

**ERZİNCAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Teucrium chamaedrys* L. ve *Achillea biebersteinii* Afan.
BİTKİLERİNİN ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN
MUKAYESESİ**

Hüseyin KANBUR

Danışman: Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL

**KİMYA
ANABİLİM DALI**

**ERZİNCAN
2012**

Her Hakkı Saklıdır

Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL danışmanlığında, Hüseyin KANBUR tarafından hazırlanan bu çalışma 19/07/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Yrd. Doç. Dr. Bülent ÇAĞLAR

imza:



Üye : Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL

imza:



Üye : Yrd. Doç. Dr. Salih MUTLU

imza:



Yukarıdaki sonucu onaylarım



Doç. Dr. Recep POLAT

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***Teucrium chamaedrys* L. ve *Achillea biebersteinii* Afan.
BİTKİLERİNİN ANTIOKSIDAN AKTİVİTELERİNİN
MUKAYESESİ****Hüseyin KANBUR**Erzincan Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL

Bu çalışma *Teucrium chamaedrys* L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkilerinin antioksidan aktivitesini incelemek amacı ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla bitkiler Erzincan ili Çayırılı ilçesinin Çilhorozu köyünden toplandı, kurutuldu ve etanol ekstraları hazırlandı. Hazırlanan etanol ekstraları üzerinde ferrik tiyosiyanat metoduna göre total antioksidan aktivite, kuprak metodu ile Cu^{2+} ve potasyum ferriksiyanat indirgeme metodu ile Fe^{3+} iyonları indirgeme kapasitesi, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) giderme aktivitesi tayinleri ve toplam fenolik ve flavonoid bileşik miktar tayinleri yapıldı. *Teucrium chamaedrys* L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkilerinden elde edilen $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonluk etanol ekstralarının linoleik asit emülsiyonunun lipit peroksidasyonunu sırasıyla % 77,2 ve % 71,3 inhibe ettiği gözlemlendi. Aynı konsantrasyonda α -tokoferol % 85,3 ve troloks % 83,1'lik bir inhibisyona sebep oldu. Toplam fenolik içeriği *Achillea biebersteinii* Afan.'dan daha fazla olduğu tesbit edilen *Teucrium chamaedrys* L. yine daha yüksek DPPH giderme ve metal indirgeme aktivitesi sergiledi. Etanol ekstresi çıkarılan *Teucrium chamaedrys* L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkilerinin antioksidan aktiviteleri araştırılırken, butillenmiş hidroksi toluen (BHT), α -tokoferol ve onun suda çözünen bir analogu olan troloks referans antioksidan bileşikleri olarak kullanıldı.

2012, 57 sayfa**Anahtar Kelimeler:** *Teucrium chamaedrys* L., *Achillea biebersteinii* Afan., Antioksidan aktivite, Metal indirgeme.

ABSTRACT

Master Thesis

COMPARISON OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF *Teucrium chamaedrys* L. and *Achillea biebersteinii* Afan. PLANTS**Hüseyin KANBUR**Erzincan University
Faculty of Sciences and Arts
Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL

This study is aimed to examine the antioxidant activities of *Teucrium chamaedrys* L. and *Achillea biebersteinii* Afan. plants. For this purpose, plants were collected from Çilhorozu which is the village of Çayırılı, a town of Erzincan province, and they were dried and ethanol extractions were prepared. On prepared ethanol extraction, total antioxidant activity was determined by ferrocyanate reduction method; Cu^{2+} and potassium ferric thiocyanate were determined by Cuprac method; was determined by reduction method capacity of Fe^{3+} ions; the activity of scavenging of 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) was determined; the total amount of the compounds of phenolic and flavonoid was determined. It was observed that $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ concentrated of ethanol extracts obtained from *Teucrium chamaedrys* L. and *Achillea biebersteinii* Afan. plants inhibited the lipid peroxidation of linoleic acid emulsion as 77.2 % and 71.3 % respectively. In the same concentration, α -tocoferol and trolox caused inhibitions of 85.3 % and 83.1 %, respectively. *Teucrium chamaedrys* L. plant in which it was detected that the content of total phenolic were much more than those in *Achillea biebersteinii* Afan. Plant still displayed higher DPPH scavenging and metal reduction activity. Butylated hydroxy toluene (BHT), ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA), α -tocopherol and an analogue of its which is the solved in water, namely Trolox were used as reference antioxidant compounds, while the antioxidant activity of *Teucrium chamaedrys* L. and *Achillea biebersteinii* Afan. plants whose ethanol extractions were taken out were being examined.

2012, 57 pages**Keywords:** *Teucrium chamaedrys* L., *Achillea biebersteinii* Afan., Antioxidant activity, Metal reduction.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarında her türlü desteği sağlayan, maddi manevi ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, değerli hocam Sayın Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL'a, maddi manevi yardımlarını esirgemeyen Kimya Bölüm Başkanı Sayın Yrd. Doç. Dr. Bülent ÇAĞLAR'a, Biyoloji bölümü öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa KORKMAZ'a teşekkür ederim.

Ayrıca laboratuvar çalışmalarımızda bizlere göstermiş olduğu yardımlardan dolayı kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e şükranlarımı sunarım. Çalışmalarımın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen Emrah DİKİCİ'ye ve çalışmalarım sırasındaki yardımlarından dolayı Mesut IŞIK ve Fatih TOZOĞLU'na teşekkür ederim. Kimya Bölümü araştırma görevlisi Sayın Ekrem ADIGÜZEL'e, Biyoloji Bölümü araştırma görevlisi Sayın Veli İLHAN'a ve Biyoloji Bölümü yüksek lisans öğrencisi Zeynettin ALPASLAN'a minnettarım.

Her aşamada yanımda olan ailemin her türlü desteğinden dolayı kendilerine şükranlarımı sunarım.

Hüseyin KANBUR
Temmuz, 2012

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	21
3. MATERYAL ve YÖNTEM	25
3.1. Materyal	25
3.1.1 Kullanılan kimyasal maddeler	25
3.1.2. Yararlanılan malzeme, alet ve cihazlar	25
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması.....	26
3.1.3.a. Toplam fenolik bileşik miktarı tayini ile ilgili çözeltiler	26
3.1.3.b. Toplam flavonoit bileşik miktarı tayini ile ilgili çözeltiler	26
3.1.3.c. Ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivite tayini ile ilgili çözeltiler	26
3.1.3.d. Ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgeme kuvveti tayini ile ilgili çözeltiler.....	27
3.1.3.e. Kuprak metoduna göre idirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler...27	27
3.1.3.f. DPPH• serbest radikal giderme aktivitesi ile ilgili çözeltiler	28
3.2. Yöntem.....	29
3.2.1. <i>Teucrium chamaedrys</i> L. ve <i>Achillea biebersteinii</i> Afan. bitkilerinin toplanması ve kurutulması.....	29
3.2.2. <i>Teucrium chamaedrys</i> L. ve <i>Achillea biebersteinii</i> Afan. bitkilerinin etanol ekstrelerinin hazırlanması	29
3.2.3. Toplam fenolik bileşik miktarı tayini.....	29
3.2.4. Toplam flavonoit bileşik miktarı tayini	30
3.2.5. Ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivite tayini	31
3.2.6. Ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgeme kuvveti tayini	32

3.2.7. Kuprak metoduna göre indirgeme kapasitesi tayini.....	32
3.2.8. DPPH• serbest radikallerini giderme aktivitesi tayini.....	33
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	34
4.1. Antioksidan Araştırma Bulguları	34
4.1.1. Toplam fenolik bileşik miktarı tayini bulguları	34
4.1.2. Toplam flavonoid bileşik miktarı tayini bulguları	35
4.1.3. Ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivite tayini bulguları.....	37
4.1.4. Ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgeme kuvveti bulguları.....	38
4.1.5. Kuprak metodu ile ilgili bulgular.....	39
4.1.6. DPPH• serbest radikal giderme aktivitesi bulguları.....	40
4.2. Tartışma.	42
5. SONUÇ	46
6. KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ.....	57

Kısaltmalar

BDE	Bağ Disosiyasyon Enerjisi
BHT	Bütillenmiş Hidroksitoluen
BHA	Bütillenmiş Hidroksianisol
CAT	Katalaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH•	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radikali
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RNS	Reaktif Azot Türleri
R•	Organik Radikali
ROO•	Peroksit Radikali
RO•	Alkoksi Radikali
RS•	Tiyil Radikali
RSO•	Sülfenil Radikali
RSO ₂ •	Tiyil Peroksit Radikali
OH•	Hidroksi Radikali
IP	İyonizasyon Potansiyeli
TBHQ	Tersiyerbütihidrokinon
PG	Propil Galat
POD	Peroksidaz
GSH	Glutasyon
GSSG	Okside Glutasyon
GSSG-Rx	Glutasyon Redüktaz
GAE	Gallik Asit Ekvivalent
SOD	Süperoksit Dismutaz
O ₂ ^{•-}	Süperoksit Radikali
QE	Kuarsetin Ekvivalent
L	Lipid

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Serbest radikal ve reaktiflerin oluşumu	2
Şekil 2. Doğal bir antioksidan olan tokoferollerin moleküler yapıları.....	11
Şekil 3. α -Tokoferolün lipit serbest radikallerini söndürdükten sonra tokoferoksil radikale dönüşmesi	12
Şekil 4. Doğal bir antioksidan olan askorbik asitin moleküler yapısı.....	13
Şekil 5. Doğal bir antioksidan olan β -karotenin moleküler yapısı.....	14
Şekil 6. Doğal antioksidanlardan olan bazı flavonoidlerin moleküler yapıları.....	15
Şekil 7. Bütillenmiş hidroksi anisol (BHA) ve Bütillenmiş hidroksi toluen (BHT)' in moleküler yapıları	16
Şekil 8. Araşidonik asidin otooksidasyonu mekanizması	18
Şekil 9. <i>Teucrium chamaedrys</i> L.	22
Şekil 10. <i>Achillea biebersteinii</i> Afan.	23
Şekil 11. Standart bir fenolik bileşik olan ve aynı zamanda kuvvetli antioksidan olan gallik asitin açık yapısı.....	34
Şekil 12. Toplam fenolik bileşik miktarı tayini için gallik asit ile hazırlanan standart grafik	35
Şekil 13. Standart ve iyi bir antioksidan olan kuersetinin açık yapısı	35
Şekil 14. 10-50 μg arasında kuersetin kullanılarak toplam flavonoit miktarı tayini için hazırlanan kuersetinin standart grafiği	36
Şekil 15. <i>Teucrium chamaedrys</i> L. ve <i>Achillea biebersteinii</i> Afan. bitkilerinin etanol ekstrelerinin 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ deki konsantrasyonlarda toplam antioksidan aktivitesinin birer standart antioksidan olan α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması	37
Şekil 16. <i>Teucrium chamaedrys</i> L. ve <i>Achillea biebersteinii</i> Afan. bitkilerinin etanol ekstrelerinin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 $\mu\text{g mL}^{-1}$) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması	38
Şekil 17. <i>Teucrium chamaedrys</i> L. ve <i>Achillea biebersteinii</i> Afan. bitkilerinin etanol ekstrelerinin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 $\mu\text{g mL}^{-1}$) kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması	39
Şekil 18. Bir antioksidan tarafından DPPH radikalinin giderilmesi (Gülçin, 2002).	40

Şekil 19. *Teucrium chamaedrys* L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkilerinin etanol ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarda ($10\text{--}30\ \mu\text{g mL}^{-1}$) DPPH serbest radikallerini giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan α -tokoferol, troloks ve BHT ile karşılaştırması41

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Serbest radikal kaynakları.....	2
Tablo 2. Bazı önemli reaktif oksijen ve azot türleri.....	4
Tablo 3. Bazı antioksidanlar	9
Tablo 4. Bazı doğal antioksidanlar ve buldukları kaynaklar.....	11
Tablo 5. <i>Teucrium chamaedrys</i> L. ve <i>Achillea biebersteinii</i> Afan. Bitkilerinin etanol ekstratlarının 1 mg'ında bulunan toplam fenolik ve flavonoid bileşik miktarının ekvivalent olarak miktarları	46

1. GİRİŞ

Son yörüngesinde ortaklanmamış tek elektron içeren atomik ya da moleküler yapılar serbest radikaller olarak tanımlanır ve serbest radikaller başka moleküller ile kolayca elektron alışverişine girebilirler. Serbest radikaller eşleşmemiş elektronlarından dolayı kimyasal olarak çok aktiftirler ve ortamdaki diğer biyomoleküllere saldırarak onların biyolojik yapılarını bozarlar (Fantel, 1996; Temple, 2000). Serbest radikaller yaşam için gereklidirler, elektron transferi, enerji üretimi ve pek çok diğer metabolik işlevde görev alırlar. Bununla beraber eğer zincir reaksiyonu kontrolsüz bir davranış gösterirse hücrede hasarlara neden olurlar. Çoğu elektron çift halde bulunurken, serbest radikal bu elektronları birbirinden ayırır. Sonuçta serbest radikal etki ettiği atom ya da molekülü serbest radikal yapar (Nelson and Cox., 2004; Gülçin, 2007).

Serbest radikallerin aşırı oluşumu metabolizma için tehlike oluşturur. Ancak vücudun işlevlerini görebilmesi ve hastalıklardan korunabilmesi için de gereklidirler. Serbest radikaller vücudun hastalıklara karşı direncini, vücudu saran organizmaları yok ederek arttırırlar. Buna karşın fazla üretildiğinde metabolik hasara neden olarak birçok hastalığa yol açarlar. Serbest radikallerin hücrelerde protein, lipid, karbonhidrat ve nükleik asitler üzerinde önemli etkileri vardır. Proteinlerin karbonil türevleri ve oksidasyon ürünleri amino asit yan zincirlerinin modifikasyonuna sebebiyet vermektedir. Proteindeki karbonil gurupları serbest radikallerin açık hedefi durumundadır. Serbest radikaller peptit bağlarını koparabilir ve hücre membranında bulunan proteinleri yıkarak hücrenin ölümüne sebep olabilirler. Enzimler de protein yapısında olduğu için serbest radikallerden etkilenecek fonksiyonları bozulabilir. Örneğin hücredeki iyon transportunu bozarak hücrenin membran potansiyeline hasar verebilirler (Loecke, 1999).

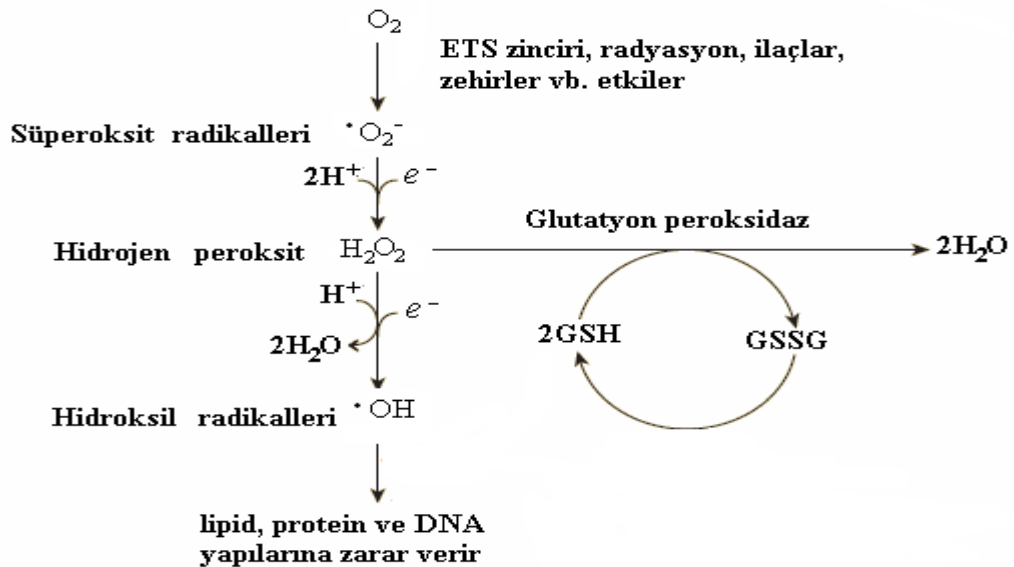
Yaşlanma bütün insanları etkileyen biyolojik bir süreçtir. Yaşlanmada rolü olduğu bilinen en önemli etkenlerden biri de metabolizma sırasında meydana gelen serbest radikallerdir (Ayar, 2008). Metabolizmadaki serbest radikallerin en büyük kaynağı

reaktif oksijen türleridir. Reaktif oksijen türlerinin oluşma kaynakları iç kaynaklı olarak elektron transport sistemi, bazı enzimatik reaksiyonlar, oksidasyon reaksiyonları gibi metabolik proseslerken, UV ışınları, radyasyon, ilaç yan etkileri, sigara, yanlış beslenme, kanserojen maddeler en önemli dış kaynaklarıdır. Bunlar serbest radikallerin endojen ve ekzojen kaynakları olarak bilinir (Aksoy, 2002).

Tablo 1. Serbest radikal kaynakları

Endojen Kaynaklar	Ekzojen Kaynaklar
Mitokondrial elektron transport zinciri	Diyet faktörleri
Redoks reaksiyonları	Sigara dumanı
Oksidatif reaksiyonlar	Zararlı ışınlar (x-ray,
Enzimler	UV)
Otooksidasyon reaksiyonları	İlaçlar
Araşidonik asit metabolizması	Organik solventler

Metabolizmada oluşan ve dış kaynaklı radikal ve reaktiflerin oluşum yolları Şekil 1.'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Serbest radikal ve reaktiflerin oluşumu (Bursal, 2009).

Oksijen, atomik halde kararlı olmadığı için doğada moleküler halde bulunur. Oksijen gazı (O₂), ozon (O₃) ve oksitler dünyamızdaki oksijen kaynaklarıdır. Yerkabuğunda (% 53,8) ve insanda (% 61) bulunan en yaygın elementtir. Biyosferde ise en yaygın ikinci elementtir (Gutteridge, 1989). Oksijen insanların hayatlarını devam ettirebilmeleri için çok önemli bir moleküldür. Fakat oksijenin eksik indirgenmesi sonucu hücreye zarar veren reaktif oksijen türleri oluşmaktadır (Davies, 2000).

Reaktif oksijen türleri ve diğer türevleri reaktivitesi yüksek moleküllerdir. Proteinler, lipidler ve nükleik asitler ile reaksiyona girerek fonksiyon azalmasına ya da bu maddelerin yok olmasına sebep olabilirler. Bu etkilerinden dolayı bunlara reaktif oksijen türleri (ROS, Reactive Oxygen Species) denmektedir (Halliwell, 1996). Reaktif türlerin zararlı etkilerinin temel sebebi radikal olmaları, radikal oluşumuna sebep olabilmeleri veya yükseltgeme potansiyellerinin daha yüksek olmalarından kaynaklanmaktadır. Oksidatif stres sürecinde meydana gelen reaktif oksijen türleri nükleik asitleri, proteinleri ve lipidleri oksitleyebilirler (Stadtman, 2002).

Hücrede ROS'nin aşırı miktarda oluşmaları "oksidatif stres" olarak tanımlanır. Bu olay, tüm hücre bileşenleri (karbonhidratlar, proteinler, yağlar) üzerinde olumsuz etkiye sahiptir. Aynı zamanda hidroksi radikali (OH•) başta olmak üzere birçok serbest radikal, genetik materyal olan DNA'daki nükleik asit bazlarının değişimine ve DNA zincirinde kırılmalara neden olarak kanser oluşumu, hücre yaşlanma ve hücre ölümüne kadar giden süreçleri başlatabilirler (Boğa, 2007).

ROS insan vücudunda normal metabolik prosesler sonucunda sürekli olarak üretilmektedir (Langseth, 1995). Birçok fizyolojik proseste önemli bir rol oynayan ROS, vücuttaki birçok oksidatif biyokimyasal reaksiyonun başlıca yan ürünü olduğu ve biyolojik moleküllere etki ederek çeşitli hastalıklara neden olan hücre ya da doku hasarına yol açtığı bilinmektedir (Whitehead *et al.*, 1992; Yen and Chen, 1995).

Metabolizmada endojen kaynaklı birçok reaktif oksijen türü ve serbest radikaller oluşmaktadır. Bu reaktif oksijen türleri ve serbest radikaller aynı zamanda hücrelerarası iletişim görevi de yaparlar. Fakat bunların aşırı miktarda oluşması oksidatif stres, erken yaşlanma, hücre fonksiyonlarının ve biyokimyasal moleküllerin yapılarının bozulması ile beraber pekçok patolojik rahatsızlıkların oluşmasına sebep olur (Nordberg and Arner, 2001).

Olumsuz etkilenen sistemler, ilişkili oldukları diğer sistemleri etkiler ve bu durum zincirleme olarak devam eder. Ta ki zincir nihayetinde sonlansın ya da antioksidan sistem tarafından prosesin bir yerinde sonlandırılınsın. Aksi durumda bu reaktif türler hücrenin doğrudan ya da dolaylı olarak ölümüne sebep olurlar (Moldovan and Moldovan, 2004).

Reaktif oksijen türlerinin yanı sıra bazı reaktif azot türleri de (RNS) vücutta meydana gelmektedir. Tablo 2’de gösterilen reaktif oksijen ve reaktif azot türleri oksidatif strese en çok sebep olan önemli faktörlerdendir (Aruoma and Cuppett, 1997).

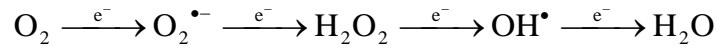
Tablo 2. Bazı önemli reaktif oksijen ve azot türleri

Reaktif oksijen türleri		Reaktif azot türleri	
Süperoksit radikali	$O_2^{\bullet -}$	Nitrik oksit radikali	NO^{\bullet}
Hidrojen peroksit	H_2O_2	Azot dioksit radikali	NOO^{\bullet}
Hidroksil radikali	OH^{\bullet}	Peroksinitrit radikali	$ONOO^{\bullet}$
Hipokloröz asit	$HOCl$	Nitröz asit	HNO_2
Singlet oksijen	1O_2	Nitrozil katyonu	NO^+
Organik radikaller	$RO^{\bullet}, R^{\bullet}, R-S^{\bullet}$	Nitroksi anyonu	NO^-
Peroksil radikali	$RCOO^{\bullet}$	Peroksinitrit	$ONOO^-$

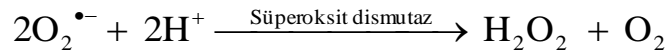
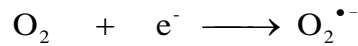
ROS, normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen ($^1\Delta_g \ ^1O_2$) ve hidroksil radikali (OH^{\bullet}) gibi yapılardır. ROS, çeşitli serbest radikallerin oluştuğu serbest radikal zincir

reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli organik radikaller ($R\bullet$), peroksit radikalleri ($ROO\bullet$), alkoksi radikalleri ($RO\bullet$), tiyil radikalleri ($RS\bullet$), sülfenil radikalleri ($RSO\bullet$), tiyil peroksit radikalleri ($RSO_2\bullet$) gibi çeşitli serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar (Dawn *et al.*, 1996; Akkus, 1995; Tietz, 1995; Burtis and Ashwood, 1999).

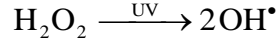
Yüksek indirgeme potansiyeline sahip elektronlar, mitokondri iç membranında elektron transport sistemi ile moleküler oksijene (O_2) transfer edilir. Mitokondrial elektron transport sisteminde, elektronların O_2 'ye transferi sırasında oksijenin kısmi indirgenmiş ürünleri oluşur. Bu ürünler çok reaktif yapıdadır ve biyomoleküllerin yapılarına girerek geri dönüşümsüz hasarlara sebep olurlar (Keha ve Küfrevioğlu, 2000). Bu reaktif oksijen türlerinden $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $OH\bullet$ oluşum reaksiyonları aşağıda verilmiştir.



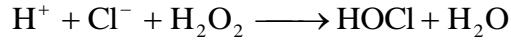
Moleküler oksijenin (O_2) mitokondrial elektron transport sisteminde bir elektron alması sonucu süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$) oluşur. Süperoksit radikalleri süperoksit dismutaz adı verilen bir enzimle inaktive edilirler.



Hidrojen peroksit (H_2O_2) eşleşmemiş elektrona sahip olmadığı için radikal olmayan özelliğe sahip bir reaktif oksijen türüdür. Ancak hidrojen peroksit Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları ile çok güçlü bir reaktif olan hidroksil radikalini ($OH\bullet$) oluşturur. Aynı zamanda hidrojen peroksitin UV ışınlarının etkisiyle $OH\bullet$ dönüştüğü bilinmektedir.

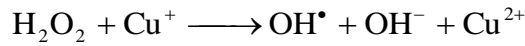
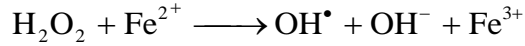


Ayrıca hidrojen peroksit reaktif bir ürün olan hipokloröz asiti (HOCl) oluşturmaktadır (Keha ve Küfrevioğlu, 2000; Asad *et al.*, 2004).

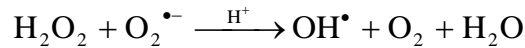


Hidroksil radikali; lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi biyomoleküllere çok güçlü bir şekilde saldırarak oksitleyip yapılarında kalıcı hasarlar bırakan ve yarı ömrü 10^{-9} saniye gibi çok kısa olan bir reaktif oksijen türüdür. Hidroksil radikali, hidrojen peroksitin indirgenmesi sonucunda açığa çıkar. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları olarak adlandırılan bu tepkimeler aşağıda gösterilmiştir (Fantel 1996; Halliwell, 2000; Nordberg and Arner, 2001).

Fenton reaksiyonları:



Haber-Weiss reaksiyonu:



ROS tarafından en fazla etkilenen molekülün, hücre membranının ana bileşeni olan lipidler olduğu düşünülmektedir. Organizmada yeterli miktarda reaktif atom ya da molekül varlığında lipid peroksidasyonu kolaylıkla başlar. Oksijenin sebep olduğu lipid oksidasyonu tipik bir radikalik zincir reaksiyonudur (Aruoma and Cuppett,

1997). Lipit peroksidasyonu, hücrenin hayati fonksiyonları için de önemlidir (Davies, 2000). Ayrıca zamanla arterlerde yağ birikmesi sonucu bu kısımların daralması ve sertleşmesi olayı olarak bilinen aterosklerozisin gelişmesinde lipit peroksidasyonunun katkısı oldukça büyüktür (Devaraj and Jialal, 1998; Kaul *et al.*, 2001; Heinecke, 2002).

ROS lipidler üzerindeki etkileri lipit peroksidasyonu olarak adlandırılır. Serbest radikallerin etkileri üzerindeki araştırmaların en kapsamlısı ve en iyi tanımlanmış etkileri lipitler üzerindedir. Lipid peroksidasyonu serbest radikaller tarafından başlatılan ve membranda bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal bir olaydır. Çünkü yağ asitleri radikallerden hızlıca etkilenebilen, kolay ulaşılan bir hedef durumundadır. Lipitlerdeki çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu radikal zincir reaksiyonuna sebep olur. Lipitlerin peroksidasyonu sonucu karbonil ve alken gibi hücrelere zararlı birçok bileşiğin oluşmasına yol açar. O_2^- , OH^\bullet , ROO^\bullet lipit peroksidasyonunu başlatan radikallerdir. (Kneepkens, 1994; Loecke, 1999).

Yağ asitlerinin oksidasyonu metilen karbonundan hidrojen atomunun çıkarılması ile başlar ve yağ asidi radikali (L^\bullet) oluşur. İlerleme aşamasında yağ asidi radikaline hızlı bir şekilde oksijen eklenerek peroksil radikali (LOO^\bullet) oluşur. Lipit peroksil radikalleri zincir reaksiyonlarının başlatıcılarıdır. Bunlar diğer çoklu doymamış yağ asidi moleküllerinden hidrojen atomlarını çıkartarak yeni reaksiyonları başlatırlar. Sonlanma aşamasında ise lipit hidroperoksitleri yıkılarak daha reaktif radikal türleri oluşturur. Peroksi radikaller ayrıca siklo endoperoksitleri de oluşturabilmektedir. Ortamda bulunan demir ve bakır tuzları lipid hidroperoksitlerinin yıkılımını hızlandırır ve oluşan peroksi ve alkoksi radikalleri ise lipit peroksidasyonlarını uyarırlar (Kneepkens, 1994; Loecke, 1999).

Proteinler de lipitler gibi oksidatif hasardan etkilenirler. Proteinlerin oksidasyonu genellikle OH^\bullet tarafından başlatılır ve sürecin seyri oksijen, süperoksit ya da onun

protonlanmış hali olan HO_2^\bullet tarafından belirlenir (Berlett and Stadtman, 1997). Diğer reaktif türler de protein oksidasyonunda yer alabilirler (Dalle-Donne *et al.*, 2003). Reaktif oksijen türleri amino asit rezidülerinin yan zincirlerini de oksitleyebilir. Bu şekilde istenmeyen protein-protein etkileşimleri oluşabilir ve proteini parçalayabilecek şekilde protein iskeletini oksitleyebilirler. Benzer oksidatif hasarlar serbest geçiş metal iyonlarının varlığında da meydana gelmektedir (Berlett and Stadtman, 1997; Stadtman, 2002). Özellikle protein yan zincirlerinde bulunan prolin, arginin, lisin ve treonin amino asitleri oksitlendiği zaman aldehitler ve ketonlarda olduğu gibi karbonil grupları oluşur ve bu gruplar kimyasal olarak kararlıdır (Dalle-Donne *et al.*, 2003). Ayrıca kanser çeşitleri, parkinson ve alzheimer gibi birçok dejeneratif hastalığın DNA'nın oksidatif hasarından kaynaklandığı bildirilmiştir (Evans *et al.*, 2004).

Metabolizmada üretilen serbest radikallerin ve normal oksijen metabolizmasının toksik etkilerinin giderilmesini sağlayan maddelere antioksidanlar denir (Fridovich, 1999). Vücudumuzu serbest radikallerin zararlı etkilerinden ve yaşlanmadan korumak için takviye besin olarak antioksidanlardan yararlanır (Tekeli vd., 2008).

Canlı organizmanın serbest radikallere ve normal oksijen metabolizmasının toksik etkilerine karşı kendini koruması gerekir. Bunun için de antioksidan mekanizmaya sahiptir (Bursal, 2009). Antioksidanlar vücudumuzda lipid peroksidasyonu ve diğer serbest radikal aracılı reaksiyonları inhibe ederek radikal süpürücü olarak görev görürler. Dolayısıyla radikallerden kaynaklanan çeşitli hastalıkları engeller (Gençaslan, 2007).

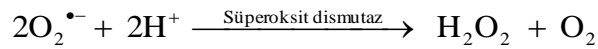
Antioksidanlar; “enzimatik ve enzimatik olmayan yapılardan oluşan radikalleri ve onların reaksiyonlarını önlemeye çalışan maddeler” olarak da tanımlanabilir (Fidan ve Dündar, 2007).

Tablo 3. Bazı antioksidanlar

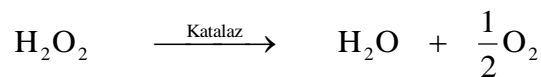
Antioksidan enzimler	Enzim yapısında olmayan antioksidanlar
Süperoksit dismutaz	A Vitamini (β -Karoten)
Katalaz	C Vitamini (Askorbik asit)
Süperoksit redüktaz	E Vitamini (α -Tokoferol)
Peroksiredoksinler	Proteinler (transferin, ferritin, albumin, bilirubin)
Peroksidaz	Hormonlar (serotonin, melatonin)
Glutasyon redüktaz	Fenolik bileşikler (polifenoller, flavonoitler)
Glutasyon S-transferaz	Lipoik asit, ürik asit, glutasyon

Enzim yapısında olan endojen antioksidanlar, radikal ve reaktifleri gidererek oluşabilecek oksidatif hasarları giderirler (Fridovich, 1999).

Süperoksit dismutaz enzimi, aerobik hücrelerde süperoksit radikalini ($O_2^{\bullet-}$) hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürmektedir. Süperoksit dismutaz enziminin mitokondri ve sitozolde bulunan farklı türleri vardır. Mitokondride bulunan süperoksit dismutaz enzimi, Mn^{2+} ihtiva etmesi ve yüksek konsantrasyonda bulunmasından dolayı oluşan süperoksitlerin büyük çoğunluğunu gidermektedir (Keha ve Küfrevioğlu, 2000).

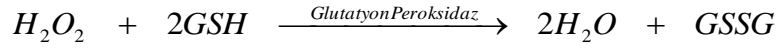


Katalaz enzimi, hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene dönüştürmektedir. Böylece H_2O_2 'ten Fenton reaksiyonu ile hidroksil radikalinin oluşumu engellenir (Halliwell, 1999).



Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksit ve büyük molekülü lipid hidroperoksitlerinin indirgenmesini gerçekleştirir. Bu enzim 4 selenyum atomu içeren tetramerik yapıda bir enzimdir. Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksiti H_2O 'ya indirgeyerek hidroksil

radikalinin oluşma riskini azaltır. GSH ise okside glutatyona (GSSG) yükseltgenir (Bursal, 2009).



Antioksidanların bitkisel kaynaklı olanları serbest radikal temizleyici, peroksit parçalayıcı, enzim inhibitörü ve sinerjist olarak fonksiyon görürler (Larson, 1988).

Ekzojen antioksidanlar ise doğal ve sentetik olmak üzere iki ana grupta incelenebilir. En önemli doğal antioksidanlar arasında askorbik asit (C vitamini), α - tokoferol (E vitamini), β -karoten (A vitamini) ve polifenolik yapıdaki bileşikler sayılabilir. Doğal antioksidanlar en çok yeşil sebzelerde (Gülçin vd., 2004a), tohumlarda (Gülçin, 2005b), baklagiller ve meyvelerde, A vitamini, C vitamini, E vitamini ve bazı B vitamini içeren besinlerde bulunur (Cao *et al.*, 1996; Gülçin vd., 2005a). Ayrıca sebzelerde, kabuklu ve kabuksuz meyvelerde, tohumlarda, yapraklarda, çiçeklerde ve köklerde bol miktarda bulunmaktadır (Pratt *et al.*, 1990).

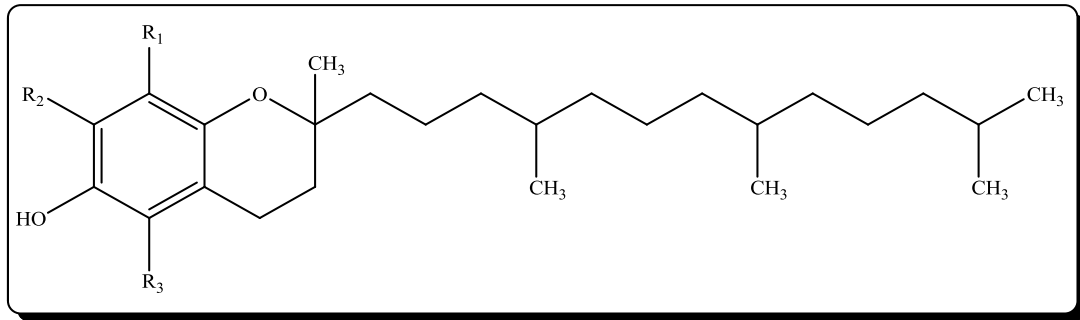
Antioksidanlar; vücut hücreleri tarafından üretildikleri gibi, gıda yoluyla da alınabilmektedir. Gıdalarda mevcut olan ve insan vücudunu zararlı serbest radikallerden koruyan başlıca doğal antioksidanlar, vitaminler (C, E ve A vitaminleri), flavonoidler, karotenoitler ve polifenollerdir. Çoğu araştırmada meyve ve sebze tüketimi ile belirli kanser ve kalp hastalıklarının oluşumu arasında ters orantılı bir ilişki olduğu saptanmıştır (Miller and Paganga, 1997).

Tokoferoller içerisinde biyolojik açıdan en önemli olanı α - tokoferoldür. Tokoferoller, gıda maddelerinin bozulmasını engelleyen ve uzun ömürlü olmalarında rol oynayan önemli bir doğal antioksidan guruptur (Ruiz-Lopez *et al.*, 1995).

Tablo 4. Bazı doğal antioksidanlar ve buldukları kaynaklar

Antioksidan türü	Bulunduğu kaynaklar
Katekinler	Yeşil çay
Flavonoitler	Tahıllar, meyve ve sebzeler
Polifenoller	Meyvelerin çekirdek ve tohumları
Karotenoitler	Bitkisel yağlar
Tokoferoller	Bitkisel yağlar

Doğal antioksidanlardan α -tokoferol (E vitamini), yağda çözünen önemli bir antioksidandır. Hücre zarları ve lipoproteinlerde önemli işlevler görmektedir. Lipit peroksil radikalleri, diğer doymamış yağ asitleri ile tepkimeye girerek zincirleme lipit peroksidasyon reaksiyonları oluştururlar. α -Tokoferol, hücre membran fosfolipitlerinde bulunan doymamış yağ asitlerini, reaktif oksijen türlerinin olumsuz etkilerine karşı korur. α -Tokoferol, lipit peroksil radikalleri (LOO \cdot) ile tepkimeye girerek bunların reaktifliğini giderir. Böylece zincir kırıcı etki yaparak lipit peroksidasyonunu engeller (Bursal, 2009).



α -tokoferol: R₁, R₂, R₃, CH₃

β -tokoferol: R₁, R₃, CH₃; R₂, H

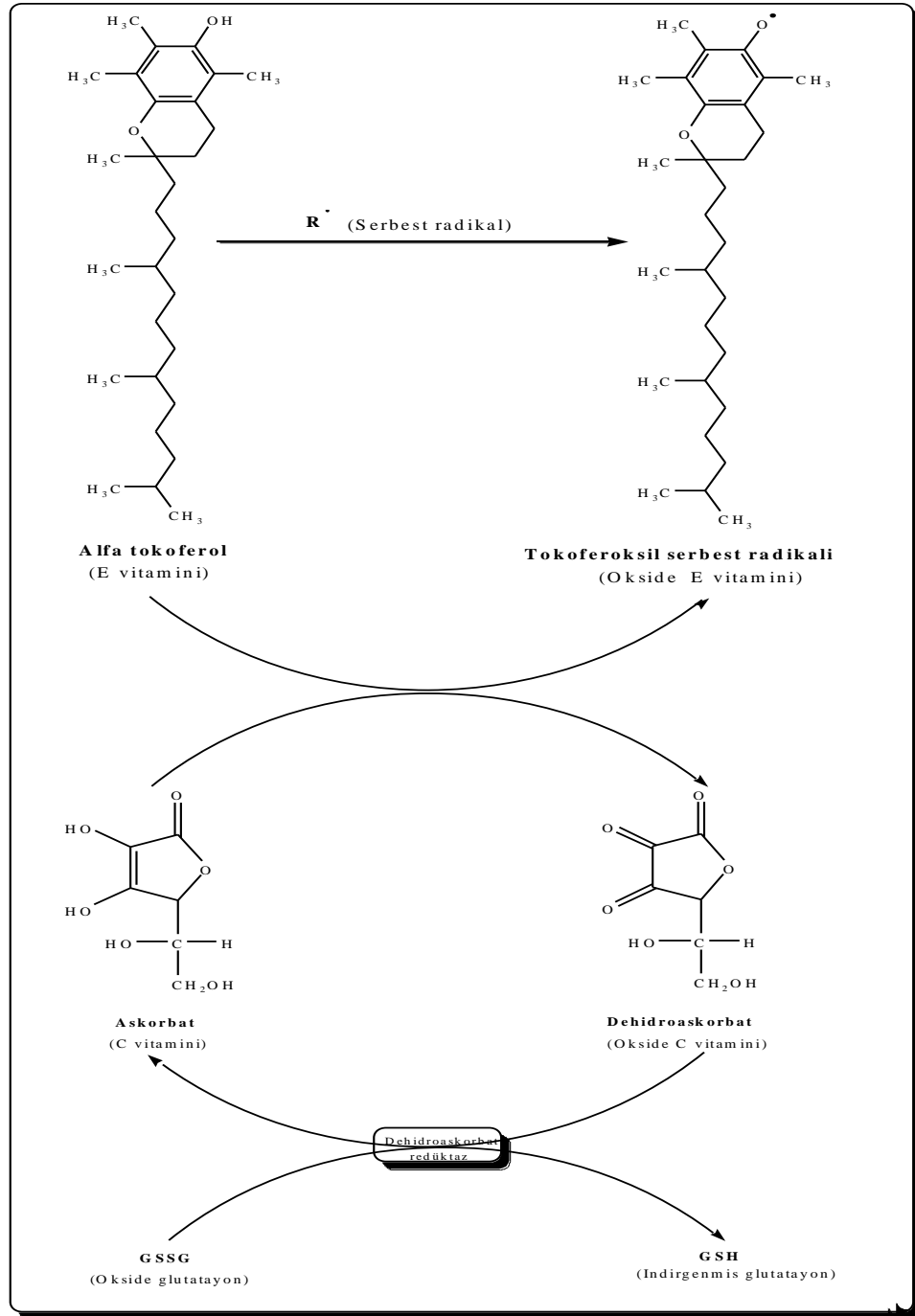
γ -tokoferol: R₁, R₂, CH₃; R₃, H

δ -tokoferol: R₁, CH₃; R₂, R₃, H

Şekil 2. Doğal bir antioksidan olan tokoferollerin moleküler yapıları.

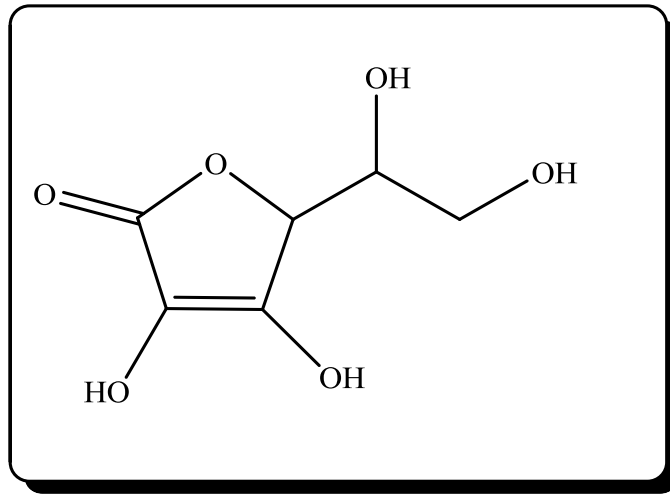
Mitokondri membranında yaklaşık 2000 fosfolipid başına bir α -tokoferol bulunmaktadır. E vitamini eksikliğinde birçok canlıda bazı olumsuz etkiler

görülmüştür. Bu etkiler ise ekzojen antioksidanlar tarafından tolere edilmektedir. Bu durum, E vitamininin *in vivo* olarak lipid peroksidasyonunu önleyici bir rol üstlendiğini göstermektedir (Halliwell and Gutteridge, 1989).



Şekil 3. α -Tokoferolün lipid serbest radikallerini söndürdükten sonra tokoferoksil radikaline dönüşmesi (Gülçin, 2002).

Diğer bir doğal antioksidan olan askorbik asit (C vitamini) ise suda çözünen bir antioksidandır. Süperoksit radikali ve hidroksil radikalini giderir. Askorbik asit serbest radikallerin hücre içinden uzaklaştırılmasında önemli rol oynamaktadır. Bundan dolayı bol miktarda sebze ve meyve tüketimi hastalıklara yakalanma riskini azalttığı gibi, kanser ve ölüm oranında düşüş meydana getirmektedir (Ames *et al.*, 1993).

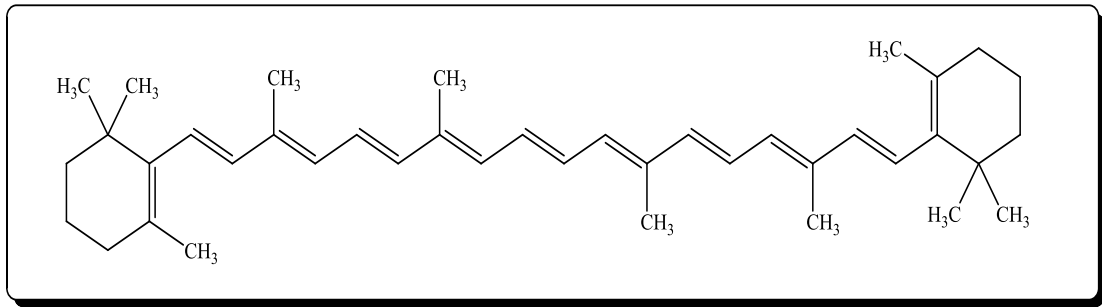


Şekil 4. Doğal bir antioksidan olan askorbik asitin moleküler yapısı.

Askorbik asit bitkiler ve birçok memeli tarafından karaciğerde glukozdan sentezlenir. Mikroorganizmalarda askorbik asit yoktur. İnsanda ise esansiyeldir. Askorbik asit, kolayca hidrojen atomu vererek dehidroaskorbik asite dönüşen kuvvetli bir indirgeyici ajandır. Dehidroaskorbik asit de aynı zamanda antioksidan etkiye sahiptir. Besinlerin ısıtılması sırasında askorbik asit büyük ölçüde etkisini kaybetmektedir (Keha ve Küfrevioğlu, 2000; Arrigoni and De Tullio, 2002; Padayatty *et al.*, 2003).

Bir molekülün indirgeme kapasitesi onun antioksidan potansiyelinin bir göstergesidir. Oksidasyona uğrayan moleküller, indirgeme potansiyelinin yüksek olmasından dolayı askorbik asit tarafından indirgenebilirler. Bu sebeple askorbik asit antioksidan kapasite sergilemektedir (Halliwell and Gutteridge, 1989).

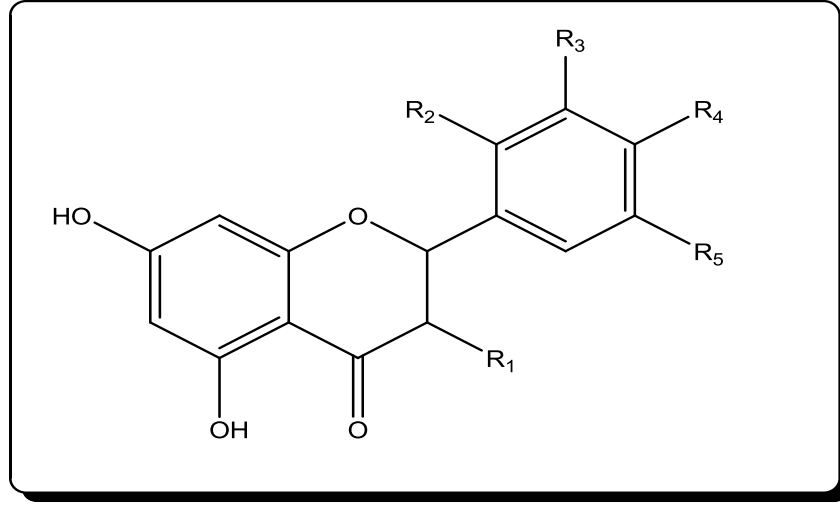
Başka bir doğal antioksidan olan β -karoten, bitkilerde bulunan ve α -tokoferol gibi peroksil ve alkoksil radikalleri ile reaksiyona girebilen bir moleküldür. Bu sebeple lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonunu engelleyebilir. Ayrıca iyi bir singlet oksijen söndürücüdür (Halliwell and Gutteridge, 1989).



Şekil 5. Doğal bir antioksidan olan β -karotenin moleküler yapısı.

Polifenolik bileşikler ve flavonoidler, çıkış maddeleri fenol olan, güneş ışığı yardımıyla bitkilerin yaprak, dal, meyve ve çiçeklerinde fotomorfogenez reaksiyonları sonucu oluşan organik bileşiklerdir. Suda orta derecede organik çözücülerde ise iyi çözünürler. Flavonoidler, bitkileri UV ışınlarına ve mikroorganizmalara karşı korurlar. Bitkilerin güneş ışığına rağmen gelişmeleri bu pigmentlerin çok fazla miktarda sentezlemesiyle mümkün olabilmektedir. İnsanlarda flavonoidler, bağışıklık sistemini güçlendirir ve kalp krizi riskini azaltır (Jung *et al.*, 2005).

Besin fenolikleri; flavonoidleri, fenolik asitleri ve fenolik polimerleri içerir. Polifenoller güçlü antioksidanlardır ve aktiviteleri kimyasal yapılarına bağlıdır. Bitki polifenoller multifonksiyonel bileşikler olup, indirgeme aracı, hidrojen atom-donör antioksidanlar ve singlet oksijen söndürücü olarak, bazıları metal iyonu şelatlama özelliklerine sahip antioksidanlar olarak davranırlar (Miller and Paganga, 1997).



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Flavonlar					
Apigenin	H	H	H	OH	H
Chrysin	H	H	H	H	H
Luteolin	H	H	OH	OH	H
Flavonoller					
Quercetin	OH	H	OH	OH	H
Myricetin	OH	H	OH	OH	OH
Morin	OH	OH	H	OH	H
Kaemferol	OH	H	H	OH	H

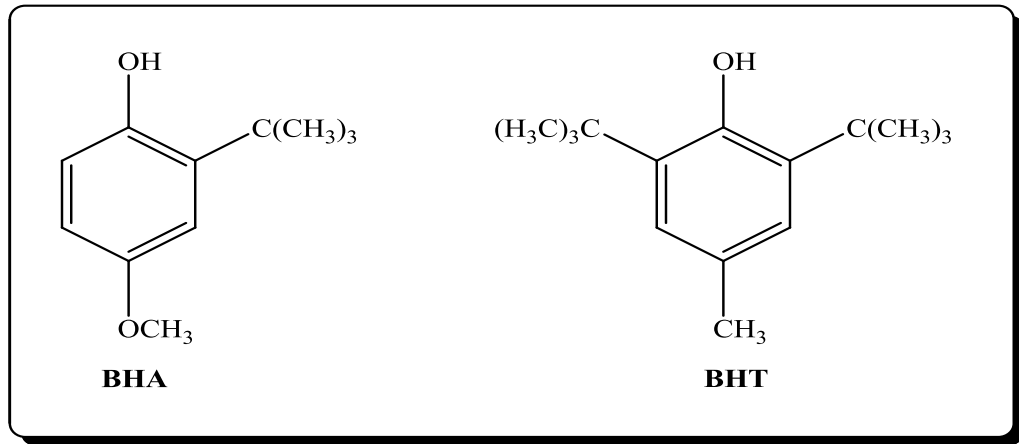
Şekil 6. Doğal antioksidanlardan olan bazı flavonoidlerin moleküler yapıları.

Bir polifenolün antioksidan olarak tarif edilebilmesi için şart, okside olabilen substratlara oranla düşük konsantrasyonlarda bulduklarında, otooksidasyonu veya serbest radikal merkezli oksidasyonu erteleyebilmesi, geciktirebilmesi veya önleyebilmesidir (Halliwell, 1990).

Bitki hücre ve dokularında basit fenolik bileşiklerin önemli bir kısmı, fenolik asitler ve fenilpropanoitlerin sentez yolunun son ara ürünleridir. Polifenolik bileşikler ve flavonoitler, lipid peroksidasyonu gibi serbest radikallerin zararlı etkilerini giderirler, metal iyonları şelatlarlar ve oksidasyonu azaltarak antioksidan özellik gösterirler (Stevenson and Hurst, 2007).

Diğer iki önemli doğal antioksidan ise karotenler ve skualendir. Karotenler hücreyi ışık, hava ve diğer foto sensitizasyon etkilerinden koruyan ve bu ortamlarda antioksidan olarak görev yapan bileşiklerdir (Krinsky, 1989). Skualen ise bir serbest radikal söndürücüsü olmakla beraber aynı zamanda singlet oksijen kuençeri olarak da görev yapmaktadır (Kohno *et al.*, 1995).

Doğal antioksidanların yanı sıra sentetik antioksidanlar da mevcuttur. Bunlar; bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA), tersiyerbütillhidrokinon (TBHQ), propil galat (PG) ve troloks gibi maddelerdir (Köksal, 2007).

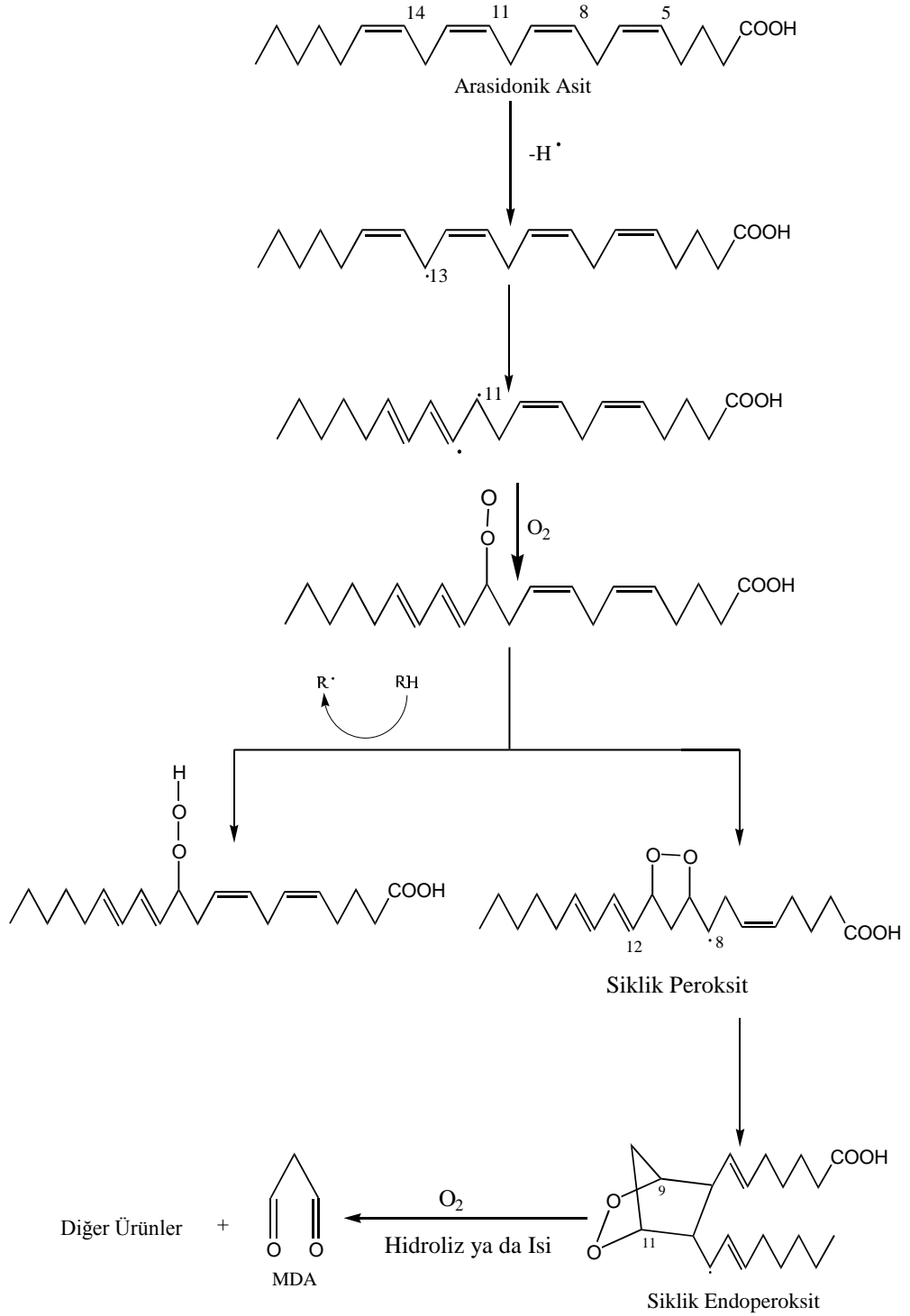


Şekil 7. Bütillenmiş hidroksi anisol (BHA) ve Bütillenmiş hidroksi toluen (BHT)' in moleküler yapıları.

Sentetik antioksidanlar gıdalarda; gıdaların oksidasyonu sonucu oluşan bozulmalar, koku oluşumu, tatların bozulması ve vitamin miktarındaki azalmaları gibi oluşan problemleri çözmeye ve bunların raf ömürlerini uzatmak amacıyla kullanılmaktadır. Ancak sentetik antioksidanların toksik ve kanserojen olabileceğini ortaya koyan çalışmalardan sonra kullanımlarına ciddi sınırlama ve yasaklar getirilmiştir (Haigh, 1986).

Sentetik antioksidanlar hakkındaki bu şüpheler, doğal antioksidanlara olan eğilimi artırmış ve bu alandaki çalışmalar ise bitki kaynaklı antioksidanlar üzerinde yoğunlaşmıştır. Doğal kaynaklı E ve C vitamini uzun yıllardır besinlerde ayrı ayrı veya sinerjist etkiden dolayı birlikte antioksidan olarak kullanılmaktadır. Ancak tokoferol ve askorbik asidin antioksidan aktivitesi sentetik antioksidanlardan nispeten daha düşüktür (Nishina, 1991).

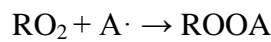
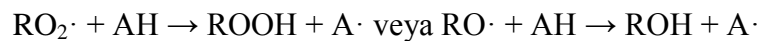
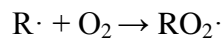
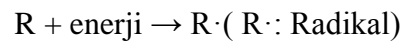
Zincirleme reaksiyon teorisine göre, oksijen ile otookside olabilen madde, oksijenle birleşmektedir. Bu şekilde meydana gelen etkinleşmiş peroksit radikal ve molekülleri, enerjilerini maddenin yükseltgenebilen diğer molekülerine aktarmaktadır. Böylelikle besinlerdeki otooksidasyon devam etmektedir. Antioksidanlar bu zincir reaksiyonunu koparıcı rolü oynarlar. Yani bu bileşikler aktivasyon enerjisini kabul ederler, ancak bu enerjiyi başka moleküllere aktaramazlar. Bu şekilde, bir antioksidan molekülünün araya girmesiyle otookside olabilen maddenin birçok molekülü yükseltgenmekten kurtulur (Keskin ve Erkmen, 1987).



Şekil 8. Araşidonik asidin otooksidasyonu mekanizması (Gülçin, 2002).

Antioksidanlar yükseltgenebilen maddeler olduğundan zincirleme reaksiyonu koparmaları sırasında kendileri yükseltgenerek bozunurlar. Bu nedenle antioksidanlar yalnız sınırlı bir zaman için yükseltgenebilen maddeyi koruyabilir ve belli bir noktadan sonra madde ortamda hiç antioksidan yokmuş gibi yükseltgenmeye devam eder. Antioksidanların kimyasal aktiviteleri, diğer bir deyişle, hidrojen veya elektron donör araçları olarak indirgeme potansiyelleri onların serbest radikal yutucu olarak göstermiş oldukları potansiyel ile ifade edilir. Bir antioksidanın aktivitesi radikal süpürme yeteneği, hidrojen veya elektron donör aracı olarak göstermiş olduğu reaktivite (redüksiyon potansiyeline bağlı olan), metal şelatlama potansiyeli, diğer antioksidanlarla olan etkileşime bağlıdır (Miller and Paganga, 1997).

Antioksidan maddelerin işleyiş mekanizmaları radikalik zincir reaksiyon mekanizmasına göre enerji emilimi ile aktive edilen madde, oksijenle birleşerek okside olmakta ve bu şekilde meydana gelen aktiflenmiş peroksit molekülleri, enerjilerini maddenin okside olabilen başka moleküllerine aktararak otooksidasyona devam etmektedir. Antioksidanların kullanımı ile aktivasyon enerjisini antioksidan molekülü kullanmakta, bu enerjiyi başka moleküllere aktaramamaktadır. Antioksidan molekülünün araya girmesiyle otooksidasyona uğrayan maddenin birçok molekülü oksidasyondan kurtulmaktadır. Aşağıda antioksidan maddenin çalışma mekanizması görülmektedir (Tozoğlu, 2011).



Aktif antioksidanın molekülü ($A\cdot$) enerjisini radikal moleküllerine aktarmamakta, genellikle inaktif moleküllere okside olmaktadır (Tozoğlu, 2011, Gülçin, 2002). (AH: Antioksidan molekül, $A\cdot$: Aktif antioksidan molekülü, AO: İnaktif antioksidan molekülü).

Antioksidan maddelerin bu önemli görevlerinden yola çıkarak Lamiaceae familyasının bir üyesi olan *Teucrium chamaedrys* L. (Erkurtaran) ve Asteraceae familyasının bir üyesi olan *Achillea biebersteinii* Afan. (Sarı civanperçemi) bitkilerinin antioksidan aktiviteleri araştırıldı.

Teucrium chamaedrys L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkileri 30/07/2011 tarihinde, Erzincan'ın Çayırlı ilçesinde Keşiş dağı eteklerinden; Erzincan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Mustafa Korkmaz tarafından bir arazi çalışması sırasında toplandı. Erzincan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Herbarium'unda ki 2981 kod numaralı *Teucrium chamaedrys* L. ve 2858 kod numaralı *Achillea biebersteinii* Afan. bitkileri Erzincan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Araştırma Görevlisi Veli İlhan tarafından teşhis edildi. Teşhis edilen numuneler daha sonra küçük parçalara ayrıldı ve oda sıcaklığında gölgede kurutuldu. Kurutulan numuneler antioksidan çalışmalarında kullanılmaya kadar karanlıkta ve buzdolabında (+4 °C'de) muhafaza edildi.

2.KAYNAK ÖZETLERİ

Teucrium chamaedrys L. bitkisi yöresel olarak; Erkurtaran, Kısa Mahmut, Dalak otu, Kumacıotu, Meşecik, Yermişesi ve Yerpalamudu olarak adlandırılmaktadır. Halk tarafından; gövde, yaprak ve çiçek kısımları kaynatılıp suyu içilir. Halk arasında tıbbi olarak; romatizma ve karın ağrısı şikâyetlerinde yatıştırıcı olarak kullanılmaktadır (Baytop, 1999).

Teucrium chamaedrys L. bitkisi; iştah açıcı, miğde ağrılarını kesici, uyarıcı ve kuvvet verici etkilere sahiptir. Ülkemizde mide hastalıklarına ve şeker hastalıklarına karşı çok kullanılan bir drogdur. Zehirli bileşikler taşımadığından tehlikesizdir (Baytop, 1999).

Lamiaceae familyasının *Teucrium* L. cinsinin 32 türü Türkiye’de doğal olup, bu bitkiler tek yıllık ya da çok yıllık otsu bitki ya da çalı formundadırlar (Davis, 1988; Ekim, 1982; Güner, 2000). *Teucrium* türleri 2000 yıldan daha uzun süredir tıbbi amaçlı bitkiler olarak kullanılmaktadır (Ulubelen vd., 1995; Grieve, 1996; Bedir, 2003).

Teucrium flavum L., *Teucrium montanum* L., ve *Teucrium chamaedrys* L. bitkileri Türkiye’de halk arasında ülser ve şeker hastalığını tedavi etmek amaçlı kullanılmasının yanında, obezite ile mücadele etmek için de kullanılmaktadır (Ulubelen vd., 1995; Baytop, 1999; Zeybek vd., 1994).

Teucrium chamaedrys bitkisi çoğunlukla kuzey ve orta Anadolu’da (Davis, 1988; Ekim, 1982; Güner, 2000) bulunan bir *Teucrium* taksonudur. *Teucrium orientale* var. *puberulens* bu ailenin çoğunlukla orta Anadolu bölgesinde bulunan endemik olmayan güzel kokulu bir üyesidir (Davis, 1988; Ekim, 1982; Güner, 2000).

Teucrium chamaedrys L. ise özellikle batı ve güneybatı Anadolu'da yetişmektedir (Davis, 1988; Ekim, 1982; Güner, 2000).



Şekil 9. *Teucrium chamaedrys* L.

Teucrium chamaedrys L.; anti-romatizmal, sindirim ve idrar sökücü ajan olarak geçmişten günümüze tıbbi bir bitki olarak kullanılmaktadır (Özel, 2006).

Ayrıca bu bitki (*Teucrium chamaedrys* L.) hipoglisemik insülinotropik aktivite göstermekte, kanbasıncı ve kilo ağırlığını azaltma etkisi göstermektedir (Gharaibeh *et al.*, 1989; Suleiman *et al.*, 1988).

Panovska ve arkadaşları (2005) tarafından, farklı bir *Teucrium* türü olan *Teucrium montanum* L. ile yaptıkları çalışmada, *Teucrium* türlerinin serbest radikal giderici, hidroksi radikal giderici ve *in vitro* antioksidan kapasitesinin olduğunu ve bu bitkinin ekstraktlarının doğal antioksidant olarak kullanılabileceği göstermişlerdir.

Achillea bitkisinin Türkiye florasında 42 türü bulunmaktadır ve bunların 23 ü endemiktir (Huber-Morath, 1975; Duman vd., 2000). Bu türler Türkiye'ye özgün türlerdir ve ekonomik değere sahiptirler (Kaya vd., 1998).

Achillea biebersteinii Afan. bitkisi yöresel olarak; kılıç otu ve sarı çiçek olarak adlandırılmaktadır. Genel adı Sarı civanperçemidir. Halk tarafından, çiçek ve yaprakları kaynatılıp içilmektedir. Halk arasında tıbbi olarak; iştah açıcı, astım ve kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca yaprakları kanayan bölgedeki kanın durması için de kullanılır (Baytop, 1999).



Şekil 10. *Achillea biebersteinii* Afan.

Bazı *Achillea* türleri; yara iyileştirici, ishal, karın ağrısı ve mide gazına karşı bitkisel çay olarak kullanılmaktadır (Yeşilada vd., 1993; Fujita *et al.*, 1995; Honda *et al.*, 1996; Baytop, 1999).

Achillea biebersteinii Afan. bitkisi, çiçek durumunda % 0.45 uçucu yağ bulundurmaktadır (Baytop, 1999).

Konyalıoğlu ve Karamenderes'in (2004) farklı bir *Achillea* türü olan *Achillea millefolium* A. ile yapmış oldukları çalışmada bu bitkinin sahip olduğu toplam flavonoid ve fenol içeriği ile doğru orantılı olarak antioksidan etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Buda bize *Achillea* türlerinin antioksidan kapasitesinin varlığı hakkında önemli bir fikir vermektedir.

Bitki temelli diyet, bitkilerde bulunan doğal bileşikler sayesinde kalp hastalığı ya da kanser gibi birçok kronik hastalıkların gelişme riskini azalttığı tesbit edilmiştir (Lekli *et al.*, 2010).

Bu bilgiler ışığında çalışmamız Çayırılı Keşiş dağı Florasından olan *Teucrium chamaedrys* L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. üzerinde yoğunlaştırıldı. Bu bitkinin antioksidan aktivitesi; toplam fenolik bileşik miktar tayini, toplam flavonoit miktarı tayini, ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivite tayini, DPPH• serbest radikal giderme aktivitesi tayini, ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgeme kuvveti tayini ve kuprak metoduna göre indirgeme kapasitesi tayini ile tespit edildi ve α -tokoferol, troloks ve BHT gibi referanslarla mukayesesi yapıldı.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Neokuprin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin), 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH·) radikali, linoleik asit, α -tokoferol, polioksietilensorbitan monolaurat (Tween-20) ve trikloroasetik asit (TCA) Sigma-Aldrich'den satın alındı. Amonyum tiyosiyanat ise Merck'ten satın alındı.

3.1.2. Yararlanılan malzeme, alet ve cihazlar

UV-VIS Spektrofotometre	: Shimadzu, UV-1208
Derin dondurucu	: Sanyo, Japan
pH-metre	: Hanna Instrument
Hassas terazi	: Scaltec SBA 41
İnkübatör	: Elektro-Mag (0-300°C)
Otomatik pipetler	: Biohit, Socorex ve Oxford Pipettors
Vorteks	: Fisons, Whirlimixer
Evaporatör	: Heidolph 94200, Bioblock Scientific
Saf su cihazı	: Firstreem Calypso MK 1 Glass Still
Magnetik karıştırıcı	: Stuart Scientific
UV-Spektrofotometre küveti	: 3 cm ³ 'lük Kuartz Küvet

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

3.1.3.a. Toplam fenolik bileşik miktarı tayini ile ilgili çözeltiler

1. % 2'lik Na_2CO_3 çözeltisi: 2 g Na_2CO_3 100 mL'lik balon jodede bir miktar saf suda çözüldü ve hacmi yine saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
2. Folin-Ciocalteu Reaktifi: Satın alındığı şekilde kullanılmıştır.

3.1.3.b. Toplam flavonoit miktarı tayini ile ilgili çözeltiler

1. 1 M'lık CH_3COONa çözeltisi: 8,2 g CH_3COONa alınıp bir miktar saf suda çözüldü ve hacmi yine saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
2. %10'luk $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ çözeltisi: 10 mL $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ alınıp hacmi destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.c. Ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivite tayini ile ilgili çözeltiler

1. 0,04 M pH: 7,4 fosfat tamponu hazırlanması: 1,135 g Na_2HPO_4 alındı 180 mL destile suda çözüldü ve pH-metre kullanılarak pH'sı 7,4'e ayarlandı. Destile su ile toplam hacmi 200 mL'ye tamamlandı.
2. Linoleik asit emülsiyonunun hazırlanması: 0,017 M'lık linoleik asit emülsiyonu hazırlamak için 265 μL linoleik asit 50 mL ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponuna ilave edildi. Emülgatör olarak Tween-20 ilave edilerek karışım homojenize edilmiştir.
3. %3,5'luk HCl çözeltisinin hazırlanması: %37'lik HCl'den 9,46 mL alınarak 100 mL'ye destile suyla tamamlanarak hazırlanmıştır.

4. 20 mM FeCl₂ çözeltisi hazırlanması: 281 mg FeCl₂.3/4H₂O, %3,5'luk HCl ile çözülerek hacim aynı çözeltiyle 100 mL'ye tamamlandı.
5. %30'luk NH₄SCN çözeltisinin hazırlanması: 15 g NH₄SCN saf suda çözüldü, hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.d. Ferrik iyonlarını (Fe³⁺) ferröz iyonlarına (Fe²⁺) indirgeme kuvveti tayini ile ilgili çözeltiler

1. 0,2 M pH: 6,6 fosfat tamponunun hazırlanması: 6,24 g Na₂HPO₄ yaklaşık 180 mL destile suda çözüldü ve pH metre kullanılarak pH'sı 6,6'ya ayarlandı. Toplam hacim 200 mL olacak şekilde destile su ile tamamlandı.
2. %1'lik K₃Fe(CN)₆ çözeltisinin hazırlanması: 1,5 g K₃Fe(CN)₆ destile suda çözüldü ve toplam hacim 150 mL'ye destile su ile tamamlandı.
3. %10'luk TCA çözeltisinin hazırlanması: 15 g TCA destile suda çözüldü ve toplam hacmi 150 mL'ye destile suyla tamamlandı.
4. %0,1'lik FeCl₃ çözeltisinin hazırlanması: 165 mg FeCl₃.6H₂O destile suda çözüldü ve toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.e. Kuprak metoduna göre indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler

1. 0,01 M'lık CuCl₂ çözeltisinin hazırlanması: 47 mg CuCl₂ alındı ve 50 mL destile suda çözüldü.
2. 7,5.10⁻³ M'lık etanolik neokuprin çözeltisinin hazırlanması: 78 mg Neokuprin alındı ve 50 mL etanolde çözüldü.

3. 1 M'luk $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ tamponunun hazırlanması (pH: 6,5): 7,7 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ alındı ve 80 mL saf suda cözüldü, pH-metre ile pH'sı 6,5'e ayarlandı ve toplam hacim 100 mL'ye saf su ile tamamlandı.

3.1.3.f. DPPH• serbest radikal giderme aktivitesi ile ilgili cözeltiler

1. 10^{-3} M'luk DPPH• cözeltisinin hazırlanması: 39 mg DPPH• etanolda tamamen cözününceye kadar bir gece boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Toplam hacim destile su ile 200 mL'ye tamamlandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. *Teucrium chamaedrys* L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkilerinin toplanması ve kurutulması

Deneyleerde kullanılan *Teucrium chamaedrys* L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkileri Keşiş dağı etekleride Erzincanın Çayırılı ilçesine bağılı Çilhorozu köyünden temin edildi. Erzincan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Mustafa Korkmaz tarafından teşhis edildi. Toplanan numuneler daha sonra küçük parçalara ayrıldı ve oda sıcaklığında gölgede kurutuldu. Kurutulan numuneler antioksidan ile ilgili çalışmalarda kullanılıncaya kadar da karanlıkta ve buzdolabında muhafaza edildi.

3.2.2. *Teucrium chamaedrys* L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkilerinin etanol ekstralarının hazırlanması

Etanol ekstresinin hazırlanması literatürde belirtildiğı gibi yapıldı (Gülçin, 2005). Etanol ekstresi için blenderde öğütölmüş ve toz haline getirilmiş *Teucrium chamaedrys* L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkileri 20 g numuneler 1 litrelik ağızlı kapalı erlenlerde numunelerin yirmi katı etanol ile (400 mL) manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Elde edilen etanol ekstraları süzgeç kâğıdından süzöldü. Süzölmüş ekstralar birleştirilerek evaporatörde 40 °C’de etanol uzaklaştırıldı.

3.2.3. Toplam fenolik bileşik miktarı tayini

Teucrium chamaedrys L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkilerinin etanol ekstralarında bulunan toplam fenolik bileşik miktarı FCR ile belirlendi (Singleton *et al.*, 1999). Standart fenolik bileşik olarak gallik asit kullanıldı. Bunun için önce bir standart grafik çizildi. Bu amaçla 25 mg gallik asit 25 mL destile suda çözüldü ve 1 mg/mL konsantrasyonunda stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltiden 100-500 µg

gallik asit içeren çözelti erlenlere aktarıldı ve hacim destile suyla 23 mL'ye tamamlandı. Erlenlere sırasıyla 0,5 mL FCR ve 3 dakika sonra da %2'lik Na_2CO_3 çözeltisinden 1,5 mL ilave edildi. Karışım 2 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra numunelerin absorbansı 760 nm'de destile sudan oluşan köre karşı kaydedildi. Kontrol için numune yerine destile su kullanıldı.

Teucrium chamaedrys L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkilerinin etanol ekstralarında bulunan toplam fenolik bileşik miktarı Gülçin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre değerlendirildi (Gülçin, 2005). Daha önce hazırlanan her bir stok çözeltiden 1 mg alındı ve vezin kaplarına aktarıldı ve hacim 23 mL'ye destile suyla tamamlandı. Karışıma 0,5 mL FCR ve 3 dakika sonra da 1,5 mL %2'lik Na_2CO_3 ilave edildi. Numuneler iki saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Bu süre sonunda numunelerin absorbansı saf sudan oluşan köre karşı 760 nm'de okundu. Bu işlemler üçer defa tekrarlandı. Numunelerin absorbans değerlerine karşılık gelen gallik asit ekivalent miktarı standart grafikten elde edilen aşağıdaki denklem yardımıyla bulundu. Bulgular gallik asit ekivalent (GAE) ve mikrogram olarak verildi.

3.2.4. Toplam flavonoit bileşik miktarı tayini

Teucrium chamaedrys L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkilerinin etanol ekstralarında bulunan toplam flavonoit bileşik miktarı Park ve arkadaşlarının yapmış olduğu metoda göre belirlendi (Park *et al.*, 1997). Standart flavonoit bileşik olarak kuarsetin kullanıldı. Bunun için önce standart grafik çizildi. Bu amaçla 25 mg kuarsetin 25 mL destile suda çözülerek 1 mg/mL konsantrasyonda stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltiden 10-50 µg kuarsetin içeren çözelti deney tüplerine aktarıldı. Daha sonra bunun üzerine sırasıyla 0,1 mL (1 M) suda hazırlanmış CH_3COOK ve 0,1 mL (%10) $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ çözeltilerini içeren 4,3 mL etanol çözeltisi ilave edilerek vortekste karıştırıldı. Oda sıcaklığında 40 dakika inkübe edildikten sonra 415 nm'de absorbansları etanolden oluşan köre karşı kaydedildi. Toplam flavonoit konsantrasyonu kuarsetinin standart olarak kullanıldığı aşağıda verilen standart grafik denkleminde mikrogram kuarsetin ekivalent (QE) olarak hesaplandı.

Teucrium chamaedrys L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkilerinin etanol ekstralarında bulunan toplam flavonoit bileşik miktarını belirlemek için toplam fenolik bileşik miktarı tayininde kullanılan stok çözeltilerden deney tüplerine sırasıyla 1000 µg ekstre ihtiva eden stok çözelti aktarıldı. Daha sonra ise deney tüplerine aktarılan farklı miktarlardaki ekstralar 0,1 mL (1 M) suda hazırlanmış potasyum asetat ve 0,1 mL (%10) alüminyum nitrat çözeltilerini içeren 4,3 mL etanol çözeltisi ile seyreltildi ve vortekste karıştırıldı. Oda sıcaklığında 40 dakika inkübe edildikten sonra 415 nm’de absorbanları aynı şekilde kaydedildi.

3.2.5. Ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivite tayini

Toplam antioksidan aktivite tayini ferrik tiyosiyanat metoduna göre belirlendi (Mitsuda *et al.*, 1966). Öncelikle stok çözeltiler hazırlandı. Bu amaçla 20 mg etanol ekstraları 20 mL etanolde çözünerek hazırlandı. İstenilen miktarlara karşılık gelen konsantrasyonlarda stok çözeltilerden vezin kaplarına otomatik pipetlerle pipetlendi ve hacim tampon çözeltiyle 2,5 mL’ye tamamlandı. Daha sonra her bir vezin kabına 2,5 mL linoleik asit emülsiyonu ilave edildi. Kontrol olarak 2,5 mL tampon çözelti ve 2,5 mL linoleik asit emülsiyonu kullanıldı. İnkübasyon 37°C’de gerçekleştirildi. Her altı saatte bir vezin kaplarından 100’er µL alındı 4,7 mL etanol bulunan deney tüplerine konuldu 100 µL Fe²⁺ çözeltisi daha sonra da 100 µL SCN⁻ çözeltisi ilave edildi. Kör olarak 4,8 mL etanol bulunan deney tüpüne 100 µL Fe²⁺ ve 100 µL SCN⁻ çözeltilerinin ilavesiyle hazırlandı. Numunelerin 500 nm’deki absorbanları köre karşı okundu.

3.2.6. Ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgeme kuvveti tayini

Toplam indirgeme kuvveti tayini Oyaizu metoduna göre yapıldı (Oyaizu, 1986). Taze hazırlanan stok çözeltilerden 10, 20 ve 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olacak şekilde alındı ve deney tüplerine aktarıldı ve hacim destile suyla 1 mL'ye tamamlandı. Daha sonra her bir tüpe 2,5 mL 0,2 M fosfat tamponu (pH: 6,6) ve 2,5 mL %1'lik potasyum ferrisiyanür [$K_3Fe(CN)_6$] ilave edildikten sonra karışım 50 °C'de 20 dakika inkübe edildi. Bu işlemlerden sonra reaksiyon karışımına 2,5 mL %10'luk TCA ilave edildi.

Çözeltinin üst fazından 2,5 mL alındı ve bunun üzerinede 2,5 mL destile su ve %0,1'lik 0,5 mL $FeCl_3$ ilave edildikten sonra absorbans 700 nm'de köre karşı okundu. Kör olarak destile su kullanıldı. Kontrol için ise numune yerine su kullanıldı.

3.2.7. Kuprak metoduna göre idirgeme kuvveti tayini

Teucrium chamaedrys L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkilerinin etanol ekstrelerinin kuprik iyonu (Cu^{2+}) indirgeme kapasiteleri Apak ve arkadaşlarının (2006) kullandığı Cuprak metoduna göre yapıldı. Bunu için deney tüplerine 0,01 M'luk 0,25 mL $CuCl_2$ çözeltisi ilave edildi.

Bunun üzerine 0,25 mL $7,5 \times 10^{-3}$ M'luk etanolik neokuprin çözeltisi ve 0,25 mL 1M'luk amonyum asetat tamponu aktarıldı. Çözelti karıştırıldıktan sonra farklı konsantrasyonlarda (10–30 $\mu\text{g/mL}$) *Teucrium chamaedrys* L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkilerinin etanol ekstreleri ve standartlar ilave edildi. Yarım saatlik bir inkübasyondan sonra 450 nm'de absorbansları kaydedildi. Reaksiyon karışımının artan absorbansı artan kuprik iyon (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesini göstermektedir.

3.2.8. DPPH• Serbest radikallerini giderme aktivitesi tayini

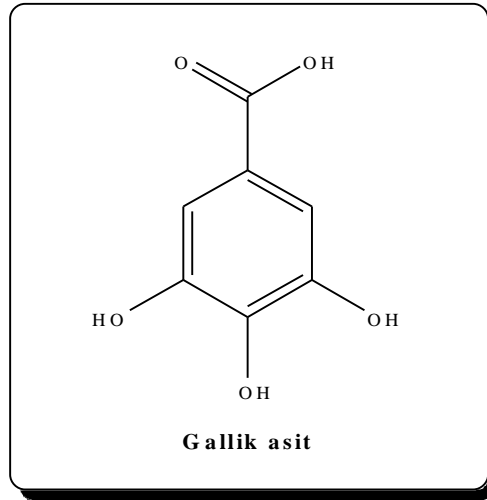
DPPH serbest radikal giderme Blois metoduna göre yapıldı (1958). Serbest radikal olarak DPPH•'ın 1 mM'lık çözeltisi kullanıldı. Deney tüplerine sırasıyla 10, 20 ve 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonlarında çözelti oluşturacak şekilde stok çözeltiler aktarıldı ve toplam hacimleri 3 mL olacak şekilde destile etanol ile tamamlandı. Daha sonra her bir numune tüpüne stok DPPH• çözeltisinden 1 mL ilave edildi. 30 dakika oda sıcaklığı ve karanlıkta inkübe edildikten sonra etanolden oluşan köre karşı 517 nm'de absorbansları kaydedildi. Kontrol olarak, 3 mL etanol ve 1 mL DPPH• çözeltisi kullanıldı. Azalan absorbans geriye kalan DPPH• çözeltisi miktarını yani serbest radikal giderme aktivitesini verdi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Antioksidan Araştırma Bulguları

4.1.1. Toplam fenolik bileşik miktarı tayini bulguları

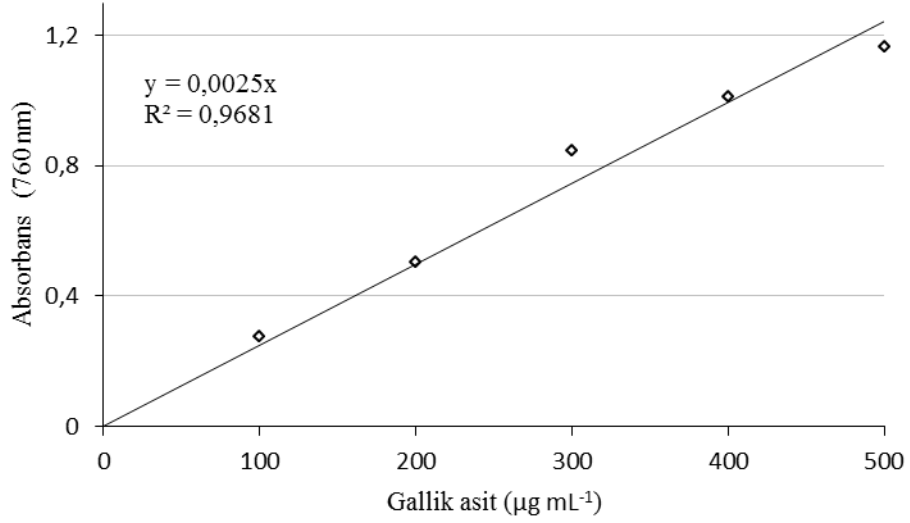
Teucrium chamaedrys L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkilerinin etanol ekstralarında bulunan toplam fenolik bileşik miktarını tespit için standart fenolik bileşik olarak kullanılan galik asitin açık yapısı Şekil 11.' de görülmektedir.



Şekil 11. Standart bir fenolik bileşik olan ve aynı zamanda kuvvetli antioksidan olan gallik asitin açık yapısı (Köksal, 2007).

Bunun için öncelikle gallik asitten standart grafik hazırlandı. Standart grafikten elde edilen formülden de yine her iki ekstrede bulunan toplam fenolik bileşik miktarları gallik asit ekivalent (GAE) olarak hesaplandı (r^2 : 0,9681). Bu amaçla hazırlanan standart gallik asit grafiği Şekil 12.' de verilmiştir.

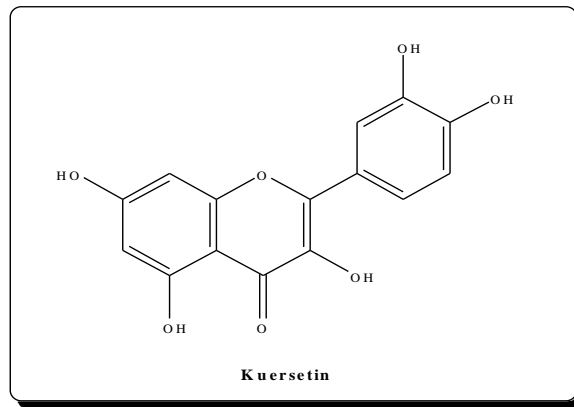
$$\text{Absorbans}_{(\lambda 760\text{nm})} = 0,0026 \times [\text{Gallik asit}]$$



Şekil 12. Toplam fenolik bileşik miktarı tayini için gallik asit ile hazırlanan standart grafik

4.1.2. Toplam flavonoid bileşik miktarı tayini bulguları

Şekil 13.' de açık yapısı verilen ve birçok çalışmada standart antioksidan olarak kullanılan kuersetin (Büyükokuroğlu vd., 2001; Gülçin, 2002; Gülçin vd., 2004) çalışmamızda standart flavonoid olarak kullanıldı (Türkoğlu vd., 2006). Flavonoidler iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden meydana gelen difenil propan yapısındaki fenolik bileşiklerdir.

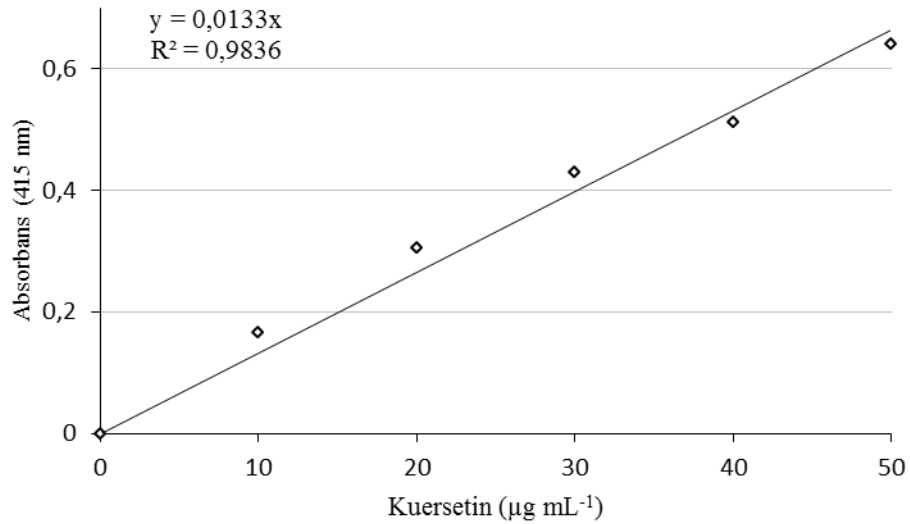


Şekil 13. Standart bir antioksidan olan kuersetinin açık yapısı (Köksal, 2007).

Flavonoitler antioksidan özelliğe sahip olup, kroner kalp hastalıkları gibi birçok hastalığı önleyen önemli bir doğal bileşik gurubudur. Bitkilerden elde edilen flavonoitlerin UV ışınlarını absorblayan özellikleri ve antioksidan aktivitelerinden dolayı kanser tedavisinde kemoprotektif etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (Hertog *et al.*, 1995). Ayrıca flavonoitlerin lösemi (Larocca *et al.*, 1990; Hirano *et al.*, 1994) ve yumurtalık kanseri gibi kanserli hücreler üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu (Benavente-Garcia *et al.*, 1997) tespit edilmiştir.

Teucrium chamaedrys L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkilerinden elde edilen etanol ekstresinde bulunan toplam flavonoit bileşik miktarı için öncelikle kuersetin standart olarak kullanılarak bir standart grafik hazırlandı. Standart grafikten elde edilen formül yardımıyla ekstrede bulunan toplam flavonoit miktarı kuersetin ekivalent (QE) olarak hesaplandı (r^2 : 0,9836). Bu amaçla hazırlanan standart galik asit grafiği Şekil 14.' de verilmiştir.

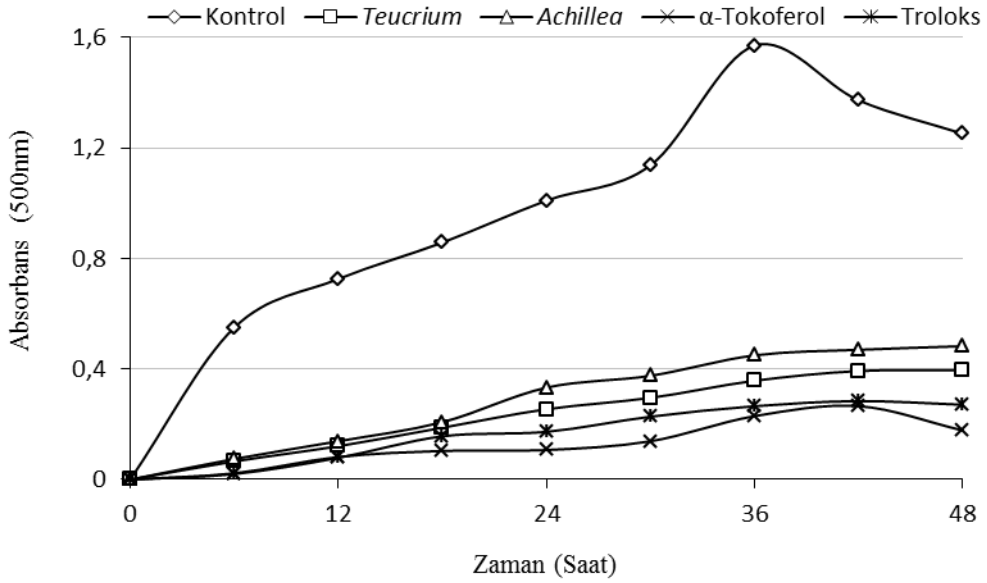
$$\text{Absorbans}_{(\lambda 415\text{nm})} = 0,0133 \times [\text{Kuersetin}]$$



Şekil 14. 10-50 µg arasında kuarsetin kullanılarak toplam flavonoit miktarı tayini için hazırlanan kuersetinin standart grafiği

4.1.3. Ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivite bulguları

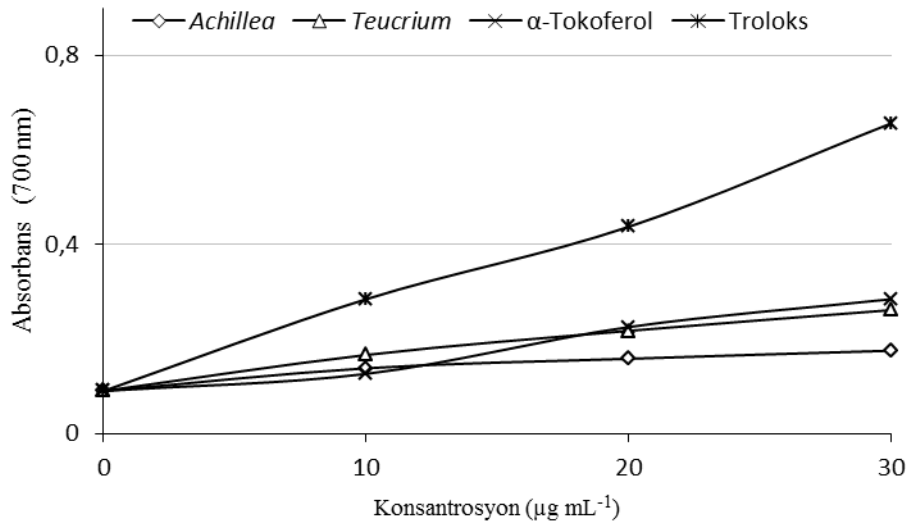
Çalışmada kullanılan *Teucrium chamaedrys* L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkilerinin etanol ekstrelerinden antioksidan aktivitesi ferrik tiyosiyanat metoduna göre belirlendi. Toplam antioksidan aktivite tayini için $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonları kullanıldı. Şekil 15.' de görüldüğü gibi *Teucrium chamaedrys* L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkilerinin etanol ekstrelerinin birbirine yakın fakat standart antioksidan olarak kullanılan α -tokoferol ve troloksan daha az total antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bitkilerden *Teucrium chamaedrys* L.'in *Achillea biebersteinii* Afan.'a göre daha fazla total antioksidan aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir.



Şekil 15. *Teucrium chamaedrys* L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkilerinin etanol ekstrelerinin $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ deki konsantrasyonda toplam antioksidan aktivitesinin birer standart antioksidan olan α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

4.1.4. Ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgeme kuvveti ile ilgili bulgular

Antioksidan çalışmalarda kullanılan bu biyoanalitik metotta, test çözeltisinin sarı rengi ortamda bulunan antioksidan maddelerin indirgeme aktivitelerinden dolayı farklı tonlardaki yeşil renge dönüşmektedir (Gülçin vd., 2006). Çalışmada kullanılan *Teucrium chamaedrys* L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkilerinin etanol ekstrelerinde indirgeme kapasitesi artan konsantrasyon ile *Teucrium chamaedrys* L.'in doğru orantılı olarak arttığı görülürken, *Achillea biebersteinii* A.'ın demir indirgeme aktivitesinin *Teucrium chamaedrys* L.'e göre daha az olduğu belirlenmiştir. Her iki ekstrenin indirgeme potansiyeli, farklı konsantrasyonlardaki ($10-30 \mu\text{g mL}^{-1}$) çözeltilerinin 700 nm 'deki absorpsanları ölçülerek belirlenmiştir. Şekil 16.'dan görülebileceği gibi *Achillea biebersteinii* A., *Teucrium chamaedrys* L. ve kullanılan standartlardan daha az indirgeme potansiyeli göstermiştir. *Teucrium chamaedrys* L. trolokstan az, α -tokoferol ile çok yakın değerlerde indirgeme kapasitesi göstermiştir.

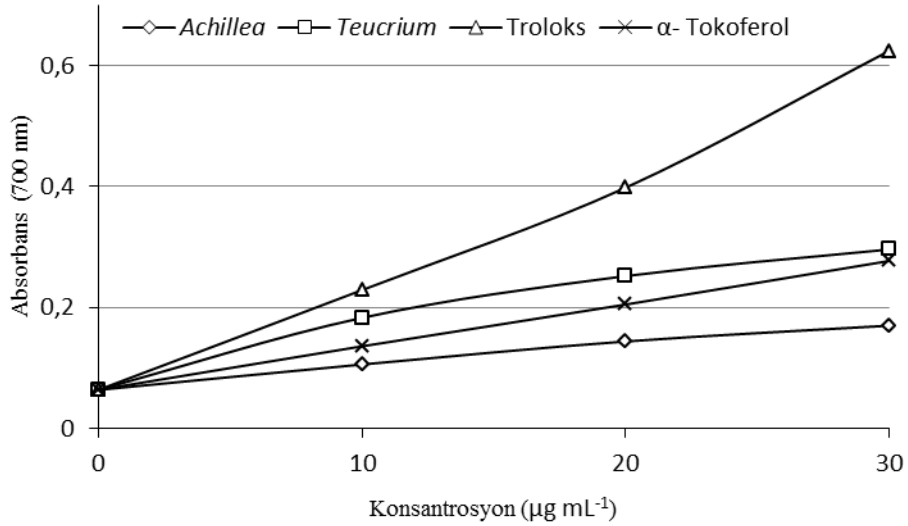


Şekil 16. *Teucrium chamaedrys* L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkilerinin etanol ekstrelerinin farklı konsantrasyonlardaki ($10-30 \mu\text{g mL}^{-1}$) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

4.1.5. Kuprak metoduna göre indirgeme kuvveti bulguları

Teucrium chamaedrys L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkilerinin etanol ekstralarının kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesi ekstraların artan konsantrasyonu ile artmıştır. *Teucrium chamaedrys* L.'in indirgeme gücü standart antioksidan bileşik olan troloks'dan az, α -tokoferol'den ise yüksektir. *Achillea biebersteinii* Afan.'ın ise indirgeme gücü, *Teucrium chamaedrys* L. ve standart antioksidan bileşiklere göre daha az ve dolayısıyla antioksidan özelliğinin daha düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir.

Her iki ekstrenin kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesi farklı konsantrasyondaki ($10\text{-}30 \mu\text{g mL}^{-1}$) çözeltilerinin 450 nm 'deki absorpsanları ölçülerek belirlenmiştir (Şekil 17).

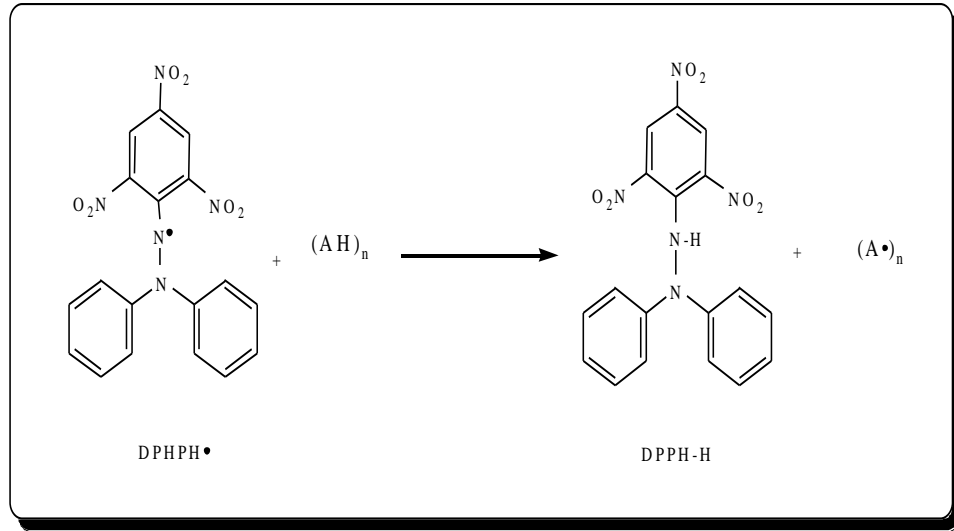


Şekil 17. *Teucrium chamaedrys* L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkilerinin etanol ekstralarının farklı konsantrasyonlardaki ($10\text{-}30 \mu\text{g mL}^{-1}$) kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

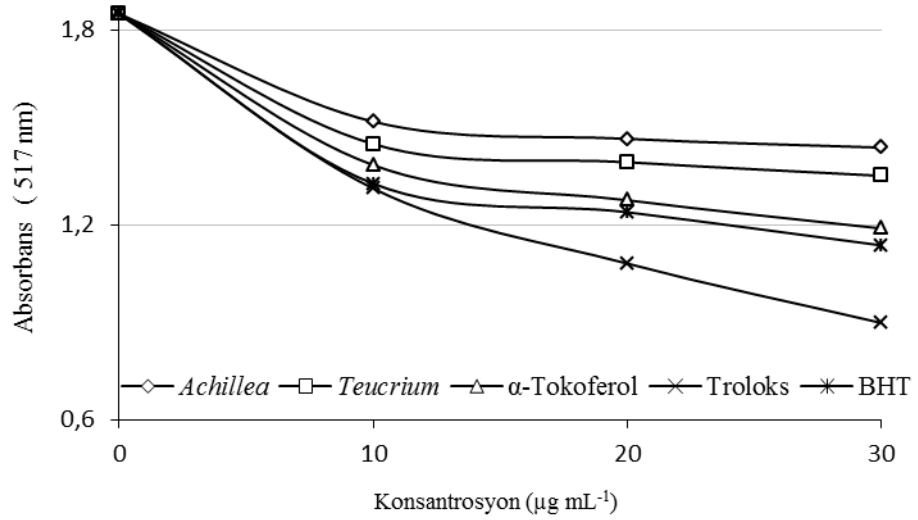
4.1.6. DPPH• serbest radikal giderme aktivitesi bulguları

Teucrium chamaedrys L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkilerinin, DPPH• serbest radikalini giderme aktivitesini tesbiti için yapılan çalışmada BHT, α -tokoferol ve troloks gibi standart antioksidan bileşikleri kullanılmıştır.

Teucrium chamaedrys L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkilerinin, DPPH serbest radikalinin giderilmesinde (Şekil 18) farklı etki göstermişlerdir. DPPH serbest radikalini, *Teucrium chamaedrys* L. ve *Achillea biebersteinii* Afan.'ın etanol ekstreleri standartlara göre daha az fakat standartlara yakın miktarlarda giderdikleri gözlemlenmiştir (Şekil 19). Bununla birlikte *Teucrium chamaedrys* L.'in *Achillea biebersteinii* Afan.'a göre daha fazla miktarda DPPH serbest radikali giderdiği belirlenmiştir.



Şekil 18. Bir antioksidan tarafından DPPH radikalini giderilmesi (Gülçin, 2002).



Şekil 19. *Teucrium chamaedrys* L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkilerinin etanol ekstralarının farklı konsantrasyonlarda ($10\text{--}30 \mu\text{g mL}^{-1}$) DPPH serbest radikallerini giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan α -tokoferol, troluks ve BHT ile karşılaştırması

Teucrium chamaedrys L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkilerinin etanol ekstraları ile standart antioksidanlar $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonunda sırasıyla şu şekilde DPPH radikali giderme aktivitesi sergilediler: *Teucrium chamaedrys* L. %27, *Achillea biebersteinii* Afan., %22.3, α -tokoferol %35,8, troluks %51,4. Bulgulardan da anlaşıldığı gibi *Teucrium chamaedrys* L.'in *Achillea biebersteinii* Afan.'a göre daha yüksek DPPH radikali giderme aktivitesi sergilediği gözlemlendi.

4.2. Tartışma

Doğal antioksidanların aktiviteleri, onların biyofonksiyonlarıyla yakından ilgilidir. Kronik hastalıkların, DNA hasarlarının, mutasyonların, karsinogenezin azaltılması, patojenik bakteriyel gelişiminin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde serbest radikallerin gelişiminin sonlandırılmasıyla yakından ilgili olduğu bilinmektedir (Zhu *et al.*, 2002).

Teucrium chamaedrys L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkilerinin etanol ekstrelerinin antioksidan ve antiradikal özellikleri ile ilgili yapılan çalışmalarda ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivite, Fe^{3+} - Fe^{2+} transformasyonu metoduna göre indirgeme kapasitesi, kuprak metoduna göre kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) küpröz iyonlarına (Cu^+) indirgeme kapasitesi, DPPH serbest radikal giderme aktivitesi, farklı biyoanalitik metotlar kullanılarak farklı konsantrasyonlarda ayrı ayrı belirlendi. Kullanılan antioksidan ve antiradikal yöntemlerde bulunan aktiviteler kozmetik ve gıda sanayinde yaygın olarak kullanılan α -tokoferol ve onun suda çözünen bir analogu olan troloks ile mukayese edildi.

Fenolik bileşikler özellikle flavonoidler hidroksil guruplarında bulunan hidrojenlerini kolaylıkla verebilirler. Çünkü fenolik bileşiklerdeki oksijen ile hidrojen arasındaki bağ, oluşacak fenol radikalinin rezonans kararlılığından dolayı kolaylıkla homolitik olarak parçalanabilir ve böylece üzerinde bir tane elektron bulunduran hidrojen kolaylıkla verilebilir. Lipit peroksidasyonu, gıda maddelerinin işlenmesinde ve muhafazasında önemli bir sorun oluşturmaktadır. Yağlarda ve yağlı yiyeceklerde sadece yiyecekleri bozmakla kalmaz, aynı zamanda kansere, mutasyonlara ve yaşlanmaya sebep olan peroksi ($ROO\bullet$) ve hidroksi ($OH\bullet$) radikalleri ile reaktif oksijen türleri ve serbest radikalleri de meydana getirir (Yagi, 1987).

Lipitlerin oksidasyonu tipik bir radikalik zincir reaksiyonudur. Çoklu doymamış yağ asitleri, doymuş yağ asitlerine göre hidrojen koparmasıyla oluşan radikal çift bağın

konjugasyonu ile kararlı hale getirmesi ve böylece de hidrojenin daha kolay koparılmasına sebep olmasından dolayı, otooksidasyona daha yatkındırlar (Halliwell ve Gutteridge, 1989).

Ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan kapasite biyoaktif bileşenleri için en çok kullanılan antioksidan parameterlerden biridir. Ferrik tiyosiyonat metodu, lipit peroksidasyonu boyunca meydana gelen peroksitin miktarını ölçer. Bu analizde, hava oksijeni tarafından oksitlenen ve emülsiyonda linoleik asitin peroksidasyonu sonucu oluşan hidroperoksitler dolaylı olarak ölçülür. Bu metodun esası, linoleik asit emülsiyonunun oksidasyonu sonucu oluşan hidroperoksitin spektrofotometrik olarak 500 nm'de ölçülmesine dayanır. Yüksek absorban, peroksidasyon sonucu oluşan peroksit miktarının fazlalığını gösterir. Oluşan hidroperoksit ise Fe^{2+} 'yi Fe^{3+} 'e yükseltir. Daha sonra Fe^{3+} , ilave edilen tiyosiyanat ile kompleks oluşturularak 500 nm'de maksimum absorban verir.

Teucrium chamaedrys L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkilerinin etanol ekstraktlarının toplam antioksidan aktivitesinde olduğu gibi indirgeme kapasitesinde de artan konsantrasyona bağlı olarak *Teucrium chamaedrys* L.'in *Achillea biebersteinii* Afan.'a göre daha yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu belirlenmiştir. İlk bakışta oksidasyonun indirgeme gücü yüksek olan ekstraktlar daha kuvvetli bir şekilde bastırılacağı düşünülebilir. İndirgeme gücü bir bileşiğin antioksidan aktivite sergilemesinde önemli bir faktördür (Meir *et al.*, 1995). Ancak herhangi bir saf maddenin antioksidan özelliği farklı mekanizmalar üzerinden gidebilir. Örneğin, oksidasyonun geçiş metalleri tarafından hızlandırıldığı bir sistemde, antioksidan bileşiğin indirgeme gücü antioksidan özellik yönünden önemli değildir. *In vivo* olarak serbest demir ve bakırın varlığı kontrol edilebilmektedir.

Demir iyonları barsaklar tarafından emilir ve transferin proteinleri tarafından ferrik iyonları (Fe^{3+}) formunda demir ihtiyacı olan hücrelere taşınır ve ferröz iyonları (Fe^{2+}) şeklinde ferritin ve hemosferin proteinlerinde depolanır. Spesifik olarak transferine bağlı olan demir iyonları serbest radikal reaksiyonlarına katılmazlar. Fazla olan

demir iyonları ise birer “demir havuzu” olan ferritin ve hemosferinde depolanırlar. İnsan plazmasında bulunan bakırın büyük bir kısmı serbest radikal reaksiyonlarını uyarmanın bir formda olup, seruplazmin proteinine bağılı haldedir (Halliwell, 1994). Bazı hemostatik durumlar değiştiğinde hidrosil radikali oluşur (Chevion *et al.*, 1993). Doku hasarları sonucu fagositlerin aktivasyonu veya lizis olmuş hücreslerden geğiş metal iyonlarının yayılması sonucu serbest oksijen türleri oluşabilmektedir. Bu durum hücre ve dolayısıyla doku hasarını daha da hızlandırır. Örneğin travmatik beyin hasarı sonucu demir iyonlarına bağılı serbest radikalik reaksiyonlar meydana gelebilir. Parkinson hastalığı, substantia nigra da mevcut hücrelerin ölü mü sonucu meydana gelmektedir. Demir iyonları ölü hücrelerin parçalanması sonucu açığa çıkmaktadır. Böylece Parkinson hastalığına yakalanan hastalar oksidatif strese maruz kalır. Bu durumda serbest radikalik reaksiyonlar muhtemelen substantia nigranın dejenerasyonuna katkıda bulunmaktadır. Bunun yanısıra serbest oksijen radikalleri, enzim ve proteinlerin yapılarında bulunan amino asitlerin tiyol guruplarını da oksitleyerek deaktive ederler. Ayrıca hücre membranında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini de oksitleyerek hücre hasarlarına da sebep olmaktadır (Köksal, 2007).

Son zamanlarda antioksidan aktivite gösteren bitkilerin gıda ve beslenme alanlarındaki kullanımları hakkında oldukça fazla sayıda çalışmalar yapıldı. Bu çalışmalar halen yoğun bir şekilde devam etmektedir. Bunun sebebi ise bitkilerin birer antioksidan olan karotenoit, flavonoit ve fenolik bileşik içeriği bakımından zengin olmaları ve bu bileşiklerin herhangi bir yan etkiye sahip olmamalarıdır (Kulkarni *et al.*, 2006). Sıklıkla kullanılan BHA ve BHT gibi sentetik antioksidanların bazı yan etkilerinin bulunmasından sonra araştırmalar tamamen bitkisel orijinli antioksidanlar üzerine yoğunlaşmıştır (Gülçin vd., 2006a). Antioksidan aktivite tayin metodları, gıda, farmasötik veya tıbbi amaçlı kullanılan bitkilerin veya onlardan saflaştırılan biyolojik aktif maddelerin biyolojik aktivite kapasitelerinin aydınlatılması bakımından yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu amaçla toplam antioksidan aktivite tayini, toplam indirgeme kapasitesinin araştırılması, DPPH• radikal gidermesi gibi metotlar sıklıkla kullanılmaktadır (Gülçin, 2005; Gülçin, 2006).

Mevcut çalışmada da bu metotlar kullanıldı ve bulgular birer doğal ve standart antioksidan olan α -tokoferol ve troloks, BHT gibi antioksidan aktiviteleri bilinen standart antioksidanlar ile karşılaştırıldı.

Teucrium chamaedrys L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkilerinin antioksidan aktivitesini belirlemek için kullanılan metodların çoğunda bitkinin *Teucrium chamaedrys* L.'in standart antioksidan olarak kullanılan bileşiklere yakın aktivite gösterdiği fakat *Achillea biebersteinii* Afan.'ın ise standart bileşiklere göre daha düşük aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Teucrium chamaedrys L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkilerinin etanol ekstrelerinin birbirine yakın fakat standart antioksidan olarak kullanılan α -tokoferol ve trolokstan daha az total antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bitkilerden *Teucrium chamaedrys* L.'in *Achillea biebersteinii* Afan.'a göre daha fazla total antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Ayrıca bitkilerin yapısında bulunan fenolik ve flavonoid bileşiklerinin miktarları total olarak tespit edilmiş ve elde edilen sonuçların antioksidan aktivite tayin sonuçları ile önemli bir korelasyon içerisinde olduğu görülmüştür. Bitkilerden *Teucrium chamaedrys* L.'in *Achillea biebersteinii* Afan.'a göre daha yüksek fenolik bileşik içerdiği belirlenmiştir.

Bu çalışmamızın bitkilerin antioksidan özelliklerinin incelenmesi araştırmalarına katkı sağlayacak bir çalışma olduğu muhtemeldir.

5. SONUÇ

Sonuç olarak *Teucrium chamaedrys* L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkilerinin antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Çalışmamızda iyon indirgeme kapasitesi, toplam antioksidan aktivite kapasitesi, DPPH serbest radikali giderme kapasitesi, toplama fenolik ve flavonoit miktarı gibi tesbitler yapılmıştır (Tablo 5).

Tablo 5. *Teucrium chamaedrys* L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkilerinin etanol ekstralarının 1 mg'ında bulunan toplam fenolik ve flavonoit bileşik miktarının ekvivalent olarak miktarları.

	Toplam fenolik bileşik ($\mu\text{g GAE mg}^{-1}$ ekstre)	Total flavonoid miktarı ($\mu\text{g QE mg}^{-1}$ ekstre)
<i>Teucrium chamaedrys</i>	78,17	3,01
<i>Achillea biebersteinii</i>	60,13	3,61

Çalışmamızda yapılan iyon indirgeme kapasitesi, toplam antioksidan aktivite kapasitesi, DPPH serbest radikali giderme kapasitesi, toplam fenolik ve flavonoit miktarı gibi yöntemlerden elde edilen bulgulardan, *Teucrium chamaedrys* L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkilerinin farklı antioksidan aktivite gösterdiği tesbit edilmiştir. *Teucrium chamaedrys* L. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitkilerinden *Teucrium chamaedrys* L.'in yüksek antioksidan aktivite gösterirken *Achillea biebersteinii* Afan.'ın *Teucrium chamaedrys* L.'e göre daha az antioksidan aktivite gösterdiği yapılan ölçümler sonucu ortaya konmuştur. Bu sonuca paralel olarak *Achillea biebersteinii* Afan.'ın total fenolik bileşik içeriği *Teucrium chamaedrys* L.'e göre daha az olarak belirlenmiştir. Bu sonuç fenolik yapıların antioksidan özellik göstermesi bakımından anlamlıdır.

6. KAYNAKLAR

Akkuş İ.: Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. s. 3-10, 1. Baskı, **Mimoza Yayınları**, (1995).

Aksoy, Y., “Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü”, **Klinik Tıp Bilimleri**, 22, 442-448, (2002).

Ames, B.M., Shigena, M.K., Hagen, T.M., Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of ageing. **Proceedings of National Academy of Sciences**, USA, 90, 7915-7922, (1993).

Asad, N.R., Asad, L.M.B.O., Bonacossa de Almeida, C.E., Felzenszwalb, I., Cabral-Neto, J.B., Leitão, A.C., Several pathways of hydrogen peroxide action that damage the E. coli genome. **Genetics and Molecular Biology**, 27 (2), 291-303, (2004).

Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir S.E., Erça E. The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. **International Journal of Food Science and Nutrition**, 57, 292–304, (2006).

Aruoma, O.I., Cuppett, S.L., Antioxidant Methodology in vivo and in vitro Concept. AOCS Press, Champaign, Illinois, p 241. Dawn, Bm, Allan, Dm, Colleen, Ms., ‘Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach’, **Lippincott Williams & Wilkins Baltimore**, Maryland, (1997).

Arrigoni, O., De Tullio, M.C., Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**, 1569, 1-9, (2002).

Ayar, A., “*Drosophila Melanogaster*’in Oregon R Yabanıl ve *Vestigial* Mutant Soylarında Ekstrem Sıcaklık Şartlarının Ömür Uzunluğu Üzerine Etkilerinin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, **Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Erzurum, 2 (2008).

Baytop, T., Türkiyede Bitkilerle Tedavi, **Nobel Tıp Kitapevi**, İstanbul, (1999).

Bedir, E., Manyam, R. ve Khan, I.A., Neo-clerodane diterpenoids and phenylethanoid glycosides from *Teucrium chamaedrys* L., **Phytochemistry**, 63 977-983, (2003).

Benavente-Garcia, O., Casillo, O., Marin, F., Ortuno, A. and Del-Rio, J., “Uses and properties of citrus flavonoids”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4505–4515, (1997).

Berlett, B.S., Stadtman, E.R., “Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress”, *The Journal of Biological Chemistry*, 272,33, 20313–20316, (1997).

Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 26, 1199–1200, (1958).

Boğa, M. “Türkiye’de yetişen *vinca* türlerinin antioksidan aktivitelerinin tayini”, *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul, (2007).

Burtis, C., Ashwood, E., “Tietz Textbook of Clinical Chemistry”, *Saunders Company*, Philadelphia, Pennsylvania, (1999).

Bursal E., “Kivi Meyvesinin (*Actinidia deliciosa*) Antioksidan ve Antiradikal Aktivitelerinin Belirlenmesi, Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu” Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum, 6-9 (2009).

Büyükokuroğlu, M.E., Gülçin, İ., Oktay, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., “In vitro antioxidant properties of dantrolene sodium”, *Pharmacological Research*, 44, 491–495, (2001).

Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L., Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3426-3431, (1996).

Chevion, M., Liang, Y., Harel, R., Berenhshtein, E., Uretzky, G., Kitrossky, N., “Copper and iron are mobilized following myocardial ischemia: Possible productive criteria for tissue injury”, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 90, 1102–1106, (1993).

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R., “Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress”, *International Journal of Clinical Chemistry and Diagnostic Laboratory Medicine*, 329, (2003).

Davies, K.J.A., “Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems”, *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 50, 279-289, (2000).

Davis, P.H., Flora of Turkey and The East Aegean Islands, *Edinburgh University Press*, Edinburgh, 5, 67-69, (1988).

Devaraj, S., Jialal, I., “The effects of alpha-tocopherol on critical cells in atherogenesis”, *Current Opinion in Lipidology*, 9, 11-15, (1998).

Duman, H., In: Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., Başer, K.H.C. (Eds.), *Achillea L., Flora of Turkey and the East Aegean Islands, vol. 11. Edinburgh University Press*, Edinburgh, pp. 158–159, (2000).

Ekim, T. ve Teucrium L. (Labiata), In: P. H. Davis, Flora of Turkey and The East Aegean Islands, *Edinburgh University Press*, Edinburgh, 7, 53-57, (1982).

Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Cooke, M.S., “Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance”, *Mutation Research*, 567, 1–61, (2004).

Fantel, A.G., “Reactive oxygen species in developmental toxicity; Review and hypothesis”. *Teratology*, 53, 96-217, (1996).

Fidan, A.F., DüNDAR, Y., “*Yucca Schidigera* ve İçerdiği Saponinler İle Fenolik Bileşiklerinin, Hipokolesterolemik ve Antioksidan Etkileri”, *Lalahan Hay. Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 47 (2): 31-39, (2007).

Fridovich, I., *In free radical in biology*; Pryor, W.A., Ed; Academic: New York, 1, 239-271, (1976).

Fujita, T., Sezik, E., Tabata, M., Yesilada, E., Honda, G., Takeda, Y., Tanaka, T., Takaishi, Y., Traditional medicine in Turkey VII. *Folk medicine in middle and west Black Sea regions. Economic Botany* 49, 406–422, (1995).

Gençaslan, G., “Türkiye’de Tıbbi Amaçlı Kullanılan Bazı Bitkilerin Antioksidan Etkilerinin Taranması”, Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 2-3, (2007).

Gharaibeh MN, Elayan HH, Salhab AS. *Anorexic effect of Teucrium polium in rats. Int J Crude Drug Res*, 27:201–7, (1989).

Grieve, M., A Modern Herbal. *Barnes and Noble Books*, New York, 564-566, (1996).

Gutteridge, J.M.C., Iron and oxygen: A biologically damaging mixture. *Acta Paediatrica Scandinavica Suppl.*, 361, 78-85, (1989).

Gülçin, İ., “Isırgan otunun (*Urtica dioica*) antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, oksidatif enzimlerinin karakterizasyonu ve bazı *in vivo* etkilerinin incelenmesi”, *Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, s114, (2002).

Gülçin, İ., Şat, İ.G., Beydemir, Ş., Elmastaş, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., “Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.)”, *Food Chemistry*, 87, 393–400, (2004).

Gülçin, İ., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R. Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: α -Hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside F. *Planta Medica*, 70, 561-563, (2004a).

Gülçin, İ., “The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds”, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56, 491-499, (2005).

Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Şat, İ.G., Küfrevioğlu, Ö.İ., Evaluation of antioxidant activity of cornelian cherry (*Cornus mas* L.). *Acta Alimentaria*, 34, 193-202, (2005a).

Gülçin, İ., The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56, 491-499, (2005b).

Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., Boyer, L., “Antioxidant activity of lignans from fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.)”, *European Food Research and Technology*, 223, 759–767, (2006).

Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., Boyer, L., “Antioxidant activity of lignans from fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.)”, *European Food Research and Technology*, 223, 759–767, (2006a).

Gülçin, İ. Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa. *Amino Acids* 32, 431–438, (2007).

Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T. ve Başer, K.H.C., Flora of Turkey and The East Aegean Islands, *Edinburgh University Press*, Edinburgh, 11, (2000).

Halliwell, B., “How to characterise a biological antioxidant”, *Free Radical Research Communication*, 9, 1-32, (1990).

Halliwell, B., Gutteridge J.M.C., *Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press*, 543, Oxford, (1989).

Halliwell, B., “Antioxidant in human health and disease”, *Annual Review of Nutrition*, 16, 33–50, (1996).

Halliwell, B., Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end *Rev.*,55: S44-S52.ofthe beginning). *Free Radical Research*, 31, 261-272, (1999).

Halliwell, B., Clement, M.V., Long, L.H., “Hydrogen peroxide in the human body”, *Febs Letters*, 486, 10-13, (2000).

Haigh, R., Safety and necessity of antioxidants: EEC approach. *Food and Chemical Toxicology*, 24, 1031-1036, (1986).

Heinecke, J.W., “Oxidized amino acids: Culprits in human atherosclerosis and indicators of oxidative stress”, *Free Radical Biology and Medicine* 32, 1090-1101, (2002).

Hertog, M.G.L., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Menotti, A., Nedeljkovic, S., Pekkarinen, M., Simic, B.S., Toshima, H., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., “Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study”, *Archives of Internal Medicine*, 155, 381-386, (1995).

Hirano, T., Gotoh, M., Oka, K., “Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL-60 cells”, *Life Science*, 55, 1061–1069, (1994).

Honda, G., Yesilada, E., Tabata, M., Sezik, E., Fujita, T., Takeda, Y., Takaishi, Y., Tanaka, T., Traditional medicine in Turkey VI. Folk medicine in West Anatolia: Afyon, Kütahya, Denizli, Muğla, Aydin provinces. *Journal of Ethnopharmacology* 53, 75–87, (1996).

Huber-Morath, A., *Achillea* L. In: Davis, P.H. (Ed.), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands, vol. 5. Edinburgh University Press*, Edinburgh, (1975).

Jung, K.A., Song, T.C., Han, D.S., Kim, I.H., Kim, Y.E., Lee, C.H., Cardiovascular protective properties of kiwifruit extracts in vitro. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28, 1782-1785, (2005).

Kaul, N., Devaraj, S., Jialal, I., “ α -tocopherol and atherosclerosis”, *Experimental Biology and Medicine*, 226 (1), 5–12, (2001).

Kaya, Z., Kün, E., Güner, A., *National plan for in-situ conservation of plant genetic diversity in Turkey*. In: Zencirci, N., Kaya, Z., Anikster, Y., Adams, W.T. (Eds.), The Proceedings of International Symposium on in-situ Conservation of Plant Genetic Diversity. Antalya, Turkey, p. 33, (1998).

Keha, E., Küfrevioğlu, Ö. İ., **Biyokimya**, Aktif Yayınevi, Erzurum, (2000).

Keskin, H., Erkmén G., “ **Besin Kimyası**, Güray Matbaacılık, Beşinci Basım” , İstanbul, (1987).

Kneepkens, C. M.; Lepage, G.; Roy, C. C.”, The potential of the hydrocarbon breath test as a measure of lipid peroxidation”, *Free Radical Biology and Medicine*, 17:127–160, (1994).

Kohno, Y., Egawa, Y., Itoh, S., Nagagaoka, S., Takahashi, M., Mukai, K. Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in *n*-butanol. *Biochemica and Biophysica Acta*, 1256, 52-56, (1995).

Konyalioglu, S., Karamenderes, C., Screening of total flavonoid, phenol contents and antioxidant capacities of *Achillea* L. species growing in Turkey. *Acta Pharmaceutica Turcica* 46 (3), 163–170, (2004).

Köksal, E., Purification and characterisation of peroxidase from cauliflower (*Brassica oleracea* L.) and determination of their antioxidant and antiradical activities. PhD Thesis, *Atatürk University, Erzurum*, Turkey, (2007).

Köksal, E., “Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) peroksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, antioksidan ve antiradikal aktivitesinin belirlenmesi” *Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı*. Erzurum, (2007).

Krinsky, N.I. Antioxidant function of carotenoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 7, 617–635, (1989).

Lambeth, J.D., Nox enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology*, 4 (3), 181-189, (2004).

Langseth, L., Oxidants, “Antioxidants and disease prevention”, *ILSI (International Life Sciences Institute), Brussels, Belgium*, p.24, (1995).

Larson, R. A., “The Antioxidants Of Higher Plants”, *Phytochemistry*, 27: 969–978, (1988).

Larocca, L.M., Piantelli, M., Leone, G., Sica, S., Teofili, L., Benedetti-Panici, P., Scambia, G., Mancuso, S., Capelli, A., Ranelletti, F., “Type II oestrogen binding sites in acute lymphoid and myeloid leukemias: Growth inhibitory effect of oestrogen and flavonoids”, *British Journal of Hematology*, 75, 489–495, (1990).

Lekli, I., Varga, E., Juhasz, B., Bak, I., “Isolation and analysis of bioactive constituents of sour cherry (*prunus cerasus*) Seed Kernel: An Emerging Functional Food”, *Journal of Medicinal Food*, 905-910, (2010).

Loecke, L., De zwart, John H. vd ,”Biomarkers of free radical ramage applications in expremental animals and in human”, *Free Radical Biology & Medicine*, 26,202-226, (1999).

Mavi, A., İnsan eritrosit ve lökositlerinden süperoksit dismutaz enziminin saflaştırılması ve bazı ilaçların enzim üzerine etkilerinin incelenmesi. *Atatürk*

Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, s.52–53, (2005).

Meir, S., Kanner, J., Akiri, B., Hadas, S.P, “Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves”, *Journal Agricultural Food Chemistry*, 43, 1813-1819, (1995).

Miller, N. J., Paganga, G., “Antioxidant properties of phenolic compounds”, *Trends in Plant Science*, 2, 152-159, (1997).

Mitsuda, H., Yasumoto, K., Iwami K., “Antioxidativ action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid”, *Eiyoto Shokuryo*, 19, 210–214, (1966).

Moldovan, L., Moldovan, N.I., Oxygen free radicals and redox biology of organelles. *Histochemistry and Cell Biology* 122 (4), 395-412, (2004).

Nelson, D.L. and Cox, M.M., *Lehninger Principles of Biochemistry*, Fourth edition. W.H. Freeman and Company, New York, (2004).

Nishina, A., Kubota, K., Kameoka, H., Osawa, T., “Antioxidizing component, musizin, in *Rumex japonicus* houtt”, *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68, 735-739, (1991).

Nordberg, J., Arner, E.S.J., “Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system”, *Free Radical Biology and Medicine*, 31, 1287-1312, (2001).

Oyaizu, M. “Anti-oksидative activities of products of browning reactions prepared from glucosamine”, *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315, (1986).

Özel, . Z.; Goğuş, F.; Lewis, A. C. *J. Chromatogr.*, A, 114, 164, (2006).

Padayatty, S.J., Katz, A., Wang, Y.H., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.H., Chen, S.L., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S.K., Levine, M., Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American College of Nutrition*, 22, 18-35, (2003).

Panovska, T.K., Kulevanova, s., Stefova, M., In vitro antioxidant activity of some Teucrium species (Lamiaceae), *Acta Pharm.* 55 207–214, (2005).

Park, Y.K., Koo, M.H., Ikegaki, M., Contado, J.L., “Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil” *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, 40, 97–106, (1997).

Pratt, D.E., Hudson, B.J.F., Natural antioxidants not exploited commercially in food antioxidants. *Hudson B.J.F. Ed.; Elsevier*; Amsterdam, 171-192, (1990).

Ruiz-Lopez, M.D., Artacho, R., Fernandez Pinena, M.A., Lopez, G., Serrana, H., Lopez Martinez, M.C. Stability of α -tocopherol in virgin oil during microwave heating, *Lebensm Wiss Technol*, 28, 644-646, (1995).

Singleton, V.L., Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R.M., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods of Enzymology*, 299, 152–178, (1999).

Stadtman, E.R., “Importance of individuality in oxidative stress and aging”, *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 597–604, (2002).

Stevenson, D.E. and Hurst, R.D., Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 2900-2916, (2007).

Suleiman MS, Abdul-Ghani AS, Al-Khalil S, Amin R. Effect of Teucrium polium boiled leaf extract on intestinal motility and blood pressure. *J Ethnopharmacol*, 22:111–6, (1988).

Tekeli, Y., Sezgin, M., Şanda, M.,A., “Konya’da Yetişen *Centaurea Pterocaula* Truatv. ’In Fenolik Yapısı ve Antioksidan Etkisi”, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, 3(1): 35-41, (2008).

Temple, N.J., “Antioxidants and disease: more questions than answers”, *Nutritional Research*, 20, 449-459, (2000).

Tietz, N., “Clinical Guide to Laboratory Tests”, *Saunders Company*. Philadelphia, Pennsylvania, (1995).

Tozoğlu F., “Erzincan Kirazı (*Cerasus erzincanica*; Ş.Yıldırım) sap ve tohum kısımlarının antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi” *Erzincan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı* .Erzincan, (2011).

Türkoğlu A., Duru M.E., Mercan, N., Kivrak İ., Gezer, K., “Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill”, *Food Chemistry*, 267–273, (2006).

Ulubelen, A., Topçu, G. ve Sönmez, Ü., Chemical and biological evaluation of genus *Teucrium*. *Studies in Natural Products Chemistry* 23, *Bioactive Natural Products*, Part D, (1995).

Whitehead, T.P., Thorpe, G.H.G. and Maxwell, S.R.J., “Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids”, *Analytic Chemistry Acta*, 266, 265-277, (1992).

Yagi, K., “Lipid peroxides and human disease”, *Chemistry Lipids*, 45, 337–341, (1987).

Yen, G.C., Chen, H.Y., Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 27–32, (1995).

Yeşilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Goto, K., Ikeshiro, Y., Traditional medicine in Turkey IV. *Folk medicine in the Mediterranean subdivision. Journal of Ethnopharmacology* 39, 31–38, (1993).

Zeybek, N. ve Zeybek, U., *Farmasotic Botanic*, Ege Üniversitesi, İzmir, (1994).

Zhu, Q.Y., Hackman R.M., Ensunsa, J.L., Holt, R.R., Keen, C.L., “Antioxidative activities of along tea”, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 6929-6934, (2002).

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Erzincan'da doğdu. İlköğrenimini Erzincan'da, orta ve lise öğrenimini İstanbul'da tamamladı. Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nden 2010 yılında mezun oldu. 2010 yılında, Erzincan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı. Halen kimya anabilim dalında yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir.