoksit Anyon Radikalini Giderme Aktivitesinin Tayini

Ekstraktların süperoksit anyon radikalini giderme aktivitesi, nitrobluetetrazolium ürününün spektrofotometrik ölçümüyle belirlendi (47). Deney koşullarında NADH/PMS/O₂ sistemi ile üretilen süperoksit radikali sarı renkli olan NBT'yi mavi-mor renkli formazon türevine indirger. Düşük absorbans değerleri süperoksit radikalini gideren bileşiklerden dolayıdır.

1 mL 156 µM NBT çözeltisi (0,1 M, pH=7,4 fosfat tamponunda) ve 1 mL 468 µM NADH çözeltisi (0,1 M, pH=7,4 fosfat tamponunda) ve 1 mL ekstrakt veya standartlar karıştırıldı. Karışıma 10 µL 60 µM PMS çözeltisi (0,1 M, pH=7,4 fosfat tamponunda) ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. Karışım 25 °C'de 5 dk inkübe edildi ve absorbansı 560 nm'de ölçüldü. Standart olarak askorbik asit, BHA ve BHT kullanıldı. Kontrol çözeltisine ekstraktlar yerine 1 mL su ilave edilerek aynı işlemler yapıldı. Ekstraktlar ve standartlar 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlandı. Aşağıdaki denkleme göre % inhibisyon değerleri hesaplandı.

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

A_{kontrol} = Kontrolün absorbansı

A_{örnek} = Örnek ya da standartların absorbansı

ABTS^{•+} Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini

Ekstraktların ABTS^{•+} radikali giderme aktivitesi Re ve arkadaşlarının metoduna göre belirlendi (55).

ABTS•⁺ radikali, 7 mM ABTS çözeltisi ve 2,45 mM potasyum persülfat çözeltisi arasındaki reaksiyonla oluşturuldu. Oda sıcaklığında 12 saat karanlıkta bekletildi. Kullanmadan önce fosfat tamponuyla (0,1 M, pH=7,4) absorbans 734 nm'de $0,7 \pm 0,025$ olacak şekilde seyreltildi. 3 mL ABTS çözeltisi, 1 mL ekstrakt (veya standart) eklendi. 30 dk sonra 734 nm'de absorbans okundu. Aşağıdaki denkleme göre % inhibisyon değerleri hesaplandı. Burada,

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

A_{kontrol} = Kontrolün absorbansı

$A_{\text{örnek}}$ = Örnek ya da standartın absorbansı

Fosfomolibden Metodu ile Toplam Antioksidan Tayini

Ekstraktların toplam antioksidan kapasiteleri Prieto ve arkadaşlarının metoduna göre belirlendi (52).

Ekstrakt ve standart çözeltilerin 50-250 µg/mL konsantrasyonlarından 0,4 mL alınıp, amonyum molibdat (4mM), sodyum fosfat (28 mM) ve sülfürik asit (0,6 M) içeren belirteç çözeltisinden 3,6 mL ilave edilerek karıştırıldı. Reaksiyon karışımı su banyosunda 90 °C'de 90 dk inkübe edildi. Soğutulduktan sonra fosfomolibden kompleksinin absorbansı kontrole karşı 695 nm'de ölçüldü.

Standart olarak askorbik ve α-tokoferol kullanıldı. Askorbik asit için yapılan denemeden okunan absorbans ile konsantrasyon arasında çizilen grafik denkleminde ekstraktların antioksidan aktiviteleri askorbik asit ekivalenti (mg Askorbik asit/g ekstrakt) olarak ifade edildi.

Antosiyanin Tayini

Ekstraktlarının antosiyanin tayini Smidova ve arkadaşlarının metoduna göre belirlendi (62).

1000 µg/mL konsantrasyonlarındaki ekstraktların 0,5 mL'sine, 3 mL Vanilin-metanol (%4'lük v/v) çözeltisi ilave edildi. Daha sonra 1,5 mL %37'lik HCl eklendi. Son karışım oda sıcaklığında 15 dk bekletildikten sonra absorbansı 500 nm'de ölçüldü. Standart olarak kateşin kullanıldı. 50-250 µg/mL konsantrasyonlarındaki kateşin denemelerinden okunan absorbanslar ile absorbans-konsantrasyon grafiği oluşturuldu. Bitki ekstraktlarının antosiyanin miktarı mg kateşin ekivalent/g ekstrakt olarak hesaplandı.

Linoleik Asit Sisteminde Ferrik Tiyosiyanat (FTC) Metodu ile Toplam Antioksidan Aktivite Tayini

Bu metodta *in vitro* koşullarda linoleik asit oksidasyonu oluşturulur ve yöntem oksidasyon sonucu oluşan peroksitleri lme esasına dayanır. Belirli aralıklarla inkübasyondaki karışımdan örnek alınarak spektrofotometrik ölüm ile peroksitlerin oluşumu takip edilir. Yüksek absorbans değeri yüksek peroksit konsantrasyonunu ifade eder. Analiz Pan vd. (2007), Mitsuda vd. (1966)'nin uyguladığı yöntemler modifiye edilerek uygulanmıştır (45).

Bitki ekstraktları ve standart zltilerininin 1 mL'sine 1,5 mL fosfat tamponu (0,04 mM, pH=7.4) ve 2,5 mL linoleik asit emülsiyonu eklendi. zltiler karıştırıldıktan sonra 37 C'de karanlıkta inkübe edildi. 12 saatte bir zltilerden 0.1 mL alınıp üzerine 3.7 mL %75'lik etil alkol ve 0.1 mL %30'luk NH₄SCN eklendi. 3 dk sonra reaksiyon karışımlarına 0.1 mL FeCl₂ (20 mM) zltisi eklendi. 5 dk sonra oluşan rengin absorbansı 500 nm'de okundu. Oluşan peroksitler Fe²⁺ iyonlarını Fe³⁺'e yükseltir. Oluşan Fe³⁺tiyosiyanat ile reaksiyona girerek 500 nm'de maksimum renge sahip bir kompleks oluşturur. Kontrol, antioksidan madde içermeyip 2.5 mL fosfat tamponu (0.04 M, pH=7) ve 2.5 mL linoleik asit emülsiyonu içerir. Ekstrakt ve standartlar 50-250 g/mL konsantrasyonlarında hazırlandı. Standart olarak askorbik asit, BHA, BHT ve -tokoferol kullanıldı.

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

Burada A_{kontrol}, kontrolün maksimuma ulaştığı anda verdiği absorbans değeri, A_{rnek} ise ekstrakt ya da standartların maksimuma ulaştığı andaki absorbans değerini ifade eder.

Hidroksil Radikali Giderme Aktivitesi

Ekstraktların hidroksil radikali giderme aktivitesi Bajpai ve arkadaşlarının metoduna göre belirlendi (8).

450 L 0.2 M sodyum fosfat tamponu (pH=7.4), 150 L 10 mM 2-deoksiriboz, 150 L 10 mM FeSO₄-EDTA, 525 L destile su ve 75 L ekstrakt zltisinden (50, 100, 150, 200, 250 g/mL) ibaret olan reaksiyon karışımına 150 L 10 mM H₂O₂ ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. 37 C'de 4 saat inkübasyondan sonra sırasıyla 750 L %2.8'lik TCA ve 50 mM NaOH'deki %1'lik TBA zltisinden 750 L ilave edildi ve tüpler 10 dk kaynatıldı. Soğutulduktan sonra 520 nm'de kontrole karşı absorbans değeri okundu. Ekstrakt zltisi

yerine destile su içeren reaksiyon karışımı kontrol olarak kullanıldı. Standart olarak askorbik asit (50, 100, 150, 200, 250 µg/mL) kullanıldı.

Hidroksil radikali giderme aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki formül yardımıyla hesaplandı.

$$\text{Hidroksil radikali giderme aktivitesi (\%)} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

A_{kontrol} = Kontrolün absorbansı

$A_{\text{örnek}}$ = Ekstrakt ya da standartların absorbansı

Bakır İyonlarını İndirgeme Potansiyeli (CUPRAC Metodu)

Bitki ekstraktlarının bakır iyonlarını indirgeme gücü Cardenas ve arkadaşlarının metoduna göre belirlendi (20). Bitki ekstraktları ve standartların 50-250 µg/mL konsantrasyonları kullanıldı.

Metotta öncelikle her bir deney tüpüne 1 mL 10 mM CuCl₂, 1 mL 7.5 mM neokuproin, NH₄Ac tamponu (1 M, pH=7.0) çözeltisi eklenir. Daha sonra her tüpe farklı konsantrasyonlardaki ekstraktlardan 0,5 mL eklenip, toplam hacim 4.1 mL olacak şekilde saf su ilave edildi. Tüpler ağızları kapalı bir biçimde oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika bekletildi. Aynı işlemler aynı konsantrasyonlarda hazırlanan askorbik asit çözeltileri içinde yapıldı. Bu süre sonunda absorbansları 450 nm'de okundu. Testin sonuçları EC₅₀ değerleri kullanılarak da değerlendirildi.

LC-MS/MS Yöntemi ile Fenolik Madde Analizi

Çalışmada LC-MS/MS (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi/ Sıralı Kütle Spektrofotometresi) olarak Agilent Technologies 6460 Triple Quad kullanılmıştır.

Bir LC-MS/MS sistemi, bir elektrosprey iyonlaştırıcı kaynak ile donatılmış bir kütle spektrometresi ile birleştirilen ikili pompa ve otomatik örnekleyiciden oluşmaktadır. Reverse faz LC ayrımı Agilent Zorbax SB-C8 kolonu kullanılarak gerçekleştirildi ve koruma kartuşu kullanılarak koruma sağlandı (67).

Kütle spektrometresi aşağıdaki parametrelerle negatif iyon modunda çalıştırıldı; kapiler voltaj 3.0kv, koni voltajı 20v; ve ekstraktör 2v. Kaynak sıcaklığı 100 derece, desolvasyon sıcaklığı 350 derece, koni gaz akış hızı 30l/sa ve desolvasyon gaz akış hızı 350l/sa. Mobil faz bileşenleri; %0.1'lik formik asit ve asetonitril. Enjeksiyon hacmi 10 mL ve kolonun sıcaklığı 25 °C. Mobil fazın akış hızı 0.300mL/dakikadır.

2,5-dihidroksibenzoik asit, 2-hidroksitrans sinnamik asit, absisik asit, kafeik asit, kateşin, klorojenik asit, ellagik asit, epikateşin, etilgallat, gallik asit, gibberallik asit, indol-3-asetik asit, izo-hamnetin, kamferol, jasmonik asit, kumarin, lutolein, mirisetin, naringin, p-kumarik asit, piropil gallat, protokatekuik asit, quersetin, resveratrol, rutin, salisilik asit, sinapik asit, siringik asit, trans ferulik, glutatyon, okside glutatyon kullanılan standart maddelerdir.

Yöntem kullanılan standart maddeler yardımıyla analizi yapılan üvez meyvesinin hangi fenolik bileşikleri içerdiği ve bunların miktarlarını tayin etmede kullanılmaktadır.

Klorofil Tayini

Üvez yaprağının klorofil içeriği Arnon tarafından modifiye edilen metoda göre belirlendi (6).

100 mg kurutulmuş yaprak, eser miktardaki CaCO₃ ve 6 mL soğuk asetonla (%80'lik) homojenize edildi. Yaprak homojenizatları 20 dk boyunca 15 °C'de 3500 rpm'de santrifüjlendi. Süpernatantların yaklaşık olarak 4,8-5,8 mL'si alındı. Toplam klorofil içeriği, süpernatantların 645 ve 663 nm'de absorbanlarının ölçümü ile belirlendi.

Bitkilerin klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil içerikleri aşağıdaki formüllere göre mg/kg cinsinden hesaplandı.

$$\text{Klorofil a miktarı (mg/kg)} = 12.7 \times A_{663} - 2.69 \times A_{645}$$

$$\text{Klorofil b miktarı (mg/kg)} = 22.9 \times A_{645} - 4.68 \times A_{663}$$

$$\text{Toplam klorofil miktarı (mg/kg)} = 20.2 \times A_{645} + 8.02 \times A_{663}$$

İstatistik Analizler

Deneyleerde üç paralel ölçüm alındı ve standart sapmalar hesaplandı. Grafikler MATLAB 2017 programında çizildi.

BULGULAR

Üvez meyvesi için aseton ve su ekstraktlarının, çiçeği için aseton ekstraktlarının antioksidan özellikleri çeşitli metodlar kullanılarak incelendi.

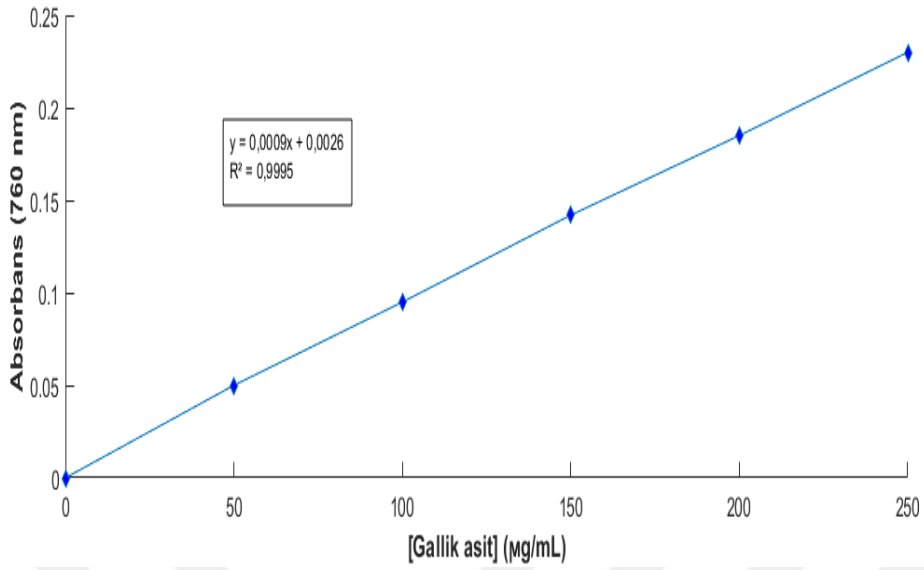
Üvez meyvesiyle hazırlanan aseton ve su ekstraktlarında bileşiklerin verimleri taze ekstrakt cinsinden sırasıyla 148.37, 327.36 mg/g olarak, çiçeği ile hazırlanan aseton ekstraktının veriminin 61.708 mg/g olarak hesaplandı. Tablo 2’de görüldüğü üzere en yüksek verimin su ekstraktında olduğu sonucuna varılmıştır.

Tablo 2. Üvezin ekstrakt verimleri

Ekstrakt	Meyve-Su	Çiçek-Aseton	Meyve-Aseton
Ham Madde (g)	25	25	25
Ekstraksiyon Verimi (mg)	327.36	61.708	148.37
Ekstraksiyon Verimi (%)	32.736	6.170	14.837

TOPLAM FENOLİK BİLEŞİK (TPC) TAYİNİ

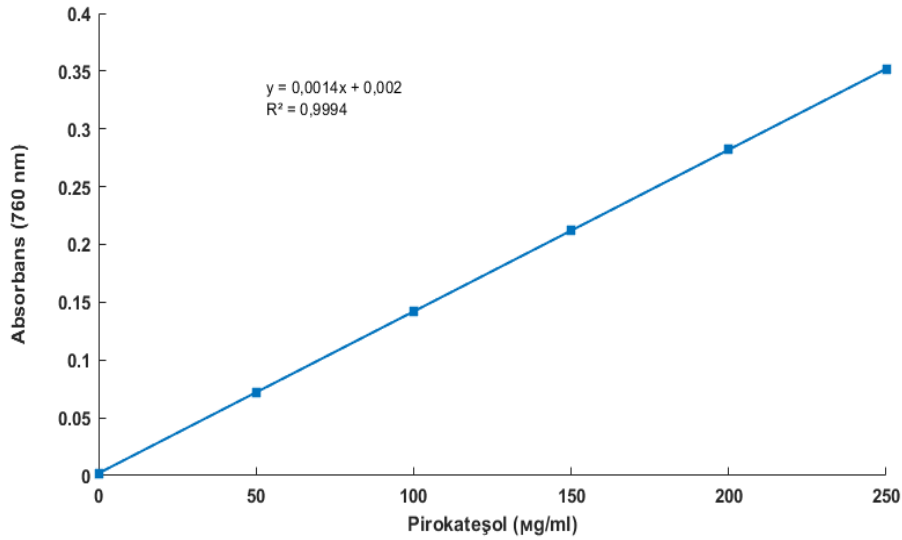
Üvez meyvesinin aseton ve su ekstraktları ve çiçeğinin aseton ekstraktında bulunan toplam fenolik bileşikleri tayin etmek amacıyla Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) kullanıldı. Standart grafikler gallik asit ve pirokateşol ile hazırlandı (Şekil 24 ve Şekil 25). Ekstraktların içerdiği toplam fenolik bileşik miktarları gallik asit eşdeğeri (GAE) ve pirokateşol eşdeğeri (PKE) ekivalenti olarak saptandı.



Şekil 24. Gallik asit standart grafiği

Gallik asit standart grafiği denklemi $y=0,0009x+0,0026$ bulundu hesaplama aşağıdaki formüle göre yapıldı.

$$\text{Absorbans}_{(760 \text{ nm})} = 0.0009 [\text{Gallik Asit}] + 0.0026$$



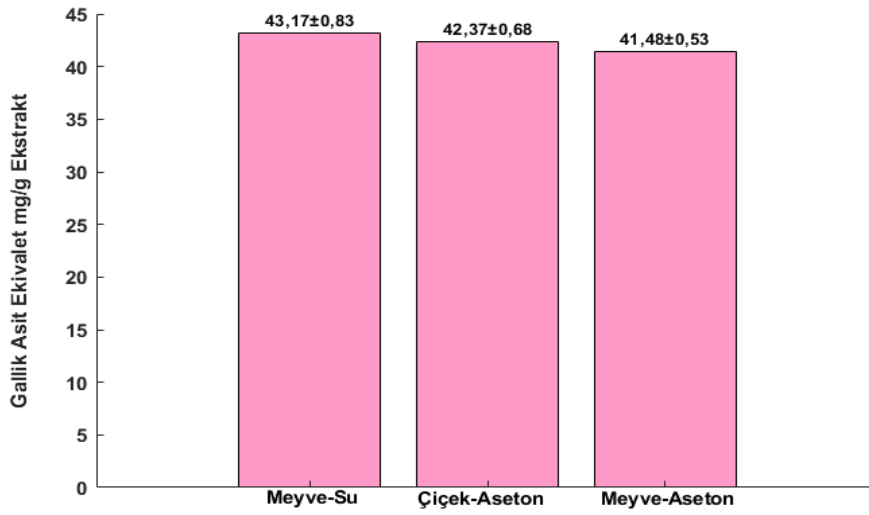
Şekil 25. Pirokateşol standart grafiği

Pirokateşol standart grafiği denklemi $y=0,0014x+0,002$ bulundu ve hesaplama aşağıdaki formüle göre yapıldı

$$\text{Absorbans}_{(760\text{nm})} = 0.0014 [\text{Pirokateşol}] + 0.002$$

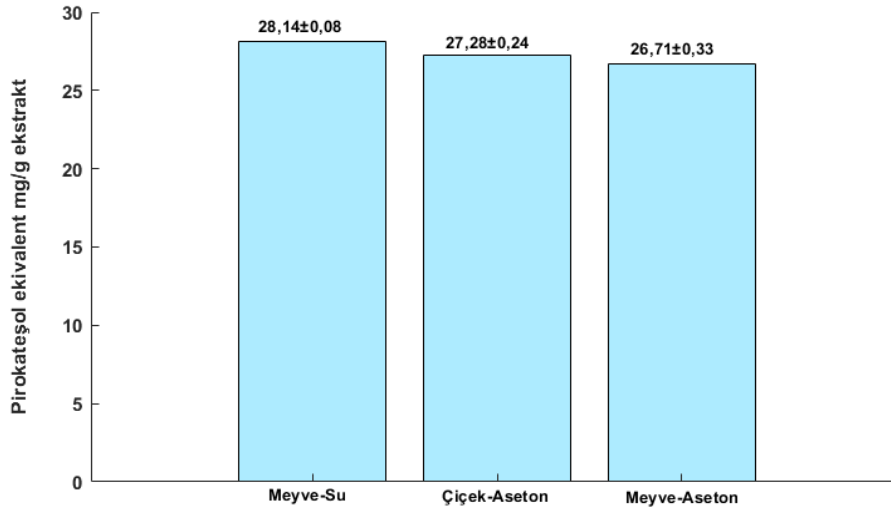
Üvez meyvesinin aseton ve su ekstraktları ile çiçeğinin aseton ekstraktlarından elde edilen fenolik madde içerikleri gallik asit ve pirokateşol eşdeğer miktarı olarak Şekil 26 ve Şekil 27’de gösterilmiştir. Ekstrakte edilen fenolik bileşikler kıyaslandığında; gallik asit ve pirokateşol standartları için meyve-su ekstraktının diğer çalışılan ekstraktlara nazaran daha çok fenolik bileşik içerdiği gözlenmiştir.

Standart grafikler yardımıyla gallik asit eşdeğeri olarak ekstraktların içerdiği fenolik madde miktarlarının $41,48\pm0,53$ – $43,17\pm0,83$ mg/g ve pirokateşol eşdeğeri olarak $26,71\pm0,33$ – $28,14\pm0,08$ mg/g arasında değiştiği belirlendi.



Şekil 26. Üvez ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri cinsinden fenolik madde içerikleri

Üvezin meyvesinin aseton ekstraktının $41,48\pm0,43$ mg/g, su ekstraktının $43,17\pm0,83$ mg/g ve çiçeğinin aseton ekstraktının ise $42,37\pm0,68$ mg/g gallik asit eşdeğeri cinsinden fenolik madde bulundurduğu belirlendi.

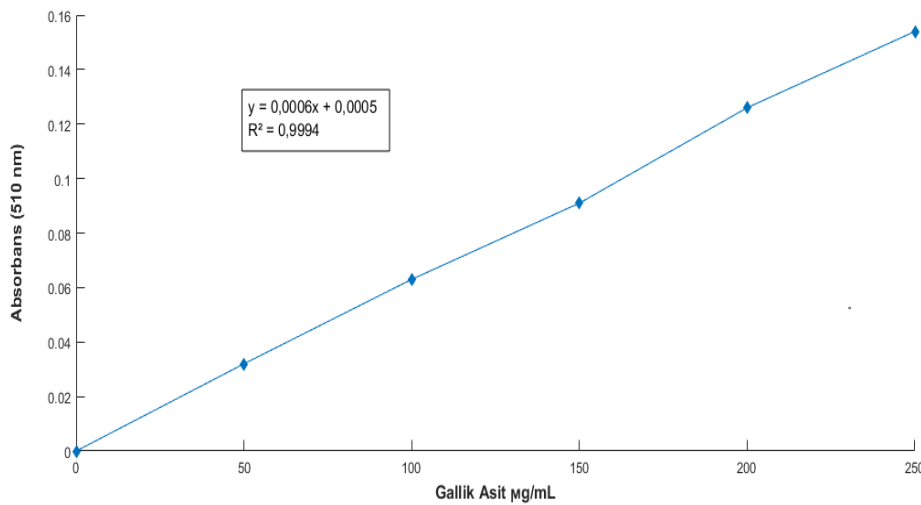


Şekil 27. Üvez ekstraktlarının pirokateşol eşdeğeri olarak fenolik madde içerikleri

Üvezin meyvesinin aseton ekstraktının $26.71\pm 0,33$ mg/g, su ekstraktının $28.14\pm 0,08$ mg/g ve çiçeğinin aseton ekstraktının $27.28\pm 0,24$ mg/g olarak fenolik madde içerdiği belirlendi.

TOPLAM FLAVONOİD İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ

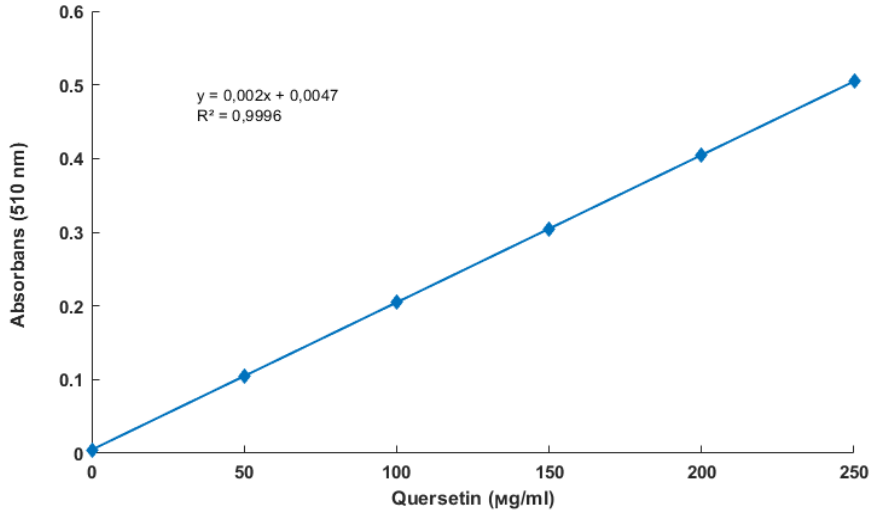
Üvezin meyvesinin aseton ve su ekstraktları ile çiçeğinin aseton ekstraktlarındaki toplam flavonoid içeriğini belirlemek için gallik asit ve quersetin kullanıldı ve standart grafikleri oluşturuldu (Şekil 28 ve Şekil 29). Ekstraktların içerdiği toplam flavonoid miktarı GAE ve QUE ekvivalenti cinsinden saptandı.



Şekil 28. Gallik asit standart grafiği

Gallik asit standart grafiği deklemleri $y=0,0006x+0,0005$ bulundu ve hesaplama aşağıdaki formüle göre yapıldı.

$$\text{Absorbans}_{(510\text{nm})} = 0.0006 [\text{Gallik asit}] + 0.0005$$



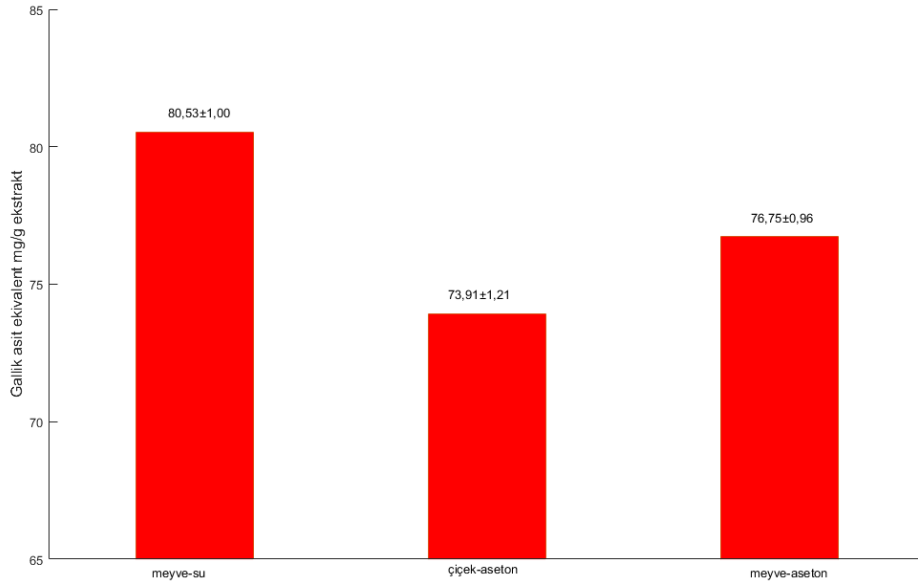
Şekil 29. Kuersetin standart grafiği

Kuersetin standart grafiği denklemleri $y=0,002x+0,0047$ bulundu ve hesaplama aşağıdaki formüle göre yapıldı.

$$\text{Absorbans}_{(510\text{ nm})} = 0.002 [\text{Kuersetin}] + 0.0047$$

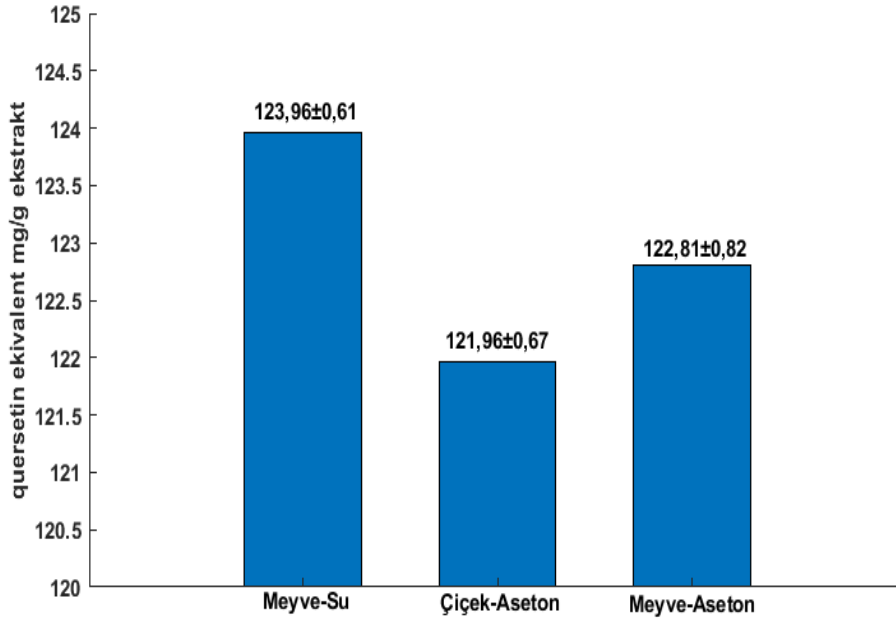
Üvezin meyvesinin aseton ve su ekstraktları ile çiçeğinin aseton ekstraktlarından elde edilen gallik asit ve kuersetin eşdeğeri olan flavonoid bileŐiklerine ait değerler Şekil 30 ve Şekil 31’de gösterilmiştir.

Standart grafikler yardımıyla üvez ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri olarak $73.91\pm 1,21$ - $80.53\pm 1,00$ mg/g ve kuersetin eşdeğeri olarak da $121.96\pm 0,67$ – $123.96\pm 0,61$ mg/g arasında flavonoid madde içerdikleri belirlendi.



Şekil 30. Üvez ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri olarak flavonoid madde içerikleri

Üvezin meyve kısmının aseton ve su ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri olarak flavonoid madde içeriği sırasıyla 76.75±0,96 ve 80.53±1,00 mg/g olarak belirlendi. Çiçek kısmının ise aseton ekstraktının gallik asit eşdeğeri olarak flavonoid madde içeriği 73.91±1,21 mg/g olarak hesaplandı.

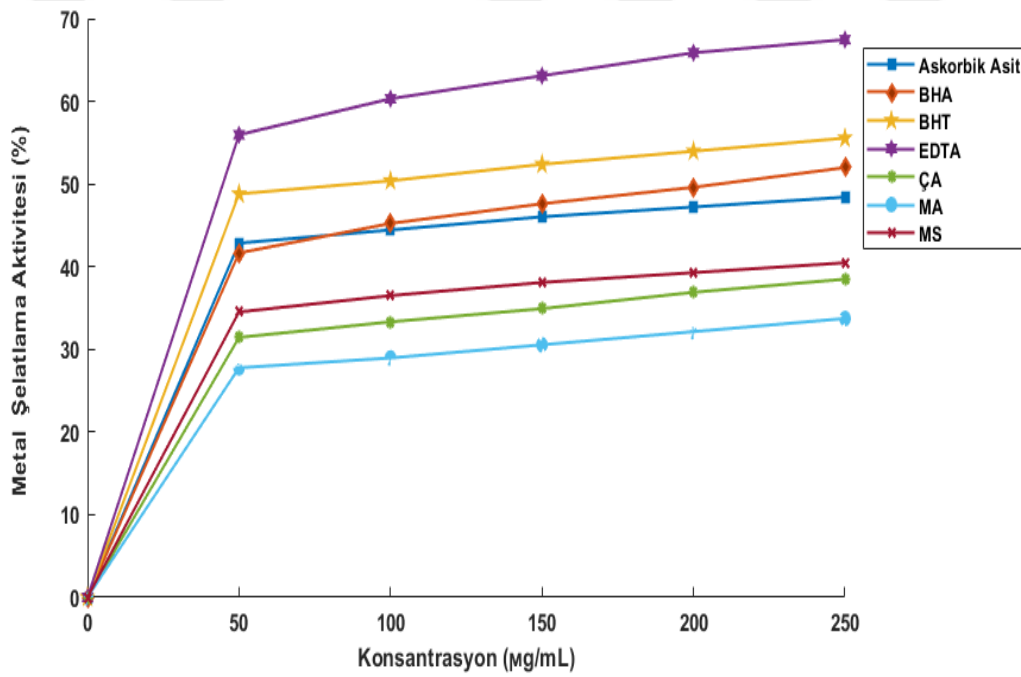


Şekil 31. Üvez ekstraktlarının quercetin eşdeğeri olarak flavonoid madde içerikleri

Üvezin meyvesinin aseton ve su ekstraktlarının quersetin eşdeğeri olarak flavonoid madde içerikleri sırasıyla $122.81 \pm 0,82$ ve $123.96 \pm 0,61$ mg/g olarak, çiçeğinin ise aseton ekstraktının quersetin eşdeğeri olarak flavonoid madde içeriği $121.96 \pm 0,67$ mg/g olarak belirlendi.

DEMİR (II) İYONLARINI ŞELATLAMA AKTİVİTESİ

Reaksiyon ortamında bulunan Fe^{2+} iyonlarını bağlamak için ekstraktların ferrozin ile yarışmada olduğu bir yöntemdir. Bu yöntemde azalan absorbans metal iyonlarının şelatlandığının bir göstergesidir. Standart olarak EDTA, askorbik asit, BHA ve BHT kullanılarak ekstraktların Fe^{2+} iyonlarını şelatlama kapasitesi belirlendi (Şekil 32).



Şekil 32. Üvez ekstraktlarının metal şelatlama kapasiteleri

Grafikten de anlaşılacağı üzere, ekstraktların konsantrasyon artışı ile birlikte artan şelatlama kapasitesi gösterdiği ve standartların üvez ekstraktlarından daha yüksek aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi. Ancak standartlar ve ekstraktların EDTA kadar iyi bir şelatlayıcı olmadığı da açıkça görüldü.

Tablo 3. Standartların farklı konsantrasyonlarının Fe²⁺ iyonlarını şelatlama kapasiteleri

Standartlar	50 µg/mL	100 µg/mL	150 µg/mL	200 µg/mL	250 µg/mL
EDTA	55.95±0,28	60,31±0,33	63.09±0,39	65.87±0,44	67.46±0,48
Askorbik Asit	42.85±0,67	44.44±0,12	46.03±0,06	47.22±0,14	48.41±0,11
BHA	41.66±0,55	45.23±0,41	47.61±0,38	49.60±0,30	51.98±0,32
BHT	48.80±0,14	50.39±0,26	52.38±0,23	53.96±0,17	55.55±0,19

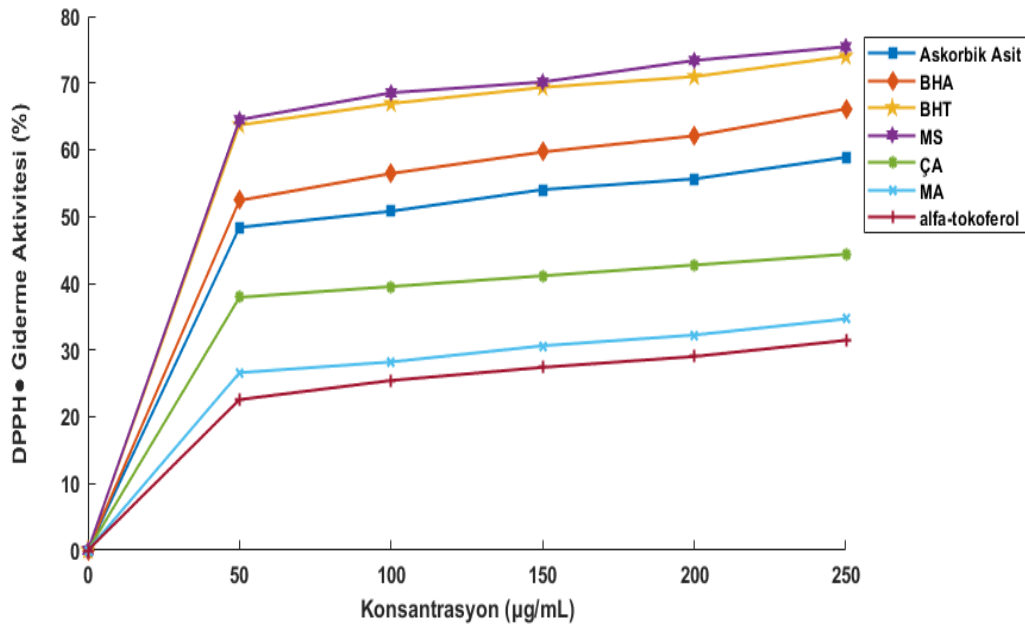
Üvezin meyvesinin aseton ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının metal şelatlama kapasitesi sırasıyla %27.77±0,85, %28.96±0,92, %30.55±0,47, %32.14±0,19, %33.73±0,23 olarak tespit edildi.

Üvezin meyvesinin su ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının metal şelatlama kapasitesi ise sırasıyla %34.52±0,81, %36.50±0,72, %38.09±0,53, %39.28±0,44, %40.47±0,88 olarak belirlendi.

Üvezin çiçeğinin aseton ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının metal şelatlama kapasitesi sırasıyla %31.34±0,78, %33.33±0,26, %34.92±0,38, %36.90±0,07, %38.49±0,41 olarak bulundu.

DPPH• RADİKALİ GİDERME AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Doğal antioksidanların keşfinde oldukça sık kullanılan bir yöntem olup, bu metod 517 nm'de absorbans vermeyen DPPH•H oluşumunun ölçülmesine dayanmaktadır. Standart madde askorbik asit, BHA, α-tokoferol ve BHT kullanılarak üvez ekstraktlarının DPPH• radikali giderme aktiviteleri belirlendi (Şekil 33).



Şekil 33. Üvez ekstraktlarının DPPH• radikali giderme aktiviteleri

Grafikten anlaşılacağı üzere, ekstraktların konsantrasyonunun artışı ile birlikte artan radikal giderme etkisi sergilediği saptandı.

Tablo 4. DPPH• radikali giderme aktivitesinde kullanılan standart çözeltilerin farklı konsantrasyonlarının radikal giderme aktiviteleri

Standartlar	50 µg/mL	100 µg/mL	150 µg/mL	200 µg/mL	250 µg/mL
α-tokoferol	48.38±0,70	50.80±0,64	54.03±0,22	55.64±0,51	58.87±0,70
Askorbik Asit	52.41±0,93	56.45±0,56	59.67±0,77	62.09±0,67	66.12±0,90
BHA	63.70±0,96	66.93±0,54	69.35±0,48	70.96±0,77	74.19±0,35
BHT	64.51±0,61	68.54±0,83	70.16±0,12	73.38±0,70	75.44±0,48

Üvezin meyvesinin su ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının DPPH• radikali giderme aktiviteleri sırasıyla %37.90±0,32, %39.51±0,61, %41.12±0,90, %42.74±0,19, %44.35±0,48 olarak tespit edildi.

Üvezin çiçeğinin aseton ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının DPPH• radikali giderme aktiviteleri sırasıyla %26.61±0,29, %28.22±0,58, %30.64±0,51, %32.25±0,80, %34.67±0,77 olarak belirlendi.

Üvezin meyvesinin aseton ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının DPPH• radikali giderme aktivitelerinin ise sırasıyla %22.58±0,06, %25.44±0,41, %27.41±0,93, %29.03±0,22, %31.45±0,16 olarak arttığı gözlemlendi. Ayrıca üvez ekstraktlarının yarısının yok edildiği konsantrasyon olan EC₅₀ değeri hesaplanarak da sonuçlar değerlendirildi (Tablo 5).

Tablo 5. DPPH• radikali giderme aktivitesi verilerinden hesaplanan EC₅₀ değerleri

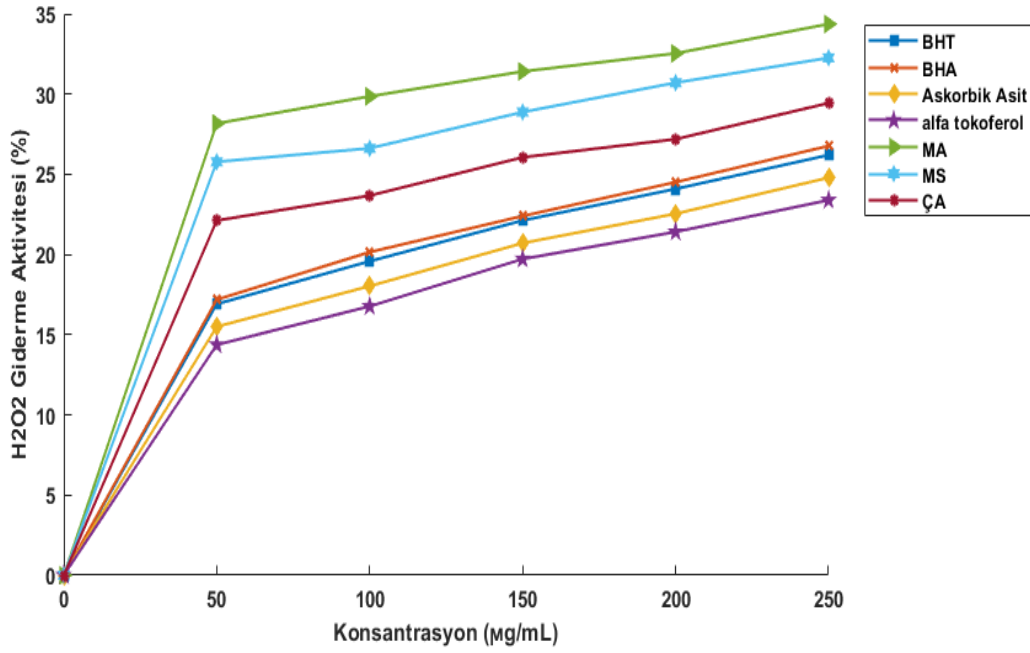
EC ₅₀ (µg/mL)			
Ekstraktlar			
Meyve-su	Çiçek-aseton	Meyve-aseton	
9.86±0,25	10.66±0,75	14.08±0,44	
Standartlar			
α-tokoferol	Askorbik asit	BHA	BHT
15.71±0,75	17.53±0,43	19.55±0,59	16.86±0,33

Tablo 5'te görüldüğü gibi, en düşük EC₅₀ değerinin meyve-su ekstraktında olduğu, dolayısıyla en yüksek radikal giderme aktivitesine meyve-su ekstraktında rastlandığı saptandı.

H₂O₂ GİDERME AKTİVİTESİ

Asıl üretimi süperoksitin dismutasyonu sonucu oluşan H₂O₂, serbest radikal olmadığı halde hücre zarından kolaylıkla geçebilen uzun ömürlü bir oksitleyici bileşiktir.

Ekstraktlar arasında en yüksek H₂O₂ giderme aktivitesi gösteren ve standartlarla kıyaslanabilecek ölçüde olan meyve-aseton ekstraktıdır (Şekil 34).



Şekil 34. Üvez ekstraktlarının ve standartların H₂O₂ giderme aktiviteleri

Grafikten de anlaşılacağı üzere konsantrasyon artışı ile artan bir H₂O₂ giderme aktivitesi olduğu gözlenmektedir. Çalışmada kullanılan ekstraktların standartlardan daha fazla H₂O₂ giderme aktivitesi göstermiştir.

Tablo 6. H₂O₂ giderme aktivitesinde kullanılan standart çözeltilerin radikal giderme aktiviteleri

Standartlar	50 µg/mL	100 µg/mL	150 µg/mL	200 µg/mL	250 µg/mL
α-tokoferol	14.37±0,61	16.77±0,67	19.72±0,55	21.41±0,42	23.39±0,72
Askorbik Asit	15.50±0,44	18.03±0,86	20.71±0,33	22.54±0,42	24.79±0,20
BHA	17.19±0,21	20.15±0,26	22.40±0,38	24.51±0,41	26.77±0,39
BHT	16.91±0,03	19.58±0,15	22.12±0,11	24.09±0,18	26.20±0,14

Üvezin meyvesinin aseton ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının H₂O₂ giderme aktiviteleri sırasıyla %28.17±0,84, %29.86±,89, %31.41±0,93, %32.54±0,80, %34.37±0,72 olarak belirlendi.

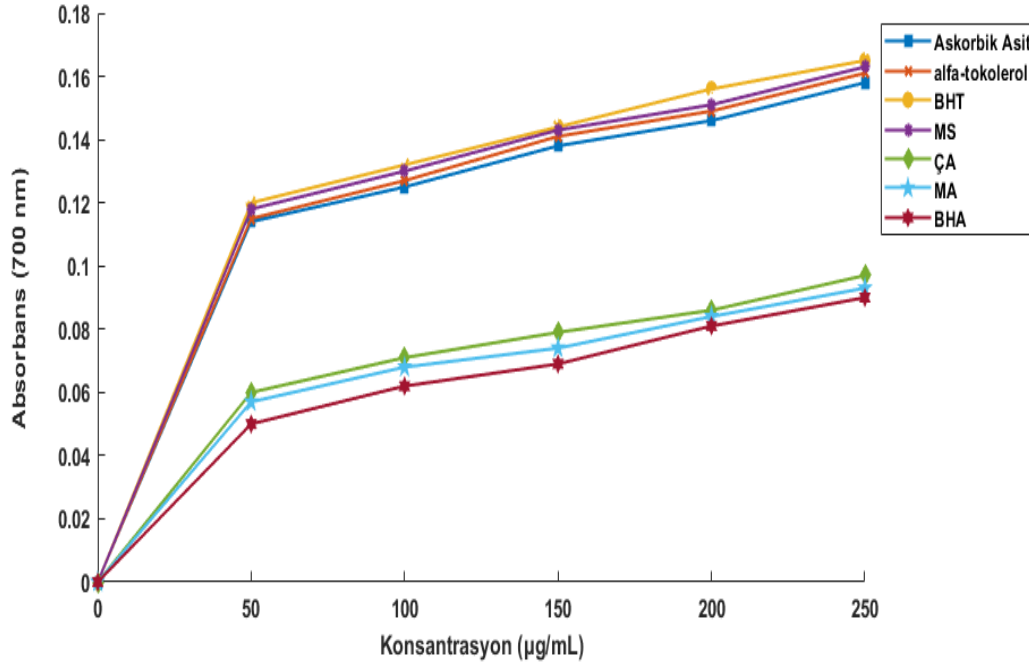
Üvezin meyvesinin su ekstraktının ise 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının H₂O₂ giderme aktiviteleri sırasıyla %25.78±0,18, %26.62±0,37, %28.88±0,11, %30.71±0,27, %32.26±0,71 olarak bulundu.

Üvezin çiçeğinin aseton ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının H₂O₂ giderme aktiviteleri ise sırasıyla %22.12±0,33, %23.67±0,58, %26.06±0,85, %27.19±0,32, %29.44±0,17 olarak tespit edildi.

TOPLAM FERRİK İYONLARINI (Fe³⁺) İNDİRGEME KAPASİTESİNİN TAYİNİ

Geçiş elementlerinin en önemlileri olan Fe ve Cu serbest radikal reaksiyonlarında katalizör görevi görerek serbest radikal reaksiyonlarını hızlandırır. Bu yüzden Fe³⁺ toksik etki göstermektedir.

Antioksidan aktivitenin bir başka göstergesi de bir bileşiğin elektronlarını verebilme özelliğinden kaynaklanmaktadır. Ekstraktların ve standart maddelerin Fe³⁺'ü indirgeme kapasitesini belirlemek üzere 50-250 µg/mL konsantrasyonları kullanıldı ve absorbansı 700 nm'de okundu. Ekstraktların indirgeme kapasitesi askorbik asit, BHA, BHT ve α-tokoferol ile karşılaştırılarak konsantrasyon-absorbans grafikleri oluşturuldu (Şekil 35).



Şekil 35. Üvez ekstraktlarının Fe³⁺'ü Fe²⁺'ye indirgeme kapasiteleri

Şekil 35’te görülebileceği gibi indirgeme kapasitesi tayininde üzve ekstraktlarının, standartlarla karşılaştırması yapıldığında çok yüksek aktiviteye sahip olmadığı gözlemlendi.

Tablo 7. Standart çözeltilerin Fe³⁺ iyonlarını indirgeme kapasiteleri

Standartlar	50 µg/mL	100 µg/mL	150 µg/mL	200 µg/mL	250 µg/mL
α-tokoferol	0.115±0,022	0.127±0,058	0.141±0,044	0.149±0,031	0.161±0,018
Askorbik Asit	0.114±0,091	0.125±0,087	0.138±0,062	0.146±0,057	0.158±0,080
BHA	0.120±0,048	0.132±0,071	0.144±0,078	0.156±0,039	0.165±0,019
BHT	0.118±0,035	0.130±0,044	0.143±0,081	0.151±0,059	0.163±0,050

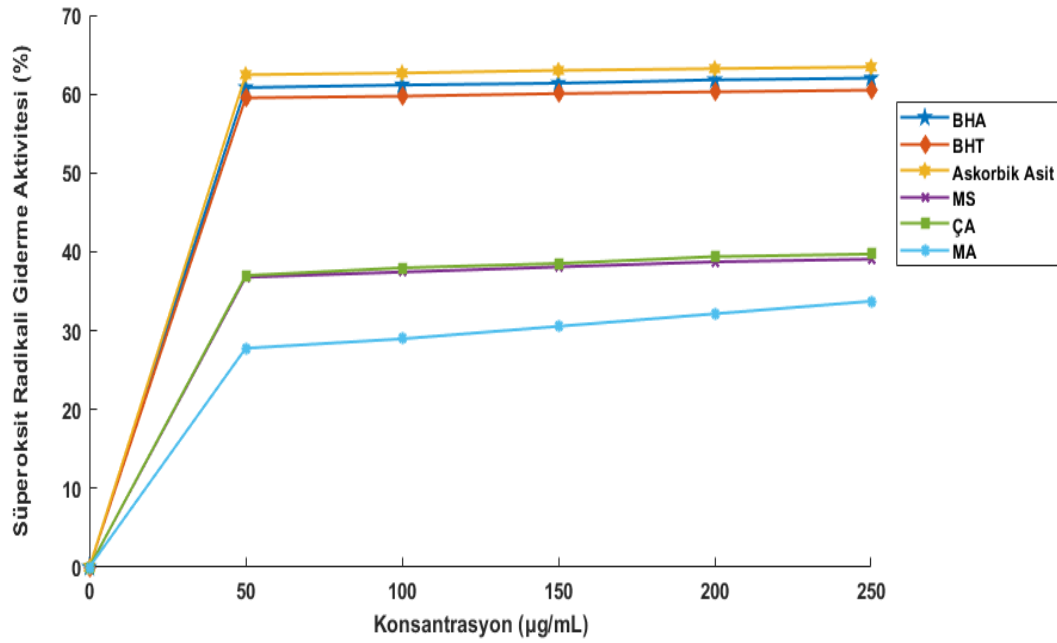
Üzevin meyvesinin su ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının Fe³⁺ iyonlarını indirgeme kapasiteleri sırasıyla 0.060±0,007, 0.071±0,009, 0.079±0,002, 0.086±0,004, 0.097±0,018 olarak tespit edildi.

Üzevin meyvesinin aseton ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının Fe³⁺ iyonlarını indirgeme kapasiteleri ise sırasıyla 0.050±0,010, 0.062±0,013, 0.069±0,015, 0.081±0,011, 0.090±0,018 olarak bulundu.

Üzevin çiçeğinin aseton ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının ise Fe³⁺ iyonlarını Fe²⁺,ye indirgeme kapasitesinin sırasıyla 0.057±0,021, 0.068±0,026, 0.074±0,030, 0.084±0,049, 0.093±0,081 olarak arttığı belirlendi.

SÜPEROKSİT RADİKALİ GİDERME AKTİVİTESİ

Süperoksit radikalinin oluşumu PMS/NADH/O₂ sistemi kullanılarak oluşturuldu. BHT, BHA ve askorbik asit standart olarak kullanıldı ve %inhibisyon grafiği oluşturuldu (Şekil 36).



Şekil 36. Üvez ekstraktlarının süperoksit radikali giderme aktiviteleri

Grafikten de anlaşılacağı üzere konsantrasyon artışı ile birlikte radikal giderme aktivitesinin tüm konsantrasyonları ile orantılı olduğu ve sonuç olarak inhibisyon değerinin konsantrasyona bağımlı olduğu sonucuna varıldı.

Tablo 8. Standartların farklı konsantrasyonlarının süperoksit radikali giderme aktiviteleri

Standartlar	50 µg/mL	100 µg/mL	150 µg/mL	200 µg/mL	250 µg/mL
BHA	60.82±0,69	61.15±0,34	61.37±0,71	61.80±0,63	62.02±0,39
BHT	59.52±0,12	59.73±0,88	60.06±0,52	60.28±0,29	60.50±0,05
Askorbik Asit	62.45±0,91	62.67±0,68	63.00±0,32	63.22±0,08	63.43±0,85

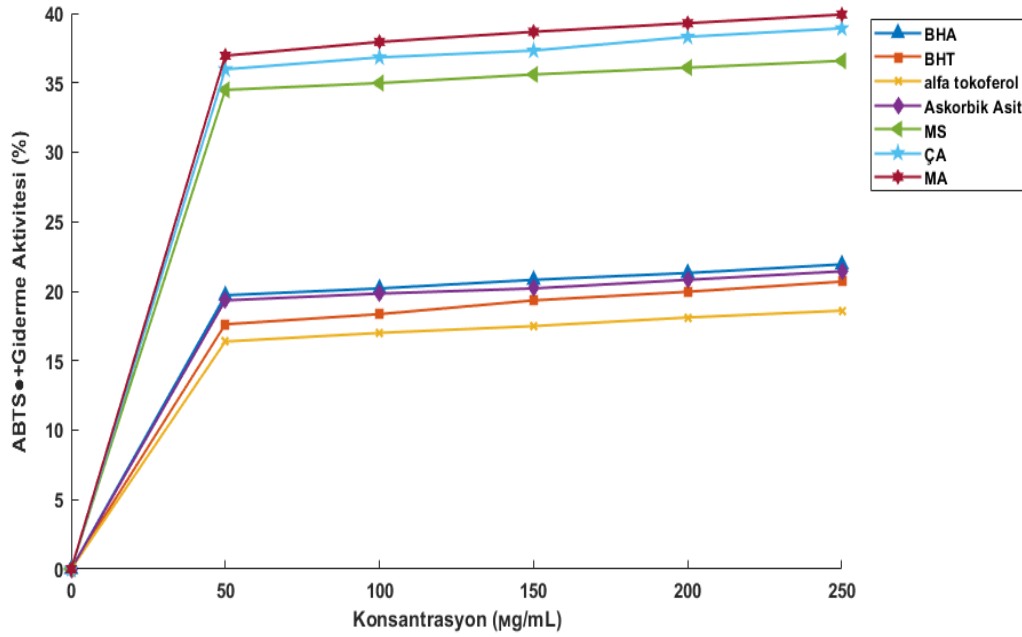
Üvezin meyvesinin su ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının süperoksit radikali giderme aktivitelerinin sırasıyla %36.77±0,91, %37.43±0,19, %38.08±0,48, %38.73±0,77, %39.06±0,42 olarak arttığı belirlendi.

Üvezin çiçeğinin aseton ekstraktının ise 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının süperoksit radikali giderme aktiviteleri sırasıyla %36.99±0,67, %37.97±0,60, %38.52±0,01, %39.39±0,06, %39.71±0,73 olarak bulundu.

Üvezin meyvesinin aseton ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının süperoksit radikali giderme aktiviteleri ise sırasıyla %34.71±0,16, %35.47±0,33, %35.79±0,97, %36.23±0,50, %36.45±0,26 olarak gözlemlendi.

ABTS•⁺ RADİKALİ GİDERME AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Ekstraktların ve standartların 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında çalışıldı. Ekstraktların inhibisyon oranları standartların inhibisyon oranları ile karşılaştırıldı (Şekil 37).



Şekil 37. Üvez ekstraktlarının ABTS•⁺ radikali giderme aktiviteleri

Grafikten de görüldüğü gibi ABTS•⁺ radikali giderme aktivitesi konsantrasyona bağlıdır. Üvez ekstraktlarının askorbik asit, α-tokoferol, BHA ve BHT'den daha etkili aktivite gösterdiği gözlenmiştir.

Tablo 9. Standart çözeltilerin ABTS•⁺ radikali giderme aktiviteleri

Standartlar	50 µg/mL	100 µg/mL	150 µg/mL	200 µg/mL	250 µg/mL
BHA	19.71±0,55	20.20±0,29	20.82±0,71	21.31±0,45	21.93±0,88
BHT	17.62±0,91	18.35±0,02	19.34±0,50	19.96±0,92	20.69±0,33
α-tokoferol	16.38±0,06	17.00±0,49	17.49±0,23	18.11±0,65	18.60±0,33
Askorbik Asit	19.34±0,50	19.83±0,24	20.20±0,02	20.82±0,71	21.043±0,71

Üvezin meyvesinin su ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının ABTS•⁺ radikali giderme aktiviteleri sırasıyla %34.49±0,72, %34.98±0,46, %35.60±0,88, %36.09±0,62, %36.58±0,36 olarak belirlendi.

Üvezin çiçeğinin aseton ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının ABTS•⁺ radikali giderme aktivitelerinin ise sırasıyla %35.97±0,94, %36.83±0,73, %37.32±0,47, %38.31±0,95, %38.92±0,37 olduğu bulundu.

Üvezin meyvesinin aseton ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının ABTS•⁺ radikali giderme aktivitelerinin sırasıyla %36.95±,41, %37.94±0,89, %38.67±0,49, %39.29±0,42, %39.91±0,85 olduğu tespit edildi. ABTS•⁺ radikalinin %50'sini gidermek için gerekli konsantrasyon olan EC₅₀ değerleri hesaplanarak da sonuçlar değerlendirilmiştir (Tablo 10).

Tablo 10. Ekstraktlar ile standartların ABTS•⁺ radikali verilerinden hesaplanan EC₅₀ değerleri

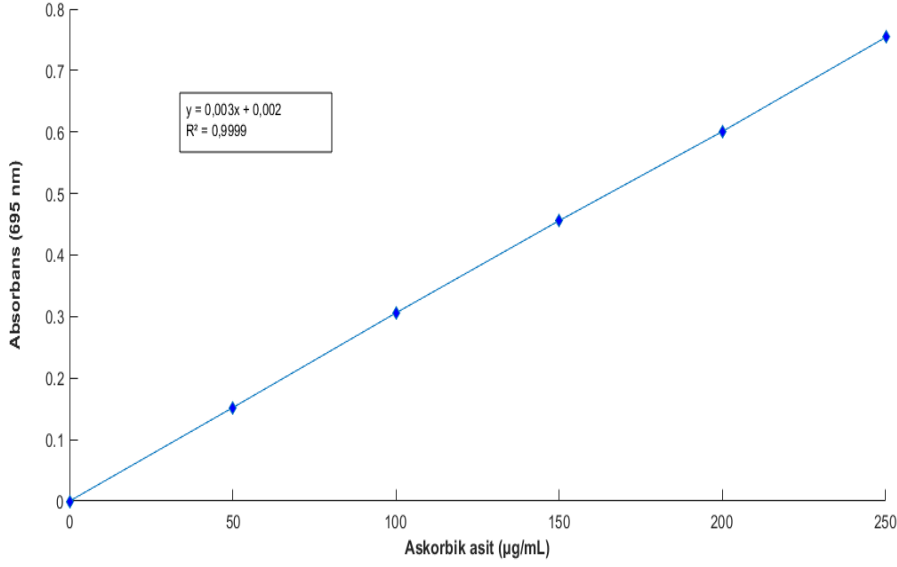
EC ₅₀ (µg/mL)			
Ekstraktlar			
Meyve-su	Çiçek-aseton	Meyve-aseton	
10.97±0,25	10.73±0,75	9.14±0,50	
Standartlar			
BHA	BHT	α-tokoferol	Askorbik asit
6.48±0,25	5.07±0,50	5.65±0,50	6.35±0,45

FOSFOMOLİBDEN METODU İLE TOPLAM ANTIÖKSİDAN AKTİVİTE TAYİNİ

Yöntemin esası amonyum molibdat, sodyum fosfat ve sülfürik asit ilave ederek hazırlanan belirteç çözeltisindeki Mo(VI)'nın antioksidanların etkisiyle Mo(V)'e indirgenmesidir. Askorbik asit ve α-tokoferol standart olarak kullanıldı ve ekstraktların antioksidan aktivite göstergeleri mg askorbik asit ekivalenti (mg A.Asit/g ekstrakt) cinsinden hesaplandı. Askorbik asit standart grafiği şekil 38'de gösterilmiştir.

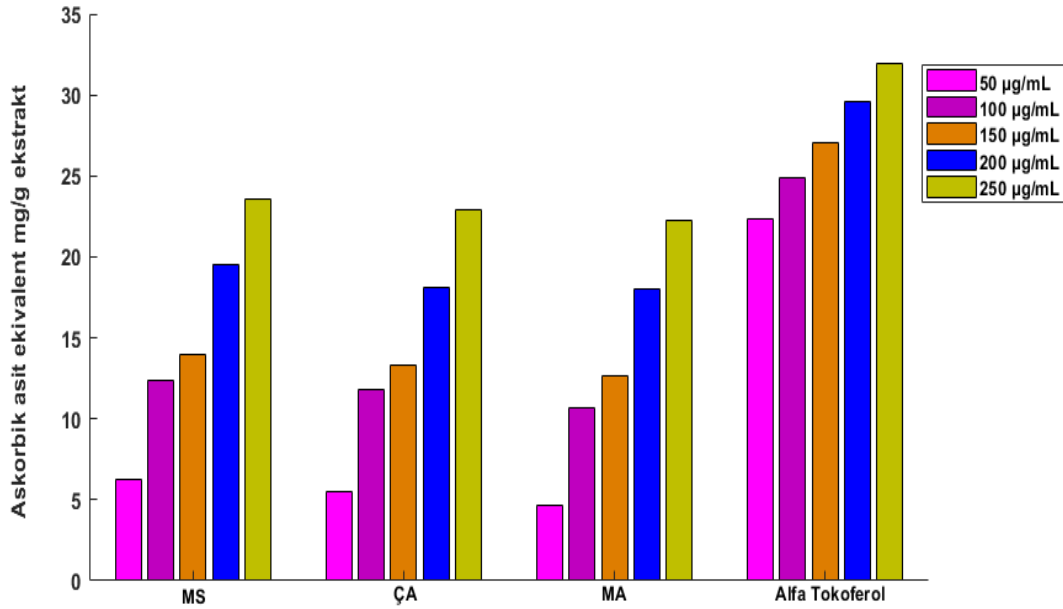
Askorbik asit standart grafiği denklemi $y=0,003x+0,002$ bulundu ve hesaplama aşağıdaki formüle göre yapıldı.

$$\text{Absorbans}_{(695 \text{ nm})} = 0,003[\text{Askorbik Asit}] + 0,002$$



Şekil 38. Askorbik asit standart grafiği

Antioksidan kapasite tayini metodunda üvez ekstraktlarının askorbik asit eşdeğeri açısından antioksidan kapasiteleri Şekil 39’da verilmiştir.



Şekil 39. Üvez ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri

Üvezin meyvesinin su ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının antioksidan kapasitelerinin askorbik asit eşdeğeri cinsinden sırasıyla; 6,23 mg/g, 12,33 mg/g, 13,93 mg/g, 19,53 mg/g, 23,54 mg/g olduğu belirlendi.

Üvezin çiçeğinin aseton ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının ise antioksidan kapasitelerinin sırasıyla; 5,52 mg/g, 11,81 mg/g, 13,33 mg/g, 18,13 mg/g, 22,91 mg/g olduğu gözlenirken, üvezin meyvesinin aseton ekstraktının ise 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının antioksidan kapasitelerinin ise sırasıyla; 4,66 mg/g, 10,66 mg/g, 12,63 mg/g, 18,03 mg/g, 22,21 mg/g olduğu belirlendi. Çalışılan ekstraktların α-tokoferole göre daha düşük antioksidan kapasiteye sahip olduğu gözlemlendi. Fakat konsantrasyona bağlı olarak antioksidan kapasitesi artış göstermiştir.

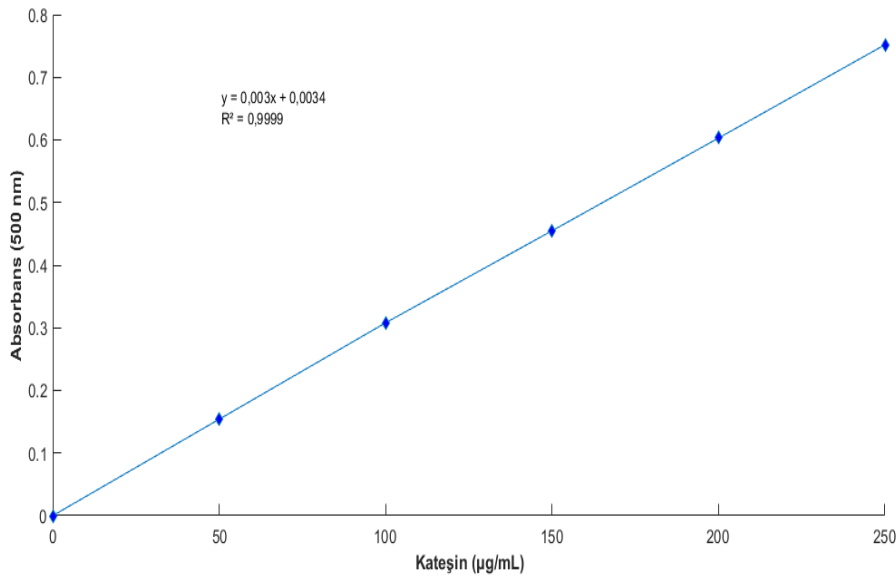
ANTOSİYANİN TAYİNİ

Antosiyaninler meyvelere kırmızı, mor-siyah ve mavi rengi veren suda çözünebilen doğal pigmentler olarak bilinir. Buldukları bitkide serbest olarak değil de şekerler ile beraber bulunurlar.

Çalışmada kullanılan üvez meyvesi ve çiçeğindeki antosiyanin içeriği kateşin kullanılarak ve kateşin standart grafiği hazırlanarak belirlendi (Şekil 40). Antosiyanin tayini, bitki ekstraktlarının 1000 µg/mL çözeltileri kullanılarak belirlendi. Sonuçlar mg/g kateşin ekvivalenti olarak hesaplanmıştır (R^2 : 0,9954).

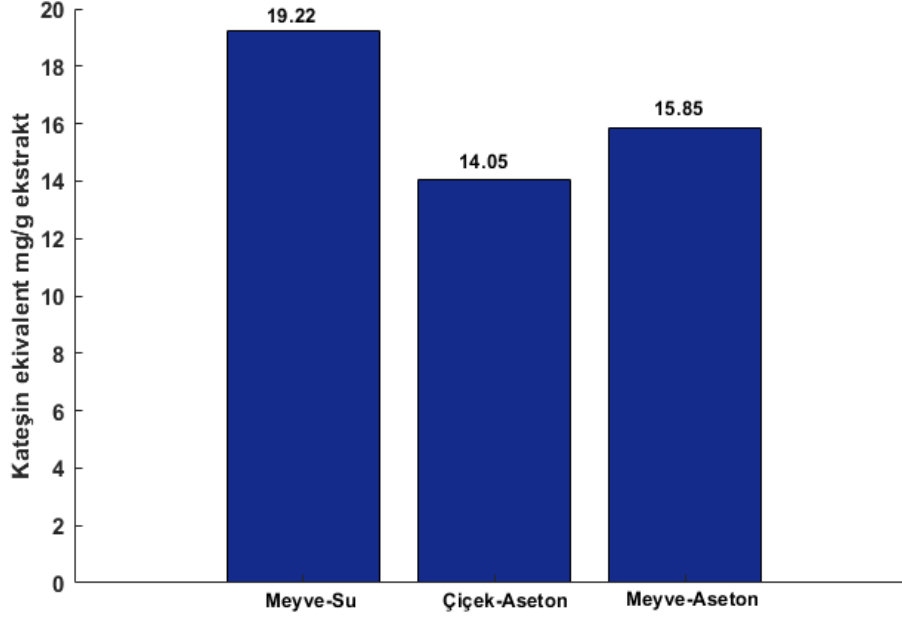
Kateşin standart grafiği denklemi $y=0,003x+0,0034$ bulundu ve hesaplama aşağıdaki formüle göre yapıldı.

$$\text{Absorbans}_{(500 \text{ nm})} = 0,003[\text{Kateşin}] + 0,0034$$



Şekil 40. Kateşin standart grafiği

Üvezin çiçeğinin aseton ekstraktının antosiyanin içeriği kateşin ekivalenti olarak 14,05 mg/g iken, üvezin meyvesinin su ekstraktının antosiyanin içeriğinin kateşin ekivalenti olarak 19,22 mg/g olduğu, aseton ekstraktının ise antosiyanin içeriğinin kateşin ekivalenti olarak 15,85 mg/g olarak belirlenmiştir.

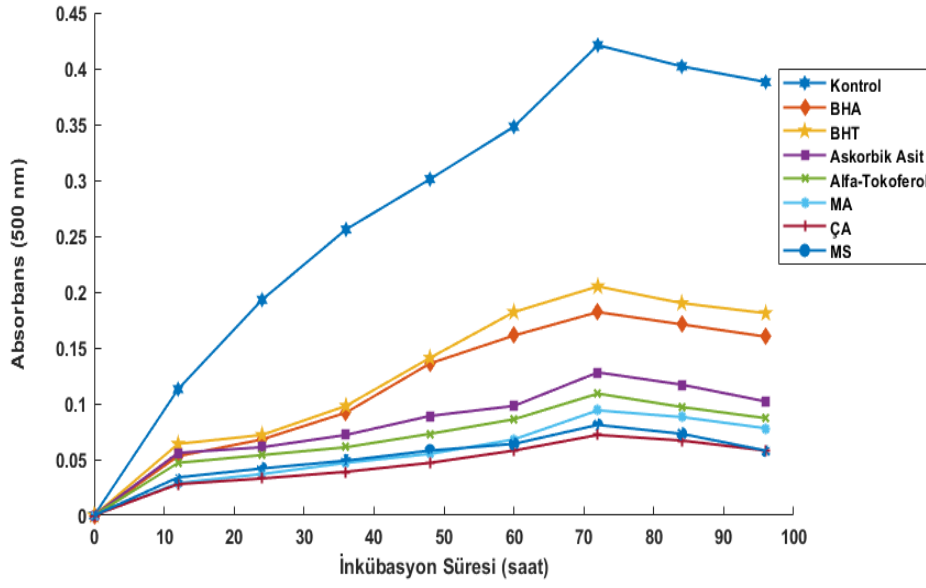


Şekil 41. Kateşin eşdeğeri olarak antosiyanin içerikleri

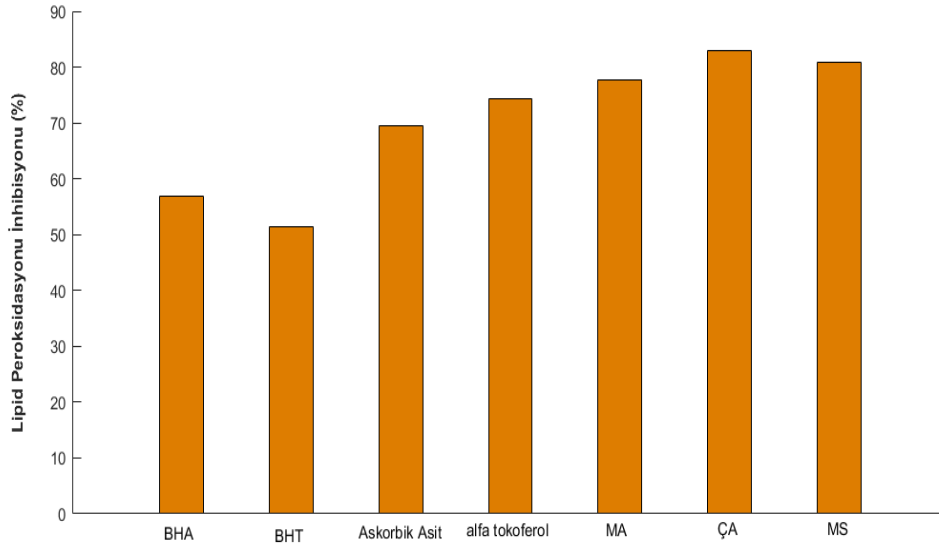
LİNOLEİK ASİT SİSTEMİNDE FERRİK TİYOSİYANAT (FTC) METODU İLE TOPLAM ANTİOKSİDAN AKTİVİTE TAYİNİ

Lipid peroksidasyonu serbest radikal reaksiyonları sonucu en çok hasara uğrayan bir proses olup, meydana gelen bu hasar geri dönüşümsüzdür. Böylece birçok hastalığı ve doku hasarını da beraberinde getirir.

Ferrik tiyosiyanat (FTC) metodu kullanılarak ekstraktların lipid peroksidasyonunu inhibe etmeleri, BHT, BHA, α -tokoferol ve askorbik asit ile sonuçlar karşılaştırılarak değerlendirildi. Peroksidasyon işlemi 12 saatte bir ölçüm alınarak 96 saat süreyle izlendi ve kontrolün absorbans değerinin maksimum anındaki değerlerden hareketle ekstraktların ve standartların grafikleri çizildi (Şekil 42, Şekil 43, Şekil 44, Şekil 45, Şekil 46, Şekil 47, Şekil 48, Şekil 49, Şekil 50 ve Şekil 51).

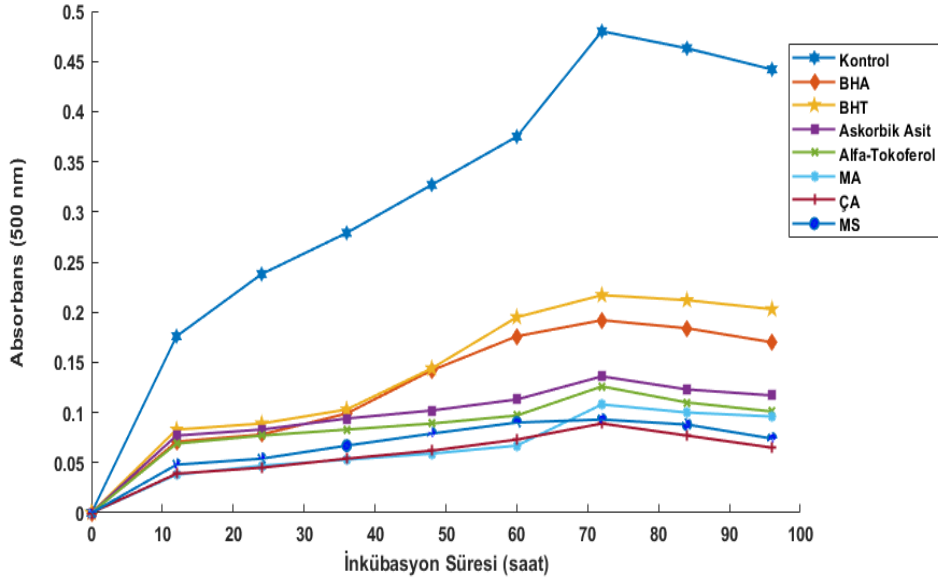


Şekil 42. Üvez ekstraktları ve standartlarının 50 µg/mL konsantrasyonlarındaki linoleik asit peroksidasyonunun zamanla değişimi

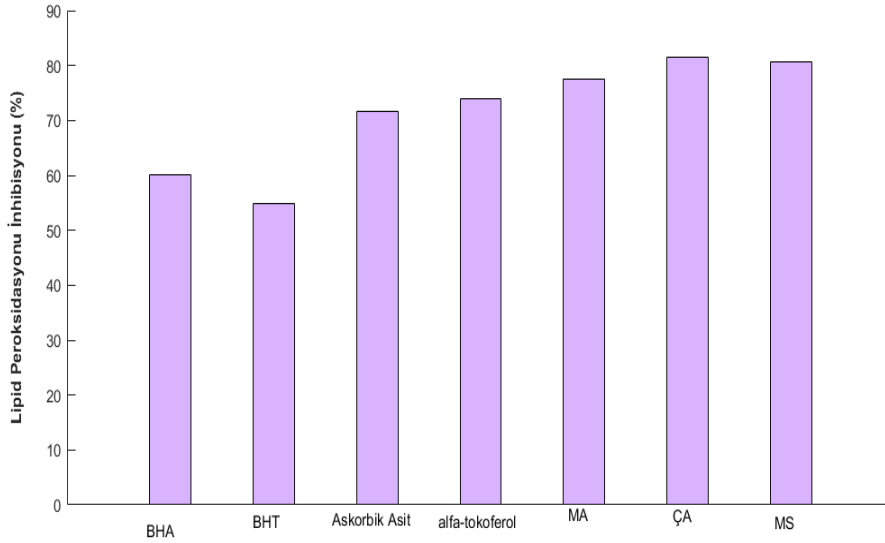


Şekil 43. Üvez ekstraktlarının 50 µg/mL konsantrasyonlarında lipid peroksidasyonunu inhibe yüzdelerinin standart antioksidanlar ile değerlendirilmesi

Şekil 43'e göre 50 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan üvezin meyvesinin su ve aseton ekstraktlarının lipid peroksidasyonu sırasıyla %80.82±0,18 ve %77.77±0,66, üvezin çiçeğinin aseton ekstraktının lipid peroksidasyonu %82.90±0,10, standart olarak kullanılan BHA, BHT, Askorbik asit ve α-tokoferolün lipid peroksidasyonları ise sırasıyla %56.81±0,21, %51.42±0,40, %69.44±0,38, %74,28±0,23 olarak belirlendi.

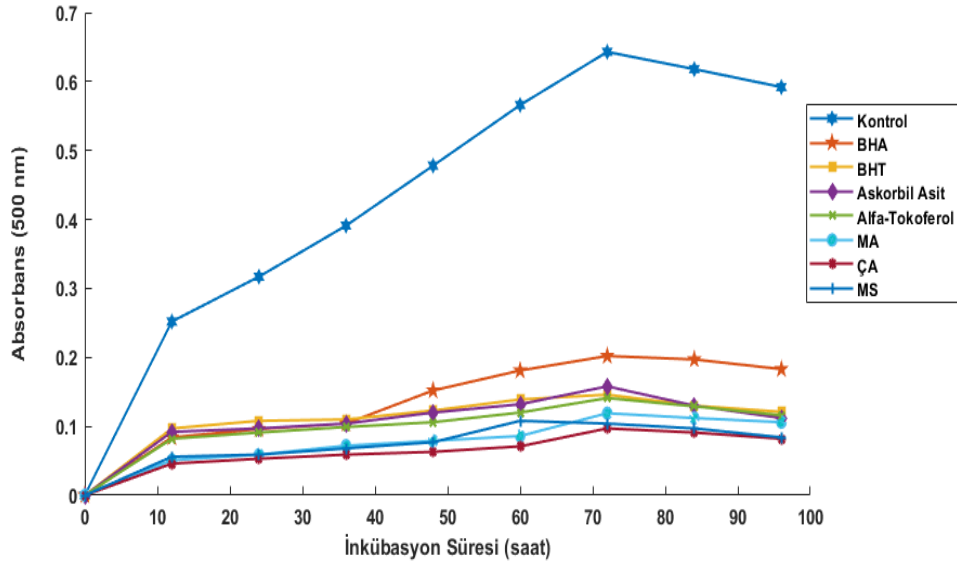


Şekil 44. Üvez ekstraktları ve standartlarının 100 µg/mL konsantrasyonlarındaki linoleik asit peroksidasyonunun zamanla değişimi

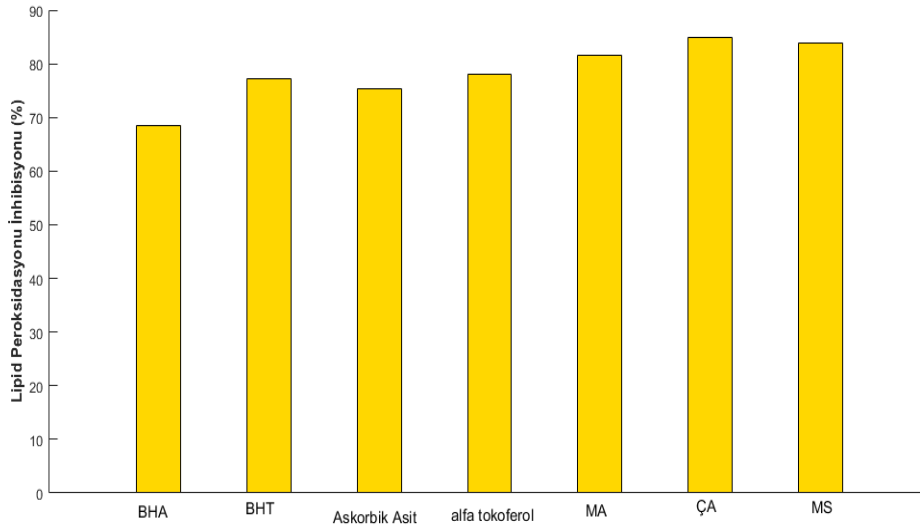


Şekil 45. Üvez ekstraktlarının 100 µg/mL konsantrasyonlarında lipid peroksidasyonunu inhibe yüzdelerinin standart antioksidanlar ile değerlendirilmesi

Şekil 45'e göre 100 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan üvez meyvesinin su ve aseton ekstraktlarının lipid peroksidasyonunu inhibe etme miktarları sırasıyla %80.72±0,70 ve %77.51±0,21, üvez çiçeğinin aseton ekstraktının lipid peroksidasyonunu inhibe etme miktarı %81.57±0,77, standart olarak kullanılan BHA, BHT, Askorbik asit ve α-tokoferolün lipid peroksidasyonunu inhibe etme miktarları ise sırasıyla %60.08±0,12, %54.82±0,40, %71.72±0,64, %73.88±0,18 olarak belirlendi.

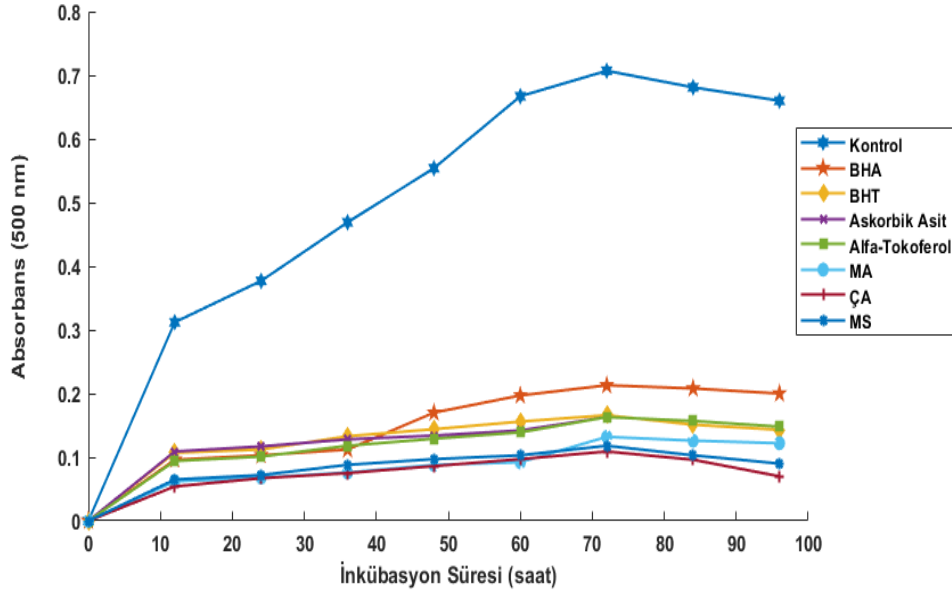


Şekil 46. Üvez ekstraktları ve standartlarının 150 µg/mL konsantrasyonlarındaki linoleik asit peroksidasyonunun zamanla değişimi

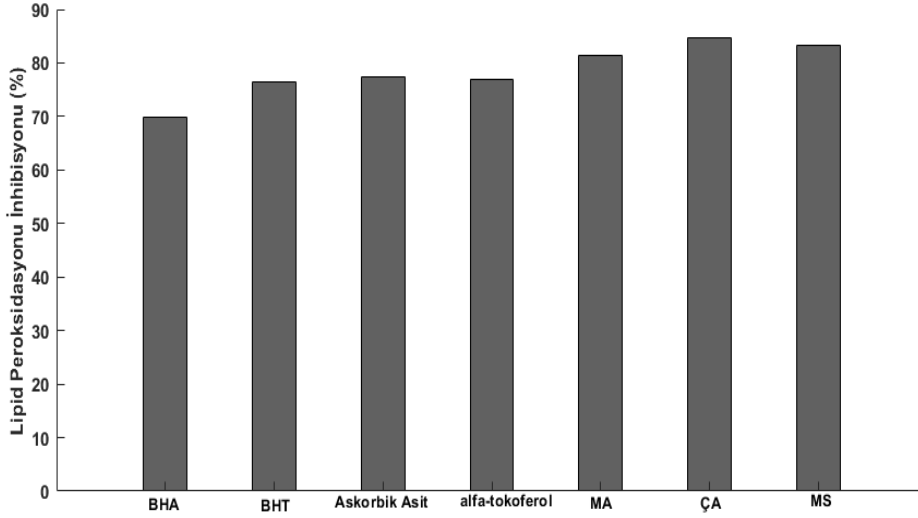


Şekil 47. Üvez ekstraktlarının 150 µg/mL konsantrasyonlarında lipid peroksidasyonunu inhibe yüzdelerinin standart antioksidanlar ile değerlendirilmesi

Şekil 47'ye göre 150 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan üvezin meyvesinin su ve aseton ekstraktlarının lipid peroksidasyonunu inhibe etme yüzdeleri sırasıyla %83.83±0,41 ve %81.50±0,69, üvezin çiçeğinin aseton ekstraktının lipid peroksidasyonunu inhibe etme miktarı %84.92±0,55, standart olarak kullanılan BHA, BHT, Askorbik asit ve α -tokoferolün ise lipid peroksidasyonunu inhibe etme yüzdelerinin sırasıyla %68.59±0,52, %77.30±0,30, %75.43±0,23, %78.08±0,84 olduğu belirlendi.

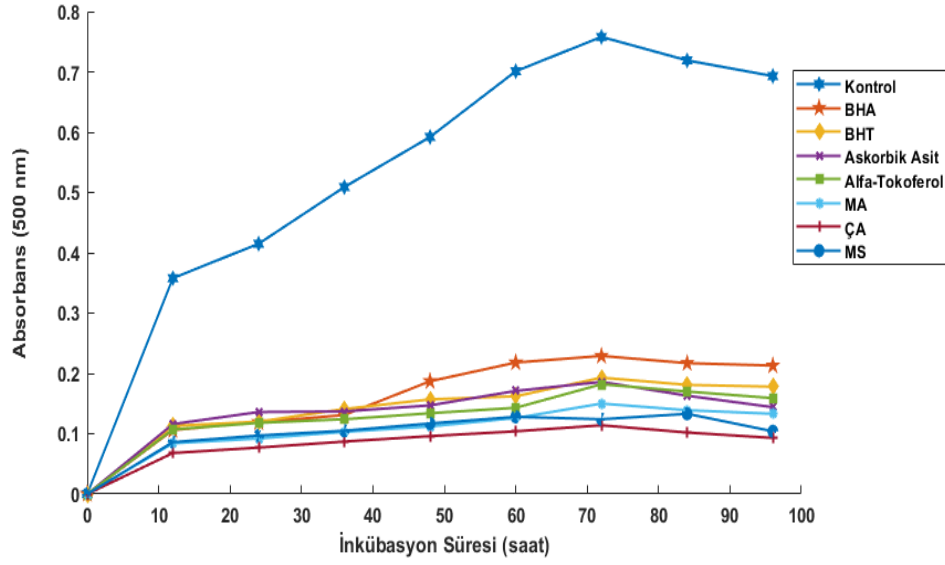


Şekil 48. Üvez ekstraktları ve standartlarının 200 µg/mL konsantrasyonlarındaki linoleik asit peroksidasyonunun zamanla değişimi

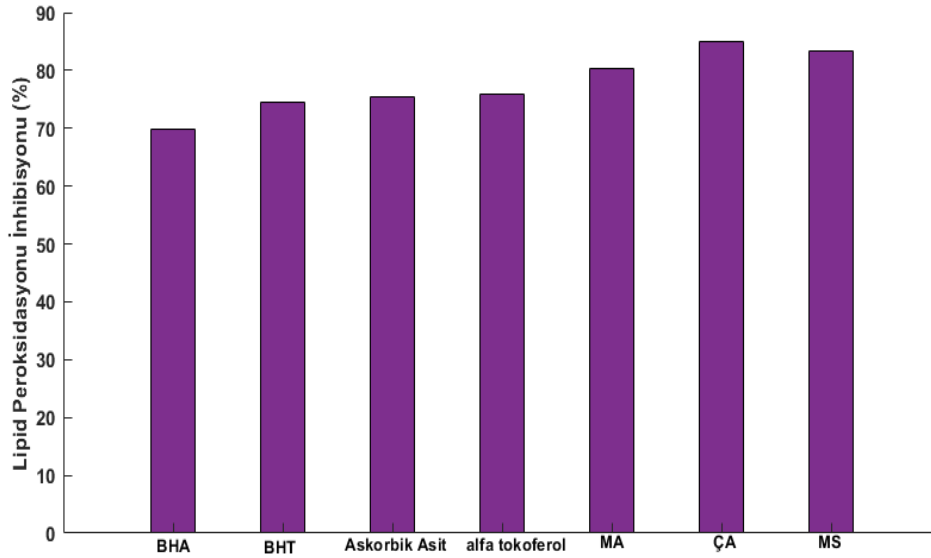


Şekil 49. Üvez ekstraktlarının 200 µg/mL konsantrasyonlarında lipid peroksidasyonunu inhibe etme yüzdelerinin standart antioksidanlar ile değerlendirilmesi

Şekil 49'a göre 200 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan üvez meyvesinin su ve aseton ekstraktlarının lipid peroksidasyonunu inhibe etme miktarları sırasıyla %83.31±0,24 ve %81.33±0,04 iken, üvezin çiçeğinin aseton ekstraktının lipid peroksidasyonu inhibisyonu %84.59±0,72, standart olarak kullanılan BHA, BHT, Askorbik asit ve α-tokoferolün lipid peroksidasyonunu inhibe etme oranları ise sırasıyla %69.88±0,72, %76.53±0,94, %77.37±0,08, %76.95±0,51 olarak belirlendi.



Şekil 50. Ekstraktların ve standartların 250 µg/mL konsantrasyonlarındaki linoleik asit peroksidasyonunun zamanla değişimi



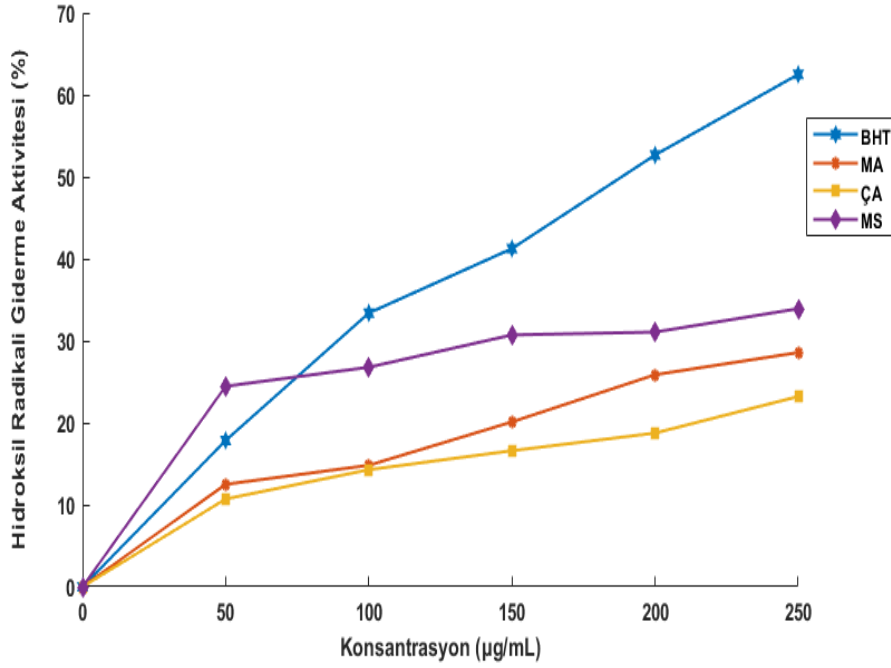
Şekil 51. Ekstraktların 250 µg/mL konsantrasyonlarında lipid peroksidasyonunu inhibe etme yüzdelerinin standart antioksidanlar ile değerlendirilmesi

Şekil 51'e göre 250 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan üvezin meyvesinin su ve aseton ekstraktlarının lipid peroksidasyonunu inhibe etme oranları sırasıyla $83.47 \pm 0,88$ ve $80.22 \pm 0,89$, üvezin çiçeğinin aseton ekstraktının lipid peroksidasyonunu inhibe etme yüzdesi $84.97 \pm 0,95$ iken, standart olarak kullanılan BHA, BHT, Askorbik asit ve α -tokoferolün lipid peroksidasyonunu inhibe etme miktarları ise sırasıyla $69.79 \pm 0,10$, $74.54 \pm 0,17$, $75.47 \pm 0,82$, $75.99 \pm 0,05$ olarak belirlendi.

HİDROKSİL RADİKALİ GİDERME AKTİVİTESİ

Üvez ekstraktlarının hidroksil radikalini giderme aktivitesi, Fe^{3+} /askorbat/EDTA/ H_2O_2 sistemi ile oluşturulan hidroksil radikallerinin deoksiribozu bozundurması ile meydana gelen tiyobarbitürik asit reaktif ürünlerinin 532 nm’de ölçümü ile belirlenmiştir.

Standart olarak BHT kullanıldı. Ekstraktların hidroksil radikalini gidermeleri aktiviteleri aşağıdaki grafiğe göre belirlendi (Şekil 52).



Şekil 52. Üvez ekstraktlarının hidroksil radikali giderme aktiviteleri

Üvezin meyvesinin aseton ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarındaki hidroksil radikali giderme aktiviteleri sırasıyla; %12.5±0,41, %14.82±0,14, %20.11±0,22, %25.89±0,28, %28.57±0,71 olarak belirlendi.

Üvezin çiçeğinin aseton ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarındaki hidroksil radikali giderme aktiviteleri ise sırasıyla; %10.71±0,42, %14.28±0,57, %16.60±0,71, %18.75±0,88, %23.21±0,42 olarak bulundu.

Üvezin meyvesinin ise su ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarındaki hidroksil radikali giderme aktivitelerinin sırasıyla; %24.46±0,42, %26.78±0,57, %30.72±0,25, %31.07±0,14, %33.92±0,85 olarak arttığı tespit edildi.

Standart olarak kullanılan BHT'nin 50-250 µg/mL konsantrasyonlarındaki hidroksil radikali giderme aktivitesinin sırasıyla; %17.85±0,71, %33.39±0,28, %41.25±0,15, %52.67±0,85, %62.5±0,32 şeklinde konsantrasyon arttıkça arttığı tespit edildi.

OH• radikalinin %50'sini gidermek için gerekli konsantrasyon olan EC₅₀ değerleri hesaplanarak sonuçlar değerlendirilmiştir (Tablo 11).

Tablo 11. Hidroksil radikali verilerinden hesaplanan EC₅₀ değerleri

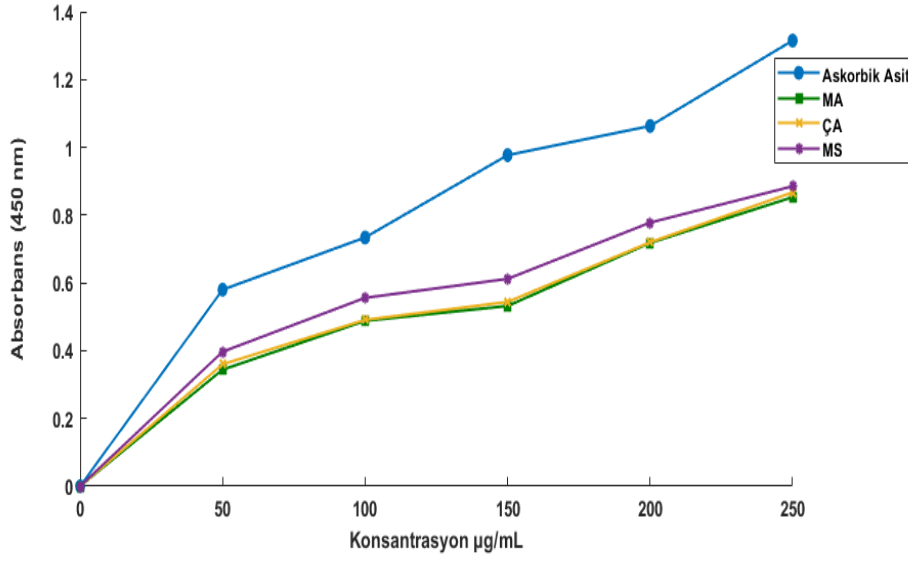
EC ₅₀ (µg/mL)		
Ekstraktlar		
Meyve-su	Çiçek-aseton	Meyve-aseton
12.48±0,81	7.80±0,25	10.14±0,29
Standart		
BHT		
14.62±0,57		

Tablo 11'de görüldüğü gibi düşük EC₅₀ değeri yüksek radikal giderme aktivitesinin belirtisi olduğu görüşünden hareketle, en düşük EC₅₀ değerinin meyve-su ekstraktında olduğu, dolayısıyla en yüksek radikal giderme aktivitesine meyve-su ekstraktında rastlandığı saptandı.

BAKIR İYONLARINI İNDİRGEME POTANSİYELİ (CUPRAC METODU)

Cu(II) iyonlarını indirgeme kapasitesine dayanarak toplam antioksidan miktarını ölçmeye yarayan bir yöntemdir. Ayrıca Cu(II) serbest radikal reaksiyonlarını hızlandırarak katalizör görevi de görür.

Metodun sonucunda 450 nm'de okunan yüksek absorbans yüksek bir indirgeme gücünün göstergesidir. Ekstraktların bakır iyonlarını indirgeme gücü konsantrasyon-absorbans grafiği Şekil 53'te verilmiştir.



Şekil 53. Ekstraktların ve askorbik asidin bakır iyonlarını indirgeme gücü

Üvezin meyvesinin aseton ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarındaki bakır iyonlarını indirgeme gücü sırasıyla $0.344 \pm 0,038$, $0.488 \pm 0,021$, $0.532 \pm 0,030$, $0.718 \pm 0,009$, $0.853 \pm 0,050$ olarak belirlendi.

Üvezin meyvesinin su ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarındaki bakır iyonlarını indirgeme gücü ise sırasıyla $0.397 \pm 0,065$, $0.556 \pm 0,081$, $0.612 \pm 0,066$, $0.778 \pm 0,070$, $0.885 \pm 0,016$ olarak tespit edildi.

Üvezin çiçeğinin aseton ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarındaki bakır iyonlarını indirgeme gücünün sırasıyla $0.360 \pm 0,039$, $0.491 \pm 0,072$, $0.544 \pm 0,040$, $0.720 \pm 0,020$, $0.867 \pm 0,071$ olduğu bulundu.

Ekstraktların EC_{50} değeri hesaplanarak da sonuçlar değerlendirildi (Tablo 12).

Tablo 12. Bakır iyonlarını indirgeme gücü sonuçlarından hesaplanan EC_{50} değerleri

EC_{50} (µg/mL)		
Ekstraktlar		
Meyve-su	Çiçek-aseton	Meyve-aseton
$0,231 \pm 0,025$	$0,206 \pm 0,075$	$0,223 \pm 0,025$
Standart		
Askorik Asit		
$0,348 \pm 0,075$		

Tablo 12'ye göre; çalışılan ekstraktlar içinde en düşük EC₅₀ değeri çiçek-aseton ekstraktında, en yüksek EC₅₀ değeri askorbik asitte tayin edildi.

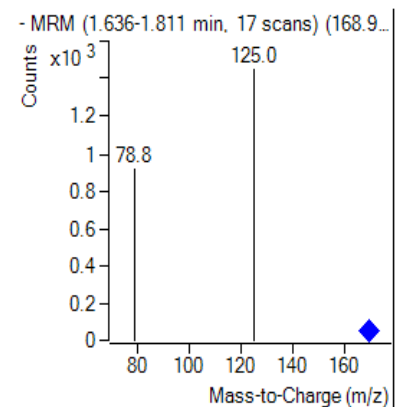
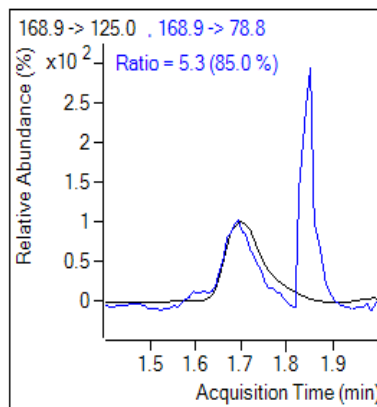
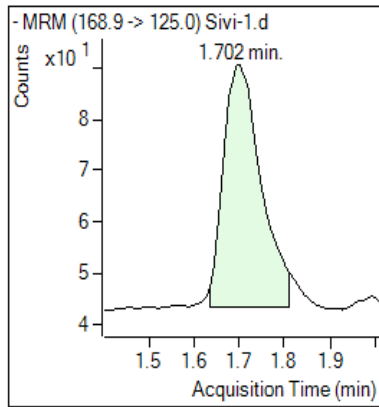
LC-MS/MS YÖNTEMİ İLE FENOLİK MADDE ANALİZİ

Bitki ekstraktının fenolik madde analizi Petra ve arkadaşlarının belirledikleri metoda göre yapıldı. Toplam fenolik madde içeriğinin belirlenmesinde ve diğer antioksidan aktivite denemelerinde ekstraktlar içinde en yüksek aktivite meyvenin su ekstraktında olduğu için fenolik madde analizinde bu ekstrakt kullanılmıştır. Ekstraktın içerdiği fenolik madde miktarı ppb olarak belirlenmiştir.

Tablo 13. Üvezin meyve ekstraktından elde edilen fenolik maddeler ve konsantrasyonları

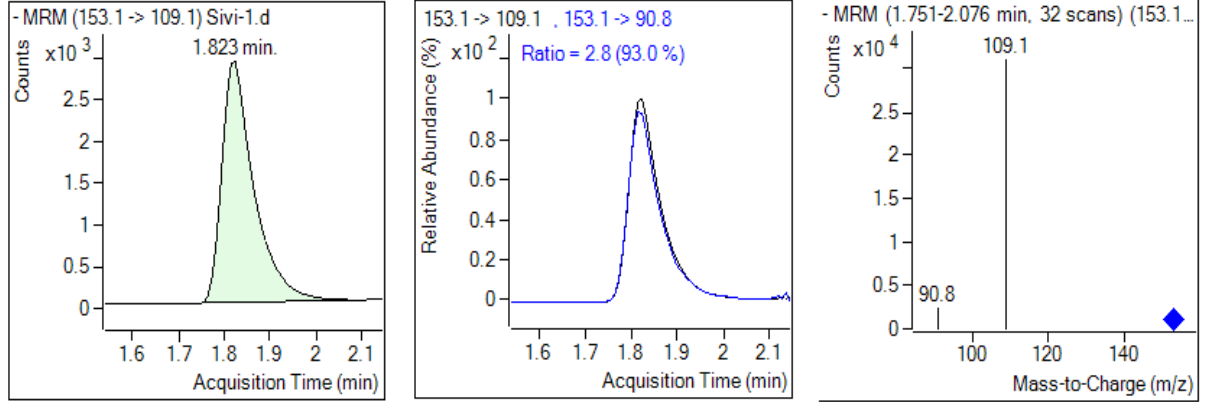
Bulunan Fenolik Maddeler	Konsantrasyon (ppb)
Gallik asit	33,3328
Protokatekuik asit	3110,1348
Salisilik asit	472,5628
Siringik asit	468,5860
Rutin	158,2384
Absisik asit	1832,3300
Jasmonik asit	5,1800
GSH	3,2825
GSSG	7,4536

Target Compound Gallic Acid



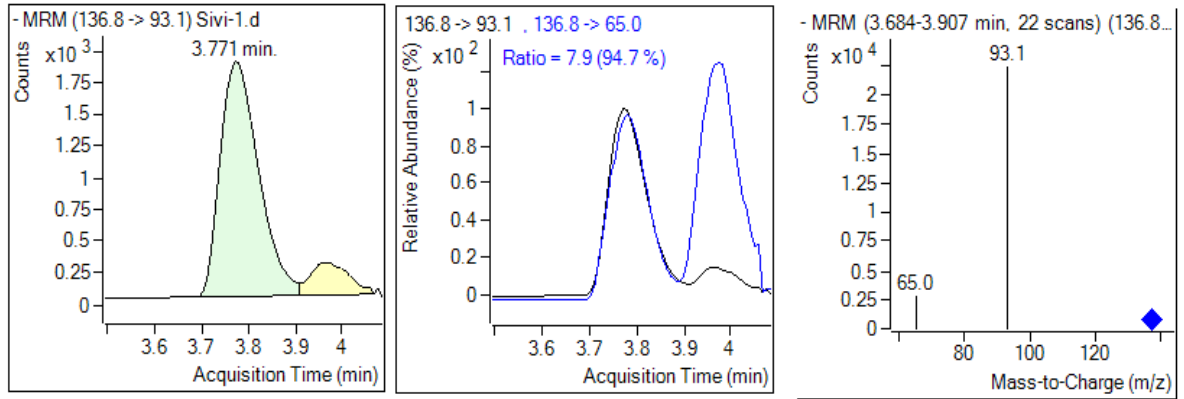
Şekil 54. Üvezin meyve ekstraktının gallik asit spektrumu

Target Compound Protocatechuic Acid



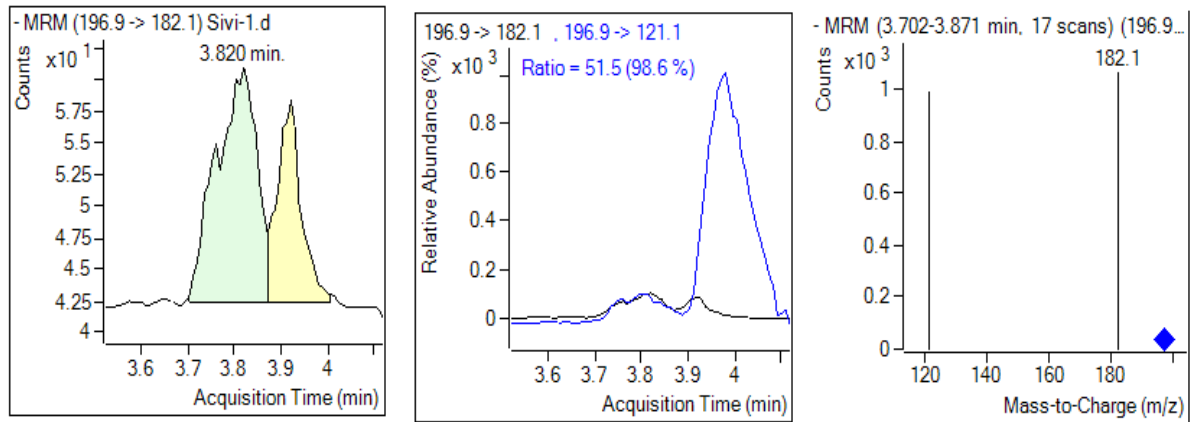
Şekil 55. Üvezin meyve ekstraktının protokatekuik asit spektrumu

Target Compound Salicylic Acid



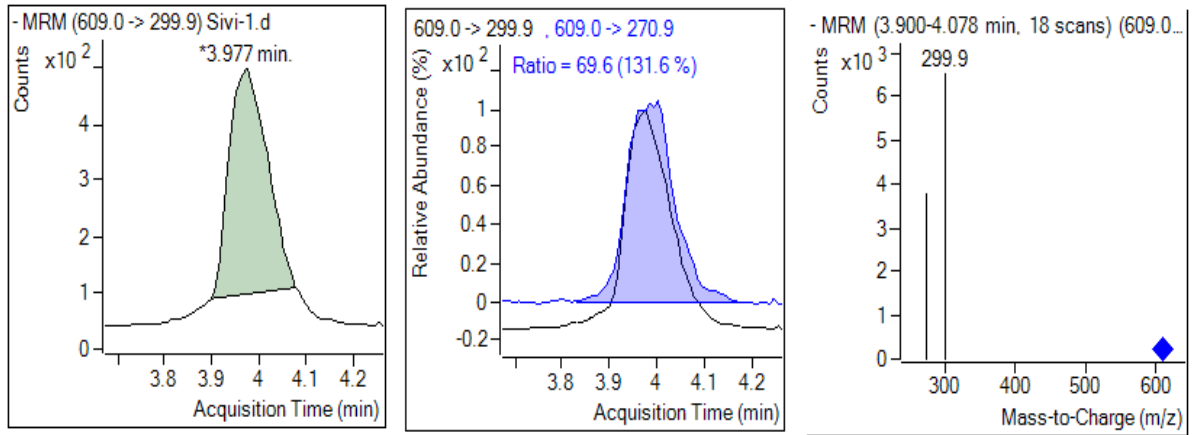
Şekil 56. Üvezin meyve ekstraktının salisilik asit spektrumu

Target Compound Syringic Acid



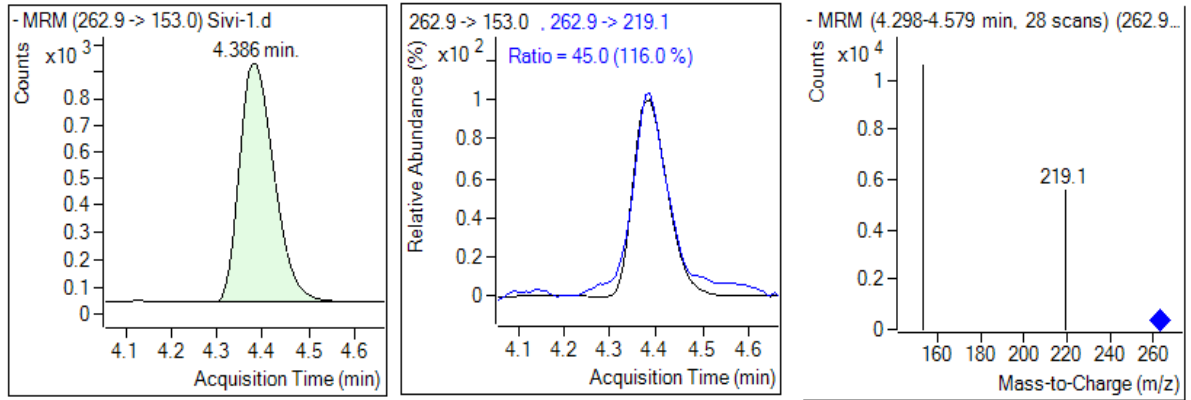
Şekil 57. Üvezin meyve ekstraktının syringik asit spektrumu

Target Compound Rutin



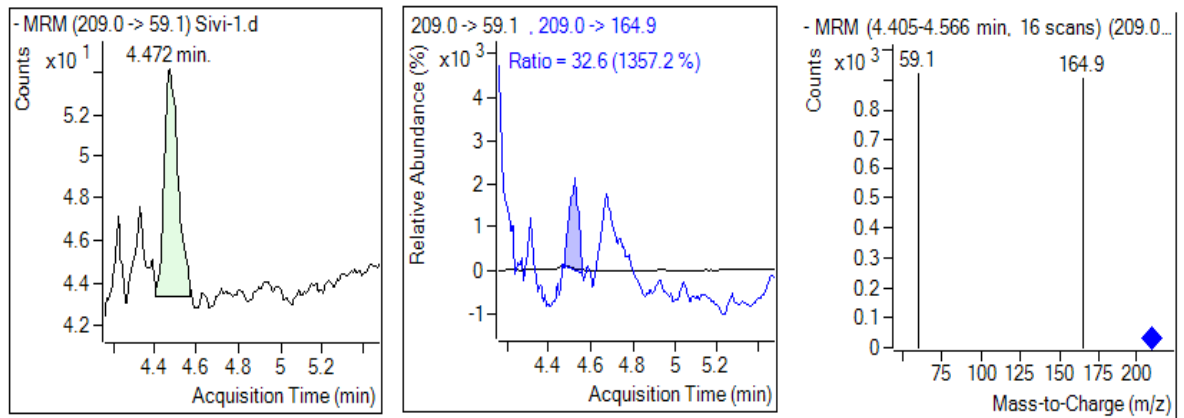
Şekil 58. Üvezin meyve ekstraktının rutin spektrumu

Target Compound Abscisic Acid



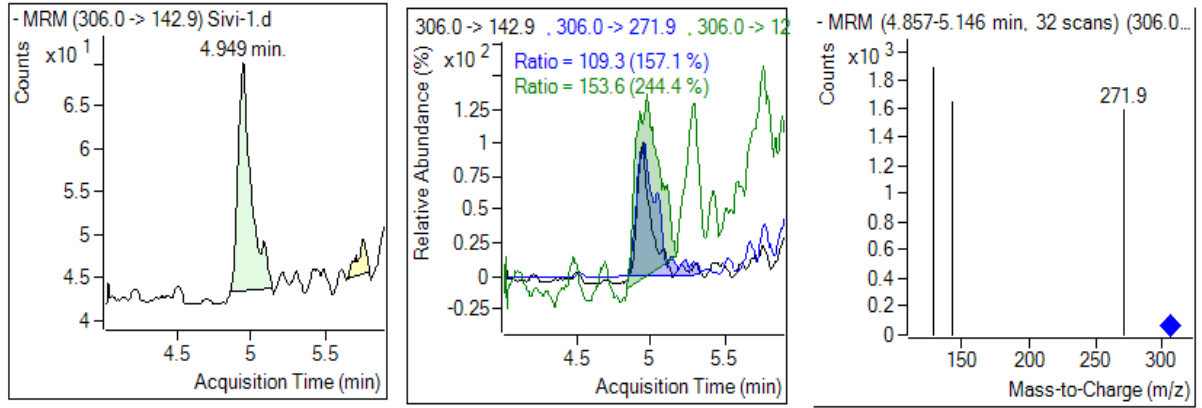
Şekil 59. Üvezin meyve ekstraktının absisik asit spektrumu

Target Compound Jasmonic Acid



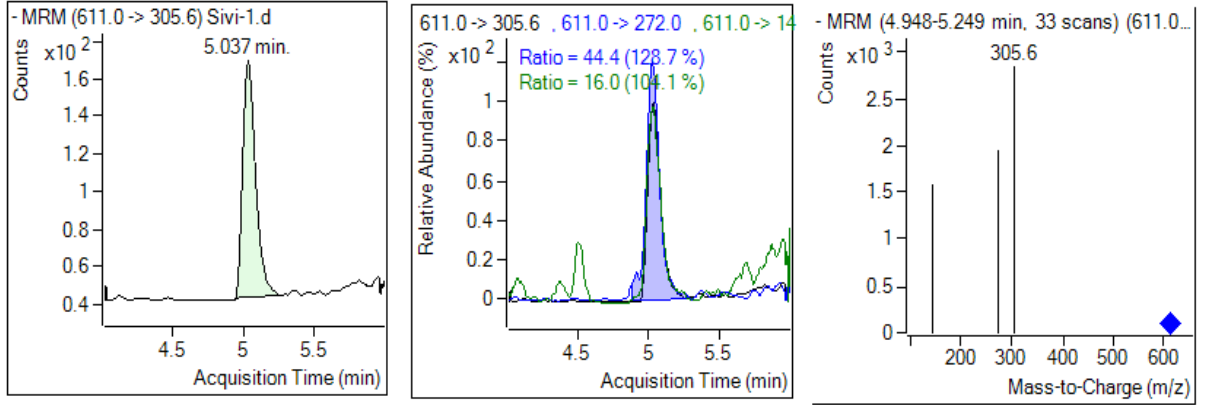
Şekil 60. Üvezin meyve ekstraktının jasmonik asit spektrumu

Target Compound GSH



Şekil 61. Üvezin meyve ekstraktının GSH spektrumu

Target Compound GSSG



Şekil 62. Üvezin meyve ekstraktının GSSG spektrumu

Tablo 14. Üvezin meyvesinde bulunan 9 önemli fenolik bileşimin alıkonma süreleri ve m/z değerleri

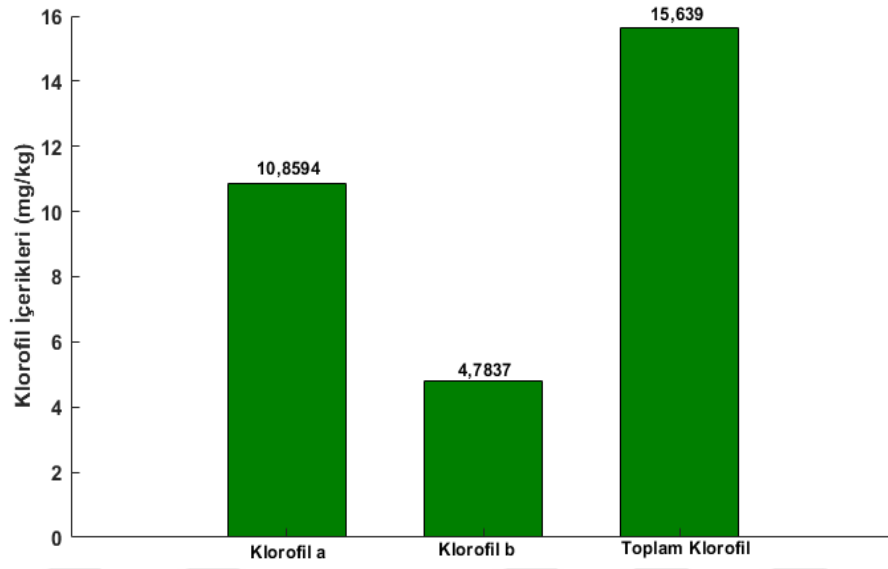
Pik değeri	Bileşik	Alıkonma süresi	[M-H]⁻ (m/z)
1	Gallik asit	1,694	169
2	Protokatekuik asit	1,823	153
3	Salisilik asit	3,771	137
4	Siringik asit	3,778	197
5	Rutin	3,968	609
6	Absisik asit	4,386	263
7	Jasmonik asit	4,481	209
8	GSH	4,949	306
9	GSSG	5,037	611

KLOROFİL TAYİNİ

Klorofil fotosentez işlemi için gerekli olup yeşil bitkilerde bulunan pigmentler karışımıdır. Klorofil a (mavi-yeşil renkli) ve klorofil b (sarı-yeşil renkli)' den oluşmuştur.

Üvez yaprağının klorofil miktarı yaş ağırlığı esas alınarak mg/yaş kg olarak hesaplandı (Şekil 63).

Üvez yağrağının, klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil içeriği sırasıyla 10.8594 mg/kg(yaş), 4.7837 mg/kg(yaş), 15.6390 mg/kg(yaş) olarak belirlenmiştir.



Şekil 63. Üvez yaprağının klorofil içeriği

TARTIŞMA

Bu çalışmada üvez (*S. domestica*) meyvesinin su ve aseton, çiçeğinin ise aseton ekstraktlarının toplam fenolik ve flavonoid bileşik miktarları tayin edilerek ekstraktların antioksidan aktiviteleri çeşitli metodlar kullanılarak incelenmiştir.

Üvez meyvelerinden elde edilen su ve aseton ekstraktlarının ekstraksiyon verimleri sırasıyla 327.36 mg/g, 148.37 mg/g ekstrakt olarak, çiçeğinin aseton ekstraktının ekstraksiyon verimi 61.708 mg/g ekstrakt olarak bulundu. En yüksek ekstraksiyon veriminin meyvenin su ekstraktında olduğu gözlemlendi.

TOPLAM FENOLİK BİLEŞİK (TPC) TAYİNİ

Yapılan çalışmada şekil 26'ya göre fenolik madde miktarı gallik asit ekivalenti cinsinden üvez meyvesinin aseton ve su ekstraktlarının sırasıyla $41.48 \pm 0,53$ mg/g, $43.71 \pm 0,83$ mg/g, çiçeğinin ise aseton ekstraktının $42.37 \pm 0,68$ mg/g ekstrakt olduğu belirlendi. Fenolik madde içerikleri gallik asit eşdeğeri olarak meyve-su>çiçek-aseton>meyve-aseton şeklinde bir azalma göstermektedir.

Üvez meyvesinin piroketaşol ekivalenti cinsinden fenolik madde miktarı Şekil 27'ye göre aseton ve su ekstraktlarının sırasıyla $26.71 \pm 0,33$ mg/g, $28.14 \pm 0,08$ mg/g, çiçeğinin aseton ekstraktının $27.28 \pm 0,24$ mg/g ekstrakt olduğu belirlendi. Fenolik madde içerikleri pirokateşol eşdeğeri olarak meyve-su>çiçek-aseton>meyve-aseton şeklinde bir azalma göstermektedir.

Sanchez-Salcedo vd. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada gallik asit ekivalenti cinsinden beyaz dut ve kara dutun su ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriklerini sırasıyla $12.81\pm 0,14$ ve $13.48\pm 0,46$ mg/g kuru ağırlık olarak belirlemişlerdir (60).

Can ve Hasbal (2013) çalışmalarında akçaağaç yapraklı üvez bitkisinin su ve aseton ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriğini gallik asit cinsinden sırasıyla $20.44\pm 0,910$ ve $8.38\pm 1,151$ mg/g olarak belirlemişlerdir (19). Çalışma sonuçlarımıza göre en yüksek fenolik madde içeriği meyvenin su ekstraktında gözlenmiştir.

TOPLAM FLAVONOID İÇERİĞİNİN TAYİNİ

Yapılan bu çalışmada şekil 30'a göre flavonoid madde miktarı gallik asit ekivalenti cinsinden üvez meyvesinin aseton ve su ekstraktlarının sırasıyla $76.75\pm 0,96$ mg/g, $80.53\pm 1,00$ mg/g, çiçeğinin ise aseton ekstraktının $73.91\pm 1,21$ mg/g ekstrakt olduğu belirlendi. Flavanoid madde içerikleri gallik asit eşdeğeri olarak meyve-su>meyve-aseton>çiçek-aseton şeklinde bir azalma göstermektedir.

Üvezin meyvesinin flavonoid madde içerikleri kuersetin ekivalenti cinsinden Şekil 31'e göre aseton ve su ekstraktlarının sırasıyla $122.81\pm 0,82$ mg/g, $123.96\pm 0,61$ mg/g, çiçeğinin ise aseton ekstraktının $121.96\pm 0,67$ mg/g ekstrakt olduğu belirlendi. Ekstraktların flavanoid madde içerikleri kuersetin eşdeğeri olarak meyve-su>meyve-aseton>çiçek-aseton bir azalma gösterdiği tespit edildi.

Can ve Hasbal (2013) çalışmalarında *S. torminalis* bitkisinin su, etil asetat, metanol ve aseton ekstraktlarının toplam flavanoid madde içeriğini kateşin ekivalenti cinsinden sırasıyla $12.19\pm 2,005$, $1.61\pm 0,410$, $1.73\pm 0,612$, $2.00\pm 0,214$ mg/g olarak bulduklarını bildirmişlerdir (19).

Mahmoudi vd. (2016) çalışmalarında 10 farklı incir (*Ficus carica* L.) türünün; Onk Elhamam, Hamra, Zarrouk, Boughandjo, Safra, Bidha, Chatwi, Bither, Bakkor, Dhokkar türlerinin toplam flavonoid madde içeriğini kuersetin eşdeğeri olarak sırasıyla $12.558\pm 0,116$, $12.492\pm 0,093$, $11.700\pm 0,132$, $14.455\pm 0,396$, $16.093\pm 0,166$, $15.446\pm 0,040$, $16.211\pm 0,156$, $13.980\pm 0,060$, $14.795\pm 0,306$, $11.667\pm 0,041$ mg/g ekstrakt olarak belirlemişlerdir (43).

DEMİR (II) İYONLARINI ŞELATLAMA AKTİVİTESİ

Ekstraktların ve standart çözeltilerin metal şelatlama aktivitesi artan konsantrasyonla birlikte artış göstermiştir. Üvezin meyvesinin aseton ve su ekstraktları ile çiçeğinin aseton ekstraktının metal şelatlama kapasitesi Şekil 32’de gösterilmiştir. Üvezin meyvesinin aseton ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında sırasıyla %27.77±0,85, %28.96±0,92, %30.55±0,47, %32.14±0,19, %33.73±0,23 şelatlama aktivitesi, meyvesinin su ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında sırasıyla %34.52±0,81, %36.50±0,77, %38.09±0,53, %39.28±0,44, %40.47±0,88 şelatlama aktivitesi, çiçeğinin aseton ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında sırasıyla %31.34±0,78, %33.33±0,26, %34.92±0,38, %36.90±0,07, %38.49±0,41 Fe²⁺ şelatlama aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir.

Ekstraktlardan meyve su ekstraktının diğer ekstraktlara göre daha yüksek şelatlama aktivitesi gösterdiği ve ayrıca çalışılan standartlara yakın değerlerde aktiviteye sahip olduğu ama EDTA kadar iyi olmadığı belirlenmiştir.

Adjimani ve Asare (2015) çalışmalarında 2,3-dihidroksibenzoik asit, kafeik asit, desferroksamin B ve benzohidroksamik asitin EDTA’ya göre Fe²⁺ iyonlarını şelatlama aktivitelerini kıyaslamışlar ve desferroksamin B’nin %93,7, benzohidroksamik asitin %61,5, kafeik asitin %24,4, 2,3-dihidroksibenzoik asitin %5,0 olduğunu ama EDTA kadar iyi olmadığını belirlemişlerdir (1).

DPPH• RADİKALİ GİDERME AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Çalışmamızda ekstraktların radikal giderme kapasitelerine ait grafikler Şekil 33’te görülmektedir. Buna göre artan konsantrasyonla birlikte radikal giderme aktivitesinde de bir artış görülmüştür.

Üvezin meyvesinin aseton ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında sırasıyla %22.58±0,06, %25.44±0,41, %27.41±0,93, %29.03±0,22, %31.45±0,16 oranında radikal giderme aktivitesi, meyvesinin su ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında sırasıyla %37.90±0,32, %39.51±0,61, %41.12±0,90, %42.74±0,19, %44.35±0,48 radikal giderme aktivitesi, çiçeğinin aseton ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında sırasıyla %26.61±0,29, %28.22±0,58, %30.64±0,51, %32.25±0,80, %34.67±0,77 radikal giderme aktivitesi tespit edildi. Ekstraktların radikal giderme aktivitelerinin sırasıyla meyve-su>çiçek-aseton>meyve-aseton şeklinde azaldığı tespit edildi.

Topçu ve Yılmaz (2011) nemrut pisiği (*Nepata sorgeare*) bitkisinin metanol ekstraktının DPPH• radikali giderme aktivitesinin 10, 25, 50, 100 µg/mL konsantrasyonlarında sırasıyla %9.050, %21.680, %40.180, %61.640 oranlarında olduğunu ve kum pisiği (*Nepata obtusicrena*) bitkisinin metanol ekstraktının DPPH• radikal giderme aktivitesinin ise 10, 25, 50, 100 µg/mL konsantrasyonlarında sırasıyla %10.600, %25.820, %45.820, %68.660 olduğunu belirlemişlerdir (68).

Sanchez-Salcedo vd. (2015) tarafından beyaz dut ve kara dutun DPPH• radikal giderme aktivitelerinin sırasıyla %12.64±0,22 ve %10.62±0,26 olduğu hesaplanmıştır (60).

Yapılan çalışmada tablo 5'e göre DPPH• radikali giderme aktivitesi verilerinden hesaplanan EC₅₀ değerleri üvezin meyvesinin aseton ve su ekstraktları için sırasıyla 14.08±0,44 ve 9.86±0,25, çiçeğinin aseton ekstraktının ise 10.66±0,75 olarak belirlendi.

Termentzi vd. (2006) *Sorbus domestica* meyvelerinin su ekstraktının farklı olgunluk aşamalarında DPPH• radikali giderme aktivitesi sonuçlarının EC₅₀ değerlerini 6.29±0,20, 4.829±0,12, 3.72±0,08 olarak belirlemişlerdir (66).

Çalışma sonuçlarımıza göre en yüksek EC₅₀ değerinin üvezin meyvesinin su ekstraktında olduğu gözlenmiştir.

H₂O₂ GİDERME AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Ekstraktlar ile standartların H₂O₂ giderme aktiviteleri Şekil 34'te gösterilmiştir. Grafikten de görüldüğü üzere çalışmamızda kullanılan ekstraktların ve standartların H₂O₂ giderme aktiviteleri konsantrasyona bağlıdır. 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan standart ve ekstraktlar içinde en yüksek aktiviteyi meyvenin aseton (%34.37±0,72) ekstraktı göstermiştir.

Üvez ekstraktlarının H₂O₂ giderme etkisi meyve-aseton>meyve-su>çiçek-aseton şeklinde bir azalma gösterdi. Çalışılan ekstraktların 50 µg/mL konsantrasyonları ile standartların aynı konsantrasyonunun H₂O₂ giderme aktiviteleri karşılaştırıldığında; meyve-aseton>meyve-su>çiçek-aseton>BHA>BHT>A.Asit>α-tokoferol şeklinde bir azalma gösterdiği bulundu.

Adjimani ve Asare (2015) çalışmalarında 2,3-dihidroksibenzoik asit, kafeik asit, desferroksamin B ve benzohidroksamik asiti H₂O₂ giderme aktivitesinin tayininde kullanılmış

ve en yüksek aktiviteyi kafeik asitin (%99,8) gösterdiği tespit edilmiştir. Buna en yakın değeri ise benzohidroksamik asidin (%99,2) izlediği bildirilmiştir (1).

TOPLAM FERRİK İYONLARINI (Fe⁺³) İNDİRGEME KAPASİTESİNİN TAYİNİ

Ekstraktlar ve standartların indirgeme kapasiteleri Şekil 35'te gösterilmiştir. Grafikten görüldüğü gibi, standartların artan konsantrasyon ile birlikte artan bir indirgeme kapasitesinin olduğu ancak ekstraktların Fe⁺³'ü standartlar kadar etkili indirgeme kapasitesi göstermediği belirlenmiştir.

Üvezin meyvesinin su ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının Fe³⁺ iyonlarını Fe²⁺'ye indirgeme kapasiteleri sırasıyla 0.060±0,007, 0.071±0,009, 0.079±0,002, 0.086±0,004, 0.097±0,018, meyvesinin aseton ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının Fe³⁺ iyonlarını indirgeme kapasitelerinin ise sırasıyla 0.050±0,010, 0.062±0,013, 0.069±0,015, 0.081±0,011, 0.090±0,018, çiçeğinin aseton ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının Fe³⁺ iyonlarını indirgeme kapasitesi açısından sırasıyla 0.057±0,021, 0.068±0,026, 0.074±0,030, 0.084±0,049, 0.093±0,081 olduğu tespit edilmiştir.

Ekstraktların indirgeme kapasitelerinin birbirine yakın, standartların indirgeme kapasitelerinin birbirine yakın değerler aldığı gözlemlendi. Ekstraktların da ferrik iyonlarını indirgeme kapasitesinin meyve-su>çiçek-aseton>meyve-aseton şeklinde azaldığı, standartların ferrik iyonlarını indirgeme kapasitesinin ise BHA>BHT>α-tokoferol>a.a şeklinde bir azalma gösterdiği belirlendi.

Hasbal vd. (2015) akçaağaç yapraklı üvez (*Sorbus torminalis*) bitkisinin su, etil asetat, aseton ve metanol ekstraktlarının ferrik iyonları indirgeme kapasitelerini sırasıyla 3.51±0,060, 1.60±0,060, 1.17±0,027, 0.45±0,020 olarak tespit etmişlerdir (36). Yapılan bu çalışmada da en yüksek indirgeme potansiyeli su ekstraktında gözlenmiştir.

SÜPEROKSİT ANYON RADİKALİNİ GİDERME AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Ekstraktlar ile standartların süperoksit anyon radikali giderme aktivitesi Şekil 36'da gösterilmiştir. Grafikten görüldüğü üzere artan konsantrasyon ile birlikte artan süperoksit radikal giderme aktivitesi tespit edildi. Bu metodta azalan absorbans süperoksit radikallerinin giderildiğinin göstergesidir. Ekstrakt ve standartların 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında çalışılmıştır.

Üvezin meyvesinin su ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının süperoksit radikali giderme aktiviteleri sırasıyla %36.77±0,91, %37.43±0,19, %38.08±0,48, %38.73±0,77, %39.06±0,42, çiçeğinin aseton ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının süperoksit radikali giderme aktiviteleri sırasıyla %36.99±0,67, %37.97±0,60, %38.52±0,01, %39.39±0,06, %39.71±0,73, meyvesinin aseton ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının süperoksit radikali giderme aktiviteleri ise sırasıyla %34.71±0,16, %35.47±0,33, %35.79±0,97, %36.23±0,50, %36.45±0,26 olarak belirlendi.

Çalışılan ekstraktların 100 µg/mL konsantrasyonları ile standartların süperoksit anyon radikali giderme aktiviteleri karşılaştırıldığında; A.Asit>BHA>BHT>ÇA>MS>MA şeklinde bir azalma olduğu belirlendi.

Hasbal vd. (2015) akçağaç yapraklı üvez (*Sorbus torminalis*) bitkisinin su, etil asetat, aseton ve metanol ekstraktlarının süperoksit anyon radikali giderme aktiviteleri karşılaştırıldığında; quersetin>etil asetat>su>aseton>metanol şeklinde bir azalma olduğunu belirlemişlerdir (36).

ABTS•⁺ RADİKALİ GİDERME AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Ekstraktların ABTS•⁺ radikalini giderme aktivitelerinin konsantrasyona bağlı olduğu bulunmuştur. Bu metodta artan absorbans ABTS•⁺ radikallerinin giderildiği anlamına gelmektedir. Ekstraktların ve standartların hepsi meyvenin aseton ekstraktından daha düşük oranda ABTS•⁺ radikali giderme aktivitesi göstermiştir. ABTS•⁺ radikali giderme aktiviteleri karşılaştırıldığında standartların BHA>A.Asit>BHT>α-tokoferol, ekstraktların ise meyve-aseton>çiçek-aseton>meyve-su sırasında bir azalma gösterdiği belirlenmiştir.

Alanon vd. (2011) ak meşe (*Quercus alba*), sapsız meşe (*Quercus petraea*), pyrenean meşesi (*Quercus pyrenaica*), saplı meşe (*Quercus robur*), anadolu kestanesi (*Castanea sativa*), kiraz (*Prunus avium*) olmak üzere bu bitki türlerinin ABTS•⁺ radikali giderme aktivitelerini sırasıyla; 0.28±0,00, 1.34±0,12, 1.39±0,08, 2.21±0,08, 1.32±0,05, 0.12±0,01 olarak belirlemişlerdir (4).

Hasbal vd. (2015) akçağaç yapraklı üvez (*Sorbus torminalis*) bitkisinin su, etil asetat, aseton ve metanol ekstraktlarının ABTS•⁺ radikali giderme aktivitesini sırasıyla 1.37±0,051, 0.94±0,0470, 0.71±0,091, 0.50±0,084 olarak tespit etmişlerdir (36).

ABTS•⁺ radikali için EC₅₀ değerleri üvezin meyvesinin su ekstraktının 10.97±0,25, aseton ekstraktının 9.14±0,50, çiçeğinin aseton ekstraktının ise 10.73±0,75 olarak belirlenmiştir. Standartların BHA, BHT, α-tokoferol ve askorbik asit için ise sırasıyla; 6.48±0,25, 5.07±0,50, 5.65±0,50, 6.35±0,45 olarak tespit edilmiştir.

Hasbal vd. (2015) akçaağaç yapraklı üvez (*Sorbus torminalis*) bitkisinin su, etil asetat, aseton ve metanol ekstraktlarının ABTS•⁺ radikali için EC₅₀ değerlerini sırasıyla 5.30±0,166, 9.30±0,449, 13.23±0,341, 27.53±4,097 kuersetin ve α-tokoferol standartları için ise 0.12±0,001, 0.49±0,035 olarak belirlemişlerdir (36).

FOSFOMOLİBDEN METODU İLE TOPLAM ANTIOKSİDAN AKTİVİTE TAYİNİ

Konsantrasyon artışı ile birlikte üvez ekstraktlarının da toplam antioksidan aktivitelerinin arttığı gözlemlendi. Çalışmamızda standart antioksidan olarak α-tokoferol kullanıldı. Ekstraktların ve α-tokoferolün toplam antioksidan aktiviteleri α-tokoferol>meyve-su>çiçek-aseton>meyve-aseton sırasında bir azalma gösterdi.

Başak vd. (2008) topajdarbaşı (*Lallemantia canescens* L.) bitkisinin ve kallus doku kültürünün fosfomolibden metoduna göre toplam antioksidan aktivitelerini sırasıyla 5.483±0,232 mg AE/mL, 4.615±0,283 mg AE/mL olarak belirlemişlerdir (65).

ANTOSİYANİN TAYİNİ

Bu metoda göre üvez ekstraktının antosiyanin içeriği kateşin ekivalenti olarak hesaplandı. Kateşin standart grafik denklemi $y=0,003x+0,0034$ bulundu. Meyvenin su ekstraktının antosiyanin içeriği kateşin ekivalenti olarak 19.22±0,12 mg KE/g, aseton ekstraktının antosiyanin içeriği kateşin ekivalenti olarak 15.85±0,20 mg KE/g, çiçeğinin aseton ekstraktının ise antosiyanin içeriği kateşin ekivalenti olarak 14.05±0,33 mg KE/g olarak belirlendi.

Ekşi ve Damar (2010) vişne suyunun antosiyanin profilinin belirlenmesi için yaptıkları çalışmada 10 farklı fraksiyon için sırasıyla 5.6 - 6.6 - 7.4 - 6.0 - 5.6 - 4.4 - 5.1 - 9.9 - 3.7 ve 3.4 mg KE/L cinsinden belirlemişlerdir (27).

Özen ve Akbulut (2008) dut suyunun antosiyanin içeriğinin belirlenmesi için yaptıkları çalışmada etanol ekstraktının antosiyanin miktarını iki farklı örnek için sırasıyla 363.702 mg KE/L ve 371.717 mg KE/L cinsinden belirlemişlerdir (49).

LİNOLEİK ASİT SİSTEMİNDE FERRİK TİYOSİYANAT (FTC) METODU İLE TOPLAM ANTİOKSİDAN AKTİVİTE TAYİNİ

Ferrik tiyosiyanat (FTC) metoduna göre belirlenen lipid peroksidasyonu, Şekil 43'te görüldüğü gibi 50 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan ekstraktların ve standartların lipid peroksidasyonunu inhibe etme oranları sırasıyla çiçek-aseton>meyve-su>meyve-aseton>α-tokoferol>Askorbik Asit>BHA>BHT şeklinde bir azalma göstermektedir.

Şekil 45'te görüldüğü gibi 100 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan ekstraktların ve standartların lipid peroksidasyonunu inhibe etme miktarları sırasıyla çiçek-aseton>meyve-su>meyve-aseton>α-tokoferol>Askorbik Asit>BHA>BHT şeklindedir.

Şekil 47'de görüldüğü gibi 150 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan ekstraktların ve standartların lipid peroksidasyonunu inhibe etme yüzdeleri ise sırasıyla çiçek-aseton>meyve-su>meyve-aseton>α-tokoferol>BHT>Askorbik Asit>BHA şeklinde azalmıştır.

Şekil 49'da görüldüğü gibi 200 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan ekstraktların ve standartların lipid peroksidasyonunu inhibe etme sırası çiçek-aseton>meyve-su>meyve-aseton>Askorbik Asit>α-tokoferol>BHT>BHA şeklinde bulunmuştur.

Şekil 51'de görüldüğü gibi 250 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan ekstraktların ve standartların lipid peroksidasyonunu inhibe etme sırası çiçek-aseton>meyve-su>meyve-aseton>α-tokoferol>Askorbik Asit>BHT>BHA şeklinde belirlenmiştir.

Şekillerden de görüldüğü üzere tüm konsantrasyonlarda en yüksek lipid peroksidasyonunu inhibe etme yüzdesi çiçek-aseton ekstraktında tespit edilmiştir. Ayrıca tüm konsantrasyonlarda ekstraktların lipid peroksidasyonunu inhibe etme yüzdelerinin çiçek-aseton>meyve-su>meyve-aseton şeklinde birbirleri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Ayrıca tüm konsantrasyonlarda standartların lipid peroksidasyonunu inhibe etme yüzdelerinin ekstraktlar ile uyumlu olduğu belirlenmiştir.

Rezaeizadeh vd. (2011) kudret narının (*Momordica charantia*) metanol ve kloroform ekstraktlarının ve BHT, Vitamin E ve Vitamin C'nin lipid peroksidasyonunu inhibe etme

miktarlarını 24 saatte bir ölçüm olarak 192 saat boyunca takip etmişler, ekstraktların ve standartların 168. saat sonunda lipid peroksidasyonunu inhibe etme oranlarını metanol ve kloroform ekstraktları için sırasıyla %1.14±0,027, %1.68±0,052, standart olarak kullanılan BHT, Vitamin E ve Vitamin C için ise sırasıyla %0.08±0,006, %0.65±0,072, %1.28±0,034 olarak belirlemişlerdir (58).

HİDROKSİL RADİKALİ GİDERME AKTİVİTESİ

Şekil 52’de görüldüğü gibi en yüksek hidroksil radikali giderme aktivitesini standart olarak kullanılan BHT göstermiştir. Konsantrasyon artışı ile birlikte artan bir hidroksil radikali giderme aktivitesi tespit edilmiştir. 250 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan ekstraktların ve standartın hidroksil radikalini giderme aktiviteleri sırasıyla BHT>meyve-su>meyve-aseton>çiçek-aseton şeklinde bir azalma göstermektedir.

Reaksiyon ortamındaki hidroksil radikalleri için EC₅₀ değerleri sırasıyla BHT (14,62±0,57)>çiçek-aseton(12.48±0,81)>meyve-aseton(10,14±0,29)>meyve-su(7,80±0,25) şeklinde belirlenmiştir.

Radojkovic vd. (2016) beyaz dut ve kara dutun su ekstraktlarının hidroksil radikallerinin %50’sinin yok edilmesi için gereken etkili antioksidan konsantrasyonu olan EC₅₀ değerlerini sırasıyla 0.164±0,011 µg/mL, 0.159±0,089 µg/mL, BHT için 0.149±0,008 µg/mL olarak belirlemişlerdir (54).

BAKIR İYONLARINI İNDİRGEME POTANSİYELİ (CUPRAC METODU)

Ekstraktların bakır iyonlarını indirgeme gücü Cardenas ve arkadaşlarının metoduna göre belirlendi. Şekil 53’te görüldüğü gibi en yüksek bakır iyonlarını indirgeme gücünü standart olarak kullanılan Askorbik asit göstermiştir. Konsantrasyon artışı ile birlikte artan bir indirgeme potansiyeli tespit edilmiştir. 200 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan ekstraktların ve askorbik asidin bakır iyonlarını indirgeme gücü sırasıyla Askorbik asit >meyve-su>çiçek-aseton>meyve-aseton şeklinde bir azalma göstermektedir.

Reaksiyon ortamındaki bakır iyonlarının %50’sinin yok edilmesi için gereken etkili antioksidan konsantrasyonu olan EC₅₀ değerleri sırasıyla Askorbik asit>ÇA>MA>MS şeklinde bir azalma göstermektedir fakat düşük EC₅₀ değeri yüksek indirgeme gücünün bir göstergesidir.

Aktümsek ve Arkan (2011) defnenin (*Daphne Sericea*) hekzan, etilasetat, metanol, etanol ekstraktları ile askorbik asidin 50 µg/mL konsantrasyonunun bakır iyonlarını indirgeme potansiyelini sırasıyla %0.206±0,004, %0.430±0,010, %0.354±0,009, %0.394±0,011, %0.902±0,032 olarak belirlemişlerdir (3).

LC-MS/MS YÖNTEMİ İLE FENOLİK MADDE ANALİZİ

Üvezin meyve ekstraktının LC-MS/MS yöntemine göre fenolik madde analizi Terpinc ve arkadaşlarının belirlemiş oldukları metoda göre yapıldı. Şekil 54-62’de elde edilen fenolik maddelerin spektrumları gösterilmiştir. Tablo 13’te görüldüğü gibi analizi yapılan meyve ekstraktının bileşiminde bulunan fenolik maddeler; gallik asit, protokatekuik asit, salisilik asit, siringik asit, rutin, absisik asit, jasmonik asit, glutasyon ve okside glutatyondur. Bu fenolik maddeler içinde üvezin meyve ekstraktında en fazla konsantrasyonda protokatekuik asit (3110,1348 µg/kg) en düşük konsantrasyonda ise GSH (3,2825 µg/kg) bulunmuştur.

Meyve ekstraktındaki fenolik maddelerin konsantrasyona göre sıralaması yapıldığında protokatekuik asit>absisik asit>siringik asit>salisilik asit>rutin>gallik asit>GSSG>jasmonik asit>GSH şeklinde azaldığı tespit edilmiştir.

Radojkovic vd. (2016) tarafından beyaz dut ve kara dutun su ekstraktlarından elde edilen fenolik maddeler; gallik asit, protokatekuik asit, kateşin, kafeik asit, kafeik asit türevleri, vanilik asit, klorogenik asit, epikateşin, rutin ve kuersetin türevleridir. Dut ekstraktlarında kafeik asidin yüksek oranda bulunduğu, klorogenik asidin ise düşük konsantrasyonda olduğunu bildirmişlerdir (54).

KLOROFİL TAYİNİ

Taze üvez yaprağının klorofil miktarı Şekil 63’e göre klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil içeriği cinsinden sırasıyla 10.8594, 4.7837 ve 15.6390 mg/kg yaş ağırlık olarak bulunmuştur.

Baştaş ve Karacif (2012) elma ve armut yapraklarının toplam klorofil miktarını 0.162±0,019 mg/kg yaş ağırlık ve 0.210±0,025 mg/kg yaş ağırlık olarak hesaplamışlardır (11).

SONUÇLAR

Vücudumuz gerek metabolizma sonucu, gerek çevresel sorunlar ya da çeşitli sebeplerden dolayı oluşan serbest radikalleri yok etmek için antioksidan sistemler ile donatılmıştır. Bu serbest radikaller yok edilmediği sürece kalp-damar hastalıkları, kanser, katarakt, nörodejenaratif hastalıklar gibi daha birçok hastalık etkenlerinin oluşmasına sebep olmaktadır.

Son yıllarda antioksidan aktiviteyle ilgili olan çalışmaların artması bu hastalıkların tedavisinde alternatif tıbbı büyük katkı sağlamış, doğal ürünlere olan ilgiyi arttırmış ve dahası insanların bu doğal ürünleri günlük beslenmelerine de ilave etmelerine büyük oranda faydalı olmuştur.

Antioksidan aktivite tayininde literatürde birçok yöntem vardır ve her geçen gün bunlara yenileri ilave edilmektedir. Bu tez çalışmasında ülkemizde doğal olarak yetişen üzve meyvesi ve çiçeğinin antioksidan aktivitesinin incelenip, literatüre kazandırılması amaçlandırılmıştır.

Toplam fenolik madde tayininde standart olarak gallik asit ve pirokateşol kullanılarak ekstraktların bu standartlar açısından içerikleri tespit edildi. Gallik asit standart grafiğı $y=0,0009x+0,0026$, pirokateşol standart grafiğinin ise $y=0,0014x+0,002$ olduğu bulundu. Toplam fenolik madde tayininde gallik asit ekivalenti olarak en yüksek miktarın meyvenin su ekstraktında ($43,17\pm0,83$ mg GAE/g), pirokateşol eşdeğeri olarak ise en yüksek miktarın yine meyvenin su ekstraktında ($28,14\pm0,08$ mg PKE/g) olduğu belirlendi.

Toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesinde standart olarak gallik ve quersetin kullanıldı. Gallik asit için standart grafiğın $y=0,0006x+0,0005$, quersetin için ise standart grafiğın $y=0,002x+0,0047$ olduğu bulundu. Toplam flavonoid içeriğinin tayininde gallik asit ekivalenti olarak en yüksek miktarın meyvenin su ekstraktında ($80,53\pm 1,00$ mg GAE/g), quersetin ekivalenti olarak ise en yüksek miktarın yine meyvenin su ekstraktında ($123,96\pm 0,61$ mg QUE/g) olduğu belirlendi.

Demir (II) iyonlarını şelatlama aktivitesini belirlerken BHA, BHT, askorbik asit ve EDTA standart olarak kullanıldı. $50 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda standartlar arasında en yüksek şelatlama aktivitesini etkili bir şelatlayıcı olan EDTA ($\%55,95\pm 0,28$), ekstraktlar içinde ise en yüksek şelatlama aktivitesini meyvenin su ekstraktı ($\%34,52\pm 0,81$) göstermiştir.

DPPH• radikali giderme aktivitesinin tayininde standart olarak α - tokoferol, Askorbik asit, BHA ve BHT kullanıldı. $250 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda standartlar arasında en yüksek radikal giderme aktivitesini BHT ($\%75,44\pm 0,48$), ekstraktlar içinde ise en yüksek radikal giderme aktivitesini meyvenin su ekstraktı ($\%44,35\pm 0,48$) göstermiştir. DPPH• radikali giderme aktivitesinden elde edilen EC_{50} değeri için en yüksek değere BHA ($19,55\pm 0,59 \mu\text{g/mL}$), en düşük değere ise meyvenin su ekstraktının ($9,86\pm 0,25 \mu\text{g/mL}$) sahip olduğu tespit edilmiştir.

H_2O_2 giderme aktivitesi tayininde BHT, BHA, askorbik asit ve α - tokoferol standart olarak kullanıldı. $100 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda standartlar içinde en yüksek H_2O_2 giderme aktivitesini BHA ($\%20,15\pm 0,26$), ekstraktlar içinde ise H_2O_2 giderme aktivitesini meyvenin aseton ($\%29,86\pm 0,89$) ekstraktı göstermiştir.

Toplam ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) indirgeme kapasitesinin belirlenmesinde standart olarak BHT, BHA, Askorbik asit ve α - tokoferol kullanıldı. $150 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda standartlar arasında en yüksek Fe^{3+} indirgeme kapasitesini BHA ($0,144\pm 0,078$), ekstraktlar arasında ise meyvenin su ($0,079\pm 0,002$) ekstraktının gösterdiği bulunmuştur.

Süperoksit anyon radikali giderme aktivitesinin tayininde BHA, BHT ve askorbik asit standart olarak kullanıldı. $200 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda standartlar arasında en yüksek süperoksit anyon radikalini giderme aktivitesine askorbik asit ($\%63,22\pm 0,08$) sahipken, ekstraktlar içinde ise çiçeğın aseton ($\%39,39\pm 0,06$) ekstraktı sahiptir.

ABTS^{•+} radikali giderme aktivitesi denemesinde BHA, BHT, α -tokoferol ve Askorbik asit standart olarak kullanıldı. 250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda standartlar arasında en yüksek ABTS^{•+} radikali giderme aktivitesini BHA (%21.93 \pm 0,88), ekstraktlar içinde ise meyvenin aseton (%39.91 \pm 0,85) ekstraktı göstermiştir. ABTS^{•+} radikali giderme aktivitesi için hesaplanan EC₅₀ değerleri içinde BHA'nın (6.48 \pm 0,25 $\mu\text{g/mL}$), meyvenin aseton ekstraktının ise (9.14 \pm 0,50 $\mu\text{g/mL}$) değere sahip olduğu tespit edildi.

Fosfomolibden metodu ile toplam antioksidan aktivite tayininde standart madde olarak askorbik asit kullanıldı. Askorbik asit standart grafiği $y=0,003x+0,002$ olarak belirlendi. Askorbik asit ekivalenti cinsinden en yüksek antioksidan aktivite miktarı α -tokoferolde belirlenmişken meyvenin su ekstraktında 23,54 mg A.asit/g bulundu.

Antosiyanin tayininde standart olarak kateşin kullanıldı. Kateşin standart grafik denklemi $y=0,003x+0,0034$ bulundu. Kateşin ekivalenti olarak en yüksek miktarın meyvenin su (19,22 mg KE/g) ekstraktında olduğu gözlemlenmiştir.

Ferrik tiyosiyanat metodu ile toplam antioksidan aktivite tayininde BHA, BHT, Askorbik asit ve α -tokoferol standart olarak kullanıldı. 50 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda en yüksek toplam antioksidan aktivitenin standartlar arasında α -tokoferolde (%74,28 \pm 0,23), ekstraktlar içinde ise çiçeğin aseton (%82,90 \pm 0,10) ekstraktında olduğu gözlemlendi. 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda en yüksek toplam antioksidan aktivite standartlardan α -tokoferolde (%78,88 \pm 0,18), ekstraktlarından çiçeğin aseton (%81,57 \pm 0,77) ekstraktında bulundu. 150 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda en yüksek toplam antioksidan aktivite standartlar içinde α -tokoferolde (%78,08 \pm 0,84), ekstraktlar arasında ise çiçeğin aseton (%84,92 \pm 0,53) ekstraktında gözlemlendi. 200 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda en yüksek toplam antioksidan aktivite standartlardan askorbik asitte (%77,37 \pm 0,38), ekstraktlardan çiçeğin aseton (%84,39 \pm 0,72) ekstraktında tespit edildi. 250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda en yüksek toplam antioksidan aktivite standartlar içinde α -tokoferolde (%75,99 \pm 0,05), ekstraktlar arasında çiçeğin aseton (%84,97 \pm 0,95) ekstraktında gözlemlendi.

Hidroksil radikali giderme aktivitesi için standart olarak BHT kullanıldı. 200 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda standart olarak kullanılan BHT'nin hidroksil radikali giderme aktivitesi %52,67 \pm 0,85, ekstraktlar arasında ise en yüksek hidroksil radikali giderme aktivitesinin meyvenin su ekstraktında (%31,07 \pm 0,14) olduğu gözlemlendi. Hidroksil radikali giderme

aktivitesi sonuçlarından elde edilen EC₅₀ değerleri hesaplanarak BHT için (14,62±0,57 µg/mL), meyvenin su ekstraktı için ise (7,80±0,25 µg/mL) değeri tespit edildi.

Üvez ekstraktlarının bakır iyonlarını indirgeme gücü metodunda standart olarak Askorbik asit kullanıldı. 200 µg/mL konsantrasyonda standart olarak kullanılan Askorbik asitin bakır iyonlarını indirgeme gücü 1.315±0,017, ekstraktlar arasında en yüksek bakır iyonlarını indirgeme gücü değerine meyvenin su ekstraktının (0.885±0,016) olduğu gözlemlendi. Bakır iyonlarını indirgeme potansiyeli sonuçlarından EC₅₀ değerleri askorbik asidin değeri (0.348±0,075 µg/mL), meyvenin su ekstraktının ise (0.206±0,075) değerine sahip olduğu tespit edildi.

LC-MS/MS ile üvezin meyve ekstraktının fenolik madde analizinde standart olarak 2,5-dihidroksibenzoik asit, 2-hidroksitrans sinnamik asit, absisik asit, kafeik asit, kateşin, klorojenik asit, ellagik asit, epikateşin, etilgallat, gallik asit, gibberallik asit, indol-3-asetik asit, izo-hamnetin, kamferol, jasmonik asit, kumarin, lutolein, mirisetin, naringin, p-kumarik asit, piropil gallat, protokatekuik asit, kuersetin, resveratrol, rutin, salisilik asit, sinapik asit, siringik asit, trans ferulik, glutatyon ve okside glutatyon kullanıldı. Bu analiz sonucunda üvezin meyve ekstraktında bulunan fenolik maddeler; gallik asit, protokatekuik asit, salisilik asit, siringik asit, rutin, absisik asit, jasmonik asit, glutatyon ve okside glutatyon olduğu tespit edildi. Üvezin meyve ekstraktındaki protokatekuik asit (3110,1348 µg/kg) değeri ile en yüksek konsantrasyona sahipken, GSH'nin (3,2825 µg/kg) miktarı ile düşük oranda bulunduğu belirlendi.

Klorofil a miktarı 10,85 mg/kg yaş ağırlık, klorofil b miktarı 4,7837 mg/kg yaş ağırlık, toplam klorofil miktarı 15,6390 mg/kg yaş ağırlık olarak bulundu.

ÖZET

Ceylan, B. (2017). Üvez (*Sorbus domestica* L.) Ekstraktlarının Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi. Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Yüksek Lisans Tezi, Edirne.

Üvez (*Sorbus domestica* L.) meyvelerinin ve çiçeğinin antioksidan aktivitesi su ve aseton çözücülerini kullanılarak elde edilen ekstraktlarla incelendi. Ekstraktların toplam fenolik bileşik tayini, toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesi, demir (II) iyonlarını şelatlama aktivitesi, DPPH• radikali giderme aktivitesi, H₂O₂ giderme aktivitesi, toplam ferrik iyonlarını (Fe³⁺) indirgeme kapasitesi, süperoksit anyon radikali giderme aktivitesi, ABTS•⁺ radikali giderme aktivitesi, fosfomolibden metodu ile toplam antioksidan miktarı, antosiyanin içeriği, klorofil içeriği, linoleik asit sisteminde ferrik tiyosiyanat (FTC) metodu ile toplam antioksidan aktivitesi, hidroksil radikali giderme aktivitesi, LC-MS/MS ile fenolik madde analizi ve bakır iyonlarını indirgeme potansiyeli (CUPRAC metodu) tayin edildi.

En yüksek ekstrakt verimini su ekstraktı (327,36 mg/g) gösterdi. En yüksek toplam fenolik bileşik ve toplam flavonoid miktarlarının su ekstraktında olduğu saptandı. Metal şelatlama aktivitesi tayininde, standartlara en yakın aktivite gösteren ekstrakt, meyvenin su ekstraktıdır.

DPPH• radikali giderme aktivitesi tayininde, ekstraktlar arasında en iyi aktiviteyi meyvenin su ekstraktı göstermiştir. H₂O₂ giderme aktivitesi tayininde, meyvenin aseton (%34.37±0,72) ekstraktı standartlardan daha yüksek aktivite göstermiştir.

İndirgeme kapasitesi tayininde, ekstraktların standartlara göre daha düşük aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi. Süperoksit radikali giderme aktivitesinde, çiçeğin aseton ekstraktı diğer ekstraktlara göre daha yüksek oranda radikal giderme aktivitesi gösterdi.

ABTS•⁺ radikali giderme aktivitesi tayininde, meyvenin aseton (%39.91±0,85) ekstraktı standartlardan daha yüksek aktivite göstermiştir. Fosfomolibden metodu ile toplam antioksidan aktivite tayininde meyvenin su ekstraktının en yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlendi.

Antosiyanin tayininde, en yüksek antosiyanin miktarı meyvenin su (19,22 mg KE/g) ekstraktında gözlemlendi. Klorofil tayininde, toplam klorofil miktarı (15,639 mg/kg) yaş ağırlık olarak bulundu.

FTC metoduyla toplam antioksidan kapasitesi tayininde, çiçeğin aseton (%84.97±0,95) ekstraktının en yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlendi. Hidroksil radikali giderme aktivitesi tayininde, meyvenin su ekstraktı en yüksek radikal giderme aktivitesi göstermiştir.

LC-MS/MS ile fenolik madde analizinde, en yüksek fenolik madde konsantrasyonu protokatekuik asitte (3110,1348 µg/kg) gözlemlendi. Bakır iyonlarını indirgeme potansiyeli (CUPRAC metodu) tayininde, en yüksek indirgeme potansiyelini meyvenin su ekstraktı göstermiştir.

Üvez (*Sorbus domestica* L.) meyvelerinden ve çiçeğinden elde edilen tüm ekstraktların antioksidan aktivite gösterdiği ve üvez meyvesinin doğal bir antioksidan kaynağı olarak kullanılabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan aktivite, fenolik bileşikler, serbest radikaller, *Sorbus domestica* L., hidroksil radikali giderme aktivitesi.

Bu çalışma, Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2017/74.

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ROWANBERRY (*Sorbus domestica* L.) EXTRACTS

SUMMARY

Ceylan, B. (2017). Determination of antioxidant activity of rowanberry (*Sorbus domestica* L.) extracts. Trakya University Health Science Institute, Basic Pharmacy Sciences Department, Master of science thesis, Edirne.

The antioxidant activity of (*Sorbus domestica* L.) fruit and flower was examined by using extracts of water and acetone solvents. The extracts were analyzed for total phenolic compound content, total flavonoid content determination, chelating activity of iron (II) ions, DPPH• radical scavenging activity, H₂O₂ scavenging activity, total ferric ions (Fe³⁺) reduction capacity, superoxide anion radical scavenging activity, ABTS•⁺ radical scavenging activity, total antioxidant activity by the phosphomolybdenum method, anthocyanin content, chlorophyll content, ferric thiocyanate method in linoleic acid sytem, hydroxyl radical scavenging activity, phenolic substance analysis by LC-MS/MS and reduction potential of copper ions (CUPRAC method) were determined.

The highest extract yield was water extract (327,36 mg/g). The highest total phenolic compound and total flavonoid contents were found in the water extract. In the determination of metal chelating activity, the extract which is the closest to the standard is the water extract of the fruit.

In determining DPPH• radical scavenging activity, water extract showed the best activity among the extracts. In the determination of H₂O₂ removal activity, the fruit acetone (%34.37±0,72) extract had higher activity than the standard.

In the determination of the reduction capacity, the extracts were observed to have lower activity than the standards. In superoxide radical scavenging activity, acetone extract of the flower showed higher radical scavenging activity than the other extracts.

In the determination of ABTS•⁺ radical scavenging activity, fruit acetone (%39.91±0,85) extract had higher activity than the standard. The total antioxidant activity was determined by the phosphomolybdenum method and the fruit water extract had the highest activity.

In the determination of anthocyanin, the highest amount of anthocyanin was observed in fruit water (19.22 mg KE/g) extract. In chlorophyll determination, the total amount of chlorophyll (15.639 mg/kg) was found to be wet weight.

Determination of the total antioxidant capacity by the FTC method revealed that the extract of the flower acetone (%84.97±0,95) had the highest activity. In determining the hydroxyl radical scavenging activity, the fruit water extract showed the highest radical scavenging activity.

In the analysis of phenolic material by LC-MS/MS, the highest phenolic substance concentration was observed in protocatechuic acid (3110,1348 µg/kg). In the determination of the reduction potential of copper ions (CUPRAC method), the fruit water extract showed the greatest reduction potential.

All the extracts obtained from fruits and flowers rowanberry (*Sorbus domestica* L.) showed antioxidant activity and the fruits could be used as a natural antioxidant source.

Key words: Antioxidant activity, phenolic compounds, free radicals, *Sorbus domestica* L., hydroxyl radical scavenging activity.

This work was supported by the Trakya University Scientific Research Projects Unit. Project number: 2017/74.

KAYNAKLAR

- 1- Adjimani J, Asare P. Antioxidant and free radical scavenging activity of iron chelators. *Toxicology Reports* 2015; 2: 721-728.
- 2- Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Konya: Mimoza Yayınları 1995.
- 3- Arkan T. Daphne Oleoides Subsp. Oleoides ve Daphne Sericea'nın Farklı Çözücülerle Antioksidan Özellikleri (tez). Konya: Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü; (2011).
- 4- Alanon ME, Costo-Vazquez L, Dioz-Maroto MC, Hermosin-Gutierrez I, Gordon MH. Antioxidant capacity and phenolic composition of different woods used in cooperage. *Food Chemistry* 2011; 129: 1584-1590.
- 5- Antolovich M, Prenzler PD, Potsalides E, McDonald S, Robards K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 2002; 127: 183-198.
- 6- Arnon DI. Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 1949; 24: 1-15.
- 7- Aslani BA, Ghobadi S. Studies on oxidants and antioxidant with a brief glance at their relevance to the immune system. *Life Sciences* 2016.
- 8- Bajpai VK, Baek KH, Kang SC. Antioxidant and free radical scavenging activities of taxoquinane, a diterpenoid isolated from *Metasequoia glyptostroboides*. *South African Journal of Botany* 2017; 111: 93-98.

- 9- Baskin SI, Salem H. Oxidants, Antioxidants and Free Radicals. Washington DC: Taylor and Francis 1997.
- 10- Bast A, Haenen GRMM, Cees JAD. Oxidant and antioxidant: state of the art. The American Journal of Medicine 1997; 91: (Suppl 3C), 30, 3C-2S, 3C-13S.
- 11- Karacif E. Erwinia amylovora Enfeksiyonundan Sonra Elma ve Armut Çeşitlerindeki Bazı Antioksidatif Enzim Seviyelerinin Belirlenmesi (tez). Konya: Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü; 2012.
- 12- Baytop T. Türkçe Bitki Adları Sözlüğü. Ankara: Türk Dil Kurumu Yayınları, No:578, Türk Tarih Kurumu Basımevi 1994.
- 13- Baytop T. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, LTD.ŞTİ. 1999.
- 14- Becker EM, Nissen LS, Skibsted LH. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. European Food Research and Technology 2004; 10.107/s00217-004-1012-4.
- 15- Benzie IFF. An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). Clinical Biochemistry 1996; 29: 116-116.
- 16- Blander G, Oliviera RM, Conboy CM, Hoigid M, Guarente L. Superoxide dismutase 1 Knock-down induces senescence in human fibroblasts. Journal of Steroid Biochemistry 2003; 278: 38966-9.
- 17- Blois MS. Antioxidant determination by the use of stable free radical. Nature 1958; 1199-1200.
- 18- Bozdemir Y. Keten Tohumu (*Linum Usitatissimum*) Ekstraktında Katalaz ve Süperoksit Dismutaz Enzim Aktiviteleri (tez). Adana: Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü; 2007.
- 19- Hasbal, G. *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. (Akçaağaç yapraklı üvez)’ın Antioksidan Aktivitesinin İncelenmesi (tez). İstanbul: İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; (2013).

- 20- Cardenas A, Gamez M, Frontona C. Electrochemical method to quantify Antioxidant employing Cupric Reducing Antioxidant Capacity, CUPRAC. *Procedio Chemistry* 2014; 12: 62-65.
- 21- Cheesman K H, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulltin* 1993; 49(3): 481-493.
- 22- Choe E, Min D B. Chemistry and Reactions of Reactive Oxygen Species in Foods. *Crit Rev. Food Sci. Nut.* 2006; 46: 1-22.
- 23- Çavdar C, Sifil A, Çamsar T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 1997; 3-4: 92-95.
- 24- Çaylak E. Hayvan vw bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2011; 9(1): 78-83.
- 25- Deaton CM, Marlın DJ. Exercise-Associated Oxidative stress. *Clin. Tech. Equine Pract.* 2003; 2(3): 278-291.
- 26- Diplock A. Healty lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients, ILSI Europe Consie Monograph Series 1998; Belgium: 59.
- 27- Damar İ. Vişne Suyunun Antosiyanin Profili ve Antioksidan Kapasitesi (tez). Ankara: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü 2010.
- 28- Elliot JG. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Tech.* 1999; 53(2): 46-48.
- 29- Flora JJ. Role of free radicals and antioxidant in health and disease. *Cellular and Molecular Biology* 2007; 53: 1-2.
- 30- Frankel E N, Meyer AS. The problems of using onedimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Argiculture* 2000; 80: 1925-1941.
- 31- Freman BA, Crapo J D. Biology of disease, free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation.* 1982; 47(5): 412.
- 32- Gerewall HS. Antioxidants and Disease Prevention. Florida: CRC Press Inc. 1997; 3-19.

- 33- Gökşin A. Türkiye’de Doğal Olarak Yetişen Üvez (Sorbus L.) Taksonlarının Yayılışları ile Önemli Bazı Morfolojik ve Anatomik Özellikleri Üzerine Araştırmalar. Ankara: Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları, Teknik Bülten Serisi No: 120, 1982.
- 34- Guemouri L, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G. Siest G. Biological Variability of Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase, and Catalase in Blood. Clin. Chem. 1991; 37(11): 1932-1937.
- 35- Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of Iron in Oxygen Radical reactions. Methods in Enzymology 1984; 105: 47-56.
- 36- Hasbal G, Yılmaz-Özden T, Can A. Antioxidant and Antiacetylcholinesterase activities of Sorbus torminalis (L.) Crantz (wild service tree) fruits. Journal of Food and Drug Analysis 2015; 23: 57-62.
- 37- Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays, Reviews. Journal of Agricultural Food Chemistry 2005; 53: 184-1856.
- 38- Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C. Nitric Oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. Journal Of Cardiovascular Pharmacology 1999; 34(6): 879-886.
- 39- Inglet GE, Chan D, Berhow M, Lee S. Antioxidant Activity of Commercial Buck Wheat Flours and Their Free and Bound Phenolic Compositions. Food Chemistry 2011; 125: 923-929.
- 40- Jesberger JA, Richardson JS. Oxygen Free Radicals and Brain Dysfunctio. Intern J Neuroscience 1991; 57: 1-17.
- 41- Koca N, Karadeniz F. Gıdalardaki doğal antioksidan bileşikler. Gıda 2005; 30(4): 229-236.
- 42- Larson RA. The antioxidants of higher plants. Phytochemistry 1998; 27(4): 969-978.
- 43- Mahmoudi S, Kholi M, Benkhaled A, Banomirouche K, Baiti I. Phenolic and Flavanoid Content, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Leaf Extracts From Ten Algerian (Ficus carica L. varieties). Asian Pac. J. Trop Biomed 2016; 6(3): 239-245.

- 44- Miller DD. Minerals, İçinde O.R. Fennema (Ed). Chemistry, Marcel Dekker, New York. 1996; 617-649.
- 45- Mitsuda H, Yasumato K, Iwami K. Antioxidative Action of İndole Compounds During The Autoxidation of Lineleic Acid. Eiyoto Shokuryo 1966; 19: 210-214.
- 46- Murray RK, Mayes PA, Granner DK, Radwell VW (Çeviri: G. Mentese, B. Ersöz). Harper'in Biyokimyası. İstanbul: Barış Kitabevi; 1993.
- 47- Nishimiki M, Rao NA, Yogi K. The accuracy of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. Biochemical and Biophysical Research Communications 1972; 46(2): 849-854.
- 48- Oyaizu M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. Japan Journal of Nutrition 1986; 44: 307-315.
- 49- Özen G, Akbulut M. Dut Suyunun Antosiyanin İçeriğinin Belirlenmesi. Türkiye 10. Gıda Kongresi Özet Kitabı s.279, Konya, 2008.
- 50- Piscochi AM, Pop A. The Role of Antioxidant in The Chemistry of Oxidative Stress: A review. European Journal of Medicinal Chemistry 2015; 97: 55-74.
- 51- Podsedek A. Natural antioxidant and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review, LWT-Food Science and Technology 2007; 40(1): 1-11.
- 52- Prieto P, Inedo M, Aguliar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Analytical Biochemistry 1999; 269: 337-341.
- 53- Proteggente AR, Rehman A, Halliwell B, Rice-Evanj CA. Potential problems of ascorbate and iron supplementation: pro-oxidant effect in vivo. Biochemical and Biophysical Research Communications 2000; 277(3). 535-540.
- 54- Radojkovic M, Zekovic Z, Maskovic P, Vidavic S, Mandic A, Mison A, Duravic S. Biological activities and chemical composition of Morus leaves extracts obtained by maceration and supercritical fluid extraction. The Journal of Supercritical Fluids 2016; 117:50-58.

- 55- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pamola A, Yang M. Antioxidants activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 1999; 26: 1231-1237.
- 56- Reaven PD, Khouw A, Beltz WF, Parthasarathy S, Witztum JL. Effect of dietary antioxidant combinations in humans, protection of LDL by vitamin E but not by beta-carotene. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 1993; 13(4): 590-600.
- 57- Reiter RJ. Interactions of the Pineal Hormone Melatonin With Oxygen-centered Free Radicals. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 1993; 26: 1141-1155.
- 58- Rezaeizadeh A, Zuki ABZ, Abdallahi M, Gah YM, Noordin MM, Hamid M, Azmi TI. Determination of antioxidant activity in methanolic and chloroformic extracts of *Momordica charantia*. *African Journal of Biotechnology* 2011; 10(24): 4932-4940.
- 59- Ruch RJ, Cheng SJ, Klauning JE. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis* 1989; 10(6): 1003-1008.
- 60- Sanchez-Salcedo EM, Meno P, Garcia-Viguera C, Hernandez F, Martinez JJ. (Poly)phenolic compounds and antioxidant activity of white (*Morus alba*) and black (*Morus nigra*) mulberry leaves; Their potential for new products rich in phytochemicals. *Journal of Functional Foods* 2015; 18: 1039-1046.
- 61- Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture* 1977; 28: 49-55.
- 62- Smidova B, Satinsky D, Dostalova K, Salich P. The pentafluorophenyl stationary phase shows a unique separation efficiency for performing fast chromatography determination of highbush blueberry anthocyanins. *Talanta* 2017; 166: 249-254.
- 63- Soriani M, Pietraforte D, Minetti M. Antioxidant potential of anaerobic human plasma: Role of serum albumin and thiols as scavengers of carbon radicals. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1994; 312: 180-188.
- 64- Streyer L. *Biochemistry*. 4th Ed., W. H. Freeman and Company, New York, 1995.
- 65- Şahin-Başak S, Candan F. *Lallemantia canescens* (L) Fisch & mey bitkisinin ve kalkus doku kültürünün antioksidan aktivitesi. *İTÜ Dergisi* 2008; 6(1): 14-26.

- 66- Termentzi A, Kefalas P, Kakkalou E. Antioxidant activities of various extracts and fractions of *Sorbus domestica* fruits at different maturity stages. *Food Chemistry* 2006; 98: 599-608.
- 67- Terpinc P, Cigic B, Polak T, Hribar J, Pazri T. LC-MS analysis of phenolic compounds and antioxidant activity of buckwheat at different stages of malting. *Food Chemistry* 2016; 210: 9-17.
- 68- Yılmaz A. *Nepeta sorgerae* ve *Nepeta obtusicrena* bitkilerinin antioksidan ve anti-alzheimer bileşenlerinin izolasyonu ve yapılarının belirlenmesi (tez). İstanbul: İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü; 2011.
- 69- Yanishlieva NV, Marinova E, Pokory J. Natural antioxidants from Herbs and Spices. *Eur. J. Lipid. Sci. Tech.* 2006; 108: 776-793.
- 70- Zhishan J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents on mulberry and their scavenging effects on superoxide radical. *Food Chemistry* 1999; 64: 555-559.

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİLLER

Şekil 1. Moleküler oksijenden ROT üretimi	4
Şekil 2. Solunumsal patlama sırasında serbest radikal oluşumu	8
Şekil 3. Serbest radikallerin neden olduğu hasarlar	9
Şekil 4. Glutasyonun indirgenmesi	11
Şekil 5. Askorbik asidin yapısı	13
Şekil 6. Askorbik asidin oksidasyonu	13
Şekil 7. α -tokoferolün yapısı	14
Şekil 8. β -karoten yapısı	14
Şekil 9. Likopen yapısı	15
Şekil 10. Melatonin yapısı	15
Şekil 11. $C_6-C_3-C_6$ sistemi ve flavonoidlerin genel yapısı	16
Şekil 12. Flavonoid iskeletleri	16
Şekil 13. Glutasyon yapısı	17
Şekil 14. Ürik asit yapısı	17
Şekil 15. Bilirubin yapısı	18
Şekil 16. Lipoik asidin dihidrolipoik aside indirgenmesi	18
Şekil 17. N-asetil sistein yapısı	18
Şekil 18. Gıdalara ilave edilen sentetik antioksidanların yapısı	20
Şekil 19. ABTS radikalinin antioksidan ile etkileşimi	22

Şekil 20. Fe ^{III} tuzlarının antioksidan ile etkileşimi	23
Şekil 21. Antioksidan tarafından DPPH radikalinin indirgenmesi	24
Şekil 22. Üvez (<i>Sorbus domestica</i> L.) meyveleri	24
Şekil 23. Üvez (<i>Sorbus domestica</i> L.)'de yaprak ve çiçek	25
Şekil 24. Gallik asit standart grafiği	39
Şekil 25. Pirokateşol standart grafiği	39
Şekil 26. Üvez ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri cinsinden fenolik madde içerikleri	40
Şekil 27. Üvez ekstraktlarının pirokateşol eşdeğeri olarak fenolik madde içerikleri	41
Şekil 28. Gallik asit standart grafiği	41
Şekil 29. Kuersetin standart grafiği	42
Şekil 30. Üvez ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri olarak flavonoid madde içerikleri	43
Şekil 31. Üvez ekstraktlarının kuersetin eşdeğeri olarak flavonoid madde içerikleri	43
Şekil 32. Üvez ekstraktlarının metal şelatlama kapasiteleri	44
Şekil 33. Üvez ekstraktlarının DPPH• radikali giderme aktiviteleri	46
Şekil 34. Üvez ekstraktlarının ve standartların H ₂ O ₂ giderme aktiviteleri	48
Şekil 35. Üvez ekstraktlarının Fe ³⁺ 'ü Fe ²⁺ 'ye indirgeme kapasiteleri	49
Şekil 36. Üvez ekstraktlarının süperoksit radikali giderme aktiviteleri	51
Şekil 37. Üvez ekstraktlarının ABTS ^{•+} radikali giderme aktiviteleri	52
Şekil 38. Askorbik asit standart grafiği	54
Şekil 39. Üvez ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri	54
Şekil 40. Kateşin standart grafiği	55
Şekil 41. Kateşin eşdeğeri olarak antosiyanin içerikleri	56

Şekil 42. Üvez ekstraktları ve standartlarının 50 µg/mL konsantrasyonlarındaki linoleik asit peroksidasyonunun zamanla değişimi	57
Şekil 43. Üvez ekstraktlarının 50 µg/mL konsantrasyonlarında lipid peroksidasyonunu inhibe yüzdelerinin standart antioksidanlar ile değerlendirilmesi	57
Şekil 44. Üvez ekstraktları ve standartlarının 100 µg/mL konsantrasyonlarındaki linoleik asit peroksidasyonunun zamanla değişimi	58
Şekil 45. Üvez ekstraktlarının 100 µg/mL konsantrasyonlarında lipid peroksidasyonunu inhibe yüzdelerinin standart antioksidanlar ile değerlendirilmesi	58
Şekil 46. Üvez ekstraktları ve standartlarının 150 µg/mL konsantrasyonlarındaki linoleik asit peroksidasyonunun zamanla değişimi	59
Şekil 47. Üvez ekstraktlarının 150 µg/mL konsantrasyonlarında lipid peroksidasyonunu inhibe yüzdelerinin standart antioksidanlar ile değerlendirilmesi	59
Şekil 48. Üvez ekstraktları ve standartlarının 200 µg/mL konsantrasyonlarındaki linoleik asit peroksidasyonunun zamanla değişimi	60
Şekil 49. Üvez ekstraktlarının 200 µg/mL konsantrasyonlarında lipid peroksidasyonunu inhibe yüzdelerinin standart antioksidanlar ile değerlendirilmesi	60
Şekil 50. Üvez ekstraktları ve standartlarının 250 µg/mL konsantrasyonlarındaki linoleik asit peroksidasyonunun zamanla değişimi	61
Şekil 51. Üvez ekstraktlarının 250 µg/mL konsantrasyonlarında lipid peroksidasyonunu inhibe yüzdelerinin standart antioksidanlar ile değerlendirilmesi	61
Şekil 52. Üvez ekstraktlarının hidroksil radikali giderme aktiviteleri	62
Şekil 53. Ekstraktların ve askorbik asidin bakır iyonlarını indirgeme gücü	64
Şekil 54. Üvezin meyve ekstraktının gallik asit spektrumu	65
Şekil 55. Üvezin meyve ekstraktının protokatekuik asit spektrumu	66
Şekil 56. Üvezin meyve ekstraktının salisilik asit spektrumu	66
Şekil 57. Üvezin meyve ekstraktının syringik asit spektrumu	66

Şekil 58. Üvezin meyve ekstraktının rutin spektrumu	67
Şekil 59. Üvezin meyve ekstraktının absisik asit spektrumu	67
Şekil 60. Üvezin meyve ekstraktının jasmonik asit spektrumu	67
Şekil 61. Üvezin meyve ekstraktının GSH spektrumu	68
Şekil 62. Üvezin meyve ekstraktının GSSG spektrumu	68
Şekil 63. Üvez yaprağının klorofil içeriği	70

TABLolar

Tablo 1. Serbest radikal türleri	5
Tablo 2. Üvezin ekstrakt verimleri	38
Tablo 3. Standartların farklı konsantrasyonlarının Fe^{2+} iyonlarını şelatlama kapasiteleri	45
Tablo 4. DPPH• radikali giderme aktivitesinde kullanılan standart çözeltilerin farklı konsantrasyonlarının radikal giderme aktiviteleri	46
Tablo 5. DPPH• radikali giderme aktivitesi verilerinden hesaplanan EC_{50} değerleri	47
Tablo 6. H_2O_2 giderme aktivitesinde kullanılan standart çözeltilerin radikal giderme aktiviteleri	48
Tablo 7. Standart çözeltilerin Fe^{3+} iyonlarını indirgeme kapasiteleri	50
Tablo 8. Standartların farklı konsantrasyonlarının süperoksit radikali giderme aktiviteleri	51
Tablo 9. Standart çözeltilerin ABTS• ⁺ radikali giderme aktiviteleri	52
Tablo 10. Ekstraktlar ile standartların ABTS• ⁺ radikali verilerinden hesaplanan EC_{50} değerleri	53
Tablo 11. Hidroksil radikali verilerinden hesaplanan EC_{50} değerleri	63
Tablo 12. Bakır iyonlarını indirgeme gücü sonuçlarından hesaplanan EC_{50} değerleri	64

Tablo 13. Üvez meyve ekstraktından elde edilen fenolik maddeler ve konsantrasyonları 65

Tablo 14. Üvez meyvesinde bulunan 9 önemli fenolik bileşimin alıkonma süreleri ve m/z değerleri 69



ÖZGEÇMİŞ

15 Ekim 1993 tarihinde Kırklareli’de doğdum. İlk ve orta öğretimimi Minnetler Köyü İlköğretim Okulu’nda tamamladım. 2011 yılında Babaeski Lisesi’nden mezun oldum ve aynı yıl Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünü kazandım ve 2015 yılında bölüm birincisi olarak lisans eğitimimi tamamladım. 2015 Güz Yarıyılı döneminde Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Eczacılık Bilimleri Anabilim Dalı yüksek lisans programına başladım.