



MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

HATAY BÖLGESİNDE YETİŞTİRİLEN ÇEŞİTLİ BİTKİLERİN
ANTIOKSİDAN KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ

BERNA KÖYBAŞI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Antakya/HATAY

EYLÜL - 2010



MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

**HATAY BÖLGESİNDE YETİŞTİRİLEN ÇEŞİTLİ BİTKİLERİN ANTIOKSİDAN KAPASİTELERİNİN
BELİRLENMESİ**

BERNA KÖYBAŞI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Antakya/HATAY

EYLÜL - 2010

MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HATAY BÖLGESİNDE YETİŞTİRİLEN ÇEŞİTLİ BİTKİLERİN
ANTIÖKSİDAN KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ

BERNA KÖYBAŞI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

Doç. Dr. Şana SUNGUR danışmanlığında hazırlanan bu tez 03 / 09 / 2010 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliği ile kabul edilmiştir.

 Doç. Dr. Şana SUNGUR Başkan
 Prof. Dr. Mahmut ÇALIŞKAN Üye
 Yrd. Doç. Dr. Yener TEKELİ Üye

Bu tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. Necat AĞCA
Enstitü Müdürü

Bu çalışma MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 04Y0102

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Serbest Radikaller.....	1
1.2. Serbest Radikallere Karşı Hücrel Savunma Sistemleri.....	2
1.3. Antioksidanlar.....	3
1.4. Doğal Antioksidanlar.....	4
1.4.1. Tokoferoller.....	4
1.4.2. Askorbik Asit.....	5
1.4.3. A Vitamini.....	5
1.4.4. Karoten.....	5
1.4.5. Gallik Asit Esterleri (Gallatlar).....	6
1.4.6. Nordihidroguayaret Asiti (NDGA).....	6
1.4.7. Aminoasitler, Peptidler, Proteinler.....	7
1.4.8. Sülfidler.....	7
1.4.9. Likopen.....	7
1.5. Sentetik Antioksidanlar	7
1.5.1. Eritorbik Asit ve Sodyum Eritorbat.....	8
1.5.2. Butillenmiş Hidroksianisol (BHA).....	8
1.5.3. Butillenmiş Hidroksitoluen (BHT).....	9
1.5.4. Tersiyer Butilhidrokinon (TBHQ).....	9
1.6. Antioksidanların Etki Mekanizmaları ve Özellikleri.....	10
1.6.1. Serbest Radikaller ile Kompleks Oluşturan Antioksidanlar.....	10
1.6.2. İndirgen Özellik Gösteren veya Oksijen Bağlayıcı Antioksidanlar.....	10
1.6.3. Şelat Oluşturucu Ajanlar.....	11

1.6.4. Sekonder Antioksidanlar.....	11
1.7. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri	11
1.8. Gıdalardaki Oksitatif Bozulmalar	13
1.8.1. Karbohidratların Bozulma Tipleri	13
1.8.2. Yağların Bozulma Tipleri.....	14
1.8.3. Proteinlerde Bozulma Tipleri.....	14
1.8.4. Lipitlerin Oksijen Varlığında Bozulması.....	15
1.9. Antioksidanların Gıdalarda Kullanım Alanları	15
1.9.1.Kullanımına İzin Verilen Antioksidanlar.....	18
1.10.UV / VIS Absorpsiyon Spektroskopisi ile İlgili Genel Bilgiler	19
1.10.1 UV / VIS Absorpsiyon Spektrofotometreleri	20
1.10.2. Spektrometre Çeşitleri.....	20
1.10.2.1. Tek Işık Yollu Spektrofotometreler.....	20
1.10.2.2. Çift Işık Yollu Spektrofotometreler.....	21
1.10.3. Işık Absorpsiyonunun Nicel Yorumu.....	22
1.10.4. UV / VIS Absorpsiyon Spektroskopisi ile Analitik Uygulamalar.....	23
1.11. Korelasyon Analizi	24
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	26
3.MATERYAL VE YÖNTEM.....	33
3.1.Materyal.....	33
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	33
3.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	33
3.2. Yöntem.....	34
3.2.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	34
3.2.2. Numunelerin Hazırlanması.....	34
3.2.3. Toplam Fenolik Madde Miktarlarının Belirlenmesi.....	35
3.2.4. Toplam Antioksidan Aktivitesi Tayini	35
3.2.5. DPPH Üzerinden Serbest Radikal Süpürücü Etki Tayini	36
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	38
4.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini Sonuçları	38
4.2. Toplam Antioksidan Aktivite Tayini Sonuçları	39
4.3. DPPH Radikal Süpürücü Aktivite Tayini Sonuçları.....	44

4.4. Korelasyon Analizi Sonuçları.....	47
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	49
KAYNAKLAR.....	51
TEŞEKKÜR	53
ÖZGEÇMİŞ.....	54

ÖZET
HATAY BÖLGESİNDE YETİŞTİRİLEN ÇEŞİTLİ BİTKİLERİN
ANTIOKSİDAN KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Son yıllarda yapılan epidemolojik çalışmalar, meyve ve sebze tüketimi ile ölümcül hastalıklara yakalanma riski arasında ters orantılı bir ilişki olduğunu göstermiştir. Meyve ve sebzelerin antioksidan içerikleri bu hastalıklardan korunmayı sağlamaktadır. Çünkü, bitkisel gıdalar antioksidanların farklı tiplerini içermektedir. Bu amaçla, bu çalışmada Hatay bölgesinde yaygınca tüketilen maydanoz, kekik, nane ve defne gibi bitkilerin antioksidan kapasiteleri incelenmiştir. Bu bitkilerin antioksidan aktivitelerini belirlemek için radikal giderme aktiviteleri, toplam antioksidan aktiviteleri ve toplam fenolik madde miktarları saptanmıştır. Çalışmada fenolik bileşik miktarı yüksek olan ekstraların, radikal süpürücü etkilerinin ve yüzde inhibisyon değerlerinin de yüksek olduğu görülmüştür. Yapılan korelasyon analizlerinde de fenolik bileşik miktarı ile radikal süpürücü etki arasında, fenolik bileşik miktarı ile yüzde inhibisyon değerleri arasında ve radikal süpürücü etki ile yüzde inhibisyon değerleri arasında kuvvetli bir korelasyon olduğu saptanmıştır. Her üç yöntemde çalışılan bitkiler kuvvetli sentetik antioksidanlarla karşılaştırıldığında antioksidan aktivitesinin BHA > maydanoz > BHT > nane > kekik > defne şeklinde olduğu görülmüştür. Sonuç olarak incelenen nane, maydanoz, kekik ve defne bitkileri içerisinde, en güçlü antioksidan aktivite ve radikal süpürücü etkiyi maydanoz bitkisinin asidik ekstresi göstermiştir.

2010, 54 sayfa

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, maydanoz, kekik, defne, nane, Hatay

ABSTRACT
DEFINITION OF ANTIOXIDANT CAPACITIES OF VARIOUS PLANTS
CULTIVATED IN HATAY REGION

In recent years ,epidemiological studies have shown that there is an inverse proportion of relation between consumption of fruit-vegetable and risk of coming down with an terminal illness.Antioxidant proportion in fruit-vegetables provides to avoid from these illnesses.Because phytonutrients supply different types of antioxidants.For this porpose , in this survey antioxidant capacities have been analyzed in some plants commonly consumed in Hatay Region like; parsley ,thyme,mint,daphne.In order to define these antioxidants activities,radical scavenging activities,total antioxidant activities and the amount of total phenolic have been established.It has been viewed in survey that extracts, contain high portion of phenolical complex, also have high radical scavenging effects and percent of inhibition values.In applied correlation analysis it has been seen that there is strong correlation between the portion of phenolic complex and radical scavenging effect, portion of phenolic complex and percent of inhibition values,and between redical scavenging effect and percent of inhibition values.It has observed that compared with strong syhntetic antioxidants , studied plants have a ntioxidant activities as in form BHA> Parsley> BHT> mint> thyme> daphne. As a conclusion , acidic extract of parsley has the most powerful antioxidant activity and the most radical (scavenging) effect among the studied plants mint,parsley thyme and daphne.

2010, 54 pages

Keywords: Antioxidant,parsley,thyme,mint,daphne,Hatay

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

UV/VIS	Ultraviyole / Görünür Bölge
GC	Gaz Kromatografisi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
FAO	Dünya Gıda Örgütü
SOR	Serbest oksijen radikali
NDGA	Nordihidroguayaret Asiti
BHA	Butillenmiş Hidroksianisol
BHT	Butillenmiş Hidroksitoluen
µg	Mikrogram
TBHQ	Tersiyer Butilhidrokinon
PG	Propil gallat
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
ORAC	Oksijen radikal absorbans kapasitesi
TRAP	Total radikal yakalama antioksidan kapasitesi
FCR	Folin-Ciocalteu reaktifi
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
MKÜFAM	Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi

ÇİZELGELER DİZİNİ**Sayfa**

Çizelge 4.1. Korelasyon Katsayıları.....	48
--	----

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1 Antioksidanların hücresel etki mekanizmasının şematik gösterimi.....	2
Şekil 1.2. Tokoferolün genel kimyasal yapısı.....	4
Şekil 1.3. Askorbik asitin kimyasal yapısı.....	5
Şekil 1.4. Karotenin genel kimyasal yapısı.....	6
Şekil 1.5. Gallik asitin kimyasal yapısı.....	6
Şekil 1.6 Likopenin kimyasal yapısı.....	7
Şekil 1.7 Butillenmiş Hidroksianisol kimyasal yapısı.....	9
Şekil 1.8. Butillendirilmiş Hidroksitoluen kimyasal yapısı.....	9
Şekil 1.9 Tersiyer Butilhidrokinon kimyasal yapısı.....	10
Şekil 1.10 Etilendiamintetraasetik asit kimyasal yapısı.....	11
Şekil 1.11. Bir spektrofotometrenin temel bileşenleri.....	20
Şekil 1.12. Kalibrasyon doğrusu.....	23
Şekil 4.1. Standart gallik asit kalibrasyon grafiği.....	38
Şekil 4.2 Örneklerin toplam fenolik madde miktarı değerleri.....	39
Şekil 4.3. Nane örneğinin linoleik asit peroksidasyonunun zamanla değişimi.....	39
Şekil 4.4. Nane örneği ekstrelerinin % inhibisyon değerlerinin kendi aralarında ve BHA ile karşılaştırılması.....	40
Şekil 4.5. Defne örneğinin linoleik asit peroksidasyonunun zamanla değişimi.....	40
Şekil 4.6. Defne örneği ekstrelerinin % inhibisyon değerlerinin kendi aralarında ve BHA ile karşılaştırılması.....	41
Şekil 4.7. Kekik örneğinin linoleik asit peroksidasyonunun zamanla değişimi.....	41
Şekil 4.8. Kekik örneği ekstrelerinin % inhibisyon değerlerinin kendi aralarında ve BHA ile karşılaştırılması.....	42
Şekil 4.9. Maydanoz örneğinin linoleik asit peroksidasyonunun zamanla değişimi.....	42
Şekil 4.10. Maydanoz örneği ekstrelerinin % inhibisyon değerlerinin kendi aralarında ve BHA ile karşılaştırılması	43
Şekil 4.11. Tüm örneklerin ekstrelerinin % inhibisyon değerlerinin kendi aralarında ve BHA ile karşılaştırılması.....	43

Şekil 4.12. DPPH radikal giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart DPPH Grafiği.....	44
Şekil 4.13. Nane örneği ekstrelerinin DPPH radikal süpürücü aktiviteleri.....	45
Şekil 4.14. Kekik örneği ekstrelerinin DPPH radikal süpürücü aktiviteleri.....	45
Şekil 4.15. Defne örneği ekstrelerinin DPPH radikal süpürücü aktiviteleri.....	46
Şekil 4.16. Maydanoz örneği ekstrelerinin DPPH radikal süpürücü aktiviteleri	46
Şekil 4.17. Tüm örnekler için IC ₅₀ değerleri.....	47

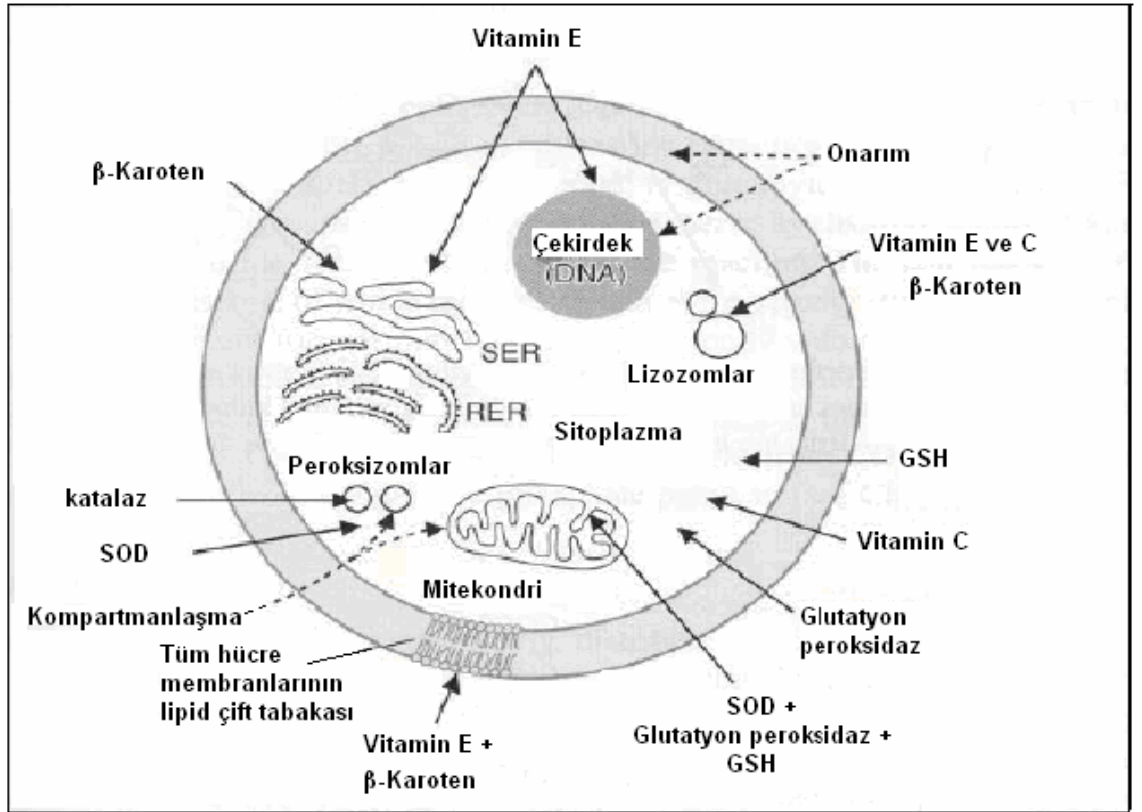
1. GİRİŞ

1.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküller olarak tanımlanmaktadır. Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil ($OH^{\cdot-}$), peroksi (ROO^{\cdot}) gibi oksijen içeren serbest oksijen radikalleri (SOR) kararsız yapıda olup kolayca reaksiyon verebilen bileşiklerdir. Günümüzde, radikallerin pek çok hücrede moleküler değişimlere ve gen mutasyonlarına yol açtığı artık iyi bilinmekte olup yaşlanma, hücresel hasar ve doku yıkımında rol aldığı kabul edilmektedir. Serbest oksijen radikalleri (SOR), fizyolojik olan ve olmayan birçok süreçte oluşmakta ve oksijenin hem süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidroksi (HO^{\cdot}), hidroperoksi (HO_2^{\cdot}), peroksi (ROO^{\cdot}), alkoksi (RO^{\cdot}) gibi radikal türevlerini, hem de singlet oksijen (1O_2), ozon (O_3), hidrojen peroksit (H_2O_2), hipoklorik asit ($HOCl$), nitrik oksit (NO^{\cdot}) ve peroksinitrit ($ONOO^-$) gibi radikal olmayan türevlerini kapsamaktadır. Başta mitokondriyal solunum zinciri olmak üzere, fagositik hücrelerdeki solunum patlaması, mikrozomal sitokrom P_{450} sistemi, sitoplazmik, peroksizomal, lizozomal ya da membrana bağlı oksidaz aktiviteleri gibi fizyolojik şartlarda gerçekleşen pek çok hücresel süreç, SOR oluşumuna yol açmaktadır. Diğer taraftan, hiperoksi durumu, iskemi, inflamasyon, ağır egzersiz, aromatik hidrokarbonlar, antineoplastik ajanlar, antibiyotikler, anestezikler, radyasyon, sigara dumanı ve hava kirliliği gibi çevresel faktörler ya direk olarak ya da intraselüler metabolizma ve detoksifikasyon sırasında radikallere dönüşerek, SOR düzeylerini etkilemektedirler. İntraselüler SOR seviyesi, hücre tipine ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişebilse de nötrofiller, monositler ve makrofajlar, SOR üretimi bakımından yüksek aktiviteye sahip olan hücrelerdir (Yazıcı ve Köse, 2004). Serbest radikaller çoğu dejeneratif düzensizlik, kanser ve bunun gibi hastalıklar, kalp damar hastalıkları ve Alzheimer gibi hastalıkların oluşumunda önemli rol oynamaktadırlar. Antioksidanlar oksidasyonun bazı zararlı etkilerini hafifletebilmektedirler (Rice-Evans ve Burdon, 1993).

1.2. Serbest Radikallere Karşı Hücresel Savunma Sistemleri

Reaktif oksijen türlerinin (SOR) oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinmektedir (Altınışık, 2000). Antioksidanların hücresel etki mekanizmaları Şekil 1.1'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1 Antioksidanların hücresel etki mekanizmasının şematik gösterimi

Antioksidanlar başlıca dört yolla oksidanları etkisiz hale getirmektedirler;

- 1. Süpürme etkisi (Scavenging):** Oksidanları daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirmektedirler. Antioksidan enzimler ve moleküller bu yolla etki etmektedir.
- 2. Söndürme etkisi (Quenching):** Oksidanlara bir hidrojen aktararak inaktive etmesine denmektedir. Vitaminler ve flavonoidler bu şekilde etki etmektedir.

3. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi (Chain Breaking): Hemoglobin, serüloplazmin ve ağır metaller oksidanları kendilerine bağlamakta ve inaktive etmektedir.

4. Onarma etkisi (Repair): Oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onarmaktadırlar (Gökpınar ve ark., 2006).

1.3. Antioksidanlar

Dünya nüfusunun hızlı artışı, insanların hayat standartlarını yükseltme eğilimleri ve hızlı sanayileşme, hazır gıda maddelerine olan talebi arttırmış ve bunun sonucunda da gıda maddelerinin üretimi bir sanayi kolu haline gelmiştir. Böylece, işlenmiş gıda maddeleri son derece çeşitlenmiş ve üretimde kullanılan gıda katkı maddelerinin sayıları da büyük bir hızla artmıştır. Bu artışta, üretim tekniklerinin gelişmesi, tüketici beğenisinin çeşitlilik kazanması, kayıpların azaltılması, dağıtım kolaylığı ve değişik formüllü yeni gıdaların üretimi gibi birçok faktör etkili olmuştur.

Günümüzde yaklaşık 2500 civarında kimyasal katkı maddesinin gıda sanayinde değişik amaçlarda kullanımına izin verilmiş ve kullanımları birçok ülkede yasal düzenlemelerle belirlenmiştir. Bu gıda katkı maddeleri içerisinde oldukça fazla öneme sahip olan ve binlerce çeşit gıda maddesinde yaygın olarak kullanılanlarından biri de antioksidanlardır. Antioksidanlar gıda sanayinde bitkisel ve hayvansal yağlar ve yağ içeren gıda maddelerinin üretimi, depolanması, taşınması ve pazarlanması sırasında, normal sıcaklıklarda atmosfer oksijeninin etkisini geciktiren, gıdanın bozulmasını ve açılmasını belli bir süre engelleyen en önemli maddelerdir. Doğal antioksidanların gıda sanayinde kullanılmaları çok eskilere dayanmaktadır. Yapay antioksidanların kullanımları ise 1967 yılında ABD’de bütillenmiş hidroksianisol (BHA)’un antioksidan etkinliğinin belirlenip, çalışmalar sonucunda gıdalarda kullanılabilirliği tespit edildikten sonra başlamıştır. Daha sonraki yıllarda gıdaların, antioksidan ihtiyacını karşılamada birçok antioksidan maddeden yararlanılmış ve kullanımları yasal düzenlemelerle sınırlandırılmıştır.

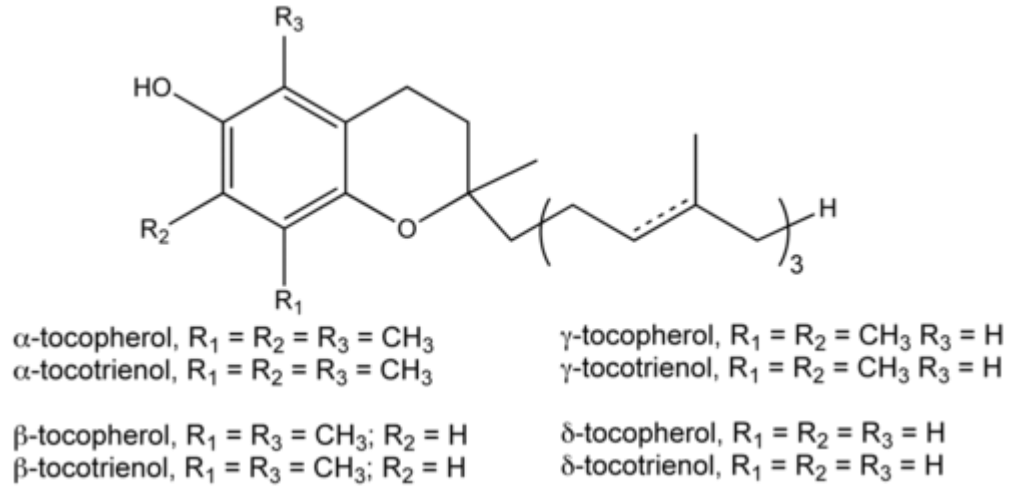
Antioksidanların etkili olabilmeleri için iyi hammaddelerle birlikte kullanılmaları, prosesin doğru seçilmesi, uygun ambalajlama ve depolama koşullarının yerine getirilmesi gerekmektedir. Uygun antioksidanın seçilmesinde bitkisel ve hayvansal yağlardaki etkinliği, su ve yağ fazında çözünürlüğü, gıdanın içine dağılabilme

ve işleme sonrası kararlılığını koruyabilme yeteneği gibi faktörler dikkate alınmaktadır .

1.4. Doğal Antioksidanlar

1.4.1. Tokoferoller

Tokoferoller genellikle birçok izomerin karışımı olarak daha çok bitkisel yağlarda doğal olarak bulunmaktadır.

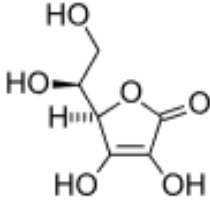


Şekil 1.2. Tokoferolün genel kimyasal yapısı

Tokoferollerin antioksidatif etkileri biyolojik etkinlikleri ile paralel gitmektedir. Tokoferoller hayvansal yağlarda düşük miktarlarda bulunmaktadırlar ($5\text{-}30 \text{ mg kg}^{-1}$). Yüksek miktarda tokoferol içermelerinden dolayı buğday ve mısır embriyosu yağları, antioksidatif madde olarak kullanılmaktadır. Bu güne kadar tokoferollerin toksik açıdan sakınca yarattıkları konusunda bir kayda rastlanmamıştır.

1.4.2. Askorbik Asit

Doğal olarak meyvelerde ve sebzelerde yer alan bir vitamin olan (C vitamini) L-askorbik asit (3- keto-L-gulofuranolakson), ($C_6H_8O_6$), beyaz veya hafif sarı renkte, kokusuz, kristalimsi yapıda bir maddedir. Suda tamamen çözünürken, etonolde biraz dietil eter çözeltisi içinde ise hiç çözünmemektedir. Askorbik asit, özellikle konserve veya şişelenmiş ürünler gibi tepe boşluğu olan gıdalarda oksijen tutucu olarak kullanılmaktadır.



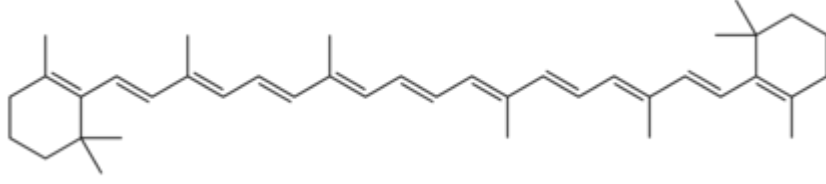
Şekil 1.3. Askorbik asitin kimyasal yapısı

1.4.3. A Vitamini

Yağda eriyen vitaminlerden biridir. Retinoidler adı verilen yaklaşık 2500 kimyasal bileşik ile, provitamin A karotenoidleri adı verilen kimyasal moleküller vitamin A ailesini oluşturmaktadır. A vitamini hayvansal ürünlerde, örneğin balık, karaciğer yağı, karaciğer, süt yağı ve yumurta sarısında bulunmaktadır. Renksiz denecek kadar açık sarı renkte bir vitamindir.

1.4.4. Karoten

Kimyasal olarak karoten yağda çözünebilir bir terpen'dir ve sekiz izopren birimden biyokimyasal olarak sentezlenmektedir. Başlıca iki türü vardır. Bunlar α -karoten ve β -karotendir. γ , δ ve ϵ karotenler de vardır. β -karoten iki retinil gruptan oluşmakta ve ince bağırsak mukozasında β -karoten dioksijenaz tarafından yıkıma uğrayıp bir tür A vitamini olan retinole dönüşmektedir.

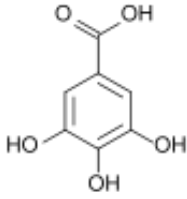


Şekil 1.4. Karotenin genel kimyasal yapısı

β -karoten daha yaygın olup sarı, turuncu ve yeşil yapraklı meyve ve sebzelerde bulunmaktadır. Bunlar arasında havuç, ıspanak, marul, domates, tatlı patates, brokoli, kavun, portakal ve kabak başta gelmektedir. Bir antioksidan olan β -karoten, zararlı serbest radikallerin fazlasını bertaraf etmekte yararlı olabilmektedir

1.4.5. Gallik Asit Esterleri (Gallatlar)

Gallik asidin en çok kullanılan esterleri propil gallat, oktil gallat, dodesil gallat ve lavrik gallattır. Bunlar suda çözülmezler.



Şekil 1.5. Gallik asitin kimyasal yapısı

Gallatlar antioksidan olarak oldukça etkili maddelerdir. Ancak bunların metal iyonları ile özellikle demir iyonları ile koyu renkli kompleksler oluşturma özellikleri, yağda ve substratta istenmeyen renk değişikliklerine neden olmakta ve bu yüzden de kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Gallik asit esterlerinin kullanılmasına ilişkin toplum sağlığı ve gıda hijyeni açısından olumsuz hiçbir bilgi ileri sürülmemektedir. FAO/WHO örgütünün ilgili komisyonu, günlük tüketilme değerini 0.2mg/kg olarak önermektedir.

1.4.6. Nordihidroguayaret Asiti (NDGA)

NDGA, *Lurrea divaricata* bitkisinden elde edilen doğal bir antioksidandır. Ayrıca yapay olarak üretilmektedir. Bu amaçla fırıncılık ürünlerinde, eterik yağlar,

domuz yağı ve balık yağlarında kullanılmaktadır. NDGA'nın bazı ülkelerde gıdalara katılmasına izin verilmektedir.

1.4.7. Aminoasitler, Peptidler, Proteinler

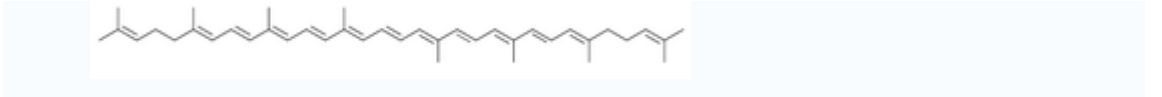
Kısa bir süre önce aminoasitlerin antioksidatif ve sinerjist etkileri ortaya konmuştur. Bu konuda yapılan çeşitli araştırmalar bazı aminoasitlerin antioksidatif özellikler taşıdığını ortaya koymuştur. Triptofan ve peptitlerden oluşan antioksidanlar salam, sucuk ve süt ürünleri için önerilmektedir. Bazı süt ürünlerinde depolama sırasında süt yağının oksidasyona uğramasında önleyici olarak kullanılan triptofan ve lisinin önemli derecede antioksidatif etki yarattıkları saptanmıştır.

1.4.8. Sülfidler

SO₂, Na₂SO₃, NaHSO₃, KHSO₃, Na₂S₂O₅ ve K₂S₂O₅ gibi maddeler değişik gıdalarda zayıf antioksidan olarak kullanılmaktadırlar. Örneğin, SO₂ biraya depolama sırasında, tat bozulmalarını engellemek için ilave edilmektedir. Sülfidler, enzimlerin katalizlediği reaksiyonların yanı sıra enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonlarını da kontrol etmektedirler. Örneğin, kesilmiş sebze ve meyvelerin tazeliğini korumak amacı ile sülfitleme ajanları kullanılmaktadır.

1.4.9. Likopen

Likopen parlak kırmızı bir karotenoid pigmenttir. Domates ve diğer kırmızı meyvelerde bulunmaktadır. Likopen insan vücudunda bulunan en yaygın karotenoiddir ve en güçlü karotenoid antioksidanlardan birisidir. Likopenin doğada yaygın olarak bulunmasından dolayı bir gıda boyası olarak kullanılmasına izin verilmiştir.



Şekil 1.6 Likopenin kimyasal yapısı

1.5. Sentetik Antioksidanlar

Yağların oksidasyon mekanizmalarının anlaşılması ile birlikte, oksidasyonu

önlemek amacıyla antioksidan üretimi konusunda pek çok gelişme gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla tokoferoller ve askorbik asidin doğal özdeş formları veya türevleri laboratuvarında sentezlendiği gibi, doğal yapı ile ilgili olmayan yapay antioksidanlar da üretilmiştir. 1940'lı yıllardan beri yüzlerce yapay antioksidan madde sentezlenmesine karşın, bunların ancak az bir kısmı günümüzde kullanılmaktadır.

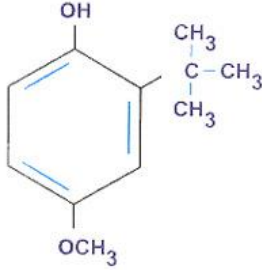
1.5.1. Eritorbik Asit ve Sodyum Eritorbat

Diğer adı "izoaskorbik asit" olan eritorbik asit ($C_6H_8O_6$) ve tuzu olan sodyum eritorbat ($C_6H_7O_6Na \cdot H_2O$)'ın antioksidatif etkileri oksijen bağlama yolu ile gerçekleşmektedir. Güçlü bir indirgen ajan olan eritorbik asit, oksijen tutucu ve moleküler oksijeni indirgeyici rol oynamaktadır. Eritorbik asidin, asidik ortamlarda nötr ortamlara göre daha stabil olduğu belirtilmektedir. Eritorbik asit, sitrik asit ile birlikte sülfitle alternatif olarak kullanılabilir. Bu kombinasyon, özellikle donmuş deniz ürünleri, salatalar ve elmalarda meydana gelen renk kaybını ve acılaşmayı engellemek amacıyla uygulanmaktadır. Eritorbik asit ve sodyum eritorbat ($C_6H_7O_6Na$) 150-200 ppm düzeylerinde donmuş meyvelerde oksidatif bozulmayı engellemek amacıyla kullanılabilir.

1.5.2. Butillenmiş Hidroksianisol (BHA)

Butillenmiş hidroksianisol (BHA), ($C_{11}H_{16}O_2$), ticari olarak 3-terciyer-butil-4-hidroksianisol (%85) ile 2-terciyer-butil-4-hidroksianisol (%15) izomerlerinin karışımı halinde bulunmaktadır.

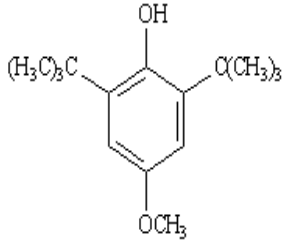
BHA beyaz, mumsu katı bir yapıya sahip, hem hayvansal hem de bitkisel yağlarda çözünebilir ancak suda çözünemeyen bir antioksidan olarak tanımlanmaktadır. Bu antioksidanın gıdalarda kullanımına ilk olarak 1948 yılında ABD'de izin verilmiş olup, günümüzde pek çok ülkede gıda olarak tüketilen katı ve sıvı yağlarda kullanılmaktadır. Yapısındaki hidroksil gruba karşı orto veya meta pozisyonunda yer alan terciyer butil grup nedeni ile BHA'ya "engelleyici fenol" adı verilmektedir. Bu sterik engellenmenin, terciyer butil grubun fenolik yapının antioksidatif aktivitesi ile girişim meydana getirmesi ve bu nedenle BHA'nın bitkisel yağlarda etkisinin az olmasına neden olduğu öne sürülmektedir.



Şekil 1.7 Butillenmiş Hidroksianisol kimyasal yapısı

1.5.3. Butillenmiş Hidroksitoluen (BHT)

Butillenmiş hidroksitoluen (BHT), ($C_{15}H_{24}O$), 2.6-ditersiye- butil-4-metil fenolun, 1954 yılında gliserdiler üzerinde etkili ve koruyucu bir antioksidan olduğunun belirlenmesi sonucunda gıda olarak tüketilen yağlarda ve diğer bazı gıdalarda kullanılmaya başlanmıştır.



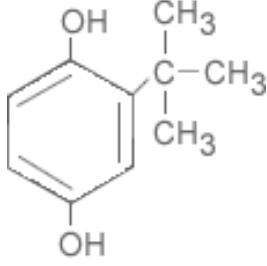
Şekil 1.8. Butillendirilmiş Hidroksitoluen kimyasal yapısı

BHT, yağlarda iyi çözünebilir ancak suda çözünmeyen, beyaz renkli ve kristal yapıda bir maddedir. Bu madde BHA gibi bitiksel yağlarda düşük aktiviteye sahip olmasına karşın diğer antioksidanlarla beraber kullanıldığında yağın ilave edildiği gıdanın koruma özelliğinden yararlanılmaktadır. BHT, BHA ile sinerjistik etki gösterirken gallerle sinerjistik etki meydana getirmemektedir.

1.5.4. Tersiyer Butilhidrokinon (TBHQ)

ABD Gıda ve İlaç İdaresinin (FDA) yaptığı çalışmalar sonucunda etkili bir antioksidan olduğu belirlenen tersiyer butilhidrokinon (TBHQ)'un kullanımına ilk kez 1972 yılında izin verilmiştir. Mono-tersiyer-butilhidrokinon ($C_{10}H_{14}O_2$) yapısında olan

bu antioksidan, beyaz, kristalimsi ve karakteristik kokusu olan bir maddedir. Günümüzde tersiyer-butil hidrokinon (TBHQ)'un bitkisel yağlarda stabiliteyi arttırmak amacı ile kullanımına bir çok ülke tarafından izin verilmektedir. TBHQ'un bitkisel yağlardaki antioksidatif etkisi diğer antioksidanlara göre daha fazladır. En iyi etkiyi ise sitrik asitle birlikte kullanıldığında vermektedir.



Şekil 1.9 Tersiyer Butilhidrokinon kimyasal yapısı

TBHQ'nun galatlardan farklı olarak ortamda demir varlığında renk bozulmasına neden olmadığı, ayrıca BHT ve BHA'dan daha uçucu, yüksek sıcaklığa dayanıklı olduğu ifade edilmektedir.

1.6. Antioksidanların Etki Mekanizmaları ve Özellikleri

1.6.1. Serbest Radikaller ile Kompleks Oluşturan Antioksidanlar

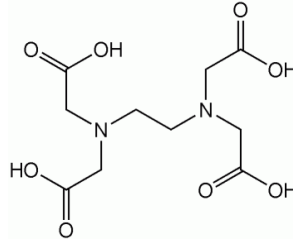
Bu tip antioksidanlar fenolik yapılarından veya moleküler yapılarındaki fenolik konfigürasyondan dolayı fenolik hidroksit gruplarından hidrojen verip, başlangıçtaki serbest yağ asidi radikal oluşumunu engelleyici oksidasyonu inhibe ederler. Bu şekilde etki gösteren antioksidanların en yaygın kullanılanları bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), propil gallat (PG), tersiyel bütül hidrokinon (TBHQ) ve tokoferollerdir.

1.6.2. İndirgen Özellik Gösteren veya Oksijen Bağlayıcı Antioksidanlar

Bu antioksidanlar hidrojen atomlarını oksijene transfer ederek oksijenin oksitleyici etkisini ortadan kaldırırlar ve ransiditeyi geciktirirler. Bu şekilde etki gösteren antioksidanların en yaygın kullanılanları, askorbik palmirat, askorbik asit, sulfidler, erithorbik asit ve sodyum tuzudur.

1.6.3. Şelat Oluşturucu Ajanlar

Şelat oluşturucu ajanlar antioksidan olmamakla birlikte gıdaların stabilize edilmelerinde önemli rol oynamaktadırlar. Sinerjistler olarak da sınıflandırılan şelat oluşturucu ajanlar lipid oksidasyonunu katalize eden demir ve bakır gibi metal iyonları ile kompleks oluşturarak onların katalitik etkisini engellerler. Yaygın olarak kullanılan şelatörler arasında sitrik asit ve tuzları, fosforlar ve etilendiamintetraasetik asit (EDTA)'ın tuzları sayılabilmektedir. Sitrik asit, çok etkili bir şelat oluşturucu ajandır. Antioksidanlarla birlikte kullanıldığında onların etkisini arttırmaktadır. Gıda sanayinin hemen her dalında yaygın olarak kullanılmaktadır. Fosforik asitin türevleri olan polifosfatlar özellikle sodyum asit pirofosfat ve sodyum tripolifosfat olup, etkinlikleri pH'ın artmasıyla azalmaktadır. Kalsiyum disodyum EDTA ve disodyum EDTA kimyasal koruyucu olarak kullanılan diğer şelat oluşturucu ajanlardır.



(Edta titriplex III)

Şekil 1.10 Etilendiamintetraasetik asit kimyasal yapısı

1.6.4. Sekonder Antioksidanlar

Bunlar lipit oksidasyonu sırasında ortaya çıkan hidrojen peroksiti stabil son ürünlere parçalayarak etki göstermektedirler. Bunlara tiyodipropiyonik asit ve dilavril tiyodipropiyon örnek olarak verilebilmektedir.

1.7. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

Antioksidan kapasite tayin yöntemleri, kullanılan kimyasal reaksiyon açısından temel olarak iki sınıfta toplanabilir.

1. Hidrojen atomu transferi reaksiyonuna dayananlar (HAT)
2. Elektron transferi reaksiyonlarına dayananlar (ET)

HAT reaksiyonuna dayanan analiz yöntemlerinin çoğu azo bileşiklerinin bozunması sonucu oluşan peroksi radikallerinin antioksidan ve substrat tarafından yarışmalı bir şekilde giderilmesi prensibine dayanır.

HAT analiz yöntemleri;

- a) İndüklenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein otooksidasyonu,
- b) Oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC)
- c) Total radikal yakalama antioksidan kapasitesi (TRAP)
- d) Crocin bleaching deneyleri olarak sıralanabilir.

ET temelli analiz yöntemleri antioksidan maddenin, indirgendiğinde renk değiştiren bir oksidan maddeyi, indirgeme kapasitesinin ölçümüne dayanır. Renk değişiminin derecesi örneğin antioksidan derişimi ile bağlantılandırılır.

ET temelli analiz yöntemleri;

- a) Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile toplam fenolik madde analizini
- b) Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) ölçümünü
- c) Ferrik iyonu indirgeme antioksidan gücü (FRAP) ölçümünü
- d) Cu (II) kompleksini oksidan olarak
- e) DPPH kullanarak “toplam antioksidan potansiyel” ölçüm yöntemleri olarak sıralanabilir.

Bu yöntemlerden FCR’in antioksidanın indirgeme kapasitesinin belirlenmesinde ve ORAC’ın ise antioksidan radikal süpürücü kapasitesinin belirlenmesinde kullanılması önerilmektedir.

Yukarıda bahsedilen tüm yöntemlerin bir bitkinin antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde kullanılması mümkün olmakla birlikte, örnekteki antioksidan maddelerin moleküler çeşitliliği bu yöntemlerin arasında her zaman doğrusal ilişki oluşmasını engelleyebilir. Bu nedenle tek bir yöntem kullanarak bitkinin antioksidan kapasitesi hakkında karar vermek uygun olmayabilir.

1.8. Gıdalardaki Oksitatif Bozulmalar

Bu konuyla ilgili en önemli konu, yağ ve yağlı gıdalardaki oksidatif bozulmadan kaynaklanan kötü tat ve kokunun gelişmesidir. Bunlar, gıdalarda yer alan temel öğelerin her birinde aşağıda açıklandığı gibi farklı belirtilerle kendilerini göstermektedir.

1.8.1. Karbohidratların Bozulma Tipleri

Gıdalarda yer alan karbohidratların oksidasyonu renk değişikliğine ve tat bozukluğuna yol açmaktadır. Rengin bozulması olayı genellikle kahverengi, gölgeli, gri ve sarı rengin teşekkülü ile kendini göstermektedir. Bu bozulma olayında iki tip tepkime gelişmektedir. Bunlardan birincisi “mailard” reaksiyonudur. Bir esmerleşme olayı olarak da isimlendirilebilen bu tepkime genellikle karbohidratlar ile aminoasitler arasında veya çeşitli azotlu bileşikler ile organik asit zincirleri arasında oluşmaktadır. Daha çok büyük molekülü karbohidrat içeren meyve ve sebzeler ile su ürünlerinde görülen bir tepkimedir. Mailard reaksiyonunun yarattığı olumsuz etkiler ancak askorbik asit, sitrik asit ve diğer organik asitlerin eklenmesiyle ortadan kaldırılabilmektedir.

İkinci tip oksidasyon ise gıdalarda yer alan enzimlerin neden olduğu tepkimelerdir. Antioksidanlar, enzimlerin yol açtığı bu yan etkileri önlemede pek yardımcı olamamaktadır. Bu tip oksidasyonu engellemenin tek yolu, sıcak teknikle enzimi inhibe etmesidir.

Karbohidratlı gıda maddelerinde görülen bir başka oksidasyon şekli de renk bozulması halinde belirlemektedir. Bu olay gıdalarda yer alan doğal pigmentlerin oksidasyonu ile meydana gelmektedir. Bu pigmentlerin en önemlisi karotenoid ve benzerleridir. Doğal pigmentlerin oksidasyonu antioksidan kullanımı ile engellenebilmektedir. Ancak su miktarı fazla olan gıdalarda bulunan karoten ile yağda çözünen antioksidanların etkileşimini sağlamak önemli bir sorun oluşturmaktadır. Pigment oksidasyonu yüksek sıcaklık, metaller ve mikrobiyolojik yan ürünlerle hızlanmaktadır. Bu tip oksidasyon reaksiyonlarını azaltmak metallerin ve mikrobiyolojik katalizörlerin şelatlanması veya uzaklaştırılması ile mümkün olabilmektedir.

1.8.2. Yağların Bozulma Tipleri

Yağ ve yağlı ürünlerde kalitenin düşmesini etkileyen en önemli faktör oksidasyondur. Bu maddelerin oksidatif bozulmaları tat ve koku kusurlarına yol açmaktadır. Bazı durumlarda oksidatif tepkime ürünleri toksik yapıda oluşmaktadır. Yağ oksidasyonu, genellikle toksik yan ürünlerinin oluşması ile durmaktadır. Yağ bozulmaları dört gruba ayrılmaktadır.

- **Hidroliz;** Bu tür yağ bozulmasında yağ asitleri ve gliserol oluşumu, gıda maddesinde sabunumsu bir yapı meydana gelmesine yol açmaktadır. Geri dönüşlü bu tepkimede yüksek sıcaklık, lipolitik enzimler ve asit katalitik etki yapmaktadır.
- **Ransidite:** Bu deyim gıda sanayinde çok yaygın olarak kullanılan ve önemli bir tepkimeyi tanımlayan bir sözcük olup, pek çok sayıdaki tat bozukluklarını kapsamaktadır. Ransidite, uçucu bileşik grubundaki doymamış yağ asitlerinin otooksidasyonu ile oluşmaktadır.
- **Tat dönmesi (Reversion):** Bu tür tat ve koku bozulması sebze, balık ve diğer yüksek derecede doymamış yağ içeren gıdalarda görülmektedir. Meydana gelen tat ve koku bozukluğunun nedeni linoleik tipteki asit oksidasyonu ürünüdür.
- **Polimerizasyon:** Polimerizasyon, doymamış yağlardaki iki karbon atomu (C=C) arasındaki zincirin kopması durumudur. Bir başka şekliyle, iki yağ asiti zinciri arasındaki doymamış kısma oksijenin bağlanmasıdır. Her iki şekildeki polimerler siklik yapıdadır.

Antioksidanlar oksidasif ransidize ve oksidatif polimerizasyon etkisiyle, meydana gelen bozuklukları giderebildikleri halde hidroliz ve reversiyona etki edememektedirler.

1.8.3. Proteinlerde Bozulma Tipleri

Proteinlerin oksidasyonu gıda maddelerinde kötü koku ve tat teşekkülü şeklinde ilk anda kendini göstermeyebilmektedir. Proteinler proteolitik enzimler tarafından parçalandıkları gibi ayrıca ısıtma ve hidrolitik reaksiyonlarla denatürede olurlar.

Pigmentler normal olarak proteinlerle bir arada bulunurlar. Bu grup pigmentlere “heme pigment” denilmektedir. Meydana gelen oksidasyonla derhal renk değişimi ortaya çıkmaktadır. Bu tür renk değişimini herhangi bir gıda katkısı ilave ederek engellemek söz konusu değildir. Hemoglobin kendi yapısı içindeki oksidasyonda aktif olarak katalitik rol oynamaktadır.

1.8.4. Lipitlerin Oksijen Varlığında Bozulması

Doymuş ve doymamış yağ asitleri ve bunların esterleri, kimyasal oksidasyon maddeleri (nitrik asit, kromik asit, ozon, potasyum permanganat ve hidrojen peroksit) tarafından okside edilmektedirler. Otoksidasyon (atmosferik oksidasyon) imalat ve depolama koşullarında keton ve aldehitlerin oluşturduğu istenmeyen tat ve kokuyu geliştirmektedir.

İmalat sırasında gıdaların temas ettiği metaller oksidasyon yolu ile meydana gelen tat ve koku bozukluklarını daha hissedilir hale getirmektedir. Özellikle demir, bakır ve benzeri metaller bu olaya neden olmaktadır. Burada katalitik bir rol oynayan metallere karşı engelleyici olarak fosforik asit, sitrik asit, askorbik asit gibi maddeler kullanılmaktadır. Bu maddeler gıdalarda oksidatif yağ bozulmasını yavaşlatmakta ve böylece yağları, karotenoidleri A ve E vitaminleri ile diğer besin öğelerini hava oksijeninin bozucu etkisine karşı korumaktadırlar.

1.9. Antioksidanların Gıdalarda Kullanım Alanları

Şekerlemelerde kullanılan birçok ingrediyeant kolaylıkla bozulabilmektedir. Örneğin süt tozu, süt, katı ve sıvı yağlar, fındık, fıstık türü maddeler ve esansiyel yağlar tat ve kokunun kaybolmasına veya istenmeyen kötü koku oluşumuna neden olan değişik tipte bozulmalara maruz kalabilmektedir.

Herhangi bir ingrediyeantin stabilitesindeki zayıflık bitmiş üründe bozulmaya neden olabilmektedir. Antioksidanlar değişik tip şekerlerde acılaşmayı engelleyici olarak kullanılmaktadır.

Et ve et ürünlerinde kalite bozulmalarının en belirgin şeklinin yapılarında bulunan lipidlerin veya yağ içeren kısımlarının oksidasyonu olduğu belirtilmektedir. Etin öğütülmesi, ezilmesi ve yapılarındaki lipidlerin oksidasyona maruz kalması

oksidasyona karşı eğilimin sebepleri arasında yer almaktadır. Ayrıca ette bulunan hem pigmenti lipidler ile etkileşmekte ve oksidasyonu katalizlemektedir. Özellikle yüksek oranlardaki tuz, dondurarak depolamada oksidasyon reaksiyonunu katalizlemektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda gıdalarda kullanılan antioksidanların sığır eti, domuz eti, kümes hayvanları ve balıkta oksidatif bozulmayı engelledikleri ifade edilmektedir.

Et ürünlerindeki uygulamalar, antioksidanın parçalanmış etlere disperse olması ilkesine dayanmaktadır. Ticari uygulamalarda bu işlem BHA ve CA içeren tuz kullanılarak, bu maddelerin kristallerin yüzeyine disperse olmaları ile tamamlanmaktadır. Antioksidan ile muamele edilmiş tuz, et emülsiyonu içinde karışmakta ve böylece yağlı doku içinde çözünmektedir. Bu ürünlerde karşılaşılan problemlerden en önemlisinin antioksidan ile etin yağının temasının sağlanması olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle antioksidan kesilmiş, kıyma haline getirilmiş veya ezilmiş (öğütülmüş) ürünlerde daha etkin sonuç vermektedir.

Ticari uygulamalar açısından gıdalarda kullanımı uygun olan antioksidanların deniz ürünlerinde kullanımlarının başarılı olmadığı bilinmektedir. Bu durumun, birçok balık yağının trigliserid ve fosfolipidlerinin yüksek doymamışlığından, hem pigmentleri gibi doğal katalizörlerin varlığından ve uygun olmayan yöntemlerin kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Doğal balık yağlarının A ve D vitaminlerinin önemli bir kaynağı olması ve bu vitaminlerin bazı oksidatif yan ürünleri ile degrade olabilmeleri nedeni ile bu bozulmayı engellemek için antioksidanlar kullanılmaktadır. Vitamin A ve D'nin degradasyonunun engellenmesinde BHA, PG ve CA içeren karışımların etkili olduğu belirtilmektedir.

Yüksek oranda doymamış yağ asitleri içeren balık yağlarında, PG ve diğer gallatların antioksidan olarak etkili olduğu bulunmuştur. Ancak söz konusu yağların şelatlanmayan yüksek oranda demir içermeleri nedeniyle demirin gallatlarla, mavimsi siyah gallat kompleksini oluşturması sonucunda renk bozulmaları oluşturmaktadır. Bunlara bağlı olarak sadece bazı antioksidanlar ticari amaçla balık yağlarının stabilizasyonunda kullanılmaktadır.

Portakal yağı, limon yağı ve terpen benzeri lezzet verici yağlar, fosfolipidler ve trigliseridler gibi serbest radikal oksidasyonuna uğramaktadırlar. Gıdalara katılan antioksidanlar, bu yağlarda kullanıldıklarında lezzet ve koku maddelerindeki

bozulmaları azaltmakta etkili olmaktadır. Antioksidanların oksidasyonu engellemek amacı ile esansiyel yağlara işlemden hemen sonra ve mümkün olduğu kadar düşük sıcaklıklarda ilave edilmeleri gerekmektedir.

Çiklet hamurları doymamış bileşenlere sahip polimerler ve petrol mumları içermekte ve bu maddeler sürekli oksidasyona maruz kaldıklarında, polimerlerin çapraz bağlanması ile ilişkili olarak oldukça kırılğan bir yapı oluşmaktadır. Bu şekilde istenilmeyen lezzet ve koku maddeleri oluşabilmekte ve ancak antioksidan kullanımı ile bu tip bozulmalar engellenebilmektedir. BHA ve BHT bu uygulamalarda kullanılan en önemli antioksidanlar olup, çiklet hamurunun üretimi sırasında ilave edilmeleri gerekmektedir.

BHA, BHT ve tokoferoller gibi antioksidanlar fırında pişirilen gıdalar üzerinde sürdürdükleri etkilerinden dolayı fırında pişirme işlemlerinde kullanılacak yağlara ilave edilmektedir. Ancak fırınlama işlemindeki kullanımdan önce, depolama sırasında da stabilite sağladıklarından THBQ ve PG'in sıvı ve katı yağlarda kullanımları uygun olmaktadır. Bu nedenle, fırında pişirme uygulamalarında kullanılacak katı ve sıvı yağlara BHA, BHT, PG ve TBHQ'nun karışımları katılarak sinerjistik etki oluşturulmaktadır.

Hububatların lipid oranlarının oldukça düşük olmasına karşın içerdikleri lipidlerin doymamışlıkları yüksek, dayanıklılığı ise oldukça azdır. Ekstrüzyon, kızartma gibi ısı işlemler de bu tip gıdaların stabilitelerini azaltmaktadır. Kahvaltılık kuru gıdalarda kullanılan hububatlar genellikle ambalaj materyellerine katılan BHA ve BHT gibi antioksidanlarla stabilize edilmektedir. Uygun buhar basıncına sahip BHT buharlaşarak paketleme materyalinden hububata geçmekte ve bu şekilde bir koruma sağlamaktadır.

Antioksidanlar, mum, parafin ve polimerler içinde veya emülsiyon halinde gıda ambalajlarına ilave edilmekte ve buharlaşma yolu ile gıdaların içine geçiş sağlamaktadır. BHA ve BHT'nin paketleme uygulamalarında oldukça etkili oldukları ifade edilmektedir. Kullanılacak antioksidan miktarı ise paketleme materyalinin büyüklüğüne, tipine ve gerekli olan stabiliteye göre değişmektedir.

1.9.1.Kullanımına İzin Verilen Antioksidanlar

Numara	İsim	Fonksiyon
E300	L- Askorbik asit	Doğal antioksidan, vitamin C
E301	Sodyum L- askorbat	Doğal antioksidan, vitamin C
E302	Kalsiyum askorbat	Doğal antioksidan, vitamin C
E304	L-askorbil palmitat	Sentetik antioksidan
E306	Tokoferolce zenginleştirilmiş ekstrakt	Doğal antioksidan, vitamin E
E307	α – tokoferol	Sentetik antioksidan, vitamin E
E308	γ –tokoferol	Sentetik antioksidan, vitamin E
E309	Δ -tokoferol	Sentetik antioksidan, vitamin E
E310	Propil galat	Sentetik antioksidan
E311	Oktil galat	Sentetik antioksidan
E312	Dodesil galat	Sentetik antioksidan
313	Thiodipropiyonik asit	Sentetik antioksidan
314	Guaiac Gum	Doğal antioksidan
E315	Eritorbik asit	Sentetik antioksidan
E316	Sodyum eritorbat	Sentetik antioksidan
E319	Bütilhidroksinon	Sentetik antioksidan
E320	Butillenmis hidroksi anisol (BHA)	Sentetik antioksidan
E321	Butillenmis hidroksi toluen (BHT)	Sentetik antioksidan
388	Tiyodipropiyonik asit	Sentetik antioksidan

1.10. Ultraviole / Görünür Bölge (UV / VIS) Absorpsiyon Spektroskopisi ile İlgili Genel Bilgiler

Moleküler UV / VIS absorpsiyon spektroskopisi, inorganik, organik ve biyokimyasal türlerin kantitatif analizinde kullanılmaktadır. UV / VIS ışınlarının moleküller tarafından absorpsiyonu, bir veya daha çok sayıda elektronik absorpsiyon bandı şeklinde olmakta ve bu bantlar, pek çok sayıda yakın dalgaboylu çizgilerden oluşmaktadır. Her çizgi, bir elektronun temel halden uyarılmış elektronik hallerden birine geçmesi sonucu oluşmaktadır. Bu elektronik geçişle birlikte, titreşim ve dönme enerji düzeyleri arasında da geçişler olduğu için absorpsiyon bantları gözlenmektedir.

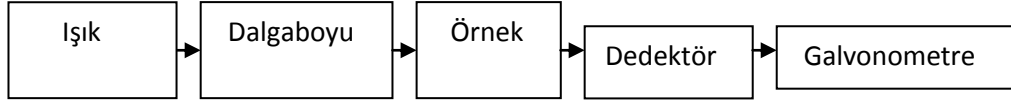
Herhangi bir molekülde, belli bir dalgaboyu aralığındaki ışığın absorpsiyonundan sorumlu olan fonksiyonel gruba “kromofor grup”, ışığı absorplamadığı halde kromofor grupların absorpladığı ışığın dalgaboyunu daha büyük değerlere kaydıran ve absorpsiyon katsayısını arttıran gruplara ise, “okzokrom grup” adı verilmektedir.

Moleküllerde, aralarında elektronik geçişlerin olduğu molekül orbitallerinin enerjileri birçok faktör tarafından etkilenebilmektedir. Bunlar, çözücü ve substitüentlerin etkisi ile konjugasyon etkisi olarak sıralanmaktadır. Bileşiklerin, çözeltilerinin ışığı absorplama özelliği incelenirken, kullanılan çözücünün absorpsiyonunun göz önünde tutulması gerekmektedir. Her bir çözücü için, belli bir dalgaboyu sınırının altında, maddelerin absorpsiyon bantları incelenememektedir. Çünkü bu sınırdan sonra çözücü ışığı absorplamaktadır. Bunun sonucunda da absorpsiyon bandı daha uzun dalgaboylarına kaymaktadır. Bu sonucu doğuran diğer bir etken ise konjugasyon etkisidir.

Çözeltide bir elektron verici ve bir elektron alıcı molekül beraber bulunuyorsa, böyle bir sistemin ışığı absorplaması sonucu elektron, vericiden alıcıya aktarılmakta, yani bir fotoredoks olayı gerçekleşmektedir. Bu tür absorpsiyon bandına “yük transferi bandı” adı verilmektedir. Pek çok inorganik ve organik kompleks, yük transferi bandında absorpsiyon gösterdikleri için, “yük transferi kompleksleri” adını almaktadır. Bu tür komplekslerde, metal iyonu genellikle elektron alıcı konumundadır.

1.10.1 .UV / VIS Absorpsiyon Spektrofotometreleri

Maddenin ışığı absorblamasını incelemek için kullanılan düzeneğe absorpsiyon spektrometresi veya absorpsiyon spektrofotometresi adı verilmektedir. Bir spektrofotometre düzeneği Şekil 1.3’de görüldüğü gibi başlıca ışık kaynağı, dalgaboyu seçicisi ve dedektörden oluşmaktadır.



Şekil 1.11. Bir spektrofotometrenin temel bileşenleri

Bu ana bileşenlere ek olarak spektrofotometrelerde ışığı toplamak, odaklamak, yansıtmaq, iki demete bölmek ve örnek üzerine belli bir şiddette göndermek amacıyla mercekler, aynalar, ışık bölücüleri ve giriş-çıkış aralıkları bulunmaktadır. Örnek ise, kullanılan dalgaboyu bölgesinde ışığı geçiren maddeden yapılmış örnek kaplarına konularak ışık yoluna yerleştirilmektedir.

1.10.2. Spektrofotometre Çeşitleri

1.10.2.1. Tek Işık Yollu Spektrofotometreler

En basit bir spektrofotometrede kaynaktan çıkan ışık, bir mercek ile toplanarak monokromatöre gönderilmekte ve dalgaboyu seçiminden sonra bir aralıktan geçirilerek örnek üzerine düşürülmektedir. Örneğin ışığı absorblama miktarı uygun bir dedektörle ölçülmektedir. Bu sinyal elektronik olarak çoğaltılmakta ve bir galvonometrede okunmaktadır. Bu bileşenlerin tümünün aynı ışık yoluna yerleştirildiği böyle bir spektrofotometreye, tek ışık yollu spektrofotometre adı verilmektedir.

Bu aletin başlıca üç ayar düğmesi bulunmaktadır. Bunlardan biri, alette kullanılan optik ağ veya prizmayı mekanik olarak döndürmeyi sağlayan düğmedir. Işık yolu tamamen kapatılarak galvonometre “sıfır” geçirgenlik ayarını yapmak için ikinci bir düğme kullanılmaktadır. Bir üçüncü düğmeyle de ışığın geçtiği aralığın eni

değiştirilmektedir. Ölçümün yapılacağı dalgaboyu birinci düğme ile ayarlandıktan sonra ışık yolu kapatılarak ikinci düğme ile “sıfır” ayarı yapılmaktadır. Daha sonra üçüncü düğme ile ışığın geçtiği aralığın eni değiştirilerek ve örnek kabında sadece çözücü kullanılarak galvanometre 100 değerine getirilmektedir. Bu işlemlerin, yani “sıfır” ve “yüz” ayarlarının, her dalga boyunda yeniden yapılması gerekmektedir. Ancak bu iki ayarlamadan sonra içinde örneğin bulunduğu çözelti ile geçirgenlik ölçülürse, örneğe ait absorpsiyon spektrumu, ışık kaynağındaki şiddet değişmesinden ve dedektördeki duyarlık farklarından bağımsız olarak ortaya çıkmaktadır.

1.10.2.2. Çift Işık Yollu Spektrofotometreler

Her dalgaboyunda “sıfır” ve özellikle “yüz” ayarlarının yapılması oldukça zaman alıcı bir işlemdir. Spektrofotometrede, monokromatörden çıkan ışığın eşit şiddette iki demete bölünerek birinin örneğe, diğerinin ise sadece çözücünün bulunduğu kaba gönderilmesi ile bu işleme gerek kalmamaktadır. Böylece örnekteki geçirgenlik değeri sürekli olarak çözücününki ile karşılaştırılmış olmaktadır. İkiye ayrılan ışık, iki ayrı dedektörle algılanmakta ve dedektörlerde oluşan sinyallerin oranı ölçülmektedir. Bu tür aletlere çift ışık yollu spektrofotometreler denmektedir. Burada iki dedektörün tam uyumlu olması, yani eşit şiddetteki ışık ile aynı sinyali oluşturması gerekmektedir.

.Çift ışık yollu spektrofotometrelerde, tek dedektör kullanılarak da ölçüm yapmak mümkündür. Bunun için örnekten ve çözücüden geçen ışık demetleri dedektör üzerine, dedektör önüne yerleştirilmiş dönen bir ışık bölücü yardımıyla ve ardı ardına gönderilmektedir. Gelen bu ışık demetlerinin oluşturdukları sinyal ise, alternatif yani periyodik türden olmaktadır. Işık bölücünün frekansına ayarlı bir elektronik çoğaltıcı yardımı ile bu alternatif sinyal kaydedilmektedir. Her iki ışık yolundan birbiri peşine gelen ışığın şiddetleri eşit ise, dedektörde herhangi bir sinyal oluşmamaktadır. Örnek bölmesinden geçen ışığın, absorpsiyon nedeniyle azalması durumunda ise, dedektöre gelen sinyal alternatif sinyal olarak algılanmaktadır. Çift ışık yollu aletlerde, ışık kaynağının şiddetindeki değişmelerden doğan hatalar ortadan kalkmaktadır.

1.10.3. Işık Absorpsiyonunun Nicel Yorumu

Absorplanan fotonların sayısı, ortamdaki absorpsiyon yapan türlerin sayısı ile doğru orantılıdır. Monokromatik ve I_0 şiddetinde ışıma, b uzunluğunda ve n sayıda absorpsiyon yapabilen tanecik içeren bir ortamda geçtikten sonra, ortamı I şiddetinde terk etmektedir.

Kabın çeperlerinde ortaya çıkan yansımalar ve çözeltide asılı halde bulunabilecek taneciklerin neden olduğu saçılma gibi etkileşimler sonucu ortaya çıkan şiddet azalmaları dikkate alınmazsa, $I_0 \rightarrow I$ şiddet azalmasının nedeni, sadece ortamdaki türlerin ışımayı absorplamasından kaynaklanmaktadır.

$$\log I_0/I = \varepsilon bC \quad (1-1)$$

Beer-Lambert yasası adı verilen bu eşitlikte $\log I_0/I$ absorbans adını almakta ve A ile gösterilmektedir.

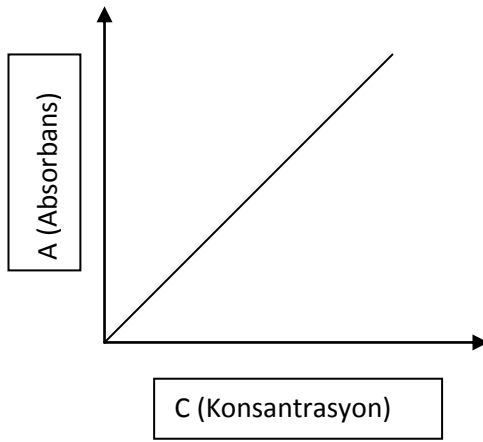
$$A = \log I_0/I = \varepsilon bC \quad (1-2)$$

A ile C arasındaki bu sabit doğrusal ilişkiden analitik uygulamalarda yararlanılmaktadır. Eşitlikte derişim C mol L^{-1} , örnek kabının kalınlığı b ise cm birimindedir. ε , molar sönüm veya molar absorpsiyon katsayısı yada molar absorbtivite olup, birimi $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 'dir. A ise absorbans adını almaktadır. A 'ya optik yoğunluk veya sönüm adları da verilmektedir.

Beer-Lambert eşitliğinin geçerli olması için uygulanan ışığın gerçekten monokromatik yani tek dalgaboyu değerinde olması, absorpsiyon olayının örneğin her yerinde eşit miktarda olması yani, örneğin homojen olması, ayrıca birden fazla ışığı absorblaması halinde, her bir bileşenin, diğerlerinin absorpsiyonunu etkilememesi gerekmektedir. Bu koşulların sağlanması halinde, A ile C arasındaki ilişki doğrusaldır. Genellikle C değerinin küçük olduğu durumlarda bu doğrusallık sağlanmaktadır. Daha derişik çözeltilerde, tanecikler arasındaki etkileşimler önem kazanmakta ve bu etkileşimler A ile C arasındaki doğrusallık ilişkisinin bozulmasına neden olmaktadır.

1.10.4. UV / VIS Absorpsiyon Spektroskopisi ile Analitik Uygulamalar

UV / VIS absorpsiyon spektroskopisi ile nitel analiz pek yapılmamaktadır. Fakat bu yöntem, nicel analiz için çok uygundur. Bir maddenin nicel analizinin yapılacağı dalgaboyu ve kullanılacak çözücüü kararlaştırmak için, örneğin absorpsiyon spektrumunu bilmek gerekmektedir. Spektrum incelenerek Beer-Lambert eşitliğine uyulan ve maksimum absorbands veren bir dalgaboyu seçilmektedir. Çözeltide analizi yapılacak türden başka türler de bulunuyorsa, bunların ışığı absorblamadığı dalgaboylarının seçilmesine özen gösterilmektedir. Çözücünün ve çözeltide bulunan başka türlerin ışığı absorblamadığı, Beer-Lambert eşitliğine uyulduğu ve nicel analiz en duyarlı bir biçimde yapılabileceği dalgaboyu değeri saptandıktan sonra, analizi yapılacak maddeyi içeren ve derişimleri bilinen bir dizi standart çözelti ile bu dalgaboyunda A değerleri ölçülmektedir. A değerleri, standart çözeltilerin bilinen derişimlerine karşı grafiğe geçirilmektedir. Bu doğruya “kalibrasyon doğrusu” veya “çalışma doğrusu” adı verilmektedir (Şekil 1.4). Nicel analiz kalibrasyon doğrusunun doğrusal olduğu bölgede yapılmaktadır. Konsantrasyonu bilinmeyen örneğin A değeri ölçülmekte ve kalibrasyon doğrusunda bu değere karşılık gelen konsantrasyon saptanmaktadır.



Şekil 1.12. Kalibrasyon doğrusu

Molar absorpsiyon katsayısının değerinin bilindiği durumlarda, Beer-Lambert eşitliğinin nicel analizde doğrudan kullanılması da m¼mk¼nd¼r. Kalibrasyon doğrusunu kullanırken molar absorpsiyon katsayısının ¼nceden bilinmesine gerek yoktur. İstendiğinde bu katsayı doğruların eğiminden hesaplanabilmektedir (Yıldız ve ark., 1997).

1.11. Korelasyon Analizi

Korelasyon analizinde, bir ana k¼tleden seğilmiş en az iki veya daha fazla ¼rnek grup alınarak, bu gruplar arasındaki etkileşime bir katsayı yardımıyla bakılmaktadır. Bu katsayıya korelasyon katsayısı adı verilmekte ve r ile g¼sterilmektedir.

Korelasyon katsayısının alabileceği en k¼çük değer -1 , en b¼y¼k değer ise $+1$ olmakta, başka bir anlatımla korelasyon katsayısı r , $-1 \leq r \leq +1$ arasında değerler almaktadır.

Korelasyon katsayısının işareti pozitifse, değişkenlerden birinin değeri artarken (azalırken) diğerinin de arttığını (azaldığını) g¼stermektedir. Korelasyon katsayısının işareti negatifse, değişkenlerden birinin değeri artarken (azalırken) diğerinin değerinin azaldığını (arttığını) g¼stermektedir. Yani ters y¼nl¼ bir ilişki s¼z konusudur.

$r = 0$ olduğunda ise, değişkenler arasında doğrusal bir ilişki bulunmamaktadır.

r 'nin $+1$ 'e eşit olması, değişkenler arasında pozitif ve tam doğrusal bir ilişkinin varlığını ortaya koymaktadır.

r 'nin -1 'e eşit olması, değişkenler arasında negatif ve tam doğrusal bir ilişkiyi belirlemektedir. Değişkenler arasındaki ilişki kuvvetlendikçe ± 1 'e, zayıfladıkça da sıfıra yaklaşan bir korelasyon katsayısı elde edilmektedir.

Korelasyon katsayısının yorumunu, tam değerler dışında ara değerler için yapmak oldukça g¼çt¼r. Ara değerler için katsayı değerlendirilirken, ¼rnek g¼zlem sayısı (n) oldukça ¼nemlidir. Çok fazla g¼zleme dayanan (serbestlik derecesi = 60) değerlendirmelerde 0.25'e kadar d¼řm¼ř bir korelasyon katsayısı bile anlamlı sayılabilmektedir. Fakat az sayıda, 5 g¼zleme dayanan değerlendirmelerde ¼nemli bir korelasyon için katsayının 0.7545'in ¼st¼nde olması gerekmektedir.

X ve Y diye adlandırabileceğimiz n adet gözlem değerine ait, iki değişken grup varsa, (iki grup aralarında neden sonuç ilişkisi olan gruplar da olabilir) bu gruplar arasındaki korelasyon katsayısı aşağıda verilen formülden yararlanılarak hesaplanabilmektedir.

$$r = \frac{\sum x \cdot y}{\sqrt{(\sum x^2) \cdot (\sum y^2)}}$$

1. X ve Y, n adet gözlemden oluşan iki değişken gözlem dizisini ifade etmektedir.
2. $x = X - \bar{X}$ ve $y = Y - \bar{Y}$ olarak ifade edilmektedirler. Tüm gözlem değerleri ortalamadan çıkarılarak x ve y dizileri oluşturulmaktadır.
3. x ile y dizisinin değerleri teker teker çarpılarak toplamları bulunmaktadır.
4. x dizisinin ve y dizisinin ayrı ayrı kareleri alınarak toplamları bulunmaktadır.
5. x ile y dizisinin çarpılarak toplamları alınmış değer, x dizisinin karesi alınarak toplamı bulunmuş değer ile y dizisinin çarpılarak toplamları alınmış değere bölünmektedir (ORHUNBİLGE, 1996).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Öztürk ve ark. (2002), Eskişehir bölgesinden temin edilen *Petroselinum crispus* (maydanoz), *Anethum graveolens* (dereotu) ve *Eruca sativa* (roka)'nın kurutulmuş topraküstü kısımlarından hazırlanan ekstralarının antioksidan ve serbest radikal süpürücü etkilerini test etmiş ve toplam fenol miktarlarını hesaplamışlardır. Her üç türe ait ekstraların toplam fenol miktarları Folin-Ciocalteu Metodu, fenolik bileşikleri ise YBSK metodu kullanılarak tayin etmişlerdir. Antioksidan aktiviteleri Ransimat yöntemi ile, serbest radikal süpürücü etkileri ise DPPH serbest radikali üzerinden tayin ederek ekstraların antioksidan aktivitelerini sentetik antioksidan BHT ile karşılaştırmışlardır. Yapılan deneyde üç bitkinin de sulu, etil asetatlı, metanollü ve asitli ekstralarını hazırlamışlardır. Deney sonucunda ise dereotu (*Anethum graveolens*)'nun metanol ekstresinin (AME) hem Ransimat metodunda peroksidasyon ürünlerinin oluşumunu önlemesine, hem de serbest radikal süpürücü etki tayininde IC₅₀ değerlerine bakarak az da olsa antioksidan etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. Maydanoz (*Petroselinum crispum*)un ise en yüksek miktarda fenolik madde içeren asitli ekstresinin (PAE) Ransimat metodunda düşük konsantrasyonda standart olarak kullanılan BHT'ninkine yakın etki göstermesi zayıf da olsa antioksidan etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışmalarda rokanın asitli ekstresinin (EAE) hem Ransimat metodunda hem de serbest radikal süpürücü etki tayininde elde edilen yüksek aktivite değerlerine sahip olduğu görülmüş ve bunun yüksek fenolik madde miktarından kaynaklandığını ifade etmişlerdir.

Koşar ve ark. (2002), sumak(*rhus coriaria*)'ın fenolik bileşiklerini ve antioksidan etkilerini incelemişlerdir. Bu amaçla toplam fenol ve antosiyanin (kırmızı renkli fraksiyonda) analizi ile birlikte sumaktan elde edilen polar ekstraları Sephadex-LH kolonda fraksiyonlandırarak her bir fraksiyonun lipit peroksidasyonunu inhibe edici ve serbest radikal süpürücü etkilerini belirlemişler ve aktif fraksiyonların içermiş oldukları bileşikleri sıvı kromatografisi-atmosferik basınç iyonizasyon elektron spray (LC-API-ES) kütle spektroskopisi yöntemi ile tayin etmişlerdir. Yapılan çalışmada sumakta yüksek antioksidan aktivite gözlenmiş ve aktif fraksiyonlarda antosiyaninler ve tanenler bulunmuştur. Bu nedenle gözlenen antioksidan aktivitenin özellikle gallik asit olmak üzere bu grup bileşiklerden ileri geldiği düşünülmüştür.

Bozan ve Yılmaz (2005), defne ağacı (*Laurus nobilis* L.) meyvelerinin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi üzerinde çalışmışlar ve bu çalışmada defne meyvelerinin kabuk ve meyve içi kısımlarından su, etilasetat, etanol/su ve aseton/su gibi çeşitli çözücü/çözücü karışımları ile antioksidan maddelerce zengin ekstratlar elde etmiş ve antioksidan kapasiteleri Ransimat, beta-karoten-linoleik asit model sistemi ve DPPH radikali ile serbest radikal süpürücü aktivite testleri ile belirlemişlerdir. Aktif ekstratların toplam fenolik madde miktarlarını Folin-Ciocalteu UV-vis spektrofotometrik metot ile tayin etmiş, fenolik asit ve flavonoid grupları ise YBSK-DAD analizleri ile belirlemişlerdir. Kullanılan antioksidan aktivite test yöntemlerine göre tüm ekstratlar antioksidan aktivite göstermiş olmalarına rağmen, sinamik asit türevlerince zengin meyve içi ekstratlarının lipid peroksidasyonunu inhibe edici etkilerinin, sentetik antioksidan olarak test edilen BHT ile kıyaslanabilir derecede olduğunu belirlemişlerdir.

Karadeniz ve Tosun (2003), çay ve çay fenoliklerinin antioksidan aktivitesi ile ilgili çalışmalarıyla çayın tipine bağlı olarak fenolik madde miktar ve kompozisyonunun dolayısıyla antioksidan aktivitesinin değiştiğini, yeşil çayın içerdiği yüksek flavanoller nedeniyle, siyah çayın ise flavanol içeriği yanında enzimatik oksidasyon aşamasında oluşan sekonder fenolik maddeler nedeniyle yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir.

Gerçekçioğlu ve Elmastaş (2006), bazı üzüksü meyve türlerinin (ahududu (*Rubus idaeus* cv. *Heritage*), gelebor (*Viburnum* spp.), mürver (*Sambucus* spp.) kuşburnu (*Rosa canina* var. *canina*)) antioksidan aktivitelerini araştırmışlardır. Analizde kullanılan meyve türlerini etanol ekstraksiyonu yaparak elde edilen ham ekstratlerde toplam antioksidan aktivite, serbest radikal giderme aktivite, metal şelatlama aktivite analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Elde edilen sonuçları, standart antioksidan olarak bilinen α -tokoferol, BHT ve BHA gibi standartların sonuçları ile karşılaştırmışlardır. Ayrıca, bu çalışmada kullanılan her bir meyvenin toplam fenolik bileşik miktarı ve askorbik asit miktarını da ölçmüşlerdir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre, çalışmada kullanılan üzüksü meyvelerden antioksidan aktivitesi en yüksek olan meyvenin toplam fenolik bileşik miktarının da en yüksek olduğu görülmüştür. Askorbik asit miktarı kuşburnunda fazla olmasına rağmen antioksidan kapasite bakımından ise daha düşük bir aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Buna göre gelebor'un (*Viburnum*

spp. L) antioksidan kapasitesinin, ahududu (*Rubus ideaus cv. Heritage*), mürver (*Sambucus spp.*) ve kuşburnu (*Rosa canina var.canina*) meyvelerinkinden daha yüksek olduğu sonucuna varmışlardır.

Anlı ve Kızılet (2006), çalışmalarında Ankara Üniversitesi deneme bağından 2003 hasat döneminde elde edilen merlot, pinot noir, syrah, carignan ve cabernet sauvignon üzüm çeşitlerinden, yine Ankara Üniversitesi şarap işletmesinde mikrovinifikasyon yöntemiyle üretilen şaraplarda *trans*-resveratrol, kuersetin, kateşin, epikateşin gibi antioksidan özellik gösteren fenolik bileşenleri GC-MS (gaz kromatografisi kütle spektrometresi) yöntemlerini kullanarak saptamışlardır. Çalışmada fenolik madde analizleri, Shimadzu Model QP 5000 GCMS cihazı ve 30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm boyutlarındaki TC-5 kapiler kolon ile yapılmıştır. Taşıyıcı gaz olarak 1,5 ml dak⁻¹ akış hızında helyum gazı kullanılmıştır. Kalitatif olarak kumarik asit, gallik asit, ferulik asit, kafeik asit, *trans*-resveratrol, epikateşin, kateşin ve kuersetin tayin edilmiştir. Kantitatif olarak ise, *trans*-resveratrol, epikateşin, kateşin ve kuersetin tayin edilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen örneklerde kateşin ve epikateşin düzeyinin yabancı ülkelerdeki eşdeğer örnek ortalamalarından daha düşük, kuersetin ve *trans*-resveratrol düzeyinin ise ortalama değerler gösterdiği belirlenmiştir. Nitekim, merlot, cabernet sauvignon ve pinot noir şaraplarıyla yapılan çalışmada *trans*-resveratrol miktarları 0.85 - 2.50 mg L⁻¹, kuersetin miktarları ise 2-5.26 mg L⁻¹ arasında saptanmış ve *trans*-resveratrol ve kuersetin miktarlarının çeşitler arasında benzer sınırlar içinde farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada, merlot, cabernet sauvignon ve pinot noir şaraplarında epikateşin düzeyleri sırasıyla; 50 mg L⁻¹, 25 mg L⁻¹ ve 82 mg L⁻¹ olup, şarap çeşitleri arasında epikateşin miktarı bakımından benzer şekilde önemli farklılıklar gözlenmiştir. Carignan şarabı üzerine yapılan bir araştırmada kateşin miktarının benzer şekilde geniş bir aralıkta (4.4-23.4 mg L⁻¹) değiştiği saptanmıştır. Genel olarak belirtilen çeşitlerin Ankara koşullarına iyi adapte oldukları, kaliteli şarap verdikleri, antioksidanları literatürlerdeki aralıklarda bulduklarını sonucuna varmış olup, diğer yandan GC-MS yönteminin HPLC ile yapılan benzer çalışmalara alternatif olduğu görüşünde bulunmuşlardır.

Gülçin ve Şerbetçi (2007), meyan (*Glycyrrhiza glabra* L.) bitkisinin antioksidan kapasitesinin belirlenmesi üzerinde çalışmışlardır. Meyan (*Glycyrrhiza glabra* L.) bitkisinin kök ve gövde kısımlarının su ve etanol ekstratlarının antioksidan aktivitesini

değerlendirmek için 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikal giderme aktivitesi, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH·) serbest radikal giderme aktivitesi, N,N-dimetil-p-fenilendiamin (DMPD•+) radikal giderme aktivitesi, süperoksit anyonradikali ($O_2^{\bullet-}$) giderme aktivitesi, ferrik tiyosiyanat metodu ile toplam antioksidan aktivite, potasyum ferriksiyanit indirgeme metodu ile toplam indirgeme kuvveti, Kuprak metodu ile kuprik iyonları (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesi, hidrojen peroksit giderme aktivitesi ve ferröz iyonları (Fe^{2+}) şelatlama aktivitesi çalışmışlardır. Mevcut çalışmada kullanılan meyan (*Glycyrrhiza glabra* L.) bitkisinin kök ve gövde kısımlarından elde edilen su ve etanol ekstraları etkili bir şekilde ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivite, Fe^{3+} - Fe^{2+} transformasyonu metoduna göre indirgeme kuvveti, Kuprak metoduna göre Cu^{2+} - Cu^+ indirgeme kuvveti, ferröz iyonları (Fe^{2+}) şelatlama kapasitesi, hidrojen peroksit giderme etkisi, DPPH, ABTS, DMPD ve $O_2^{\bullet-}$ radikal giderme aktivitesi sergilediğini gözlemlemişlerdir. Bu aktiviteler toplam antioksidan aktivite, indirgeme kuvveti tayinlerinde, ferröz iyonları (Fe^{2+}) şelatlama aktivitesinde, DPPH, ABTS ve DMPD radikal giderme aktivitesi tayinlerinde artan konsantrasyona bağlı olarak arttığını görerek, kullanılan bütün metotlarda meyan bitkisinin bütün ekstralarının genel itibarıyla α -tokoferol ve trolokstan daha etkili olduğunu bulmuşlardır. Sonuç olarak meyan (*Glycyrrhiza glabra* L.) bitkisinin kök kısmından elde edilen su ve etanol ekstralarının $30 \mu g ml^{-1}$ konsantrasyonunda linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonunu sırasıyla % 88.6 ve % 80.1 inhibe ettiğini, benzer şekilde meyan (*Glycyrrhiza glabra* L.) bitkisinin gövde kısmından elde edilen su ve etanol ekstralarının aynı konsantrasyonda linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonunu sırasıyla % 87.9 ve % 83.6 inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir. Diğer taraftan aynı konsantrasyonda α -tokoferol ve troloks linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonunu sırasıyla % 81.3 ve % 68.1 inhibe ettiklerini görmüşler ve ayrıca meyan (*Glycyrrhiza glabra* L.) bitkisinin kök ve gövde kısımlarının her iki ekstresinin de etkili bir şekilde DPPH, ABTS, DMPD ve $O_2^{\bullet-}$ radikal giderme aktiviteleri, toplam antioksidan aktivite, indirgeme kuvveti, hidrojen peroksit giderme ve metal şelatlama aktivitesi gösterdiğini belirtmişlerdir.

Çiğremiş ve Erdağ (2007), *Marrubium cordatum* (Labiatae) bitkisinin antioksidan kapasitesinin 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH)/nitrik oksit (NO) radikal süpürücü aktiviteler, indirgeyici güç ve toplam fenolik madde analizi gibi kurulmuş

çeşitli *in vitro* sistemlerle Labiatae familyasına ait *Marrubium cordatum*'un metanol özütünün antioksidan özelliklerini incelemişlerdir. Deneyler sonucunda elde edilen verilerden ortamdaki DPPH radikalinin %50' sini süpüren *Marrubium cordatum* bitkisinin IC₅₀ değerinin 263 µg ml⁻¹ olduğunu ve NO radikalinin %50'sini süpüren *Marrubium cordatum* bitkisinin IC₅₀ değerinin ise 303 µg ml⁻¹ olduğunu tespit etmişlerdir. Bitkinin aynı zamanda doza bağlı olarak bir indirgeyici güç sergilediği ve yapısında içermiş olduğu polifenolik maddeler etkisiyle antioksidan yeteneğinin olduğu yorumunu yapmışlardır. Netice olarak, *M. cordatum*'un anlamlı bir şekilde DPPH ve NO radikallerini doza bağlı konsantrasyonlarda inhibe ettiğini ve yüksek kapasitede indirgeyici güç aktivitesi sergilediğini görmüşlerdir. *In vitro* modellerden elde edilen bu veriler *M.cordatum*'un metanol özütlerinin antioksidan özelliği olduğunu göstermiştir.

Ting Sun ve ark. (2007), kuşkonmaz, brokoli ve bunların öz suyundaki antioksidan aktivitelerini 2.20 DPPH, 2.20 ABTS ve karoten beyazlaştırıcı tahliller kullanılarak ölçmüştür. Kuşkonmazın brokoliye göre daha büyük bir antioksidan faaliyet gösterdiğini ve yine kuşkonmaz suyunun brokoli suyuna göre daha büyük antioksidan faaliyete sahip olduğunu bulmuşlardır. Kuşkonmaz ve brokolinin metanol ve aseton özünün ise su özlerine göre çok belirgin büyüklükte antioksidan içerdiğini bulmuş, ancak toplam fenolik içerikte belirli bir fark görmemişlerdir. Bununla birlikte kuşkonmazın brokoliye göre daha fazla flavonoid içerdiğini, kuşkonmaz ve brokoli özlerindeki antioksidan aktivitesinin bunların flavonoid içerikleri ile doğrusal bir ilişki gösterdiğini bulmuşlardır.

Erkan ve ark. (2008), deneylerinde üç saf bileşen olan carnosic acid, rosmarinic acid ve sesamol ve iki bitki özü olan biberiye (rosemary) özü ve siyahtohum (blackseed) uçucu yağı DPPH ve ABTS + radikal-süpürme metodu ve ferrik tiyosiyanat metodunu uygulayarak antioksidan aktiviteleri ölçmüşlerdir. Toplam üç test yöntemlerinde biberiye özünün siyahtohum (blackseed) uçucu yağına göre daha yüksek antioksidan faaliyette bulunduğunu ispatlamışlardır. Saf bileşenlerin antioksidan faaliyetlerinin yöntemleri farklı testler içerisinde değişim gösterdiğini, bunun her bir elementin yapısal özelliklerine dayandırmışlardır. Biberiye (rosemary) özü ve siyahtohum (blackseed) uçucu yağı fenolik içeriği de saptamışlar, biberiye (rosemary) özünün siyahtohum (blackseed) uçucu yağına göre daha yüksek fenolik içeriğe sahip olduğu bulmuşlardır.

Bu olguyu biberiye (rosemary) özünün daha yüksek antioksidan faaliyete sahip olmasını açıklamakta kullanmışlardır.

Locatelli ve ark. (2009), Fındık kabuğunun toplam antioksidan faaliyeti (Nocciola Piemonte PGI) ve farklı sıcaklık koşullarındaki etkileri üzerinde çalışmışlardır. Fındık çekirdeğini saran ince kahverengi kabuk genellikle ısınma işleminden sonra zengin fenolik yan ürünler çıkardığından, bu çalışmada ısınmış “Nocciola Piemonte PGI” fındık kabuğundan elde edilen fenolik özün toplam antioksidan faaliyetini nitelendirmeyi amaçlamışlardır. Farklı kökenden çözümlenici (metanol, asidik metanol, etanol, asidik etanol ve aseton/su) ve farklı protokoller kullanmışlar, farklı sıcaklık derecelerinin (180 °C/10 dk. ve 180 °C/20 dk.) etkilerini araştırmışlardır. Ayrıca fındık kabuğundaki fenoller için önemli antioksidan özellikleri ispat eden bu çalışmada DPPH ve ABTS + koklu gaz çıkarma metotları, demir iyonu kıskacılama faaliyetleri ve lipid peroksidasyonu yasaklaması araştırılmıştır. Görünen antiradikal faaliyetlerin içerdiği ana mekanizma toplam fenol içeriği ($r = 0.8798$ ve 0.8285 için DPPH ve ABTS + ayrı ayrı ölçüm). ile sıkı biçimde ilişkili bulmuşlardır.

Shukla ve ark. (2009), çalışmalarında *Caesalpinia bonducella* çekirdeğinin etanol özünün antioksidan faaliyeti ve toplam fenol içeriğini araştırmışlardır. Özün (20, 40, 50, 100 and 200 lg/ml) DPPH faaliyetinin dozun çeşitli biçimlerinde arttırmış ve askorbik asit (% 64.26–82.58) ile karşılaştırıldığında % 38.93–74.77 aralığında bulmuşlardır. Etanolik özün ve DPPH radikal süpürme deneyi içindeki askorbik asitin IC50 değerini ise sırasıyla 74.73 ve 26.68 lg/ml olarak bulmuşlardır. *Caesalpinia bonducella*nın etanolik özünün toplam fenolik içeriği Folin–Ciocalteu reaktifi kullanılarak 62.50 mg/g olarak ölçmüşler ve değeri bu standart gallik asidin referansı ile karşılaştırıldığında ise önemli derecede yüksek olduğunu görmüşlerdir. Etanol özün ayrıca hidroksil radikali, nitrik oksit, süperoksit anyonu IC50 değerini ise sırası ile 109.85, 102.65 ve 89.84 lg/ml olarak, bununla birlikte IC 50 değerine göre standart askorbik asiti sırası ile 70.79, 65.98 ve 36.68 lg/ml belirlemişlerdir. Sonuç olarak bu çalışmada *C. Bonducella* nın doğal antioksidan aracı olarak kullanılması için önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermişlerdir.

Jaitak ve ark. (2009), çalışmalarında *Potentilla fulgens* Lodd’un kökünden elde edilen metanol öz, parça ve ayrıştırılmış bileşimin antioksidan faaliyetlerini ABTS, DPPH ve FRAP deneyleri ile ölçmüşlerdir. Çalışmada NMR ve kütle spektrumu

temelinde PF1 epicatechin olarak nitelendirilirken PF-2 yeni bir flavanoid olarak karakterize edilmiş ve Potifulgene olarak tanımlanmıştır. Bitkinin kök tozunu metanol/su (80:20) ile soğuk özleştirme yapmış ve sonra etil asetat, butanol ve sulu fraksiyon ile daha ileri parçalara ayırmışlardır. Üç bölüm (etil asetat, butanol ve su fraksiyonu) ve toplam sulu metanolik öz içinde, TEAC (mM Trolox equivalent/mg extract) açısından butanol fraksiyonun iyi bir süpürücü yani güçlü bir antioksidan faaliyete sahip olduğunu görmüşlerdir. (2.54 - 0.69, 2.41 - 0.53, 3.57 - 0.05 mM Trolox equivalent/mg extract) (ABTS, DPPH ve FRAP deneylerine göre) Özün kimyasal bileşenlerini, toplam polifenol bileşeni (TPC) olarak çalışmışlar, 20.61 - 0.38 ile 33.28 - 0.11 mg/g gallik asit eşdeğer aralığında bulmuşlardır. Ayrıca polifenoller ve antioksidan aktivitesi arasında önemli ilişkiyi bularak bu öz ve parçanın antioksidan faaliyetleri içindeki fenolik katılımı göstermişlerdir. ABTS, DPPH ve FRAP deneyleri ile yeni flavanoid (Potifulgene) in antioksidan aktivitesini 6.85 - 0.38, 4.24 - 0.41, 5.35 - 0.53 epicatechin antioksidan aktivitesinden 2.13 - 0.05, 1.50 - 0.02, 1.57 - 0.03 yüksek şekilde bulmuşlardır.

3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalar sırasında aşağıdaki kimyasal maddeler kullanılmıştır. Kimyasal maddeler kullanılmadan önce herhangi bir saflaştırma işleminden geçirilmemiştir. Kimyasal maddelerin adı, formülü, alındıkları firma ve katalog numaraları aşağıda verilmiştir.

Kimyasal madde adı

Firma adı ve katalog numarası

Sodyum karbonat (Na_2CO_3)	Merck 106392
Folin-Ciocaltaeu reaktifi	Merck 109001
Tween20($\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$)	Merck 109280
Amonyum tiyosiyanat (NH_4SCN)	Merck 101213
Demir klorür tetra hidrat ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	Merck 103861
Metanol (CH_3OH)	Merck 106009
Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)	Merck 100983
Etil asetat ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$)	Merck 109623
DPPH (1,1-difenil-2-pikril-hidrazil) [$(\text{O}_2\text{N})_3\text{C}_6\text{H}_2\text{NHN}(\text{C}_6\text{H}_5)_2$]	Aldrich 28.168-9
Linoleik Asit($\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_2$)	Merck 111616
Hidroklorik asit (HCl)	Merck 100314
Dietileter [$(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$]	Aldrich 45.515-6
Gallik Asit [$(\text{OH})_3\text{C}_6\text{H}_2\text{CO}_2\text{H}$]	Aldrich 14.791-5
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	Merck 105108

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışma süresince kullanılan cihazlar ve özellikleri aşağıda verilmiştir.

Cihazın adı

Özellikleri (Marka/Model)

UV/Vis spektrofotometre	UV-1208 SHIMADZU
Ultra saf su cihazı	New Human Power I model
pH metre	İnoLab wtw serisi
Analitik terazi	Sartorius BL210S
Etüv	Nüve FN 400

3.2.Yöntem

3.2.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

- a) HCl : 1.2 N'lik HCl (a/h) sudaki çözeltisi %50'lik MeOH'de hazırlandı.
(HCl d=1.19 g/cm³ , %37'lik)
- b) Na₂CO₃ : %20'lik (a/h) sudaki çözeltisi hazırlandı.
- c) Linoleik asit emülsiyonu : 0.28 gr.linoleik asit, 0.28gr Tween 20, 50 ml 0.02 M fosfat tamponu(pH= 7)'nun karıştırılmasıyla hazırlandı.
- d) FeCl₂.4H₂O : 20mM'lık , %3,5 HCl içindeki çözeltisi hazırlandı.
- e) NH₄SCN : %30'luk sudaki çözeltisi hazırlandı.
- f) Folin-Ciocaltaeu : %10'luk (h/h) sudaki çözeltisi hazırlandı.
- g) KH₃OH : % 70'lik (h/h) CH₃OH'ın sudaki çözeltisi hazırlandı.
- h) Gallik asit : 0.1 , 0.2 , 0.4 , 0.5 ve 0.6 mg ml⁻¹'lik sudaki çözeltileri hazırlandı.
- i) DPPH çözeltisi : 0.05 , 0.10 , 0.15 , 0.20 ve 0.25 mg ml⁻¹'lik sudaki çözeltileri hazırlandı.

3.2.2.Numunelerin Hazırlanması

Çalışmada kullanılacak bitki numuneleri iyice kurutulduktan sonra toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilmiş her numuneden 30 g alınarak petrol eteri ile 30 - 40 °C'de 30 dak. süreyle ekstrakte edilmiştir. Ekstraktlar petrol eteri uzaklaştırıldıktan sonra 3 kısma ayrılmıştır. Birinci kısım % 70'lik MeOH ile 40 °C 'deki su banyosunda 30 dakika (4 kez) ekstre edilmiş, süzüntüler 40 °C'de alçak basınç altında metanolden kurtarılmıştır. İkinci kısım da aynı şekilde % 70'lik MeOH ile 40 °C'deki su banyosunda 30 dakika (4 kez) ekstre edildikten ve süzüntüler 40 °C'de alçak basınç altında metanolden kurtarıldıktan sonra sulu kısım EtOAc ile sıvı-sıvı ekstraksiyonuna tabi tutulmuş (4 kez) ve ayrılan EtOAc fazı yoğunlaştırılmıştır. Üçüncü kısım ise önce 1.2 N HCl (%50 MeOH) ile 40°C 'deki su banyosunda 1 saat (4 kez) hidroliz edilmiş, metanol 40 °C'de alçak basınç altında uzaklaştırıldıktan sonra sulu kısım EtOAc ile sıvı-sıvı ekstraksiyona tabi tutulmuş (4 kez) ve EtoAc fazı yoğunlaştırılarak ayrılmıştır. Bu şekilde her 4 bitki için elde edilen 3 ekstre de aktivite tayinlerinde kullanılmıştır.

3.2.3. Toplam Fenolik Madde Miktarlarının Belirlenmesi

Ekstreler içindeki toplam fenol miktarları Folin-Ciocaltaeu Metodu kullanılarak kolorimetrik olarak tayin edilmiştir (Singleton ve ark., 1999). Standart fenolik bileşik olarak gallik asit kullanılmıştır. Bunun için önce standart bir grafik çizilmiştir. Bu amaçla, 50 mg gallik asit 50 ml saf suda çözülerek 1 mg ml⁻¹'lik stok çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden 2.5, 5.0, 10.0, 12.5 ve 15.0 ml alınarak saf su ile 25 ml'ye tamamlanmıştır. Üzerlerine 0.5 ml Folin-Ciocaltaeu reaktifi (%10'luk, h/h, suda) ve 3 dakika sonra da 7.5 ml (% 20'lik, a/h, suda) Na₂CO₃ çözeltisi eklenerek 2 saat süreyle oda sıcaklığında karıştırılmışlardır. Sonra numunelerin absorbanları 760 nm'de saf suya karşı ölçülmüştür. Daha sonra, bitki örneklerinden 1'er mg alınarak 1'er ml ekstrakte edildikleri çözeltilerde çözülmüşlerdir. Üzerlerine yine 0.5'er ml Folin-Ciocaltaeu reaktifi (%10'luk, h/h, suda) ve 3 dakika sonra da 7.5 ml (% 20'lik, a/h, suda) Na₂CO₃ çözeltisi eklenerek 2 saat süreyle oda sıcaklığında karıştırılmışlardır. Sonra numunelerin absorbanları 760 nm'de ölçülmüştür. Ölçülen absorbanlar çizilen gallik asit kalibrasyon eğrisinden okunarak, toplam fenolik madde miktarları gram ekstrede mg gallik asite eşdeğer olacak şekilde hesaplanmıştır.

3.2.4. Toplam Antioksidan Aktivitesi Tayini

Toplam antioksidan aktivite tayini Saha ve ark., 2004'e göre ferrik tiyosiyanat metodu kullanılarak yapılmıştır. Bu yöntemde, linoleik asidin oksidasyonu sonucu oluşan peroksit formu reaksiyon ortamına katılan Fe²⁺'yi Fe³⁺'e yükseltmektedir. Fe³⁺'ün SCN ile oluşturduğu kompleksin 500 nm'deki absorbanı spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Bu amaçla linoleik asit emülsiyonu 0,28 gr.linoleik asit, 0,28 gr. Tween 20 ve 50 ml 0,02 M fosfat tamponunun (pH 7.0) karıştırılması ile hazırlanmıştır. Reaksiyon cam erlende 37 °C'de mümkün olduğu kadar karanlıkta gerçekleştirilmiştir. Elde edilen özütlerden 4'er mg alınarak üzerlerine 4'er ml ekstrakte edildikleri çözeltilerden eklenmiştir. 4.1 ml linoleik asit emülsiyonu ve 8 ml pH'ı 7.4 olan 0,04 M fosfat tamponu ve 3.9 ml saf su eklenmiştir. Hazırlanan karışımlar oksidasyon işlemini kolaylaştırmak amacıyla 40 °C'de su banyosunda inkübe edilmiştir. Bu hazırlanan stok çözeltilerden ilk hazırlandığı andan itibaren 24 saat ara ile 100'er µL alınıp 9.7'şer ml etil alkol, 100'er µL demir(II) klorür (20 mM % 3.5'luk HCl içinde) ve 100'er µL

amonyum tiyosiyanat (% 30'luk) ilavesi ile oluşan komplekslerin 500 nm'de absorbansları ölçülmüştür.

Antioksidan aktivitesi ve % peroksidasyon inhibisyonu (%PI) olarak ifade edilerek aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$\% PI = \left[1 - \left(\frac{\text{Örneğin Absorbans}}{\text{Kontrolün Absorbans}} \right) \right] \times 100$$

3.2.5. DPPH Üzerinden Serbest Radikal Süpürücü Etki Tayini

Öncelikle DPPH'nin kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Bu amaçla DPPH'nin 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 ve 0.25 mg ml⁻¹'lik standart çözeltileri hazırlanmıştır. Daha sonra, karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika bekletilen çözeltilerin 517 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Bitki özütleri, kör ve kontrol de aşağıdaki çizelgede gösterildiği şekilde hazırlanmıştır.

	Kör	Kontrol	Özüt
0.05 M'luk Asetat tamponu (pH=5.5)	2 ml	2 ml	2 ml
Metanol	3 ml	2 ml	1.9 ml
Özüt	---	---	0.1 ml
0.3 mM DPPH	---	1 ml	1 ml

Bitki özütlerinden 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 ve 0.25 mg alınıp ekstrakte edildikleri çözeltilerin 1'er ml'sinde çözülmüşler ve bu çözeltilerden 0.1'er ml alınmıştır. Yukarıdaki çizelgedeki şekilde hazırlanan çözeltiler oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. 30 dakika sonunda özütün, körün ve kontrolün absorbansları 517 nm'de köre karşı okunmuştur. DPPH'ın inhibisyon yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Shyu ve Hwang, 2002).

$$\% \text{ Süpürücü Etki} = [A_0 - (A - A_b) / A_0] \times 100$$

A_0 = Kontrolün absorbansı

A = Özütün absorbansı

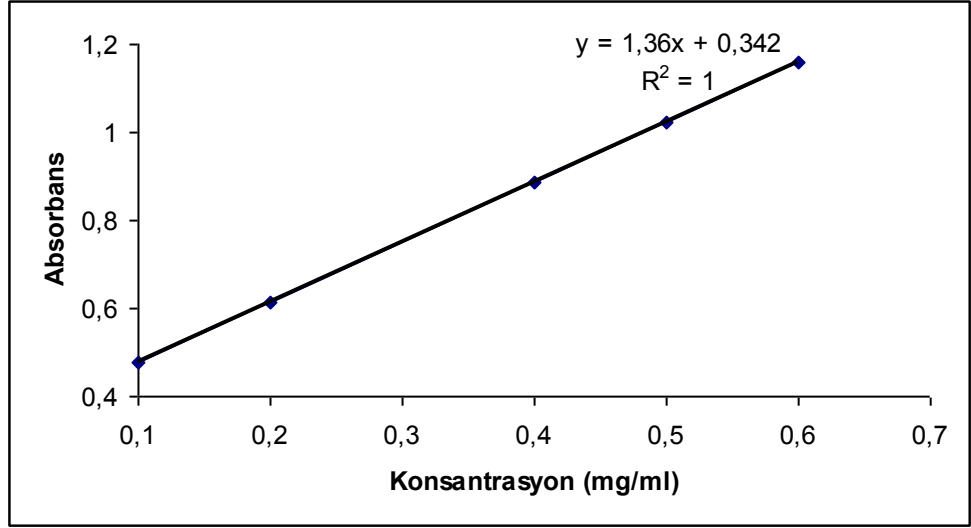
A_b = Körün absorbansı

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Yapılan tüm deneysel çalışmalar, bu teze kaynak oluşturan önceki çalışmalar ve elde edilen bulgular tartışılmıştır. Araştırma bulguları ve tartışma, materyal ve metot kısmındaki alt başlıklara uygun olarak verilmiştir.

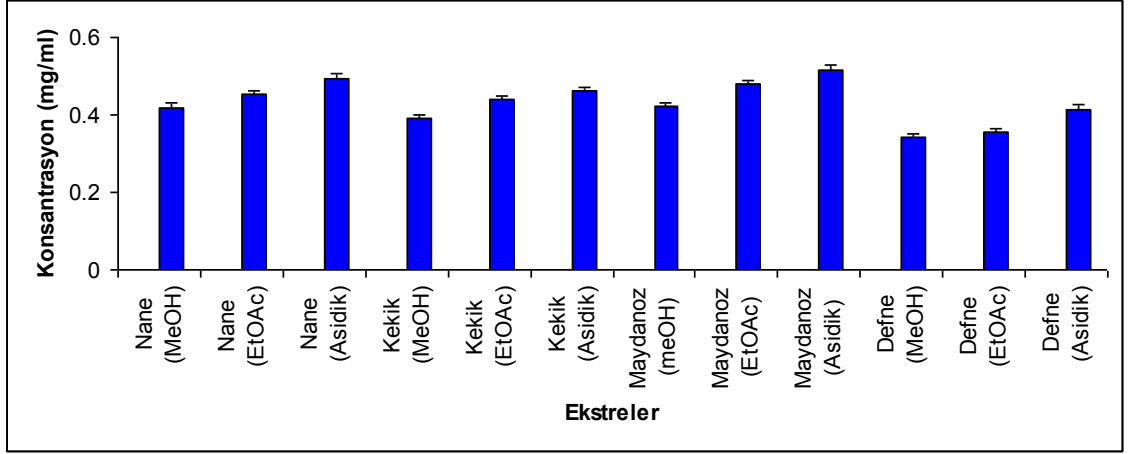
4.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini Sonuçları

Örneklerin toplam fenolik madde miktarı değerleri gallik asit eşdeğeri olarak hesaplanmıştır. Bunun için gallik asit derişimlerine karşı absorbanlar ölçülerek bir standart çalışma grafiğı oluşturulmuştur (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Standart gallik asit kalibrasyon grafiğı

Tüm örneklerin Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak elde edilen toplam fenolik madde miktarı değerleri karşılaştırmalı olarak Şekil 4.2’de verilmiştir.

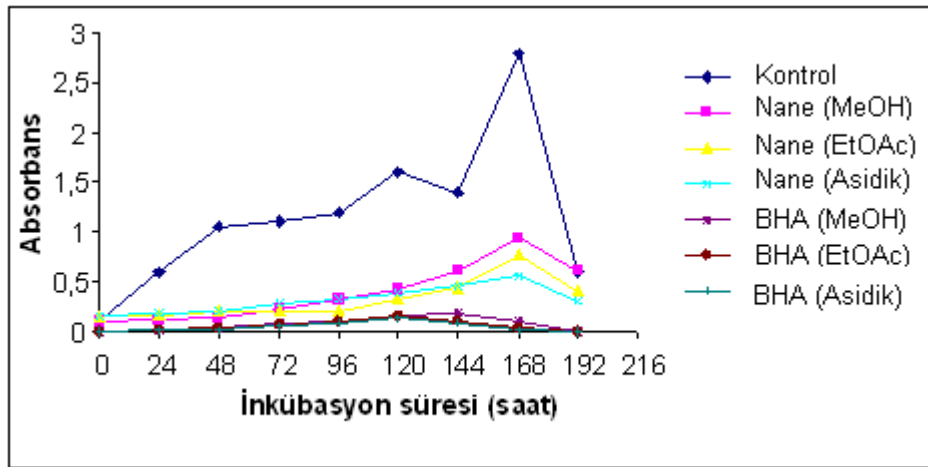


Şekil 4.2. Örneklerin toplam fenolik madde miktarı değerleri

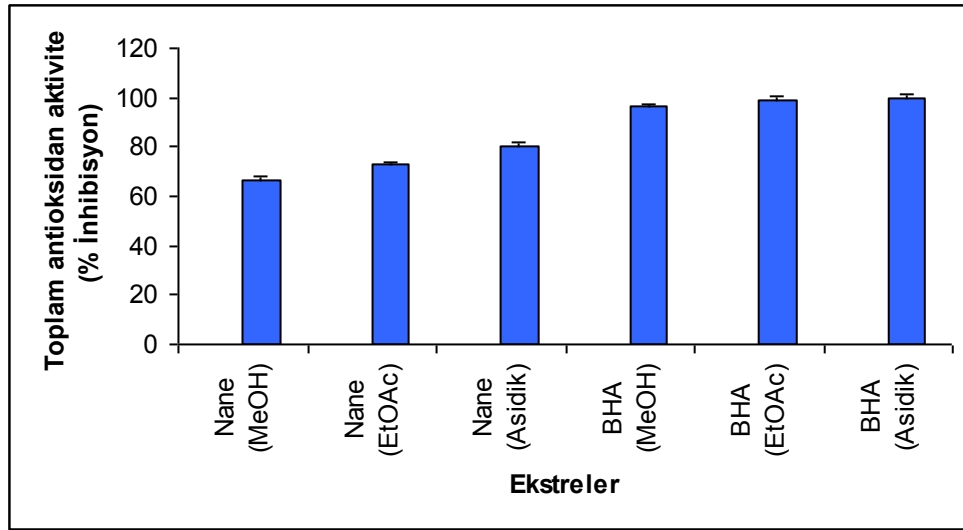
Şekilden de görüleceği gibi, tüm örneklerden asidik hidroliz ile hazırlanan özütlerde toplam fenolik madde içeriği daha yüksek bulunmuştur. İncelenen bitkiler içerisinde de en yüksek fenolik madde miktarı maydanozda saptanmıştır.

4.2. Toplam Antioksidan Aktivite Tayini Sonuçları

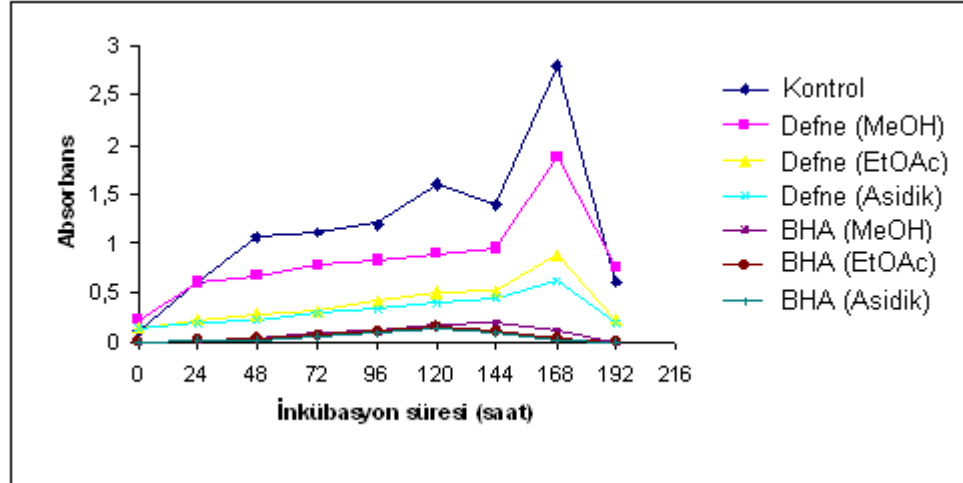
Toplam antioksidan aktivitesi ölçülen tüm örneklerin zamana bağlı absorban ölçümleri ve hesaplanan linoleik asit peroksidasyonunun inhibisyon yüzdeleri Şekil 4.3 – 4.10’da gösterilmiştir.



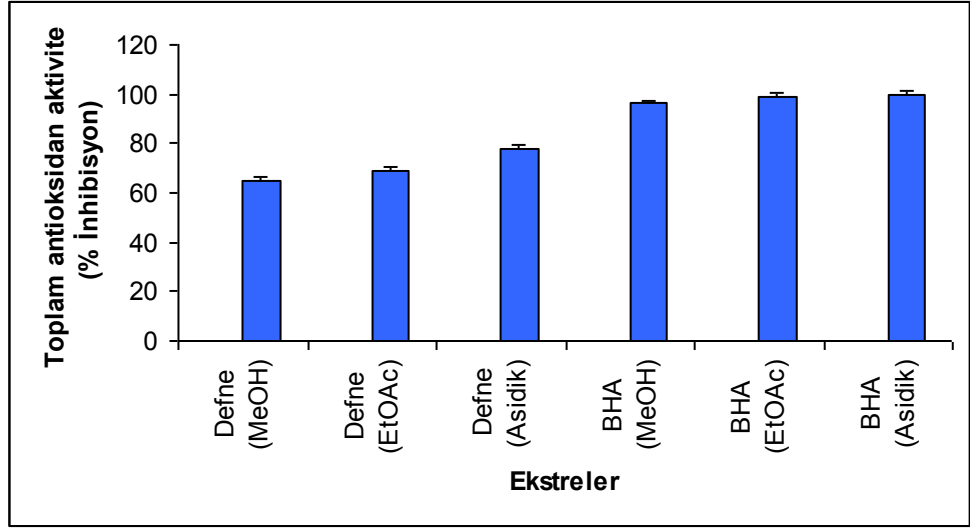
Şekil 4.3. Nane örneğinin linoleik asit peroksidasyonunun zamanla değişimi



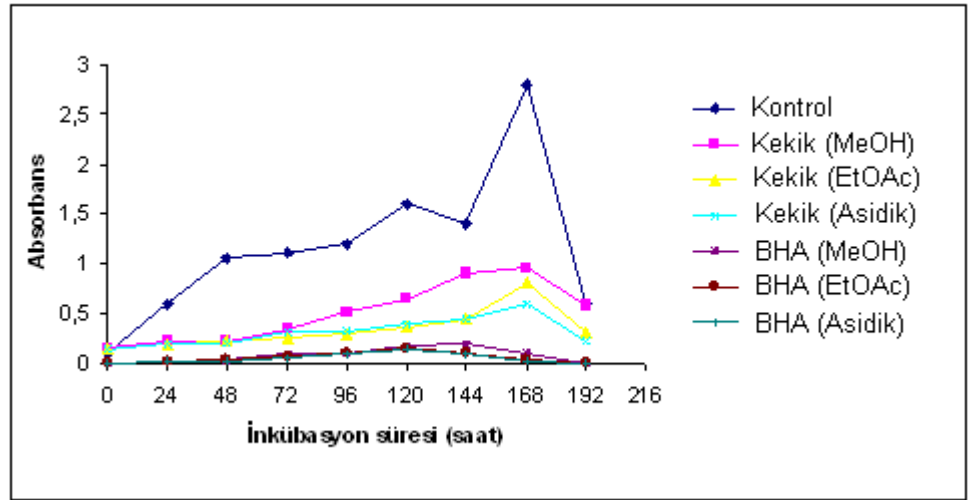
Şekil 4.4. Nane örneği ekstralarının % inhibisyon değerlerinin kendi aralarında ve BHA ile karşılaştırılması. Grafik 168 saat sonundaki inhibisyon verileri kullanılarak oluşturulmuştur.



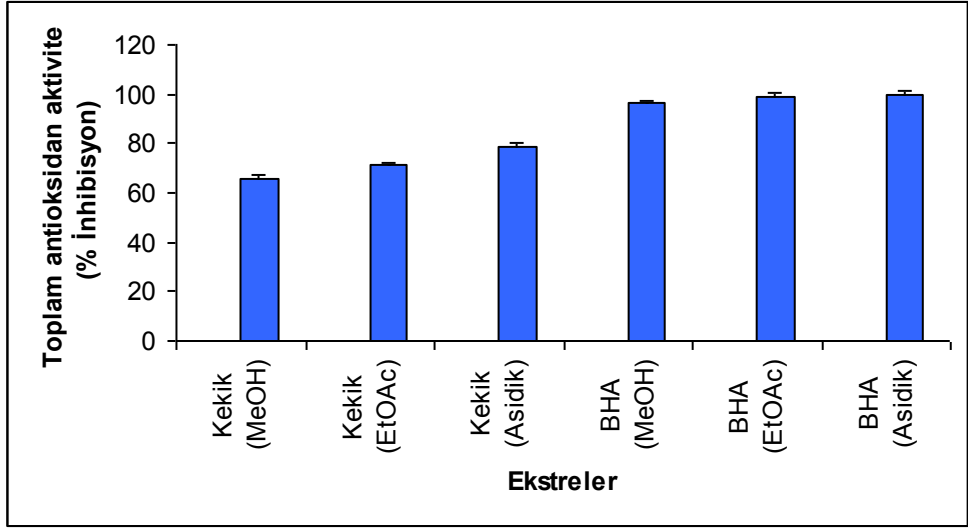
Şekil 4.5. Defne örneğinin linoleik asit peroksidasyonunun zamanla değişimi



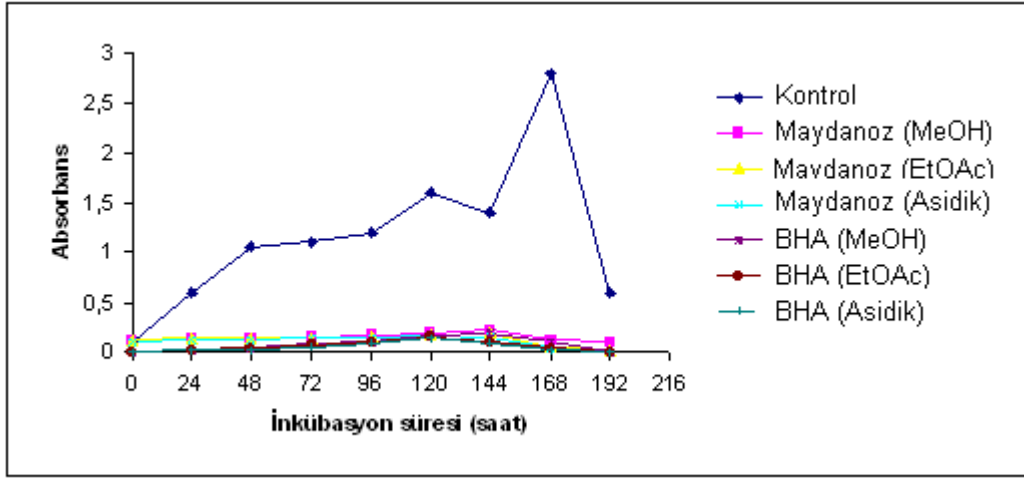
Şekil 4.6. Defne örneği ekstralarının % inhibisyon değerlerinin kendi aralarında ve BHA ile karşılaştırılması. Grafik 168 saat sonundaki inhibisyon verileri kullanılarak oluşturulmuştur.



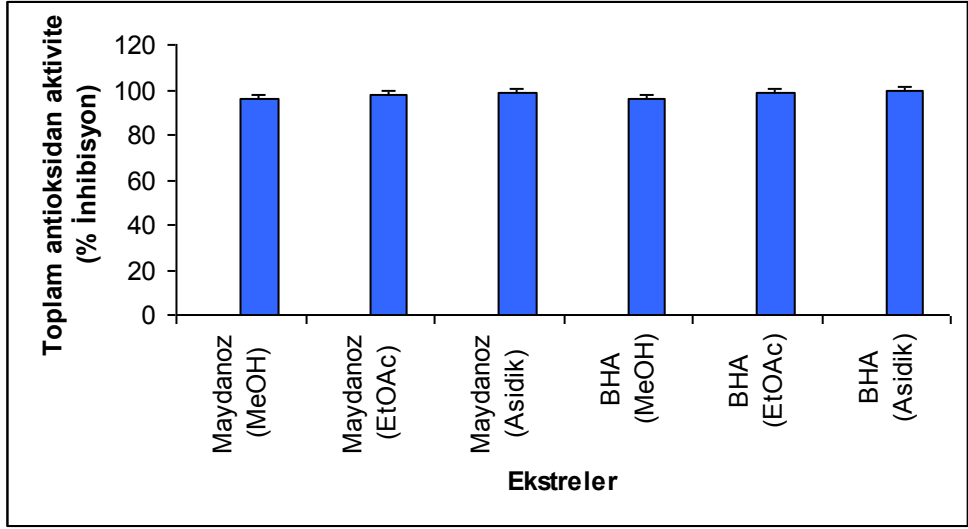
Şekil 4.7. Kekik örneğinin linoleik asit peroksidasyonunun zamanla değişimi



Şekil 4.8. Kekik örneği ekstralarının % inhibisyon değerlerinin kendi aralarında ve BHA ile karşılaştırılması. Grafik 168 saat sonundaki inhibisyon verileri kullanılarak oluşturulmuştur.

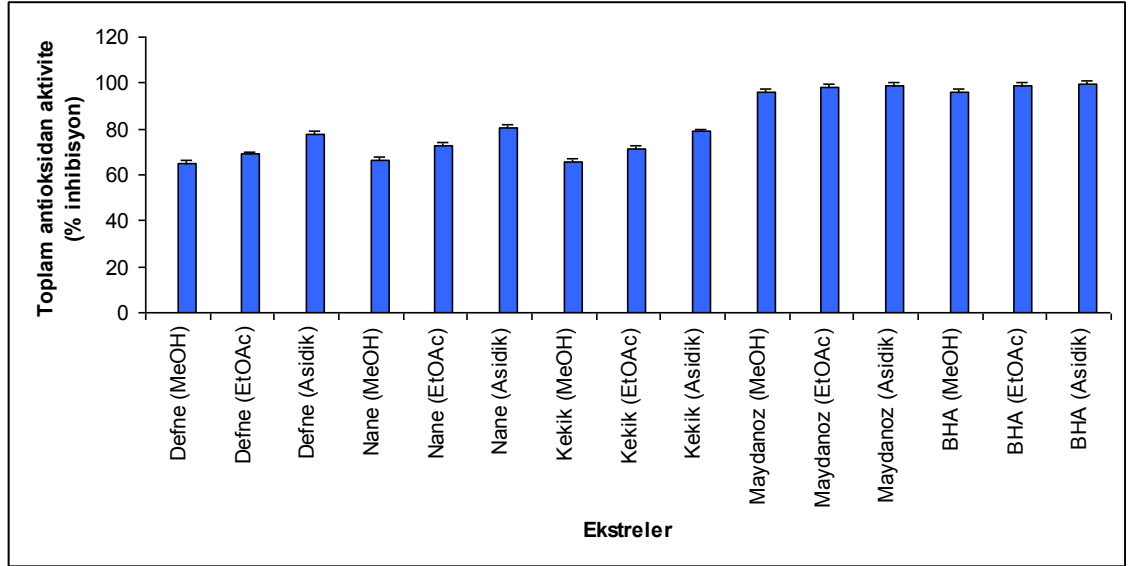


Şekil 4.9. Maydanoz örneğinin linoleik asit peroksidasyonunun zamanla değişimi



Şekil 4.10. Maydanoz örneği ekstralarının % inhibisyon değerlerinin kendi aralarında ve BHA ile karşılaştırılması. Grafik 168 saat sonundaki inhibisyon verileri kullanılarak oluşturulmuştur.

Tüm örneklerin % inhibisyon değerlerini kendi aralarında ve BHA ile karşılaştırmak amacıyla Şekil 4.11 verilmiştir.

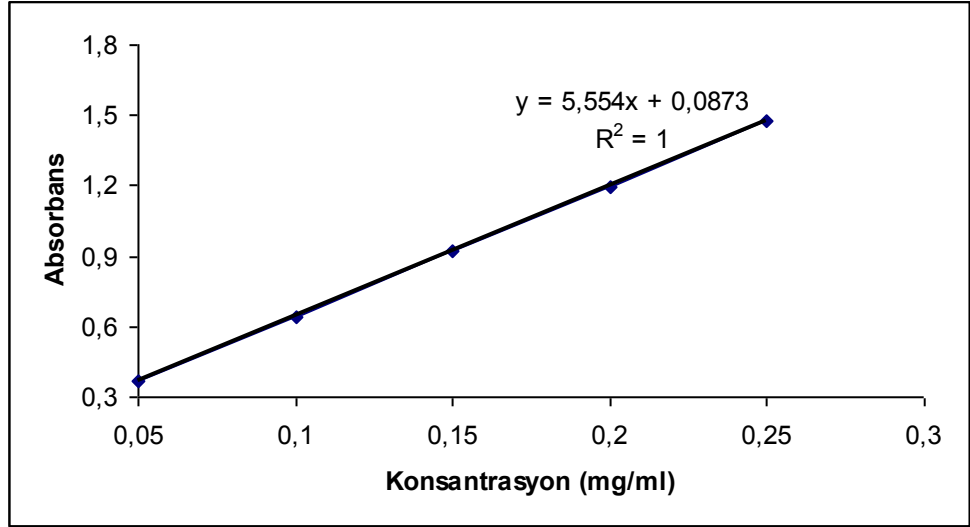


Şekil 4.11. Tüm örneklerin % inhibisyon değerlerinin kendi aralarında ve BHA ile karşılaştırılması. Grafik 168 saat sonundaki inhibisyon verileri kullanılarak oluşturulmuştur.

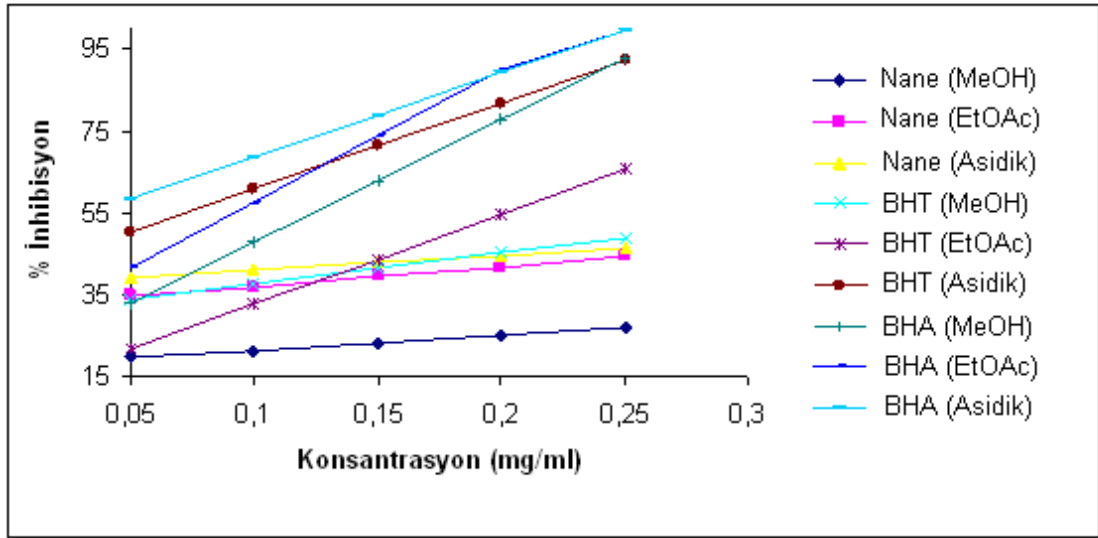
Tüm örneklerden asidik hidroliz ile hazırlanan özütlerde, yüzde inhibisyon değerlerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. İncelenen bitkilerin yüzde inhibisyon değerleri kendi aralarında ve sentetik bir antioksidan olan BHA ile karşılaştırıldığında BHA >maydanoz > nane > kekik > defne şeklinde olduğu belirlenmiştir.

4.3. DPPH Radikal Süpürücü Aktivite Tayini Sonuçları

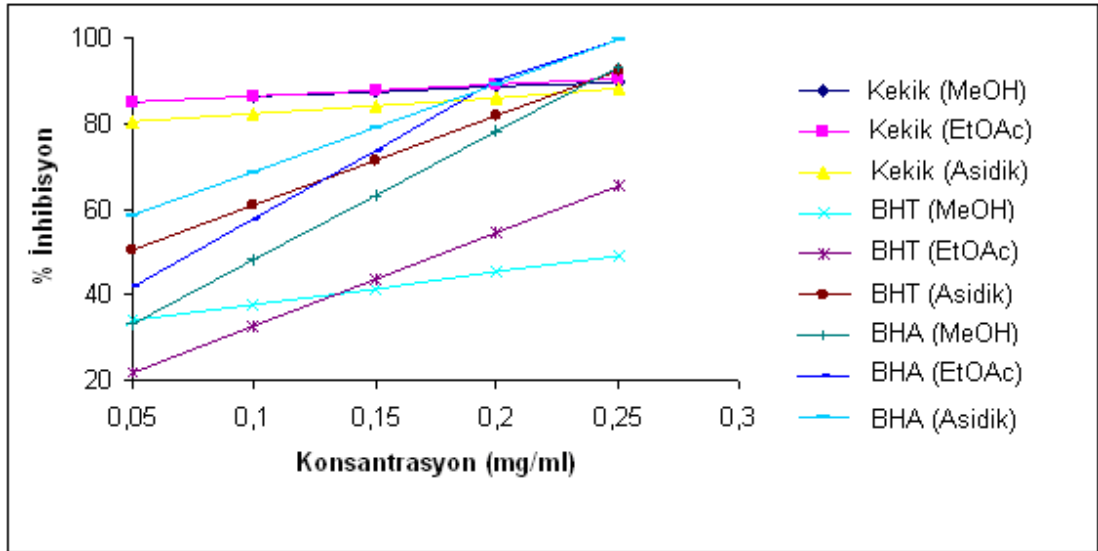
DPPH radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) doğal olmayan kararlı bir radikal olup antioksidan aktivite tayinlerinde standart olarak kullanılmaktadır. Şekil 4.11’de DPPH radikal giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart DPPH grafiği verilmiştir. Şekil 4.12 – 4.15’de örneklerden elde edilen ekstrelerin DPPH radikali süpürücü aktivitesinin bir ölçüsü olarak % inhibisyon değerleri verilmiştir. Yüzde inhibisyon değeri ne kadar yüksekse antioksidan etki de o kadar yüksek kabul edilmektedir.



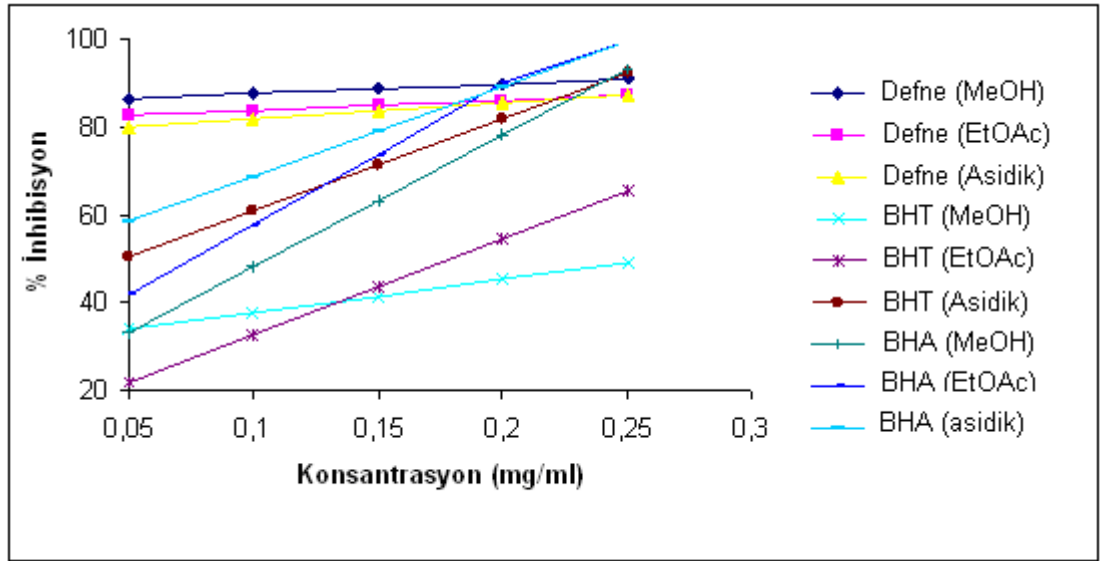
Şekil 4.12. DPPH radikal giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart DPPH grafiği



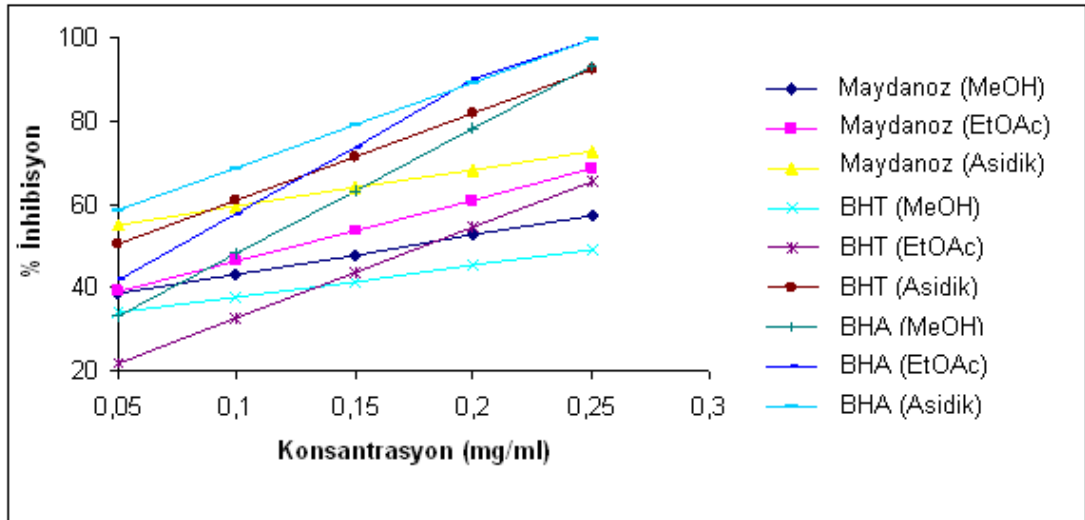
Şekil 4.13. Nane örneği ekstralarının DPPH radikal süpürücü aktiviteleri



Şekil 4.14. Kekik örneği ekstralarının DPPH radikal süpürücü aktiviteleri



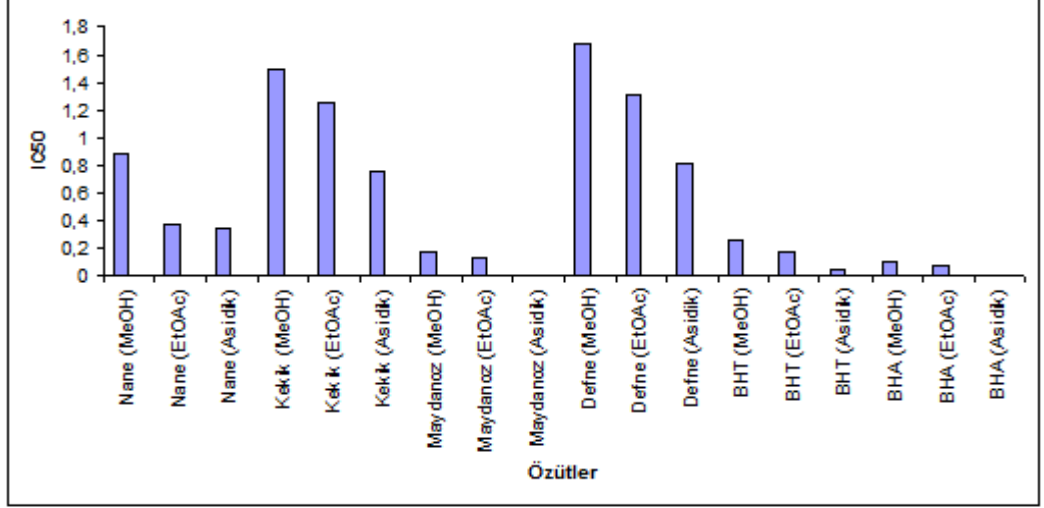
Şekil 4.15. Defne örneği ekstrelerinin DPPH radikal süpürücü aktiviteleri



Şekil 4.16. Maydanoz örneği ekstrelerinin DPPH radikal süpürücü aktiviteleri

DPPH radikal süpürücü etkisinin bir diğer göstergesi de IC_{50} değerleridir. Bu değer belirli bir DPPH derişiminde mevcut DPPH'in yarısının sönümlenmesi için gerekli olan antioksidan miktarı olarak tanımlanmaktadır ve antioksidan miktarlarına karşı % inhibisyon değerlerinin çizildiği grafikten elde edilen denklemde $y=50$

konularak hesaplanmaktadır (Brand-Williams ve ark., 1995). Tüm örnekler için IC_{50} değerleri hesaplanarak Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



Şekil 4.17. Tüm örnekler için IC_{50} değerleri

Şekilden de görüleceği gibi, tüm örneklerden asidik hidroliz ile hazırlanan özütler en yüksek DPPH radikali giderme aktivitesi göstermiştir. Tüm örnekler için elde edilen IC_{50} değerleri sentetik birer antioksidan olan BHT ve BHA'nın IC_{50} değerleri ile karşılaştırıldığında, maydanozun her 3 yöntemle de hazırlanan özütlerine ait IC_{50} değerlerinin BHT'ye ait değerlerden düşük olduğu, asidik hidroliz ile hazırlanan maydanoz özütünün IC_{50} değerinin, BHA'ya ait IC_{50} değerine de çok yakın olduğu görülmektedir. Bu da, maydanozun oldukça kuvvetli bir antioksidan olduğunu göstermektedir.

4.4. Korelasyon Analizi Sonuçları

Fenolik bileşik miktarları ile radikal süpürücü etkiler arasındaki, fenolik bileşik miktarları ile yüzde inhibisyon değerleri arasındaki ve radikal süpürücü etkiler ile yüzde inhibisyon değerleri arasındaki korelasyonlar incelenmiştir. Hesaplanan korelasyon katsayıları Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Çizelgeden de görüleceği gibi, elde edilen korelasyon katsayılarının tümü 0.7545'den daha büyüktür. Bu da, gerek fenolik bileşik miktarları ile radikal süpürücü etkiler arasında, gerek fenolik bileşik miktarları ile yüzde

inhibisyon değerleri arasında, gerekse de radikal süpürücü etkiler ile yüzde inhibisyon değerleri arasında kuvvetli bir korelasyonun olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.1. Korelasyon Katsayıları

Bitki Örnekleri	Korelasyon Katsayıları		
	Fenolik Madde- IC ₅₀ Arasındaki	Fenolik Madde- % İnhibisyon Arasındaki	IC ₅₀ - % İnhibisyon Arasındaki
Nane	0.861	0.999	0.850
Kekik	0.908	0.950	0.993
Maydanoz	0.931	0.999	0.910
Defne	0.971	0.996	0.989

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

İncelenen nane örneklerinde gallik aside eşdeğer olarak hesaplanan toplam fenolik madde içeriği $0.419 - 0.495 \text{ mg ml}^{-1}$, kekik örneklerinde $0.389 - 0.462 \text{ mg ml}^{-1}$, maydanoz örneklerinde $0.421 - 0.517 \text{ mg ml}^{-1}$ ve defne örneklerinde $0.341 - 0.415 \text{ mg ml}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Tüm örneklerden asidik hidroliz ile hazırlanan özütlerde toplam fenolik madde içeriği daha yüksek bulunmuştur. İncelenen bitkiler içerisinde fenolik madde miktarlarının en yüksekte en düşüğe doğru maydanoz > nane > kekik > defne şeklinde olduğu belirlenmiştir.

Maydanoz, kekik, defne ve nane ekstraktlarının tayini için temel olarak iki yöntem kullanılmıştır. Bunlardan birincisi örneğin linoleik asit peroksidasyonunu önleme yeteneğini ölçen toplam antioksidan aktivite tayini yöntemi, diğeri ise örneğin radikal süpürücü etkisini ölçen DPPH yöntemidir. Birinci yöntem hidrojen atomu verme yeteneğini ölçen HAT sınıfına, ikinci yöntem ise antioksidanın elektron transfer ederek indirgeme gücünü ölçen ET sınıfına girmektedir.

Toplam antioksidan aktivite tayininde, tüm örneklerin linoleik asit peroksidasyonunun zamanla değişimi incelenmiş ve nane örneklerinin 168 saat sonundaki yüzde inhibisyon değerlerinin sırasıyla % 66.57 (MeOH), % 72.57 (EtOAc) ve % 80.18 (Asidik); kekik örneklerinin % 65.78 (MeOH), % 71.21 (EtOAc) ve % 78.71 (Asidik); maydanoz örneklerinin % 96.03 (MeOH), % 97.93 (EtOAc) ve % 98.86 (Asidik) ve defne örneklerinin % 65.14 (MeOH), % 68.86 (EtOAc) ve % 77.93 (Asidik) olduğu görülmüştür. Sentetik bir antioksidan olan BHA için elde edilen değerler ise, % 96.21 (MeOH), % 98.71 (EtOAc) ve % 99.57 (Asidik) şeklindedir. Tüm örneklerden asidik hidroliz ile hazırlanan özütlerde, yüzde inhibisyon değerlerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. İncelenen bitkilerin yüzde inhibisyon değerleri kendi aralarında ve sentetik bir antioksidan olan BHA ile karşılaştırıldığında BHA > maydanoz > nane > kekik > defne şeklinde olduğu belirlenmiştir.

Nane örneklerinin IC_{50} değerleri 0.348-0.881 arasında, kekik örneklerinin 0.760-1.488 arasında, maydanoz örneklerinin 0.010-0.172 arasında, defne örneklerinin ise, 0.812-1.677 arasında bulunmuştur. Sentetik birer antioksidan olan BHA ve BHT'nin IC_{50} değerleri ise sırasıyla 0.009-0.106 ile 0.048-0.262 arasında belirlenmiştir. Tüm örneklerden asidik hidroliz ile hazırlanan özütler en yüksek DPPH radikali giderme

aktivitesi göstermiştir. İncelenen bitkilerin DPPH radikali giderme aktiviteleri kendi aralarında ve bu çalışmada kullanılan sentetik antioksidanlarla karşılaştırıldığında BHA > maydanoz > BHT > nane > kekik > defne şeklinde olduğu görülmüştür.

Fenolik bileşik miktarı yüksek olan ekstraların, radikal süpürücü etkilerinin ve yüzde inhibisyon değerlerinin de yüksek olduğu görülmüştür. Yapılan korelasyon analizlerinde de fenolik bileşik miktarı ile radikal süpürücü etki arasında, fenolik bileşik miktarı ile yüzde inhibisyon değerleri arasında ve radikal süpürücü etki ile yüzde inhibisyon değerleri arasında kuvvetli bir korelasyon olduğu saptanmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışmada incelenen nane, maydanoz, kekik ve defne bitkileri içerisinde, en güçlü antioksidan aktivite ve radikal süpürücü etkiyi maydanoz bitkisinin asidik ekstresi göstermiştir.

KAYNAKLAR

- Altınışık, M. , 2000. Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar.
<http://www.mustafaaltinisik.org.uk>
- Bozan, B., Yılmaz, U., 2005. Defne Ağacı (*Laurus nobilis* L.) Meyvelerinin Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi **Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Yüksek Lisans Tezi.**
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie**, 26: 25-30.
- Çiğremiş, Y., Erdağ, D., 2007. *Marrubium cordatum* (*Labiatae*)'un Antioksidan Kapasitesinin Araştırılması **Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi**
- Elmastaş, M., Gerçekçioğlu, R., 2006. Bazı Üzümü Meyve Türlerinin Antioksidan Aktiviteleri. **I. Ulusal Üzümü Meyveler Sempozyumu**
- Erkan, N., Ayrancı, G., Ayrancı, E., 2008. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. **Food Chemistry** 110 (2008) 76–82
- Gülçin, İ., Şerbetçi, H., 2007. Meyan (*Glycyrrhiza glabra* L.) Bitkisinin Antioksidan Kapasitesinin **Belirlenmesi Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi**
- Jaitak, V., Sharma, K., Kalia, K., Kumar, N., Singh, H.P., Kaul, V.K., Singh, B., 2009. Antioxidant activity of *Potentilla fulgens*: An alpine plant of western. **Himalaya Journal of Food Composition and Analysis** YJFCA-1836; No of Pages 6
- Kızılet, E., Ertan, R.E., 2006. Anlı Kaliteli Kırmızı Saraplarda Bazı Antioksidan Fenolik Bileşikler. **Türkiye 9. Gıda Kongresi**; 24-26 Mayıs 2006
- Koşar, M., Bozan, B., Temelli, F., Başer, K.H.C., 2002. Sumak (*Rhus Coriaria*)'ın Fenolik Bileşikleri ve Antioksidan Etkileri. **Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler**, 29-31 Mayıs 2002, Eskişehir ISBN 975-94077-2-8
- Locatelli, M., Travaglia, F., Coisson, J.D., Martelli, A., Stevigny, C., Arlorio, M., 2010. Total antioxidant activity of hazelnut skin (Nocciola Piemonte PGI): Impact of different roasting conditions. **Food Chemistry** 119 (2010) 1647–1655

- Öztürk, N., Tunalıer, Z., Koşar, M., Başer, K.H.C., 2002. *Petroselinum Crispum*, *Anethum Gra Veolens* ve *Eruca Sativa*'nın Antioksidan Etki ve Fenolik Bileşikler Yönünden İncelenmesi. **14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler**, 29-31 Mayıs 2002, Eskişehir ISBN 975-94077-2-8
- Rice-Evans, C., Burdon, R., 1993. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. **Progress in Lipid Research**, **32**: 71-110.
- Saha, K., Lajis, N. H., Israf, D. A., Hamzah, A. S., Khozirah, S., Khamis, S., Syahida, A., 2004. Evaluation of antioxidant and nitric oxide inhibitory activities of selected Malaysian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, **92**: 263-267.
- Shukla, S., Mehta, A., John, J., Singh, S., Mehta, P., Vyas, S.P., 2009. Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of *Caesalpinia bonducella* seeds. **Food and Chemical Toxicology** 47 (2009) 1848–1851.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lomuela-Raventos, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology**, **299**: 152–178.
- Sun, T., Powers, J.R., Tang, J., 2007. Evaluation of the antioxidant activity of asparagus, broccoli and their juices. **Food Chemistry** 105 (2007) 101–106
- Tosun, İ., Karadeniz, B., 2005. Çay ve Çay Fenoliklerinin Antioksidan Aktivitesi **OMÜ Zir. Fak. Dergisi**, 2005,20(1):78-83
- Yazıcı, C., Köse, K., 2004. Melatonin: Karanlığın Antioksidan Gücü. **Erciyes University Journal of Health Sciences** **13**(2): 56-65.
- Yıldız, A., Genç, Ö., Bektaş, S., 1997. Enstrümental Analiz Yöntemleri. **Hacettepe Üniversitesi Yayınları**. 44-63 s. Ankara

TEŞEKKÜR

Tezimde yürüttüğüm çalışmanın her aşamasında bilgi, deneyimi ve yardım severliği ile bana yol gösteren, güvenini ve manevi yönden desteğini ve sabrını esirgemeyen Danışman Hocam Doç. Dr. Şana Sungur'a teşekkürü bir borç bilirim.

Deneylerin yapılması sırasında görüş ve bilgileri ile bana yol gösteren hocam Yard.Doç.Dr.Yener TEKELİ ve MKÜFAM imkanlarından faydalanmamı sağladığı için Yrd. Doç. Dr. Mustafa Didin'e, yine deney çalışmaları, tez yazımı ve düzenlenmesi aşamasında desteklerini esirgemeyen çok değerli meslektaşlarım, Yüksek Kimyager Abdo Özkan ve Yüksek Lisans arkadaşım Muhammet Meriç Atan'a bu çalışmamın gerçekleşmesinde sağladıkları maddi kaynaklarından dolayı MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna teşekkür ederim.

Tezimi yürüttüğüm süreç içerisinde manevi destekleri ve her türlü yardımlarıyla yanımda olan değerli arkadaşım Enver Usca ve aileme teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

30 Haziran 1982 yılında Hatay'ın İskenderun ilçesinde doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi İskenderun' da tamamladım. 2000 yılında girmiş olduğum Adana Çukurova Üniversitesi, Fen – Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nü 2004 yılında bitirdim. 2005 yılında Pedagojik Formasyon eğitimimi tamamladım.Okulu bitirdikten özel bir firmada Finansal danışman olarak çalıştım.2007 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya Bölümü Yüksek Lisans Programına yerleştim.2008 yılında İçişleri Bakanlığı'na bağlı olarak Ankara Valiliği'ne atandım ve aynı yerde halen görev yapmaktayım.