

**BAZI BİLEŞİKLERİN EMÜLSİYON, LİPOZOM VE
RADİKAL ORTAMINDAKİ ANTİOKSİDAN
DAVRANIŞLARININ
İNCELENMESİ**

Lokman DURMAZ

**Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Doç. Dr. Ahmet MAVİ
2011**

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAZI BİLEŞİKLERİN EMÜLSİYON, LİPOZOM VE RADİKAL
ORTAMINDAKİ ANTİOKSİDAN DAVRANIŞLARININ
İNCELENMESİ**

Lokman DURMAZ

KİMYA ANABİLİM DALI

**ERZURUM
2011**

Her Hakkı Saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

Bazı Bileşiklerin Emülsiyon, Lipozom ve Radikal Ortamındaki Antioksidan Davranışlarının İncelenmesi

Doç Dr. Ahmet MAVİ danışmanlığında, Lokman DURMAZ tarafından hazırlanan bu çalışma 04/07/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından. Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

İmza :

Üye : Doç. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Ahmet MAVİ

İmza :

(imza)

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Ömer AKBULUT

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI BİLEŞİKLERİN EMÜLSİYON, LİPOZOM VE RADİKAL ORTAMINDAKİ ANTİOKSİDAN DAVRANIŞLARININ İNCELENMESİ

Lokman DURMAZ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ahmet MAVİ

Bu çalışmada 10 adet bileşiğin, lipozom ve emülsiyon sistemlerinde antioksidan davranışları araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan maddeler; kuersetin, BHT (Bütillenmiş hidroksitoluen), N-Propil Gallat, Flavon, Naringin, Hesperidin, Rutin trihidrat, Gallik asit, Vanilin ve C vitaminidir.

İlk aşamada maddelerin, maddelerin lesitin lipozom sistemindeki lipit peroksidasyonu inhibisyon etkileri incelenmiştir. Bu sistemde; kuersetin, n-propil gallat ve BHT'nin diğerlerinden daha etkili antioksidan oldukları görülmüştür.

İkinci aşamada, linoleik asit emülsiyonu sistemindeki lipit peroksidasyonu inhibisyon etkileri incelenmiştir. Bu sistemde de; kuersetin, n-propil gallat ve BHT'nin diğerlerinden daha etkili antioksidan oldukları görülmüştür.

En son aşamada ise her bir maddenin DPPH (1,1-Difenil, 2-pikril hidrazin) radikal süpürücü etkisi belirlendi. Bu maddelerin hepsinin değişik seviyelerde radikal süpürücü etkiye sahip oldukları görülmüştür.

2011, 51 sayfa

Anahtar Kelimeler: Emülsiyon, lipozom, lipit peroksidasyonu, antioksidan, radikal

ABSTRACT

Master Thesis

EXAMINATION OF ANTIOXIDANT BEHAVIORS OF SOME COMPOUNDS IN EMULSIONS, LIPOSOME AND RADICAL MEDIUM

Lokman DURMAZ

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ahmet MAVİ

In this study, the antioxidant behaviours of ten compounds in the liposome and emulsion systems were investigated. The compounds used in the study are quercetin, BHT (Butylated hydroxytoluen), n-propyl gallate, flavone, naringin, hesperidin, rutine trihydrate, gallic acid, vanillin and vitamin C.

Firstly, lipid peroxidation inhibitory effects of the compounds were examined in lecithin liposome system. In this system, it was observed that quercetin, n-propyl gallate and BHT were more effective antioxidant than that of the others.

Secondly, lipid peroxidation inhibitory effects of the compounds were examined in linoleic acid emulsion system. In this system, it was observed that quercetin, n-propyl gallate and BHT were more effective antioxidant than that of the other molecules, too.

Finally, DPPH (1,1-diphenyl, 2-picrylhydrazin) radical scavenging effects of the compounds were determined. It was detected that all compounds have a variety of radical scavenging activity.

2011, 51 pages

Keywords: Emulsion, liposome, lipid peroxidation, antioxidant, radical

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Kimya Araştırma Laboratuvar'ında yapılmıştır.

Çalışmalarında her türlü desteği sağlayan çok değerli hocam ve danışmanım Sayın Doç. Dr. Ahmet MAVİ'ye en içten minnet dolu teşekkürlerimi sunarım.

Kimya Araştırma Laboratuvarını kullanmama izin veren Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Ali YILDIRIM'a, Dekan Yardımcısı Sayın Prof. Dr. Münir OKTAY'a, Ortaöğretim Fen ve Matematik Anabilim dalı başkanı Sayın Prof. Dr. Ahmet GÜRSES'e, Kimya Eğitimi Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Yaşar DEMİR'e; ve Doktora öğrencisi Tuba AYDIN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım esnasında Sevgili eşim, Saygıdeğer annem, ağabeylerim ve bütün ailemden görmüş olduğum destekten dolayı kendilerine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lokman DURMAZ

Temmuz 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
KISALTMALAR ve SİMGELER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	17
3. MATERYAL ve METOT	29
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	29
3.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar.....	29
3.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	29
3.4. Maddelerin Lipit Peroksidasyon Üzerine İnhibisyon Etkileri.....	30
3.4.1.Lesitin Lipozom Sisteminin Hazırlanması ve Peroksidasyon İnhibisyonunun Takibi	30
3.4.2. Linoleik Asit Emülsiyonunun Hazırlanması ve Peroksidasyon İnhibisyonunun Takibi	31
3.5. Maddelerin DPPH Radikal Süpürücü Etkilerinin Belirlenmesi	32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	34
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	44
KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR ve SİMGELER

ADP	: Adenozindifosfat
ATP	: Adenozintrifosfat
BHA	: Butylated hydroxyanisole (Bütillenmiş hidroksianisol)
BHT	: Butylated hydroxytoluene (Bütillenmiş hidroksitoluen)
dk.	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPPH	: 1,1-Difenil,2-pikril hidrazin
Eks.	: Ekstre, ekstrakt
GSH	: İndirgenmiş glutatyon
GSSG	: Yükseltgenmiş glutatyon (Glutatyon disülfür)
LDL	: Low-Density Lipoprotein
MDA	: Malondialdehit
Mr	: Mol kütle
NBT	: Nitroblue tetrazolium
PG	: Propil gallat
PMS	: Phenazin meta sülfat
RNA	: Ribonükleik Asit
RNS	: Reaktif azot türleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
TBA	: Tiyobarbütirik asit
TBHQ	: Tersiyer-bütihidrokinon
TCA	: Triklor asetik asit
UV	: Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki denge ve oksidatif stres durumu	4
Şekil 1.2. Fenol radikalının rezonans yapıları (Fessenden and Fessenden 1990).....	10
Şekil 1.3. Araşidonik asitin otooksidasyonunun öne sürülen mekanizması	13
Şekil 1.4. Mikroskop altında Emülgatör içeren alışılagelmiş kremler (Emülsiyonlar)...	14
Şekil 1.5. Başlıca fosfolipit grupları ve bunların fiziksel ve kimyasal yapıları	15
Şekil 1.6. Büyük çok tabakalı lipozom (a) ve çok küçük tek-iki tabakalı lipozom (b)...	15
Şekil 1.7. Çift katlı fosfolipit tabakalarından lipozom ve hücre zarının oluşumu	16
Şekil 2.1. Deneylerde kullanılan bazı maddelerin molekül yapıları	24
Şekil 2.2. Linoleik asitin yapısı.....	27
Şekil 2.3. Lesitin yapısı.....	27
Şekil 4.1. Maddelerin (20 µg/ml) lipozom sistemde lipit peroksidasyonu üzerine inhibisyon etkileri	35
Şekil 4.2. Maddelerin (40 µg/ml) lipozom sistemde lipit peroksidasyonu üzerine inhibisyon etkileri	36
Şekil 4.3. Lesitin lipozom sisteminde Fe ²⁺ 'nin etkisi	37
Şekil 4.4. Maddelerin (40 µg/ml) emülsiyon sistemde lipit peroksidasyonu üzerine inhibisyon etkileri	38
Şekil 4.5. Maddelerin (100 µg/ml) emülsiyon sistemde lipit peroksidasyonu üzerine inhibisyon etkileri	39
Şekil 4.6. Maddelerin DPPH radikali süpürücü etkileri.....	40
Şekil 4.7. Kuersetinin konsantrasyona karşı % DPPH süpürücü etki grafiği (IC50 değeri: 1,14 µg/ml).....	41
Şekil 4.8. BHT'nin konsantrasyona karşı % DPPH süpürücü etki grafiği (IC50 değeri: 13,46 µg/ml).....	41
Şekil 4.9. Hesperidin'in konsantrasyona karşı % DPPH süpürücü etki grafiği (IC50 değeri: 122,04 µg/ml).....	42
Şekil 4.10. Rutin trihidrat'ın konsantrasyona karşı % DPPH süpürücü etki grafiği	42
Şekil 4.11. n-Propil gallat'ın konsantrasyona karşı % DPPH süpürücü etki grafiği	43
Şekil 4.12. Gallik asitin konsantrasyona karşı % DPPH süpürücü etki grafiği	43

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Reaktif Oksijen Türleri	2
Çizelge 1.2. Reaktif Azot Türleri	3
Çizelge 1.3. Antioksidanların Sınıflandırılması	5
Çizelge 3.1. Lipozom Sisteminde Deney Tüplerindeki Çözeltilerin Miktarları	31
Çizelge 3.2. Emülsiyon Sisteminde Deney Tüplerindeki Çözeltilerin Miktarları	32

1. GİRİŞ

Oksidasyon (yükseltgenme), bir atom ya da molekülün bir alıcıya elektron vermesi işlemidir. Böyle bir olayda, yükseltgenme potansiyeli karşısındakine göre daha yüksek olan madde yükseltgenirken, diğer madde indirgenir. Organik moleküllerin oksidasyonu, çoğunlukla radikalik zincir reaksiyonlar üzerinden yürüyen bir süreçtir.

Bir ya da birden fazla ortaklanmamış elektron içeren atom veya atom gruplarına radikal denir. Radikallere Serbest Radikaller de denilmektedir. Serbest radikallerin eşleşmemiş her bir elektronu tek bir nokta ile gösterilir. Örneğin $\text{OH}^\bullet$ hidroksil radikali gibi. Serbest radikaller, yüksek enerjili, çok etkin, kısa ömürlü ve izole edilemeyen ara ürünlerdir. Serbest radikaller, eşleşmemiş elektronlarını eşleştirme eğiliminde oldukları için, özellikle gevşek bağlı elektronları koparabilir. En basit serbest radikal, bir elektron ihtiva eden hidrojen ($\text{H}^\bullet$) atomudur. Hidroksil ($\text{OH}^\bullet$), peroksil ($\text{RO}_2^\bullet$), alkoksil de ($\text{RO}^\bullet$) serbest radikallere örnek olarak verilebilir (Gomberg 1900). Oksidasyona sebep olan serbest radikallere örnek olarak süper oksit anyonu ve hidroksil radikali verilebilir.

Sigara, böcek ilaçları, UV ışınları, radyasyon, çevre kirliliği, hava kirliliği ve yiyeceklerde bulunan bazı katkı maddeleri insan metabolizmasında serbest radikal oluşumuna neden olmaktadır. Serbest radikaller, eksik elektronlarını tamamlamak için arayış içerisinde olduklarından, vücut hücrelerindeki diğer moleküllere saldırır. Dolayısıyla vücudumuzda bulunan lipit, protein, karbonhidrat ve DNA gibi biyomoleküller istenmeyen oksidasyona maruz kalabilir (Halliwell and Gutteridge 1989).

Canlılığın devamı için önemli olan protein, lipit ve nükleik asitler, serbest radikallerle reaksiyona girdikleri zaman, bu biyomoleküllerin fonksiyonları azalabilir ya da tamamen yok olabilir. Bu özelliklerinden dolayı bunlara Reaktif Oksijen Türleri (ROS, Reactive Oxygen Species) denilmektedir (Halliwell 1996). Reaktif oksijen türleri insan metabolizmasında sürekli bulunabilir. Anormal şartlarda bu reaktif oksijen türlerin

konsantrasyonlarında artış görülebilir. Bazı reaktif oksijen türleri ise insan vücudunda ya çok az üretilir ya da hiç üretilmez. Bazı reaktif oksijen türleri ise dış kaynaklardan alınır. Reaktif oksijen türlerinin bazıları radikal iken bazıları değildir. Reaktif oksijen türleri Çizelge 1.1’de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Reaktif Oksijen Türleri

Reaktif Oksijen Türleri			
Radikaller		Radikal Olmayanlar	
Süperoksit	$O_2^{\bullet-}$	Hidrojen Peroksit	H_2O_2
Hidroksil	$OH^{\bullet}$	Hipoklorik Asit	$HOCl$
Peroksil	$RO_2^{\bullet}$	Hipobromik Asit	$HOBr$
Alkoksil	$RO^{\bullet}$	Ozon	O_3
Hidroperoksi	$HO_2^{\bullet}$	Singlet Oksijen	$^1\Delta_g \ ^1O_2$

Reaktif oksijen türlerinin yanı sıra bazı reaktif azot türleri de (RNS, Reactive Nitrogen Species) vücutta oluşmaktadır (Halliwell 1996). Reaktif azot türleri Çizelge 1.2’de verilmiştir.

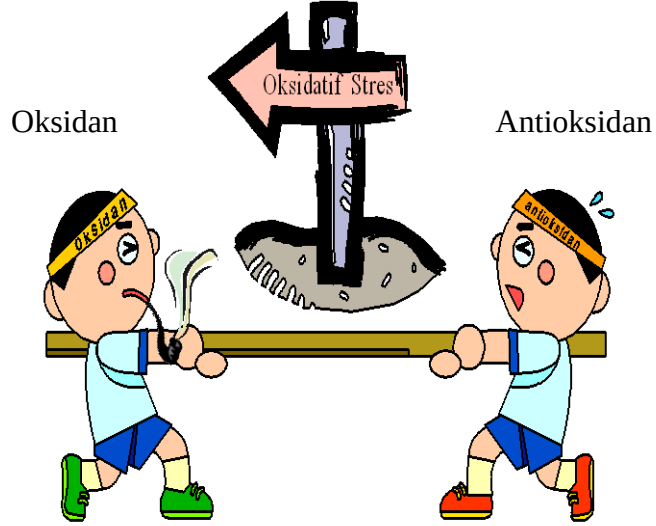
Çizelge 1.2. Reaktif Azot Türleri

Reaktif Azot Türleri			
Radikaller		Radikal Olmayanlar	
Nitrik Oksit	$\text{NO}^\bullet$	Nitroz Asit	HNO_2
Azot dioksit	$\text{NO}_2^\bullet$	Nitrozil Katyonu	NO^+
		Nitroksi Anyonu	NO^-
		Diazot Tetraoksit	N_2O_4
		Diazot Trioksit	N_2O_3
		Peroksinitrit	ONOO^-
		Peroksinitroz asit	ONOOH
		Nitronyum katyonu	NO_2^+
		Alkilperoksi nitritler	ROONO

Reaktif türlerin zararlı etkilerinin temel sebebi radikal olmaları, radikal oluşumuna sebep olmaları ve/veya indirgenme potansiyellerinin nispeten yüksek olmasıdır. Reaktif türlerin bu olumsuz etkilerine karşı koruyucu etki yapan maddeler ve sistemler mevcuttur. Bunlara genel olarak antioksidan denilmektedir. Antioksidanlar, oksidasyonu erteleyen ve inhibe eden fakat oksidasyonu tamamen engelleyemeyen bileşikler olarak tanımlanır (Aruoma and Cuppett 1998).

Vücudumuzda bulunan ve besinlerdeki lipitler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler de oksidasyona uğrayabilmekte ve bunun sonucunda moleküller fonksiyonlarını kaybetmektedir. Bu duruma oksidatif stres denir. Başka bir deyişle oksidatif stres, reaktif türler ile antioksidan savunma sistemi arasında bulunan, oksidasyon lehine olan dengesizliği ifade eden bir kavramdır. Oksidatif stres, birçok farklı hastalıkta önemli patojenik etkindir (Mancini *et al.* 2010). Oksidatif stresin baş sorumluları reaktif oksijen ve azot türleridir (Aruoma and Cuppett 1997). Reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türleri insan vücudunda değişik vesilelerle bulunabilir. Bazıları biyokimyasal döngü içerisinde kimyasal reaksiyonlar sonucunda oluşur. Reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türleri dışarıdan da organizmaya alınabilir. Örneğin; sigara içilmesiyle,

sigara dumanının asıl bileşeni olan azot dioksit vücuda alınmış olur. Oksidatif stres, biyolojik sistemlerde oksidasyon arttığı zaman oluşur.



Şekil 1.1. Oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki denge ve oksidatif stres durumu

Oksidatif stres durumunda reaktif türlerin miktarında artış olur ve dolayısıyla bu ürünlerin reaksiyon hızları artar. Bu durumdan başta lipitler, proteinler ve nükleik asitler olmak üzere vücudumuzun birçok sistemi olumsuz etkilenir (Lambeth 2004).

Bol egzersiz yapmak da, vücuttaki oksijen tüketimini artırır. Bu da hücre içindeki oksidan ve antioksidan dengesini değiştirir. Biyokimyasal mekanizmalarda, güçlü bir şekilde hücre içi serbest radikaller oluşur. Reaktif oksijen türleri, hücre içindeki sistemler için ciddi bir tehdit oluşturur. Ancak antioksidan sistemler bu durum ile mücadele halindedir. Antioksidan savunma sistemleri için, antioksidan vitaminler ve glutatyon örnek olarak verilebilir (Ji and Leichweis 1997). Antioksidanlar, vücut içi ve besin kaynaklı antioksidanlar olarak ikiye ayrılmıştır (Halliwell and Gutteridge 1989).

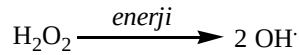
Çizelge 1.3’de antioksidanların sınıflandırılmasını görebilirsiniz (Halliwell and Gutteridge 1989).

Çizelge 1.3. Antioksidanların Sınıflandırılması

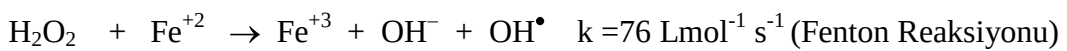
ANTIÖKSİDANLAR			
Vücutta Bulunan Antioksidanlar		Besin Kaynaklı Antioksidanlar	
Enzimler	Küçük Moleküller	Sentetik	Doğal
Katalaz	Askorbik asit	BHA	Fenolik maddeler
Peroksidaz	Glutasyon	BHT	Askorbik asit
Süperoksit dismutaz	Ürik asit	TBHQ	Karotenler
Glutasyon peroksidaz	Metal bağlayıcılar	Propilgallat	
Glutasyon redüktaz	(Hmg ve Hmy gibi)	Kuersetin	

Reaktif oksijen türleri, oksidatif stresle birlikte üretilir. Süperoksit dismutaz, katalaz ve glutasyon peroksidaz, reaktif oksijen türlerinin süpürülmesinde en önemli enzimlerdir (Fujii *et al.* 2003).

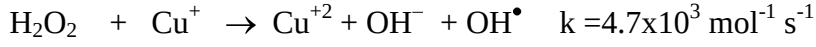
Vücudumuzdaki antioksidan sistemlerin en önemlileri antioksidan enzimlerdir. Çünkü daha önceden de zikrettiğimiz üzere reaktif türler, vücut içerisinde üretilmektedir. Örneğin, hidrojen peroksit her an için hidroksil radikaline dönüşebilme potansiyeline sahip olduğu için, biyolojik sistemlere zararlı olabileceği düşünülmektedir. H_2O_2 'deki O-O bağı nispeten zayıf olduğu için kolaylıkla parçalanabilir. Bu bağın homolitik parçalanmasından reaktivitesi çok yüksek olan $OH^\bullet$ radikali oluşur.



Bu homolitik parçalanma demir elementi tarafından da gerçekleştirilmektedir (Halliwell and Gutteridge 1990, Gutteridge 1989).

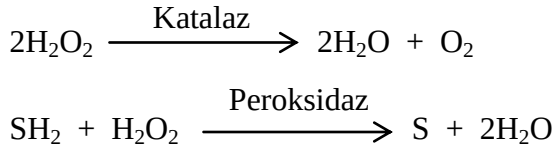


Benzer reaksiyon Cu^+ ile de olmaktadır (Gaetke and Chow 2003).



Bu reaksiyon sırasında oluşan $\text{OH}^\bullet$, yeni radikallerin oluşumunda ve böylece de DNA hasarında başrolü oynamaktadır (Henle and Linn 1997). Aynı zamanda $\text{OH}^\bullet$ radikali, en reaktif radikallerdendir.

Bu sebeple hidrojen peroksidin uzaklaştırılabilmesi önemlidir. Hücre içindeki hidrojen peroksidi uzaklaştırmak için iki tip enzim mevcuttur. Bunlar katalaz ve peroksidazdır (Miyamoto *et al.* 2003).

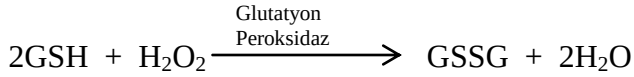


Birkaç aerop dışında (bakterilerden *Bacillus popilliae*, *Mycoplasma pneumoniae*, yeşil alglerden *Euglena*, bazı parazit bağırsak kurtları ve mavi-yeşil alglerden *Gloeocapsa*) bütün aeroplarda katalaz enzimi bulundurulur. Anaeroplarda genellikle katalaz bulunmaz fakat istisnaları vardır. Örneğin *Propionibacterium shermanii* gibi. Memelilerde bütün başlıca organlarda ve özellikle de eritrosit ve karaciğerde katalaz mevcuttur. Beyinde, kalpte, iskelet sisteminde düşük miktarlarda bulunur (Halliwell and Gutteridge 1989).

Katalaz aktivitesi hayvanlarda ve bitkilerde peroksizom denilen tek membranla çevrili organellerde görülmektedir. Peroksizomlar, H_2O_2 üreten enzimler içerir. Bunlar glikolat oksidaz, ürat oksidaz ve yağ asitlerinin β -oksidasyonunda yer alan flavoprotein dehidrogenazdır (Halliwell and Gutteridge 1989).

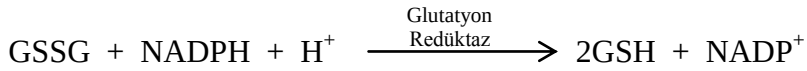
H_2O_2 ayrıca peroksidazlar tarafından da uzaklaştırılır. Katalaz ana olarak peroksizomlarda lokalize olduğu için, sitozol ve vücut sıvılarındaki H_2O_2 'i uzaklaştırmak peroksidazlara düşer. Organizmalarda değişik tipte peroksidazlar bulunmakla beraber, insanlar için en önemli olanı glutatyon peroksidazdır.

Glutatyon peroksidaz, genellikle hayvansal dokularda bulunur, yüksek bitkilerde ve bakterilerde ise bulunmaz. İstisnai olarak bazı alg ve funguslarda da bulunmuştur. Substratı glutatyondur (GSH) ve glutatyonun konsantrasyonu hayvanlarda, bitkilerde ve bakterilerde (örneğin *E. coli*, fakat genelde aneoroplarda bulunmaz) genellikle 1-10 mM aralığındadır (Halliwell and Gutteridge 1989).

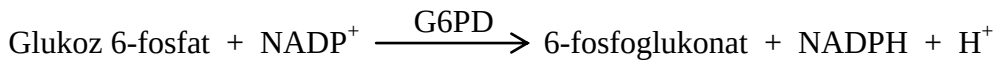


Glutatyon peroksidazın katalizlediği reaksiyonda H_2O_2 suya indirgenirken, GSH GSSG'ye yükseltgenir. Vücuttaki glutatyonun büyük bir kısmı ise GSSG'den ziyade GSH şeklinde bulunur. Glutatyonun yaklaşık üçte biri ise disülfür halinde bulunur.

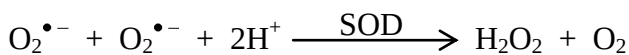
Normal hücrelerde GSH/GSSG oranı yüksektir. Çünkü glutatyon redüktaz enzimi tarafından, yükseltgenmiş glutatyon sürekli olarak indirgenmiş glutatyona dönüştürülür.



Glutatyon peroksidaz ayrıca koenzim A ile GSH arasındaki disülfid bağının indirgenmesini de katalizler. Enzimin ihtiyaç duyduğu NADPH ise ana olarak hayvansal dokularda oksidatif pentoz fosfat yoluyla sağlanır. Bu yolun ilk enzimi glukoz 6-fosfat dehidrogenazdır (G6PD) ve NADPH üretimini katalizler. Bu sebeple G6PD da antioksidan sistemin bir üyesi olarak kabul edilir.



Bir başka antioksidan enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) enzimi, bir radikal olan süperoksit anyonunun hidrojen peroksit ve oksijene dönüşmesi reaksiyonunu katalizler.



Doğal ve sentetik antioksidanlar, gıda ve ilaç sanayinde kullanılır. İn vitro şartlarda antioksidanlar, serbest radikal zincirleme oksidasyon reaksiyonunu engeller. En önemli doğal antioksidanlar arasında fenolik bileşikler, askorbik asit ve karotenoidler sayılabilir. Fenolik bileşik olan tokoferoller, gıda maddelerinin bozulmasını engelleyen ve uzun ömürlü olmalarında rol oynayan önemli bir doğal antioksidan grubudur (Kohno *et al.* 1995). Antioksidanlar, bulunduğu sistemin özelliğine bağlı olarak farklı aktivite gösterir. Polar antioksidanlar yağlı sistemlerde, apolar antioksidanlar ise yağ-su emülsiyon sistemlerinde daha iyi antioksidan etki gösterir (Porter *et al.* 1989; Frankel *et al.* 1994).

İyi bir antioksidan şu özellikleri taşımalıdır:

- Fizyolojik olarak zararsız olmalıdır.
- Yağ veya yağlı ürünlerin kokusuna, tadına ve görünüşüne etki etmemelidir.
- Yemeklerin pişirilmesi sırasında yağa ve bununla hazırlanmış besinlere etki etmemeli ve aktif kalmalıdır.
- Yağda yeterli miktarda çözünmeli ve yağla karışabilmelidir.
- Küçük derişimler etkili olmalıdır.
- Kolay elde edilebilmelidir.
- Ucuz olmalıdır.

Serbest radikal zincir reaksiyonunu önleyen antioksidanlar, hayvan ve insan ömrünün uzamasını sağlar. Şu anda bile, yaşayan sistemlerde antioksidanlar tarafından gerçekleştirilen olayların mekanizması tam olarak anlaşılmış değildir.

Gıda maddelerinde, peroksidasyon sürecini geciktirmek, ancak antioksidan bileşiklerin ilavesiyle mümkün olabileceği belirtilmişti. Gıda maddelerinin bozulmalarının engellenmesi için yıllardan beri sentetik antioksidanlar kullanılmaktadır.

En yaygın olarak da BHA (Bütillenmiş hidroksianisol), BHT (Bütillenmiş hidroksitoluen), PG (Propil gallat) ve TBHQ (tert-bütildidrokinon) kullanılmaktadır.

Fakat yapılan bazı araştırmalara göre sentetik antioksidanların, bazı yan etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Branen 1975; İmaida *et al.* 1983). Bu yüzden tüketiciler bunların sağlık açısındaki güvenirlikleri hakkında ciddi endişeler taşımaktadır. Örneğin BHT non-toksik olmakla beraber, karaciğerde sitokrom P-450 sistemine hasar verdiğine dair bazı kanıtlar ve çalışmalar mevcuttur. Farelere yüksek dozlarda verildiğinde ise karaciğerde hasara sebep olduğu görülmüştür. Ayrıca Amerikan halkı üzerinde yapılan araştırmalarda, BHT gibi sentetik antioksidanların fazla alınması durumunda vücuttan atılamayıp adipoz dokuda depolandığı da saptanmıştır (Halliwell and Gutteridge 1989).

Sentetik antioksidanlar geniş piyasaya sahip olmalarına rağmen, bu istenmeyen yan etkilerinden dolayı son zamanlarda kullanım alanları ciddi şekilde sınırlandırılmıştır. Bu sebeplerden dolayı birer doğal antioksidan olan α -tokoferol ve askorbik asit; BHA, BHT, PG ve TBHQ gibi sentetik antioksidanlardan daha düşük aktiviteye sahip olmalarına rağmen, yağlı maddelerin üretiminde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Nisihina *et al.* 1991; Osawa and Namiki 1981).

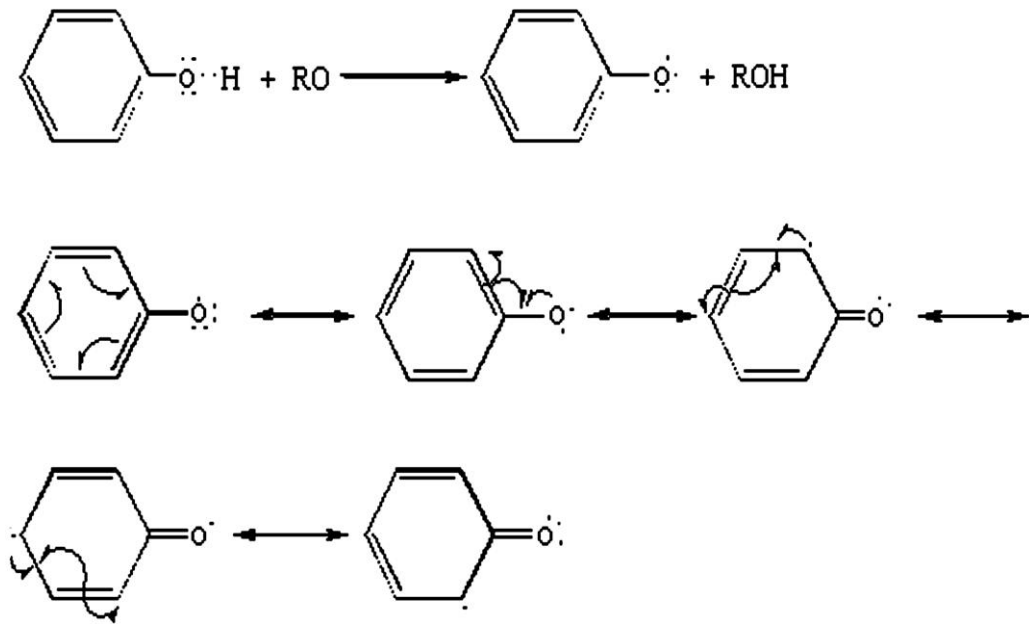
Dietle alınan antioksidanlar, hücresel antioksidan savunma sistemi başarısızlığa uğradığı zaman önemli hale gelmektedir. Antioksidanlar, biyolojik sistemlerde reaktif oksijen türlerine ve serbest radikallere karşı güçlü antioksidan aktivite gösterir (Wijeratne *et al.* 2006).

Dietle alınan antioksidanlar genellikle fenolik yapıda bileşiklerdir. Örneğin E vitamini fenolik bir maddedir. Ancak yine iyi bir antioksidan olan C vitamini fenolik madde değildir. Antioksidanların hastalık oluşturan oksidatif strese karşı etkili ve önleyici bileşikler olduğuna inanılır. Bundan dolayı antioksidanlar, popüler bir konu olmayı sürdürmektedir (Blasco *et al.* 2007).

Fenolik antioksidanlar, sağlıklı bir diyetin önemli bir bileşenidir. Bitkiler, büyüme-gelişme-bulunduğu yere adapte olma esnasında fenolik madde üretir (Shetty *et al.* 2003). Antioksidan olarak kullanılan fenolik bileşikler, sentetik veya doğal olabilir

(Koltover 2010). Zengin fenolik bileşiklerdeki esansiyel yağlar, güçlü antioksidan özellik ve DPPH radikal süpürme aktivitesi gösterir.

Bazı fenolik yapıdaki bileşiklerin antioksidan özellik göstermesi genellikle fenol radikalinin rezonans kararlılığından kaynaklanır.



Şekil 1.2. Fenol radikalinin rezonans yapıları (Fessenden and Fessenden 1990)

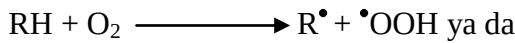
Oluşan fenoksi radikali ($\text{OH}^\bullet$), reaktif bir molekül olan alkoksi ($\text{RO}^\bullet$) radikalinden daha kararlı olduğundan ve bu nedenle de $\text{RO}^\bullet$ 'ye göre reaksiyona girme eğiliminin düşük olmasından dolayı, radikalik zincir reaksiyonun hızını yavaşlatacaktır. Böylece oksidasyon prosesinin net hızı da azalır.

Bazı fenolik bileşikler lipitler üzerine antioksidan aktivite göstermesine rağmen, in vitro şartlarda DNA, protein ve karbonhidratların oksidatif hasarını hızlandırır.

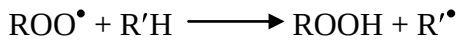
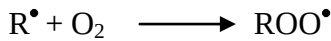
Reaktif oksijen türlerine en hassas molekülün, hücre membranının ana bileşeni olan lipitler olduğu düşünülmektedir. Oksijenle lipitlerin oksidasyonu tipik bir radikalik zincir reaksiyonudur. Bu reaksiyon, lipit peroksidasyonunu kontrol eden mekanizma

olarak da bilinir. Serbest radikal zincir reaksiyonlarını elektron vererek veya elektron alarak durdurmak mümkündür. Bu reaksiyon, başlama, gelişme ve sonlanma basamaklarından oluşur. Radikalik zincir reaksiyonunun mekanizması şematik olarak aşağıdaki şekildeki gibi olmaktadır (Aruoma and Cuppett 1997).

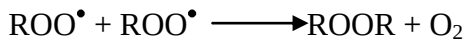
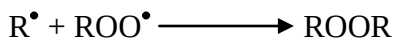
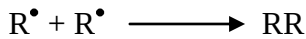
Başlama basamağı:



Gelişme basamağı:



Sonlanma basamağı:



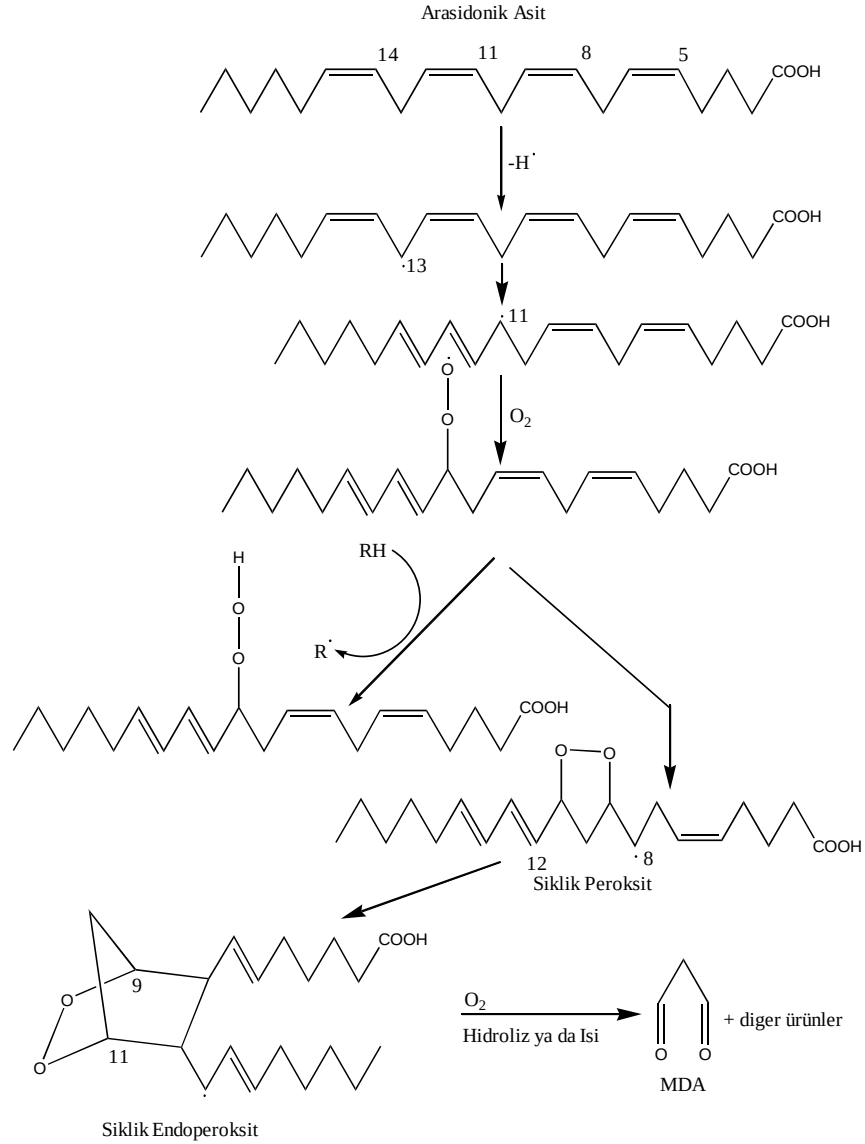
Oksijen ya da başka bir radikal, yağ asidinin karbonuna bağlı hidrojenlerden birini elektronuyla birlikte koparır böylece radikal oluşumuna sebep olabilir. Oluşan bu radikal, komşu yağ asidinden bir hidrojen koparır, kendi elektronunu eşler. Ancak aynı zamanda yeni bir radikalın oluşumuna da sebep olmuştur. Bu arada oluşan radikal, oksijenle reaksiyona girebilir ve peroksit radikali oluşturabilir. Zamanla bu zincirleme reaksiyonlar sonucunda radikal konsantrasyonu artar. Bu konsantrasyon artışı aynı zamanda radikallerin birbiriyle daha fazla reaksiyona girmesine neden olur ve radikal konsantrasyonu azalarak zincir sonlanır.

Reaktif türlerin sebep olduğu bir olaysa lipit peroksidasyonu olduğunu söylemiştik. Lipit peroksidasyonu, yağların bozulması olayıdır. Lipit peroksidasyonu sonucu membranı parçalan ve stabilitesi bozulan hücreler, akciğer rahatsızlıklarına, böbrek hasarlarına, damar tıkanıklığına, yaşlanmaya ve kansere sebep olduğu da bilinmektedir (Rice-Evans and Burdon 1993). Yağların oksidasyonu sonucu gıdalarda oluşan tat ve koku bozukluğu, lipit peroksidasyonu sonucu meydana gelen aldehit ve ketonlardan kaynaklanmaktadır (Frankel 1995). Et içeren ürünlerde kalitenin bozulmasının sebebi de lipit peroksidasyonudur (Kanner *et al.* 1991).

Lipit peroksidasyonu başka sebeplerden dolayı da önemlidir. Özellikle atherosklerozun (zamanla arterler iç yüzeyinde tabakalanmanın oluşması sonucunda damarın daralması ve sertleşmesi olayı) gelişmesinde lipit peroksidasyonunun, özellikle de LDL'nin (Low-Density Lipoprotein) oksidatif modifikasyonunun katkısı büyüktür (Antoniades *et al.* 2003). Lipit peroksidasyonunun takip etmek, oksidasyonun derecesini tespit etme yönünden önemlidir. Peroksidasyonun değişik basamaklarda takip edildiği birçok yöntem mevcuttur. Bu sebeple lipit peroksidasyonunu takip etmede tek bir yöntem peroksidasyon hakkında geniş bir bilgi için yeterli olmayacaktır. Çünkü her bir yöntem peroksidasyonun belirli basamaklarını izlemeye yarar.

Tıpta, biyolojide, toksikolojide ve gıda ile farmasötik sanayinde serbest radikaller gittikçe artan yoğun bir ilgi alanına sahip olmaktadır. Lipit peroksidasyonu, gıda endüstrisinde karşılaşılan en önemli sorunlardan biridir. İmalatçılar, antioksidanları kullanarak, lipit içeren gıdaların oksidasyonunu yavaşlatmayı hedefler. Bunun yanı sıra biyomedikalciler ve klinisyenler de organizmayı, reaktif oksijen türleri tarafından oluşan hasara karşı korudukları için, antioksidanlara ilgi duymuşlardır (Frankel 1980; Block 1992; Aruoma 1993; Papas 1993; Aruoma 1996; Duthie 1996; Pezzuto 1997).

Polidoymamış yağ asitleri, doymuş yağ asitlerine göre hidrojen koparılmasıyla oluşan radikalın çift bağın konjugasyonu ile kararlı hale getirilmesi ve böylece de hidrojenin daha kolay koparılmasına sebep olmasından dolayı, otooksidasyona daha yatkındır (Halliwell and Gutteridge, 1989).



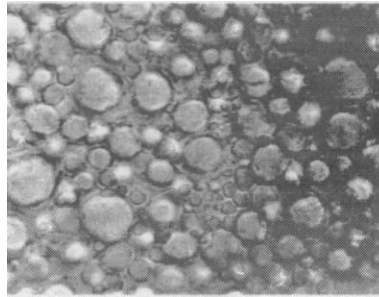
Şekil 1.3. Araşidonik asitin otooksidasyonunun öne sürülen mekanizması

Sıcaklık, oksijen konsantrasyonu, ışık, geçiş metallerinin varlığı otooksidasyonu etkiler. Sıcaklığın yükselmesi, oksijen ve geçiş metal iyonlarının konsantrasyonunun ve ışık şiddetinin artması otooksidasyon hızını artırmaktadır.

Bahsettiğimiz sebeplerden dolayı antioksidanların ve bunların aktivitelerinin belirlenmesi, önemli bir araştırma konusudur. Bir maddenin antioksidan aktivitesinin tayini amacıyla birçok yöntem kullanılmaktadır. Yaygın yöntemlerden birisi ise maddenin lipid peroksidasyonuna etkisini takip etmektedir.

Lipit peroksidasyonu genellikle lipozom ve emülsiyon sistemlerinde bakılır. Antioksidan miktarı arttıkça, lipit peroksidasyon hızı yavaşlar. Lipit peroksidasyonu, hücrenin hayati fonksiyonları için zararlıdır (Davies 2000).

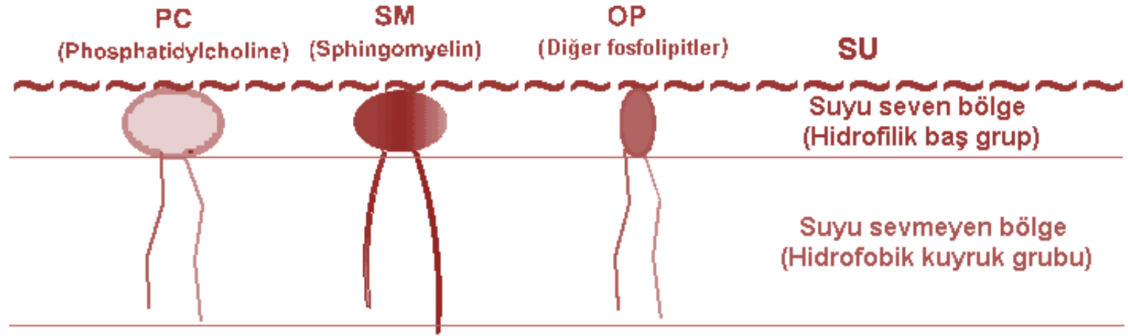
Emülsiyonlar, birbiriyle karışmayan iki sıvının birbiri içinde damlacıklar halinde dağılmasından oluşmuş heterojen sistemlerdir. Termodinamik olarak dayanıklı değildir. Emülsiyonlar farmasötik, kozmetik, tarım ve gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Emülsiyon sistemi, bir hidrofilik bir de lipofilik iki fazdan oluşur. Bu iki faz, emülsiyonun iç ve dış fazı olarak adlandırılmaktadır. Dış faz sürekli faz olarak da tanımlanır ve iç fazı damlacıklar halinde taşır. Bir emülsiyon formülasyonunun gerçekleştirilebilmesi için en az üç bileşene; yağlı faz, sulu faz ve yüzey aktif maddeye gereksinim vardır. Sulu faz: Su ve su ile karışabilen hidrofilik özellikteki maddelerden oluşur. Yağlı faz, sıvı yağlardan meydana gelir. Yüzey etkin maddeler: Genellikle yağ ve su fazı arasındaki gerilimi düşürerek etki eder, yani deterjan özelliği göstermektedir.



Şekil 1.4. Mikroskop altında Emülgatör içeren alışılagelmiş kremler (Emülsiyonlar)

www.koko-tr.com

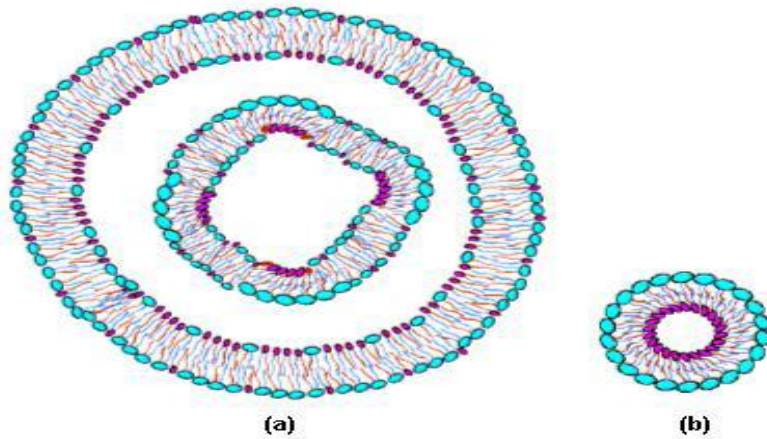
Lipozomlar, tabakalı fosfolipitlerin bileşimiyle meydana gelen çok küçük (nanometre boyutunda) küreciklerdir. Bu yapılar da hem hidrofil hem de hidrofob uç taşımaktadır.



Şekil 1.5. Başlıca fosfolipit grupları ve bunların fiziksel ve kimyasal yapıları

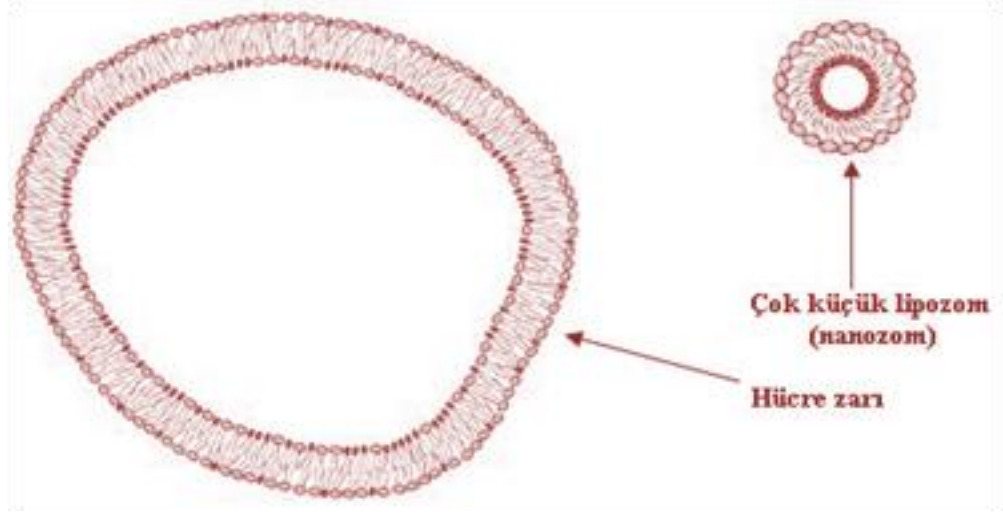
<http://www.tekstilvekonfeksiyon.org>

Lipozomlar, boyutlarına göre küçük (Small) ve büyük (Large); tabaka sayılarına göre de tek tabakalı (Monolayer), iki tabakalı (Bilayer) ve çok tabakalı (Multiplelayer) olarak sınıflandırılmaktadır. Lipozomlar, katmanlı fosfolipitlerin bileşimiyle meydana gelen çok küçük (nanometre boyutunda) sulu faz içeren kabarcıklardır. Lipozomların yapısı genel olarak Şekil 1.6 ve 1.7’de görülmektedir. Lipozomlar, temel olarak aktif maddelerin etkinliğini arttıracak ve istenmeyen toksik özelliklerini azaltacak özellikte olup, çok seçici olarak maddelerin taşınmasında kullanılmaktadır.



Şekil 1.6. Büyük çok tabakalı lipozom (a) ve çok küçük tek-iki tabakalı lipozom (b)

<http://www.tekstilvekonfeksiyon.org>



Şekil 1.7. Çift katlı fosfolipit tabakalarından lipozom ve hücre zarının oluşumu
<http://www.tekstilvekonfeksiyon.org>

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Fenolik maddeler basit fenolik maddeler ve polifenoller olmak üzere kabaca iki gruba ayrılmakla beraber meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan fenolik maddeler hidroksibenzoik asitler, hidroksisünamik asitler ve flavonoidler olmak üzere üç kısımda incelenmektedirler. Flavonoidler ise kateşinler, antosiyanidinler, flavonoller, flavanonlar ve proantosiyanidinler (löykoantosiyanidinler) olmak üzere beş alt gruba ayrılmaktadırlar. Flavonoidler, bitki kaynaklı bileşikler olup, doğada yaygın olarak bulunurlar. Flavonoidler, 8 grupta sınıflandırılır. Bunlar: Flavonlar (Apigenin, Luteolin), flavonoller (Kaempferol, Kuersetin, Myricetin), flavanonlar (Naringenin, bütin, eriodiktyo), izoflavonoidler, kalkonoidler, antosiyaninler, flavonoid glikozitler ve neoflavonoidlerdir.

Limon kabuğundan 1936 yılında elde edilen flavon bileşiklerinin, P-vitamini adı altında, kılcal damar geçirgenliği ve kırılgenliğini düşürmede kullanılması, flavonoidlere verilen önemi artırmış oldu. Bu nedenle, flavonoidlere karşı ilgi 1940'lı yıllardan itibaren hızlanmaya başladı. 1970'li yıllarda flavonoidlerle yapılan çalışmaların boyutu daha da genişledi. Bu araştırmaların sonucu olarak bugün bitkilerden 4000'den fazla flavonoid izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır. Flavonoidler, doğada bir milyar yıldan beri bulunmaktadır. Flavonoidler genellikle meyve, sebze, tohum, çiçek, yaprak ve dallarda rastlanır. Bu bileşikler, insan besininin bileşiminde yer alan vazgeçilmez unsurlardır. Flavonoidler bitkilerde antioksidan, enzim inhibitörü ve aynı zamanda ışımdan koruma gibi bir dizi önemli özelliklere sahiptir. Geleneksel tıpta, gerçekleştirilen geniş çaplı araştırmalar sonucu, flavonoidlerin çok yönlü biyokimyasal ve farmakolojik aktivitelere sahip oldukları belirlenmiştir (Bilaloğlu ve Harmandar 2000).

Kuersetin, tipik bir anti-oksidan flavonoid'i olup sebzelerde bol miktarda bulunur. ROS'inin temizlenmesinde rol oynar (Terao *et al.* 2011). Glikozitler ve kuersetin bitkiler âleminde, yaygın olarak bulunur. Flavonollar, anti kanser ve antioksidan özelliğine bağlı olarak antiinflamatuvar özelliklere sahiptir (Biesaga and Pyrzynska 2009).

Kuercetin, aynı zamanda antimutajenik olarak da kullanılır. Son zamanlarda in vitro şartlarında yapılan çalışmalar, kuersetinin antimutajenik olduğunu göstermektedir (Okamoto 2005).

BHT, gıda ve kozmetik sektöründe kullanılır. Hayvanlarda yapılan incelemede kanserojen ajanlar üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir (Okamoto 2005). Serbest radikallerin yol açtığı hasarları, azaltmak için kullanılır. Doğal antioksidan savunma sistemleri için BHT, önemli bir antioksidandır (Lanigan and Yamarik 2002).

n-propil gallat, antioksidan özelliği gösteren bir maddedir. n-Propil gallat, radikalleri tutucu olarak bilinir (Yang and Hoffman 1984).

Flavon, anti kanserojenik etki gösterir. Flavon maddesine bağlı üretilen bir ilaç, Ulusal Kansere Enstitüsü (ABD) tarafından ortaya çıkarılmıştır (Bibby and Double 1993).

Naringin, flavanon sınıfına bağlı bir glikozit bileşiktir. Naringin maddesi kullanılarak, genomik hasarlar üzerinde etkili olacağı noktasında araştırma yapılmıştır. Naringin'in DNA hasarını azalttığı belirlenmiştir (Jagetia *et al.* 2007).

Hesperidin, bir bioflavonoid olup, turuncgillerde bol miktarda bulunur. Vücuttaki eksikliği; çeşitli ağrılara, halsizliğe, gece kramp ağrılarına neden olmaktadır (Garg *et al.* 2001).

Vanillin, radikaller üzerinde süpürücü etki gösterir (Mahal *et al.* 2001). Vanillin, fenolik bir bileşiktir. Vanilya vanillin maddesi içermektedir. Vanilya, dünyada popüler olan bir maddedir. Vanilya; yiyecek, içecek, parfümeri ve ilaç endüstrisinde geniş bir uygulama ve kullanım alanı vardır. Doğal vanilya özleri üzerinde sayısız çalışma yapılmıştır. Vanilya özünün ve vanilya içeren ürünlerin kalitesini sağlamak için, teknolojiye ve çeşitli tekniklerden faydalanılmıştır. Vanilya, çeşitli özellikleri itibarıyla Vanillin olarak da adlandırılır (Sinha *et al.* 2008).

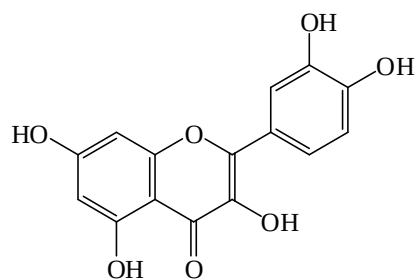
C vitamini, askorbik asit olarak da bilinen indirgeyici bir bileşiktir. Yapı itibarıyla en basit vitaminlerden biridir. Bir şeker asitinin laktonundan ibarettir. Mikroorganizmalarda askorbik asit yoktur. İnsan dahil bazı omurgalıların gıdalarında muhakkak alınması gereklidir. Besinlerin ısıtılması sırasında askorbik asit, geniş ölçüde bozulur. Diğer suda çözünen vitaminlere göre askorbik asit, hayvansal ve bitkisel dokularda oldukça yüksek konsantrasyonda mevcuttur. İnsan kan plazması, 100 ml’de 1mg kadar askorbik asit bulundurur. Narenciye ve domates, askorbik asitçe oldukça zengindir. C vitamini kapiler duvarlarının geçirgenliğini azaltır. Eksikliğinde deride kanamalar meydana gelir; devam ederse askorbik asit eksikliğinde ise skorbüt hastalığı meydana gelir. Bu hastalıkta diş etlerinde şiddetli kanamalar olur (Keha ve Küfrevioğlu 2007).

Askorbik asit bitkiler ve birçok memeli tarafından karaciğerde glukozdan sentezlenebilir. Ancak insanda bir sentez yolu mevcut değildir. Askorbik asit bazı enzimlerin kofaktörü olarak kullanılır. Bunlardan en önemli iki tanesi, kolajenin biyosentezinde yer alan prolin hidroksilaz ve lizin hidroksilazdır. Bu iki enzim de aktif merkezlerinde demir içerir. Askorbik asit ayrıca bakır içeren bir enzim olan dopamin- β -hidroksilaz aktivitesi için de gereklidir. (Padayatty *et al.* 2003, Arrigoni and De Tullio 2002). Askorbik asit Fe^{+3} ’ü Fe^{+2} ’ye indirgeyebilir. *In vivo* olarak, indirgeyici özelliğinden dolayı, bazı organik radikallerin detoksifikasyonunda yer alır. Hidroksilaz enzimlerinin aktif merkezlerindeki demir ve bakır iyonlarının, hidroksilasyonu gerçekleştirebilmeleri için, indirgenmiş halde bulunmaları gerekir. Bu kofaktör olan askorbik asit tarafından sağlanır.

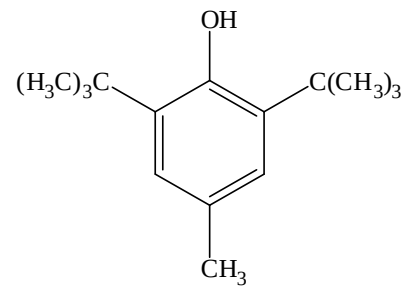
Bir molekülün indirgeme gücü onun antioksidan potansiyelinin bir göstergesidir. Oksidasyona uğrayan moleküller, indirgeme potansiyelinin yüksek olmasından dolayı askorbik asit tarafından indirgenebilirler. Bu sebeple askorbik asit, bir antioksidan moleküldür (Halliwell and Gutteridge 1989).

Metal iyonları mevcut olmadığı müddetçe askorbik asitin sulu çözeltileri kararlıdır. Metal iyonlarının varlığı, oksijenle askorbik asitin oksidasyonunu katalizler. Askorbatın

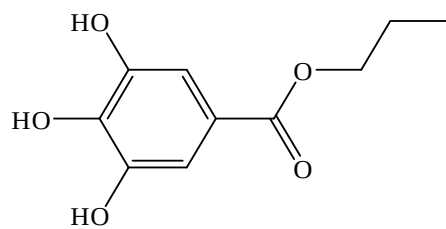
bakır katalizli oksidasyonu ise hidrojen peroksit ve hidroksil radikali oluşturur. Bu sebeple metal iyonları varlığında askorbik asit kaynaklı bazı olumsuz etkilerinin olması muhtemeldir. Askorbik asit-Cu⁺² karışımları birçok proteini inaktive edebilmektedir. Ayrıca askorbat, hidrojen peroksit varlığında Fe⁺³'ü Fe⁺²'ye indirgerken hidroksil radikali oluşumuna sebep olur (Halliwell and Gutteridge 1989).



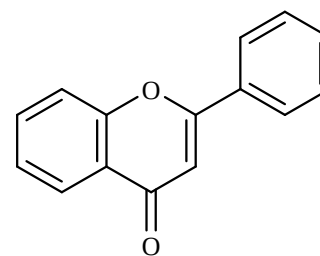
Kuersetin M_A : 302,24 g/Mol



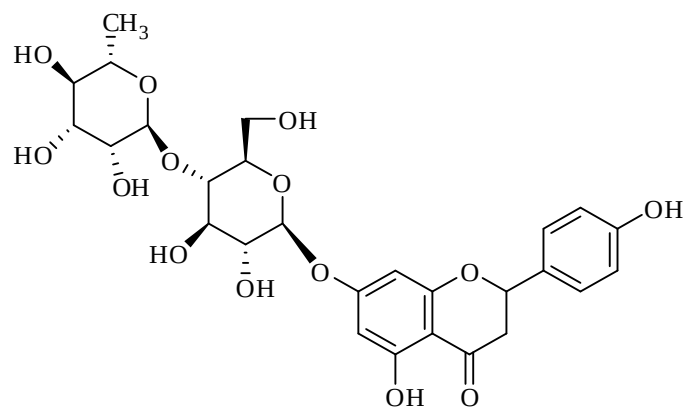
BHT M_A : 240,4 g/Mol



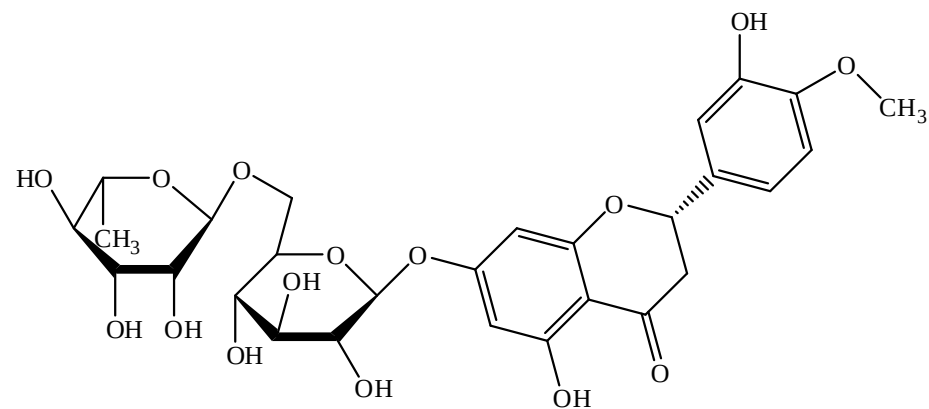
n-Propil Galat M_A : 212,2 g/Mol



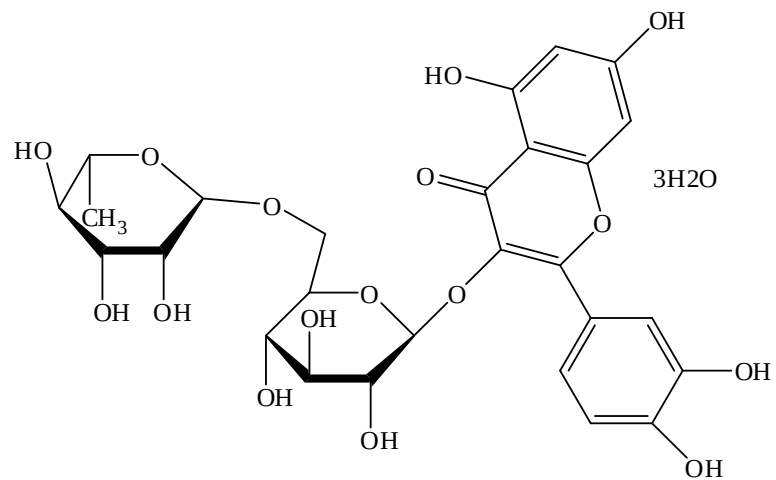
Flavon M_A : 222,25 g/Mol



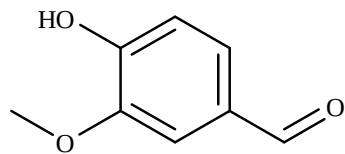
Naringin M_A : 580,55 g/Mol



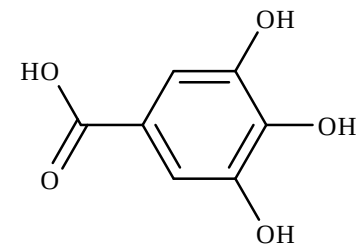
Hesperidin M_A : 610,57 g/Mol



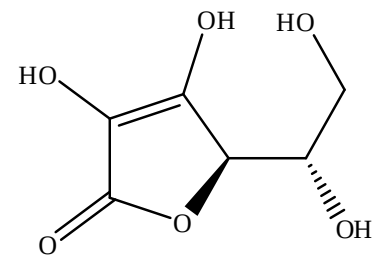
Rutin trihidrat M_A : 664 g/Mol



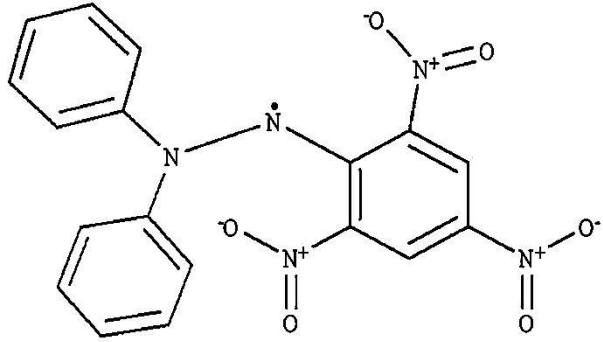
Vanilin M_A : 152,15 g/Mol



Gallik asit M_A : 170,1 g/Mol



C Vitamini M_A : 176,13 g/Mol



DPPH (1,1-Difenil, 2-pikril hidrazin) M_A : 394,33 g/Mol

Şekil 2.1 Deneylerde kullanılan bazı maddelerin molekül yapıları

Literatürde bir maddenin değişik açılardan antioksidan aktivitesinin tayini için geliştirilmiş birçok metot bulunmaktadır. Bunlardan bazıları: Hidrojen Peroksit Giderme Aktivitesi, Metal Şelatlama Aktivitesi, Süper oksit Radikalleri Giderme Aktivitesi, Serbest Radikal (DPPH) Giderme Aktivitesi (DPPH Radical Scavenging Capacity Assay), Oksijen Radikal Absorbans Kapasite Metodu (ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay), TRAP Metodu (Total Radical-trapping Antioxidant Potential), Beta-Carotene veya Crocine-Bleaching Metodu, TEAC Metodu (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), FRAP Metodu (Ferric Reducing Ability of Plasma), Lipid Ootoksidasyon Ölçüm Metodu gibi metotlardır. Bu metotlardan bazıları hakkında bilgi aşağıda verilmiştir.

Hidrojen peroksit giderme aktivitesi; genellikle Ruch ve arkadaşlarının belirledikleri metoda göre yapılır (Rutch et al. 1989). Numuneye ilave edilen 40 mM'lık hidrojen peroksit çözeltisinin 230nm'de azalan absorbansı belirlenir. Antioksidan miktarı arttıkça, 230nm'deki absorbans düşüşü daha hızlı ve daha fazla olmaktadır.

Metal şelatlama aktivitesinde genellikle Dinis ve arkadaşlarının belirledikleri metoda göre yapılır (Dinis et al. 1994). 2mM'lık ve 0,05 ml $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ve 0,35 ml saf su içeren çözeltisinin 562nm'de ferrozin ile verdiği absorbansı belirlenerek, antioksidan miktarı tayini yapılır. Çayın demir bağlaması, şelatlamaya örnek olarak verilebilir.

Süperoksit radikalleri giderme aktivitesinin spektrofotometrik olarak ölçümü genellikle Nishimiki metoduna (1972) göre yapılır. Numune 1 ml 60 μM 'lık PMS (Fenazin metasülfat) çözeltisi ile karıştırılır. Daha sonra sırayla 1ml 150 μM 'lık NBT (Nitroblue tetrazolium) çözeltileri ilave edilir. 560nm'de absorbansı okunur. Azalan absorbans, artan süperoksit radikalleri giderme aktivitesini gösterir.

Serbest radikal (DPPH) giderme aktivitesi, Blois metoduna (1958) göre yapılır. Numuneye 1mM'lık stok DPPH çözeltileri ilave edilerek 517 nm'de absorbans okunur.

Absorbanstaki azalma, antioksidan miktarı ile doğru orantılıdır. Yani antioksidan aktivite arttıkça, absorbanstaki düşme daha fazla olur.

ORAC metodunda AAPH (2,2-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride) ile peroksi radikali üretilir ve peroksi radikali fluorescein isimli floresans işaretli proteini oksitler. Antioksidan varlığında floresans maddenin oksidasyonu daha az olmaktadır. Bu metot, hem hidrofil antioksidanlar hem de lipofilik antioksidanlar için geçerlidir (Somogyi *et al.* 2007).

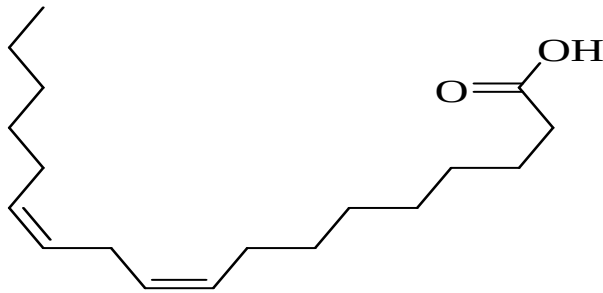
TRAP metodunda, yine AAPH ile peroksi radikali üretilir ve oluşan peroksi radikali lüminolü oksitler ve lüminol radikali oluşur. Oluşan radikal ışık yayar, bu ışığın şiddeti lüminometre ile ölçülür.

TEAC metodunda, ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) hidrojen peroksit ve peroksidaz varlığında veya hidroksi, peroksi, alkoksi ve inorganik radikallerin varlığında ABTS radikal katyonu oluşur. Bu radikal absorban vermektir. Antioksidanların varlığında daha az ABTS radikalleri söndürüleceği için daha düşük bir absorban gözlenmektedir. ABTS radikal katyonunun 660nm, 734nm ve 820nm'de absorbanının takibi yapılarak antioksidan aktivite tayini yapılır. Absorbanstaki azalma miktarı, antioksidan miktarıyla doğru orantılıdır (Dejian *et al.* 2005).

Lipit peroksidasyonunu takip etmek, oksidasyon derecesini belirlemek açısından önemlidir. Peroksidasyonun değişik basamaklarda takip edildiği birçok yöntem mevcut olduğu için lipit peroksidasyonunu takip için tek bir yöntem peroksidasyon hakkında geniş bir bilgi için yeterli olmayacaktır. Çünkü her bir yöntem, peroksidasyonun ancak belirli basamaklarını izlemeye yarar.

Maddelerin lipit peroksidasyonu inhibisyonu üzerine etkileri genellikle lipozom veya emülsiyon sistemlerde değerlendirilmektedir. Lipozom sistemi oluşturmak için lesitin, emülsiyon sistemi oluşturmak için ise genellikle linoleik asit kullanılır.

Linoleik asit, lipozom meydana getiremez. Linoleik asit, 18 karbonludur, cis konformasyona sahip iki çift bağ içermektedir. Çift bağlar, 9-10 ve 12-13 karbonlar arasında bulunur. Bu çift bağlardan dolayı linoleik asit, peroksidasyona doymuş yağlara göre daha yatkındır. Günümüzde linoleik asit omega-6 yağ asidi olarak da bilinmektedir. Linoleik asit suda çözünmez, emülgatörle suda karalı emülsiyonu oluşturulabilir.

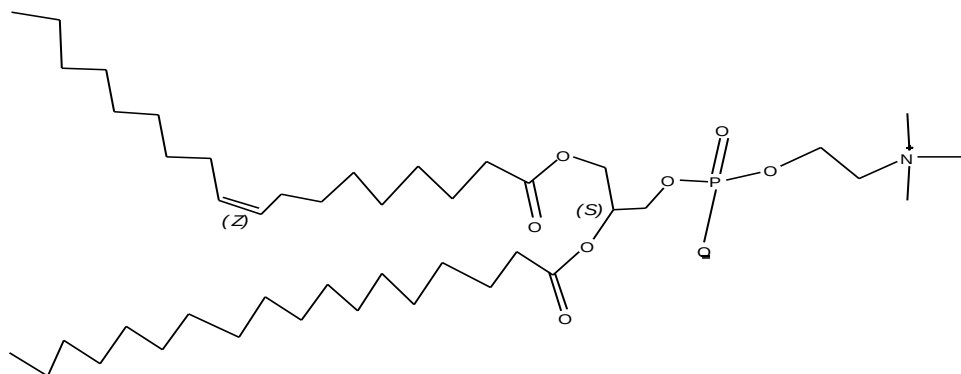


Şekil 2.2. Linoleik asitin yapısı

Lipozom sistemi oluşturmak için lesitin kullanılır. Lesitin hem polar hem de apolar uca sahip bir moleküldür. Oksijen gibi bir oksidanın varlığında oksidasyona uğrar ve MDA'ya (Malondialdehit) kadar parçalanabilir. MDA ise TBA (Tiyobarbütirik asit) reaktifi ile tespit edilebilmektedir.



Tepkimesi gerçekleşir. Ürün 535nm'de max. absorbans verir.



Şekil 2.3. Lesitinin yapısı

Lesitin, soya fasulyesinden elde edilir. Lesitin, insan vücudundaki yaşayan her hücrenin ihtiyacı olan bir fosfolipit'tir. Besinlerin hücre içine giriş ve çıkışlarını ayarlayan hücre zarı yapısının büyük kısmı, lesitin'den oluşur. Lesitin, beynin temel yapı taşlarından birisidir.

DPPH[•] bir serbest radikaldır ve DPPH radikal süpürme aktivitesinde ortama ilave edilen radikal maddedir. DPPH'nin radikal formu 517 nm'de absorbans verir. Radikal olmayan hali ise bu dalga boyunda absorbans vermez. Bu sebeple bir maddenin radikal süpürücü olup olmadığı DPPH ile tespit edilebilir. 517 nm'de absorbans ne kadar düşerse maddenin o derece kuvvetli radikal süpürücü olduğu, dolayısı ile o derece kuvvetli antioksidan olduğu düşünülür.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmalarımızda kullanılan, Linoleik asit, Askorbik asit, DPPH (1,1-Difenil,2-pikril hidrazin), Tween-20, BHT (Butylated hydroxytoluene), PBS (Phosphate buffered saline), Flavon, Naringin, Hesperidin, Rutin trihidrat, Vanillin Fluka'dan; etanol (%99,8), $\text{FeCl}_2 \cdot 3/4\text{H}_2\text{O}$, Kuersetin Riedel-Dehaen Aktiengesellschaft'dan; HCl (%35), TCA (Triklor asetik asit), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Amonyum tiyosiyanat Merck'den; n-Propil gallat, Gallik asit, Metanol, Lesitin ise Sigma'dan temin edilmiştir.

3.2.Yararlanılan Alet ve Cihazlar

UV-VIS Spektrofotometre	: Jasco V-530
Sonikatör	: Ultrasonic Cleaner Heater COCYSON CD- 4820
Etüv	: Elektro-Mag (0-300 ⁰ C)
Vorteks	: Fisons, Whirlimixer
Otomatik pipetler	: Biohit, Socorex ve Oxford Pipettors
Hassas Terazı	: Scaltec SBP 31 Function 1211025
Manyetik Karıştırıcı	: Stuart Scientific
Destile su üretme cihazı	: SANYO Gallenkamp PLC WCA900.RTA.9

3.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

1. 10 mM pH =7,4 fosfat tamponu hazırlanması: Bir tablet alınarak destile suda çözüldü ve hacmi 200 ml'ye tamamlandı.

2. Linoleik asit emülsiyonunun hazırlanması: 0,497 ml linoleik asit 80 ml pH=7,4 fosfat tamponuna ilave edildi. Emülgatör olarak 0,449 g Tween-20 ilave edilerek karışım magnetik karıştırıcıda 30 dakika karıştırıldı.

3. %3,5'lik HCl çözeltisinin hazırlanması : %35'lik HCl asitten 5,00 ml alınarak hacmi 50 ml'ye destile suyla tamamlandı.
4. 20 mM FeCl₂ çözeltisi hazırlanması: 0,1521 g FeCl₂.3/4H₂O, 60 ml %3,5'luk HCl ile çözüldü.
5. $7,7 \times 10^{-4}$ M FeCl₂ çözeltisi hazırlanması: 0,0975 g FeCl₂.3/4H₂O, 1000 ml suda çözüldü.
6. %30'luk NH₄SCN Çözeltisinin hazırlanması: 15 g NH₄SCN 35 g destile suda çözüldü.
7. TBA reaksiyonu için çözelti hazırlanması: 0,375 g TBA+15 g TCA+2,2 ml %35'lik HCl alınarak toplam hacim 100 ml'ye destile suyla tamamlandı.
8. 0,5 mM DPPH radikal çözeltisinin hazırlanması: 0,0194 g 1,1-Difenil,2-pikril hidrazin maddesinden alınır, 200 ml metanolle çözülür.
9. Test edilen maddelerin stok çözeltilerinin konsantrasyonları: Kuersetin (10mg/5ml etanol), BHT (5mg/5ml metanol), n-Propil gallat (10 mg/5 ml etanol), Flavon (5mg/5ml etanol), Naringin (5mg/5ml metanol), Hesperidin (4mg/10ml metanol sıcak su banyosunda 1d.k tutuldu.), Rutin trihidrat (5mg/5ml metanol), Gallik asit (5mg/5ml etanol), Vanillin (10mg/5ml etanol) ve C vitamini (Askorbik asit: 10mg/5ml destile su)

3.4. Maddelerin Lipit Peroksidasyon Üzerine İnhibisyon Etkileri

3.4.1. Lesitin Lipozom Sisteminin Hazırlanması ve Peroksidasyon İnhibisyonunun Takibi

Lipozom sistemi hazırlanırken öncelikle 0,3 g lesitin 1,5 ml kloroform ile bir 1000 ml'lik cam balon içerisinde çözüldü. Daha sonra çeker ocak içerisinde balondaki karışımdan N₂ gazı yardımıyla kloroform uzaklaştırıldı. Bu işlem sırasında balon sürekli olarak dairesel şekilde çalkalanmış ve lesitin balonun iç yüzeyine tabakalar şeklinde

yayılması sağlanmıştır. Kloroform tamamen uzaklaştıktan sonra balona 120 ml 0,067 M pH 7,4 fosfat tamponu eklendi. Daha sonra balon sonikatörde 15 dakika sonikate edildi. Böylelikle lesitin lipozom sistemi elde edilmiş oldu.

Deney tüplerinin içeriği, numune tüplerine 20 µl numune stok çözeltisi ilave edildiği düşünülerek Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Lipozom Sisteminde Deney Tüplerindeki Çözeltilerin Miktarları

	Kontrol	Numune	Kör
Lipozom	1,5 ml	1,5 ml	-
Tampon	400 µl	380 µl	1880 µl
Numune stok çözelti	-	20 µl	20 µl
Fe²⁺ çözeltisi (7,7x10⁻⁴ M)	100 µl	100 µl	100 µl
<i>Toplam Hacim</i>	<i>2 ml</i>	<i>2 ml</i>	<i>2 ml</i>

Deney hazırlandıktan sonra tüpler 40°C’de inkübasyona bırakıldı. Değişik zaman aralıklarında bu tüplerden örnekler alınarak TBA reaktifi ile peroksidasyonun takibi yapıldı. Bu işlem şu şekilde yapılmıştır: Numunelerden 0,4’er ml alınarak ependorf tüplere ilave edilmiş ve müteakiben her bir tüpe 0,8 ml TBA çözeltisi ilave edilerek ependorf tüpler ağızları kapalı olarak 15 dakika kaynayan suda bekletilmiştir. Daha sonra tüpler 5000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantın absorbansı 535 nm’de köre karşı okunmuştur.

3.4.2. Linoleik Asit Emülsiyonunun Hazırlanması ve Peroksidasyon İnhibisyonunun Takibi

Maddelerin linoleik asit emülsiyonu üzerine inhibisyon etkileri tiyosiyanat metoduna göre belirlendi. Önce maddelerin stok çözeltileri hazırlandı.

İstenilen miktarlara karşılık gelen hacimde stok çözelti deney tüplerine otomatik pipetlerle kondu ve hacim tampon çözeltiyle 2,5 ml'ye tamamlandı. Daha sonra her bir deney tüpüne 2,5 ml linoleik asit emülsiyonu ilave edildi. Kontrol olarak 2,5 ml tampon çözelti ve 2,5 ml linoleik asit emülsiyonu karışımı kullanıldı. Test edilen maddelerin ölçüm sırasında meydana getirecekleri girişimi önlemek için, emülsiyon yerine tampon içeren test karışımı kullanılmış, bunlardan kaynaklanan absorbands değeri, ilgili numunenin ölçülen absorbands değerinden çıkarılarak gerçek değer bulunmuştur.

İnkübasyon 40°C'de gerçekleştirildi. Belirli aralıklarla tüplerden 100'er µl alınarak 4,7 ml metanol bulunan deney tüplerine konarak 100 µl Fe²⁺ çözeltisi, 100 µl SCN⁻ çözeltisi ilave edildi. Kör, 4,8 ml etanol bulunan deney tüpüne 100 µl Fe²⁺ çözeltisi, 100 µl SCN⁻ çözeltisi ilavesiyle elde edildi. Numunelerin 500 nm'deki absorbandsları köre karşı okundu.

Deney tüplerinin içeriği, numune tüplerine 100 µl numune stok çözeltisi ilave edildiği düşünülerek Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Emülsiyon Sisteminde Deney Tüplerindeki Çözeltilerin Miktarları

	Kontrol	Numune	Kör
Emülsiyon	2,5 ml	2,5 ml	-
Tampon	2,5 ml	2400 µl	4900 µl
Numune stok çözelti	-	100 µl	100µl
<i>Toplam Hacim</i>	<i>5 ml</i>	<i>5 ml</i>	<i>5 ml</i>

3.5.Maddelerin DPPH Radikal Süpürücü Etkilerinin Belirlenmesi

Maddelerin DPPH radikal süpürücü etkileri Blois (1958) metoduna göre belirlenmiştir.

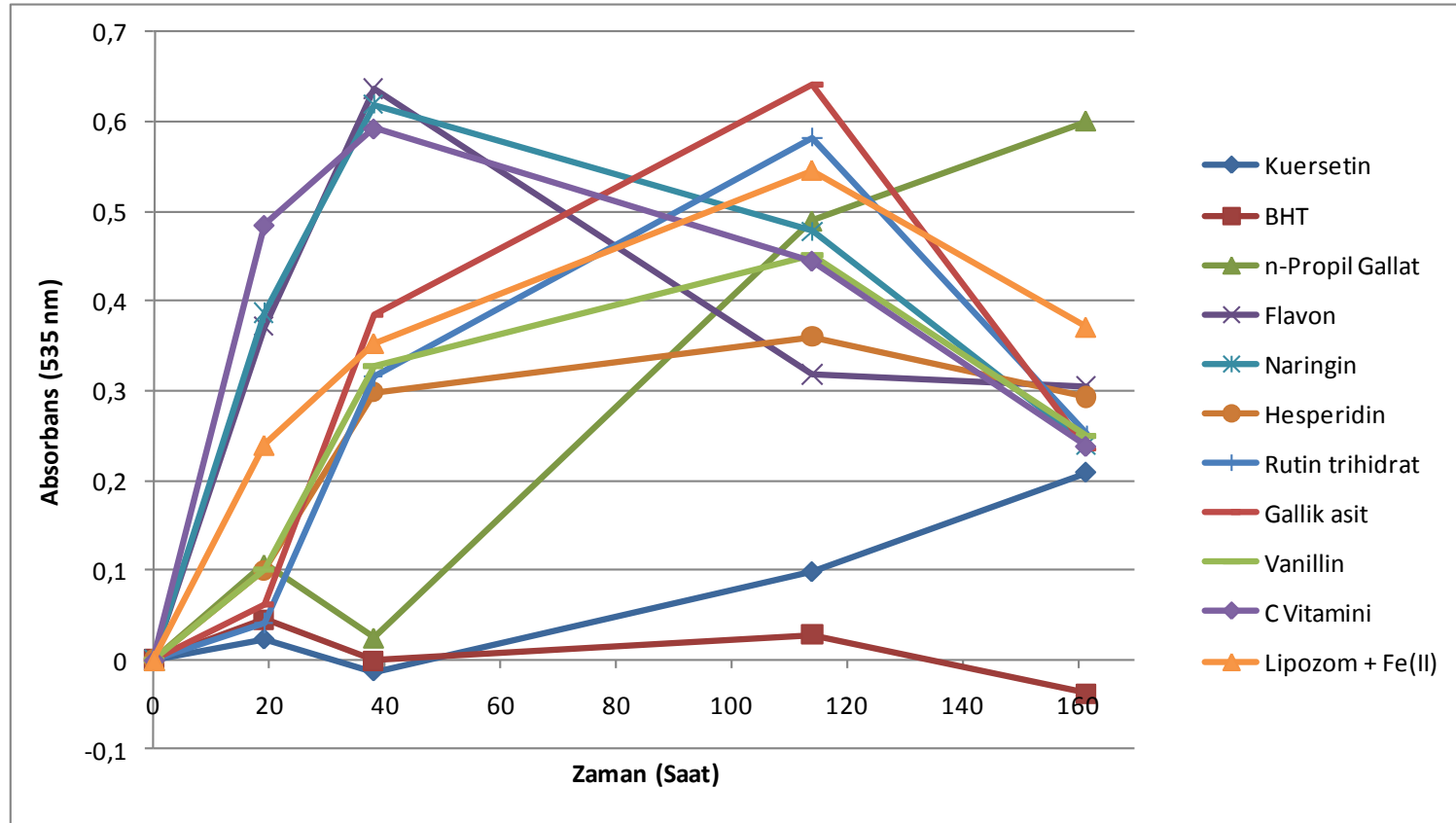
Numuneler tüplere konulduktan sonra 0,5 ml 0,5 mM DPPH stok çözeltisinden deney tüplerine konuldu ve hacim 2,0 ml'ye ilgili çözücü ile tamamlandı. Kontrol olarak 0,5 ml DPPH çözelti ve 1,5 ml etanol karışımı kullanıldı.

Tüpler 30 dakika karanlık ortamda bekletildi. Ölçüm yapılmadan önce deney tüpleri vortex cihazı ile homojenize edildi. Kör numune, 2 ml etanol kullanıldı. Numunelerin 517 nm'deki absorbansları köre karşı okundu.

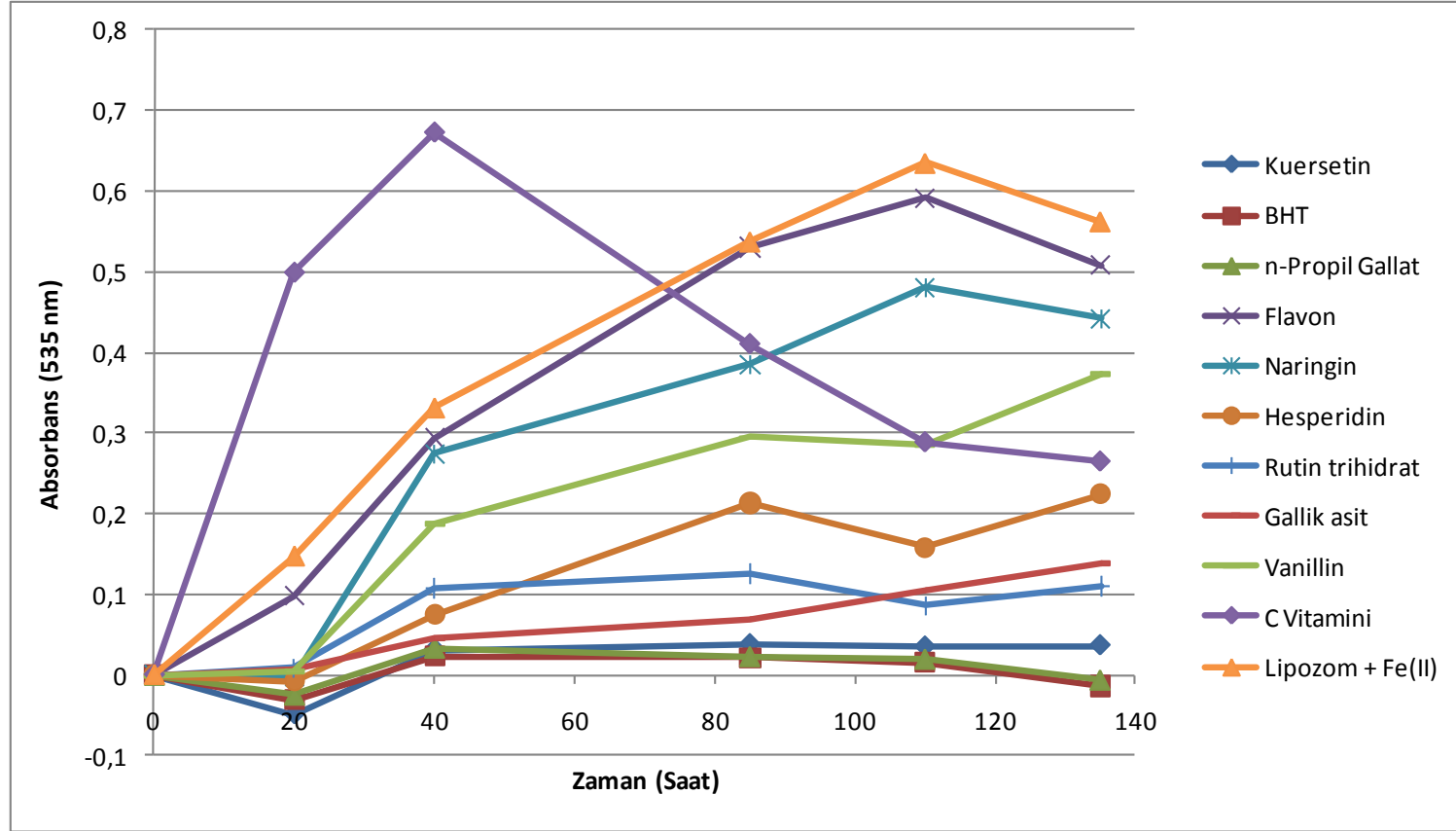
Aynı zamanda; maddelerin DPPH radikal süpürücü etkilerinin belirlenmesinin ardından n-propyl gallate, Kuersetin, BHT, Hesperidin, Rutin trihidrat ve Gallik asitin, IC_{50} değerlerine bakıldı. IC_{50} değeri DPPH absorbansını %50 düşüren madde konsantrasyonudur. Bu amaçla değişik konsantrasyonlarda numune çözeltileri hazırlanarak bunlara DPPH ilavesinden sonra 517 nm'de numunelerin absorbansı okunmuştur.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

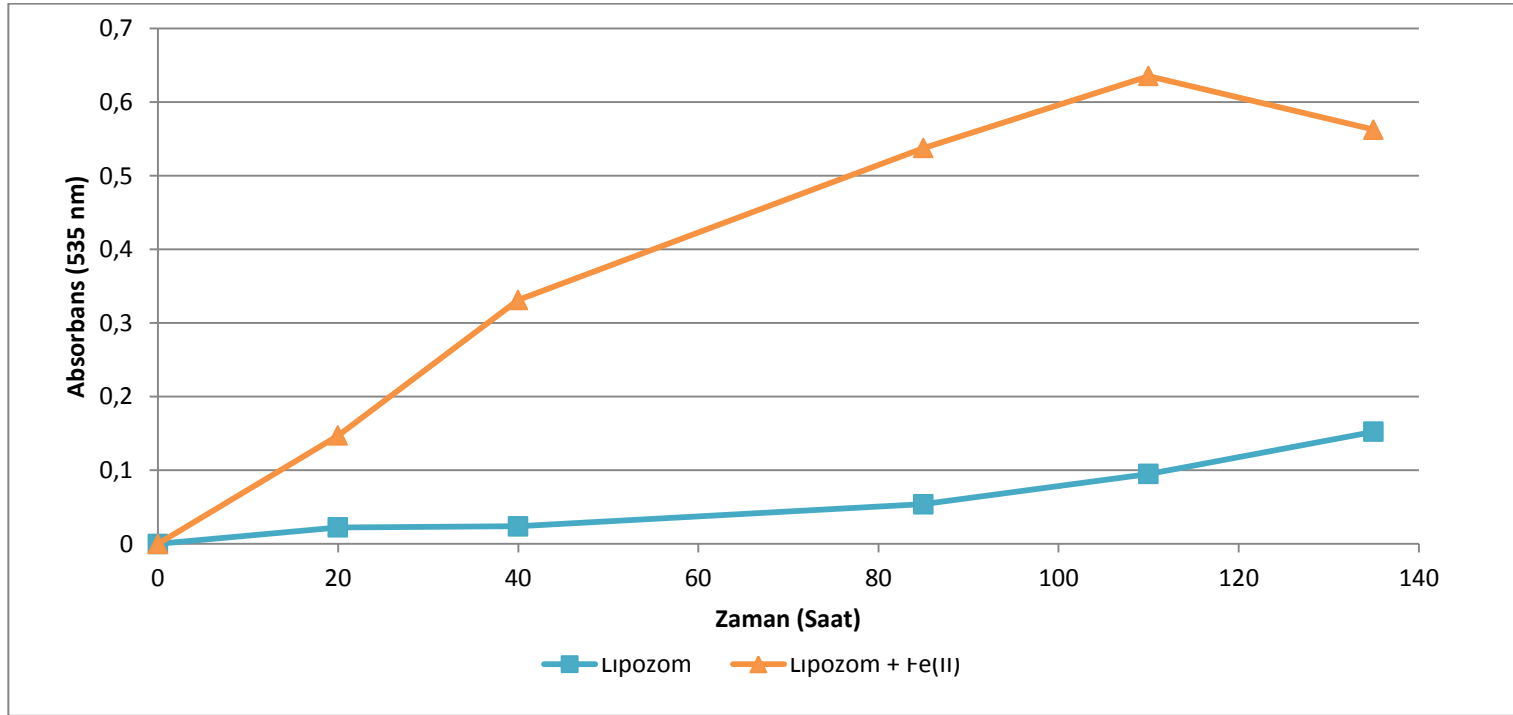
Test edilen 10 bileşiğin, lesitin lipozom sisteminde, 20 ve 40 µg/ml konsantrasyonda lipit peroksidasyon üzerine inhibisyon etkileri Şekil 4.1 ve 4.2 görülmektedir. Lipozom sisteminde Fe²⁺'nin peroksidasyonu hızlandırıcı etkisi Şekil 4.3'de verilmiştir. Bu bileşiklerin linoleik asit emülsiyon sistemi üzerine etkileri ise Şekil 4.4 ve 4.5'den görülebilir. Test edilen bileşiklerin DPPH radikal süpürücü etkileri ve bunlardan altı tanesinin IC₅₀ değerleri sırasıyla Şekil 4.6-4.12'de verilmiştir (IC₅₀ değeri: DPPH absorbansını % 50 düşüren madde konsantrasyonudur). Bu altı madde: n-propil gallat, Kuersetin, BHT, Hesperidin, Rutin trihidrat ve Gallik asittir. Bu maddelerin IC₅₀ değerleri: BHT için 13,46 µg/ml, kuersetin için 1,14 µg/ml, n-propil gallat için 1,10 µg/ml, hesperidin için 122,04 µg/ml, rutin trihidrat için 2,39 µg/ml, gallik asit için 0,80 µg/ml olarak bulunmuştur.



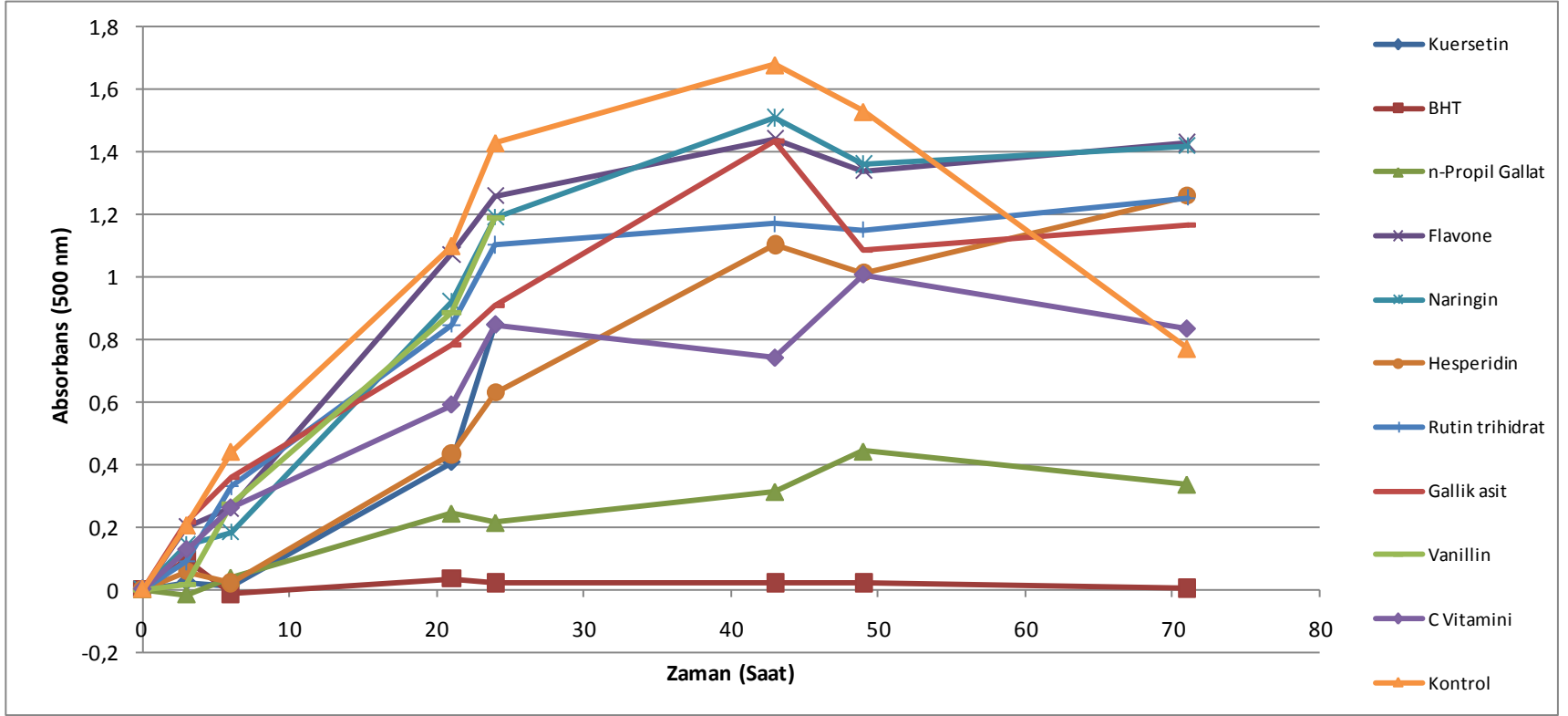
Şekil 4.1. Maddelerin (20 µg/ml) lipozom sistemde lipid peroksidasyonu üzerine inhibisyon etkileri



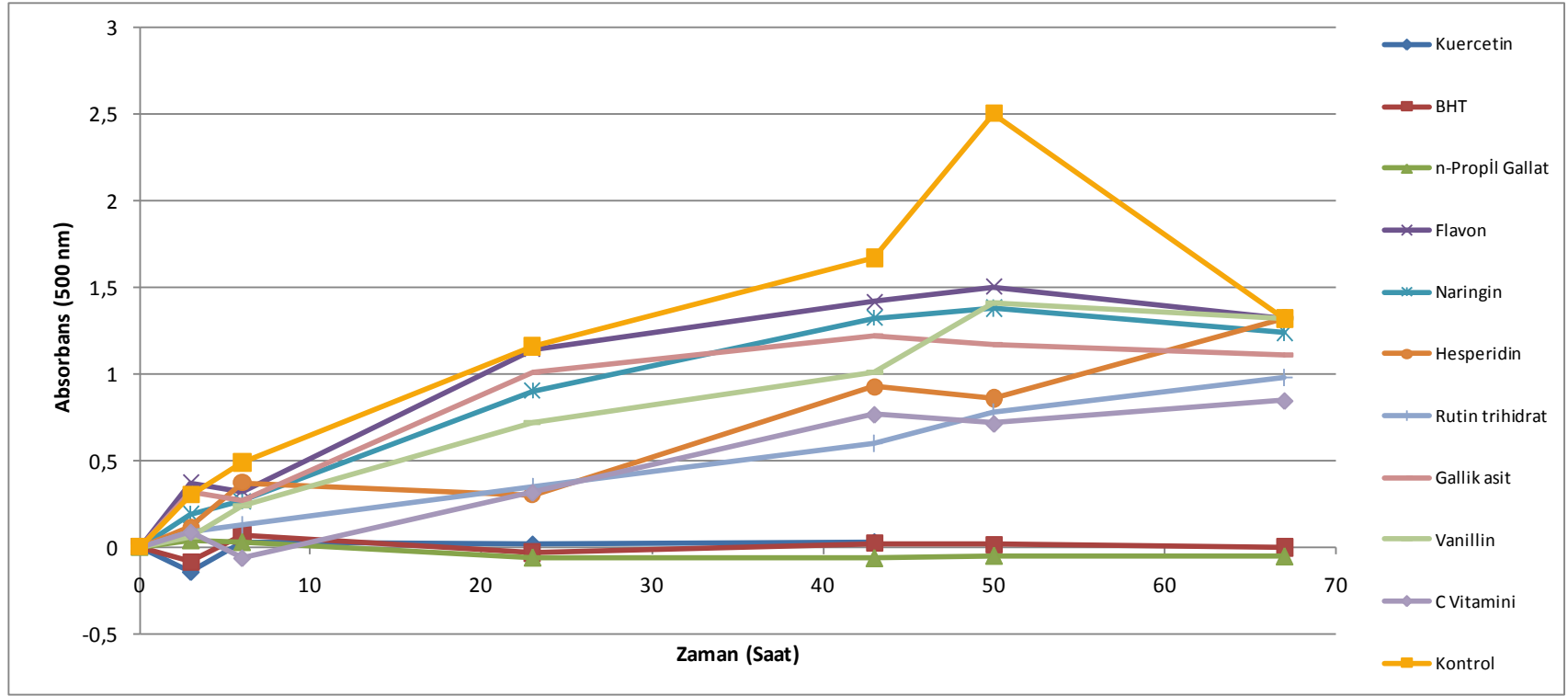
Şekil 4.2. Maddelerin (40 µg/ml) lipozom sistemde lipid peroksidasyonu üzerine inhibisyon etkileri



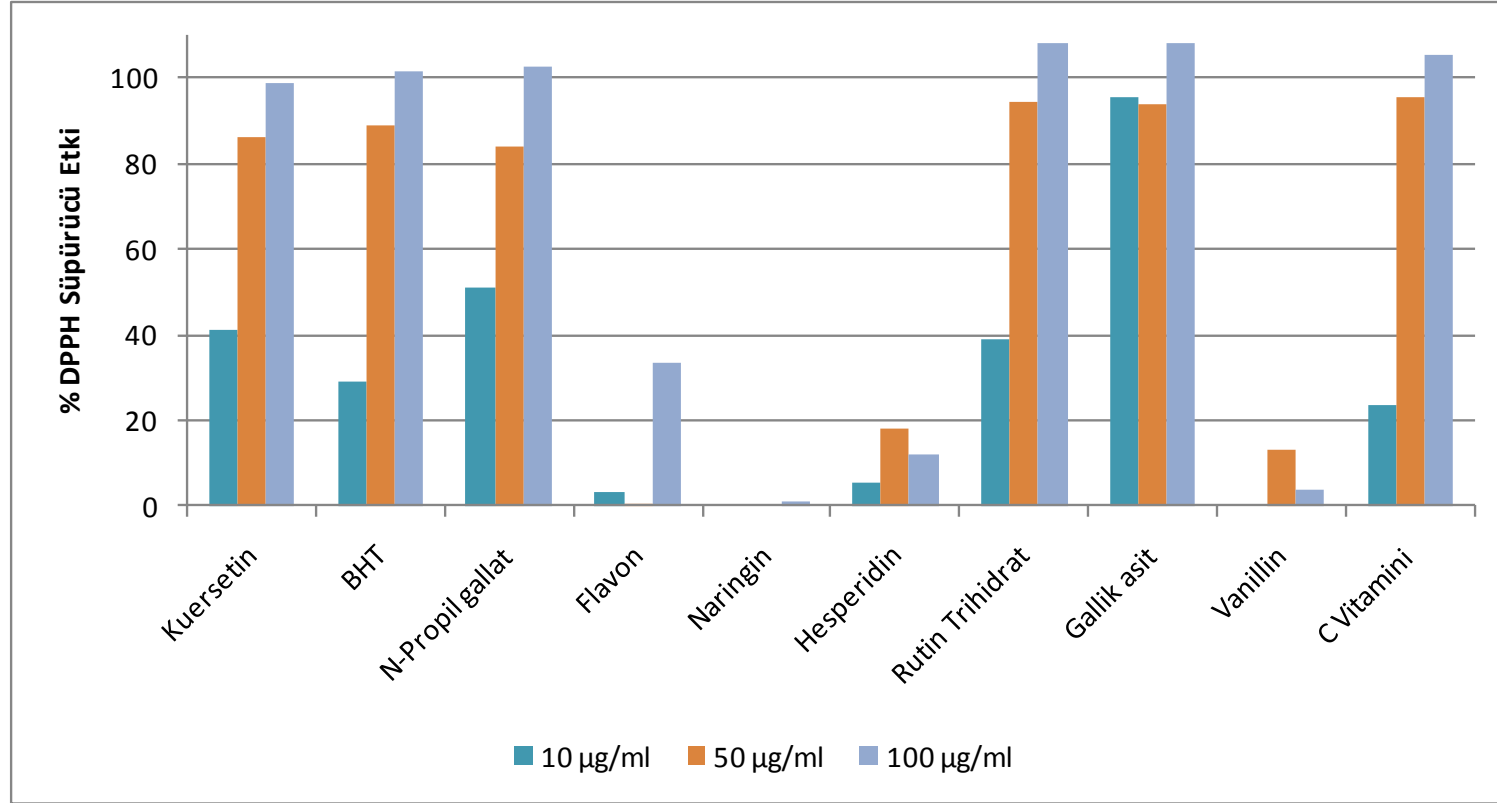
Şekil 4.3. Lesitin lipozom sisteminde Fe^{2+} 'nin etkisi



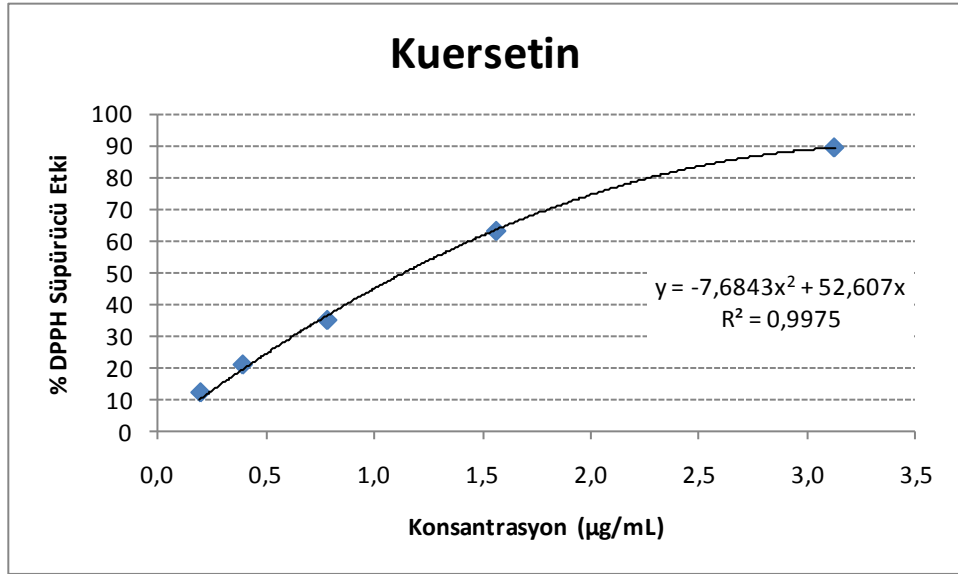
Şekil 4.4. Maddelerin (40 µg/ml) emülsiyon sistemde lipid peroksidasyonu üzerine inhibisyon etkileri



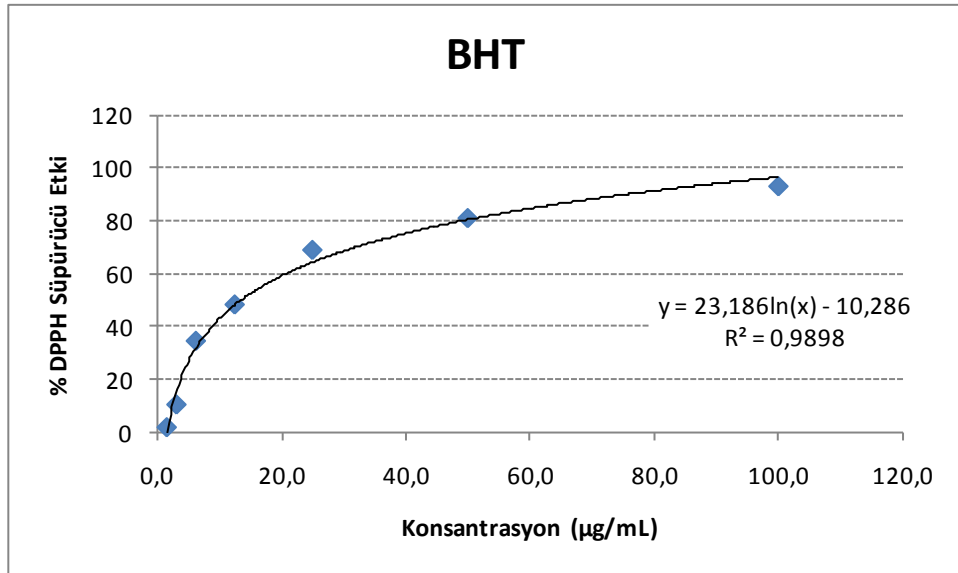
Şekil 4.5. Maddelerin (100 µg/ml) emülsiyon sistemde lipit peroksidasyonu üzerine inhibisyon etkileri



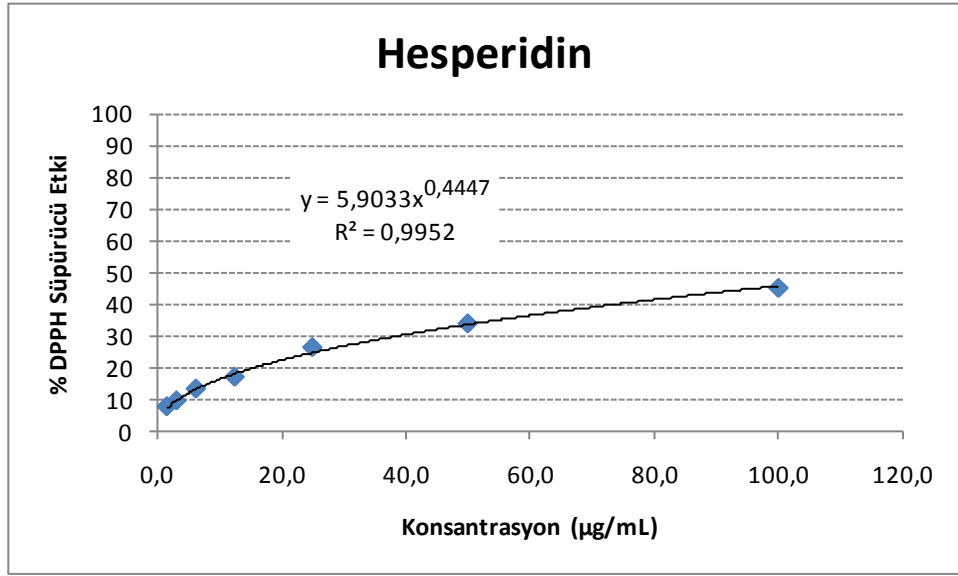
     4.6. Maddelerin DPPH radikali s       etkileri



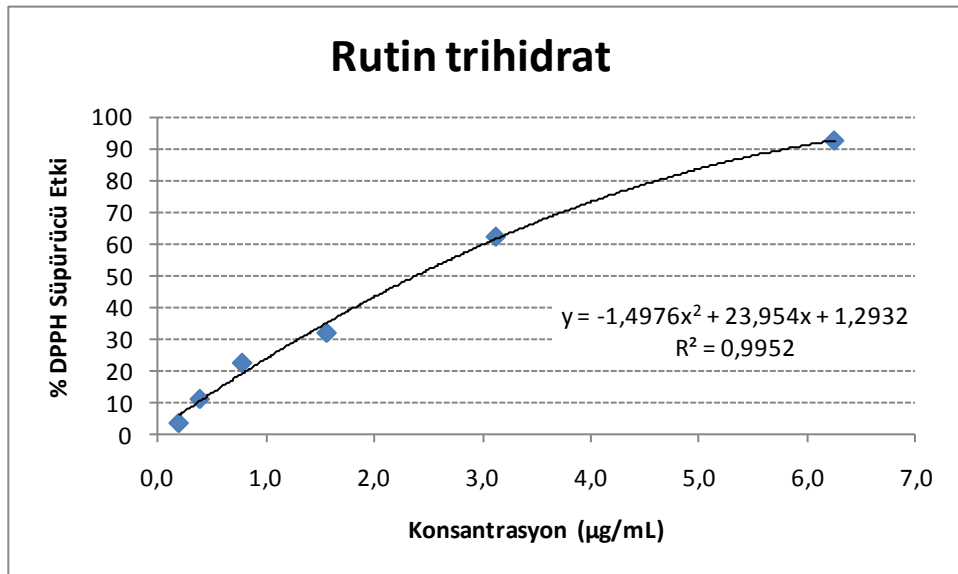
Şekil 4.7. Kuersetinin konsantrasyona karşı % DPPH süpürücü etki grafiği (IC50 değeri: 1,14 µg/ml)



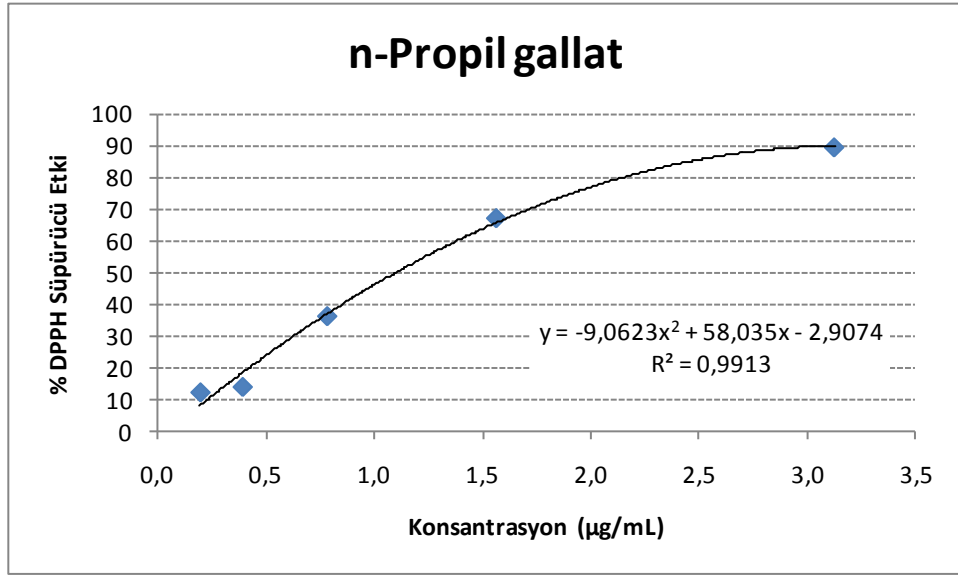
Şekil 4.8. BHT'nin konsantrasyona karşı % DPPH süpürücü etki grafiği (IC50 değeri: 13,46 µg/ml)



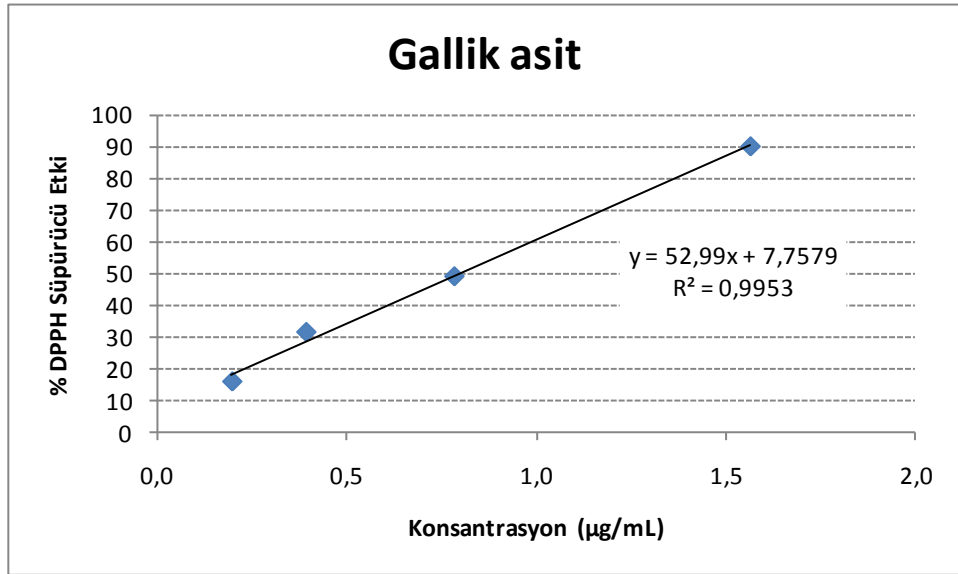
Şekil 4.9. Hesperidin'in konsantrasyona karşı % DPPH süpürücü etki grafiği (IC50 değeri: 122,04 µg/ml)



Şekil 4.10. Rutin trihidrat'ın konsantrasyona karşı % DPPH süpürücü etki grafiği (IC50 değeri: 2,39 µg/ml)



Şekil 4.11. n-Propil gallat'ın konsantrasyona karşı % DPPH süpürücü etki grafiği (IC50 değeri: 1,10 µg/ml)



Şekil 4.12. Gallik asitin konsantrasyona karşı % DPPH süpürücü etki grafiği (IC50 değeri: 0,80 µg/ml)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmada 10 adet bileşiğin, linoleik asit emülsiyonu sistemindeki ve lesitin lipozom sistemindeki lipit peroksidasyonu inhibisyon etkileri incelendi. Daha sonra ise her bir maddenin DPPH (1,1-Difenil, 2-pikril hidrazin) radikal süpürücü etkisi belirlendi. Çalışmada kullanılan maddeler: Kuersetin, BHT, n-Propil gallat, Flavon, Naringin, Hesperidin, Rutin trihidrat, Gallik asit, Vanillin ve C vitaminidir.

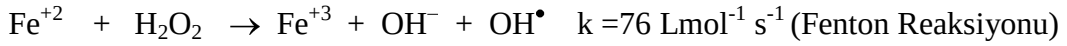
Lipozom ve emülsiyon sistemlerinde; kuersetin, n-propil gallat ve BHT'nin diğerlerinden daha etkili antioksidan oldukları görülmektedir (Şekil 4.1 ve 4.2). Çalışılan 10 adet maddenin değişik seviyelerde DPPH (1,1-Difenil, 2-pikril hidrazin) radikal süpürücü etkisinin olduğu Şekil 4.6'dan görülebilir.

Lipozom sisteminde 20µg/ml konsantrasyonda yapılan deneyde BHT, kuersetin ve n-propil gallat maddeleri daha iyi antioksidan özellik sergilemiştir. Bununla birlikte diğer maddelerin pek de etkili olmadıkları; üstelik flavon, naringin ve C vitamininin oksidasyonu bir miktar hızlandırdıkları görülmüştür.

Lipozom sisteminde 40 µg/ml konsantrasyonda ise yine BHT, n-propil gallat ve kuersetin maddeleri daha iyi antioksidan özellik göstermiştir. Lipozom sisteminde 40 µg/ml konsantrasyonda naringin, rutin trihidrat, gallik asit, hesperidin ve vanillin, lipozom sisteminde etkilidir. Yine aynı şekilde flavon, naringin ve C vitamininin 40 µg/ml konsantrasyonda etkisiz oldukları görülmüştür. Ancak bu sefer flavon ve naringinin aksine C vitamininin, lipozom sisteminde, lipit peroksidasyonu hızlandırıcı etkisi yine devam etmiştir. Kısacası C vitamini, lipozom sisteminde prooksidan olarak davranmıştır. Emülsiyon sisteminde ise böyle bir davranış görülmemektedir.

Materyal ve Yöntem bölümünde bahsedildiği üzere, lipozom sistemi ile emülsiyon sistemi arasındaki temel farklardan biri, lipozomdaki lesitin peroksidasyonunu hızlandırmak için ortama Fe^{2+} iyonu ilave edilmektedir. Fe^{2+} iyonu, Şekil 4.3'de görüldüğü gibi lesitin peroksidasyonunu hızlandırmaktadır. Bu sırada Fe^{2+} 'nin Fe^{3+} 'e

yükseltgenmesi meydana gelmektedir. Askorbik asit iyi bir indirgeyici madde olduğu için Fe^{3+} 'ü, Fe^{2+} 'ye indirgeyebilir. Daha önceden bahsedildiği üzere Fe^{2+} , Fenton reaksiyonu ile reaktif bir radikal olan $OH^\cdot$ radikali oluşumuna neden olmaktadır.



$OH^\cdot$ radikali, zincir reaksiyon başlatarak peroksidasyonu hızlandırabilmektedir.

Emülsiyon sisteminde 40 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda; BHT ve n-propil gallat'ın diğer maddelere göre çok daha iyi antioksidan olduğu görülmektedir. Diğer maddeler de değişik seviyelerde antioksidan özelliğe sahip olmakla beraber, C vitamini de bu sistemde antioksidan olarak davranmıştır.

Emülsiyon sisteminde 100 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda ise lipozom sisteminde olduğu gibi BHT, n-propil gallat, kuersetin maddeleri diğer maddelere göre daha iyi antioksidan özellik sergilemiştir. BHT, hem 40 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda hem de 100 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda antioksidan oksidasyon süresince inhibisyon sergilemiştir. Emülsiyon sisteminde 100 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda; gallik asit, naringin, flavon maddelerinin, antioksidan aktivite yönünden etkisinin nispeten daha az olduğu gözlenmiştir.

Çalışılan 10 adet madde 10, 50 ve 100 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda DPPH radikalini değişik seviyelerde süpürdüğü ve bu aktivitenin artan konsantrasyon ile arttığı görülmüştür (Şekil 4.6). Bu 10 maddeden altısının nispeten daha yüksek bir DPPH radikal süpürücü etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Radikal süpürücü etkinin nispeten yüksek olduğu bu maddeler: BHT, kuersetin, n-propil gallat, rutin trihidrat, gallik asit ve C vitamini dir. Daha sonra askorbik asit dışındaki kalan 5 madde ve hesperidinin IC_{50} değerleri (DPPH absorbansını % 50 düşüren madde konsantrasyonu) tespit edilmiştir. $IC_{50_{BHT}}$:13,46 $\mu\text{g/ml}$, $IC_{50_{kuersetin}}$:1,14 $\mu\text{g/ml}$, ($IC_{50_{n-propil\ gallat}}$: 1,10 $\mu\text{g/ml}$, $IC_{50_{hesperidin}}$:122,04 $\mu\text{g/ml}$, $IC_{50_{rutin\ trihidrat}}$: 2,39 $\mu\text{g/ml}$, $IC_{50_{gallik\ asit}}$: 0,80 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur.

Şekil 2.1’den de görülebileceği gibi yüksek radikal süpürücü etkiye sahip moleküllerin hepsi fenolik bileşiktir. Fenolik bileşikler fenoksi radikalının rezonans kararlılığından dolayı, rahatlıkla H ile birlikte bir elektronunu karşısındaki bir radikale verip radikalın elektronunu eşleştirerek onun reaktivitesini düşürmektedir. Bu olaya radikal süpürücü etki denmektedir. Böylece bir fenolik madde olmayan flavonun ise neden iyi bir radikal süpürücü olmadığını anlamak, kolaylaşmaktadır. Ancak naringin, fenolik bir maddedir ve radikal süpürücü etkileri çalışılan konsantrasyonda diğerlerine göre daha düşüktür. Nispeten büyük molekül kütlelerinden dolayı, ortamdaki hacim başına düşen fenolik OH sayısı da nispeten daha düşük olacaktır. Rutin trihidrat da yüksek mol kütleye sahip olmasına rağmen aynı kütledeki naringin ve hesperidine göre oldukça yüksek bir DPPH radikali süpürücü etkiye sahiptir. Ancak rutin trihidratın yapısına bakılacak olursa (Şekil 2.1), molekül 4 fenolik OH grubuna sahiptir. Benzer şekilde etkili bir antioksidan olarak ortaya çıkan kuersetin de 4 adet fenolik OH içermektedir. Yine n-propil gallat ve gallik asitin 3 adet fenolik OH içermesi nispeten yüksek DPPH radikal süpürücü aktivitelerini açıklamaktadır. Vanillin ise bir adet fenolik OH grubuna sahiptir ve aktivitesi nispeten düşük bir moleküldür. Burada bu beklentilerin aksi yönde davranan BHT’dir. BHT bir adet fenolik OH grubuna sahip olmasına rağmen oldukça ekili bir radikal süpürücüdür.

Gallik asit ve n-propil gallat aynı sayıda fenolik OH içermelerine ve benzer moleküler yapıya sahip olmalarına rağmen, emülsiyon ve lipozom sistemlerinde n-propil gallatın daha iyi bir şekilde lipit peroksidasyonunu inhibe ettiği görülmektedir (Şekil 4.1 ve 4.2 ile Şekil 4.4 ve 4.5). Burada aktiviteyi belirleyici faktör moleküllerin polaritesi yani lipit ortamındaki çözünürlükleri olarak düşünülebilir. Çünkü peroksidasyon lipit ortamında meydana gelmektedir ve antioksidanın lipitteki çözünürlüğü arttıkça yani polaritesi düştükçe, antioksidan aktivitesinin de artması beklenebilir. n-propil gallat, propil grubundan dolayı gallik asite göre daha az polar bir moleküldür ve bu sebeple yağdaki çözünürlüğünün daha fazla olması ve dolayısıyla daha etkin antioksidan olması beklenen bir durumdur.

Sonuç olarak; 1. Fenoksi radikalının rezonans kararlılığından dolayı fenolik maddeler antioksidan özellik sergiler, 2. Antioksidan aktivite için fenolik OH sayısı önemlidir;

ancak tek başına yeterli değildir, 3. Test sistemine ve molekülün polaritesine göre antioksidan aktivite değişebilir, 4. Bir sistemde antioksidan olarak davranan bir molekül, başka sistemde prooksidan olarak davranabilir (Örneğin askorbik asit).

KAYNAKLAR

- Antoniades, C., Tousoulis, D., Tentolouris, C., Toutouzas, P., Stefanadis, C., 2003. Oxidative stress, antioxidant vitamins, and atherosclerosis - From basic research to clinical practice. *Herz*, 28 (7), 628-638.
- Arrigoni, O., De Tullio, M.C., 2002. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 1569 (1-3), 1-9.
- Aruoma, O. I., 1993. Free radicals and foods. *Chemistry in Britain*, 29 (3), 210-214.
- Aruoma, O.I., 1996. Characterisation of drugs as antioxidant prophylactics. *Free Rad. Biology and Medicine*, 20 (5), 675-705.
- Aruoma, O.I., 1998. Free Radicals, Oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of The American Oil Chemists Society*, 75 (2), 199-212.
- Aruoma, O.I., Cuppett, S.L., 1997. Antioxidant Methodology in vivo and in vitro Concept. AOCs Press, Champaign, Illinois, p 241.
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 26, 1199-1200.
- Bibby, M.C., Double, J.A., 1993. Flavone acetic-Acid from laboratory to clinic and back. *Anti-cancer drugs*, 4 (1), 3-17.
- Biesaga, M., Pyrzynska, K., 2009. Analytical Procedures for Determination of Quercetin and its Glycosides in Plant Material. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 39 (2), 95-107.
- Bilaloğlu, G.V. ve Harmandar, M., 2000. Flavonoidler, Aktif Yaynevi, Erzurum.
- Blasco, A.J., Crevillén, A.G., González, M.C., Escarpa, A., 2007. Direct electrochemical sensing and detection of natural antioxidants and antioxidant capacity in vitro systems. *Electroanalysis*, 19 (22), 2275-2286.
- Block, G., Patterson, B. and Subar, A., 1992. Fruit, Vegetables, and Cancer Prevention - A Review of The Epidemiologic Evidence. *Nutrition and Cancer-An International Journal.*, 18 (1), 1-29.
- Branen, A.L., 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Journal of The American Oil Chemists Society*, 52 (2), 59-63.
- Davies, K.J.A., 2000. Oxidative stress, antioxidant defences, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*, 50, 279-289.
- Dinis, T.C.P., Maderia, V.M.C., Almeida, L.M., 1994. Action of phenolic derivates (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315 (1), 161-169.
- Duthie, S.J., Ma, A.G., Ross, M.A. and Collin, A.R., 1996. Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Research*, 56 (6), 1291-1295.
- Fessenden, R. J., Fessenden, J. S., 1990. Organic Chemistry, Brooks/Cole Publishing Company, Pacific Grove, California.
- Frankel, E. N., 1980. Lipit oxidation Prog. Lipid Res., 19, 1-22.

- Frankel, E.N., Huang, S.W., Kanner, J. and German, J.B., 1994. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils versus emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42 (5), 1054-1059.
- Frankel, E.N., Waterhouse, A.L. and Teissedre, P.L., 1995b. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 43 (4), 890-894.
- Fujii, J., Iuchi, Y., Matsuki, S., Ishii, T., 2003. Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. *Asian Journal of Andrology*, 5 (3), 231-242.
- Gaetke, L.M., Chow, C.K., 2003. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189 (1-2), 147-163.
- Garg, A., Garg, S., Zaneveld, L.J.D., Singla, A.K., 2001. Chemistry and pharmacology of the Citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytotherapy Research*, 15 (8), 655-669.
- Gomberg, M., 1900. An incidence of trivalent carbon trimethylphenyl. *J. Am Chem. Soc.*, 22, 757-771.
- Halliwell, B., 1996. Antioxidant in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, 16, 33-50.
- Halliwell, B., Gutteridge J.M.C., 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, 543, Oxford.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods in Enzymology*, 186, 1-85.
- Henle, E.S., Linn, S., 1997. Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron hydrogen peroxide. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (31), 19095-19098.
- Huang, D., OU, B., L. Prior, R., 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1841-1856.
- Jagetia, A., Jagetia, G.C., Jha, S., 2007. Naringin, a grapefruit flavanone, protects V79 cells against the bleomycin-induced genotoxicity and decline in survival. *Journal of Applied Toxicology*, 27 (2), 122-132.
- Ji, L.L., Leichtweis, S., 1997. Exercise and oxidative stress: Sources of free radicals and their impact on antioxidant systems. *Age*, 20 (2), 91-106.
- Kanner, J., Harel, S. and Jaffe, R., 1991. Lipid peroxidation of muscle food as affected by NaCl. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 39 (6), 1017-1021.
- Keha, E.E., ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2007. *Biyokimya, Aktif Kitabevi*, 5.baskı, 233-234 s, Erzurum.
- Kohno, Y., Egawa, Y., Itoh, S., Nagagaoka, S., Takahashi, M. and Mukai, K., 1995. Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in n-butanol. *Biochimica et biophysica acta-lipids and lipid metabolism*, 1256 (1), 52-56.
- Koltover, V. K., 2010. Antioxidant biomedicine: from free radical chemistry to systems biology mechanisms. *Russian Chemical Bulletin*, 59 (1), 37-42.
- Lambeth, J.D., 2004. Nox enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology*, 4 (3), 181-189.
- Lanigan, R.S., Yamarik, T.A., 2002. Final report on the safety assessment of BHT. *International Journal of Toxicology*, 21 (5), 19-94.

- Laughton, M.J., Halliwell, B., Evans, P. J. and Hoult, J.R.S., 1989. Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin Effects on Lipid-Peroxidation, Hydroxyl Radical Generation and Bleomycin-Dependent Damage to DNA. *Biochemical Pharmacology*, 38 (17), 2859-2865.
- Mahal, HS., Badheka, LP., Mukherjee, T., 2001. Radical scavenging properties of a flavouring agent-Vanillin. *Research on Chemical intermediates*, 27 (6), 595-604.
- Mancini, A., Festa, R., Di, Donna, V., Leone, E., Littarru, G.P., Silvestrini, A., Meucci, E., Pontecorvi, A., 2010. Hormones and antioxidant systems: Role of pituitary and pituitary-dependent axes. *Journal of Endocrinological Investigation*, 33 (6), 422-433.
- Miyamoto, Y., Koh, Y.H., Park, Y.S., Fujiwara, N., Sakiyama, H., Misonou, Y., Ookawara, T., Suzuki, K., Honke, K., Taniguchi, N., 2003. Oxidative stress caused by inactivation of glutathione peroxidase and adaptive responses. *Biological Chemistry*, 384 (4), 567-574.
- Nishina, A., Kubota, K., Kameoka, H., Osawa, T., 1991. Antioxidizing component, Musizin, in *Rumex japonicus* Houtt. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 68 (10), 735-739.
- Okamoto, T., 2005. Safety of quercetin for clinical application. *International Journal of Molecular Medicine*, 16 (2), 275-278.
- Osawa, T. and Namiki, M.A.A., 1981. A Novel type of antioxidant isolated from leaf wax of eucalyptus leaves. *Agricultural Biology Chemistry*, 45 (3), 735-739.
- Padayatty, S.J., Katz, A., Wang, Y.H., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.H., Chen, S.L., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S.K., Levine, M., 2003. Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American College of Nutrition*, 22 (1), 18-35.
- Papas, A.M., 1993. Oil-soluble antioxidants in foods. *Toxicology Industry Health*, 9 (1-2), 123-149.
- Pezzuto, J.M., 1997. Plan-derived anticancer agents. *Biochemical Pharmacology*, 53 (2), 121-133.
- Porter, W.L., Black, E.D. and Drolet, A.M., 1989. Use of polyamide oxidative fluorescence test on lipit emulsions: contrast in relative effectiveness of antioxidants in bulk versus dispersed systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37 (3), 615- 624.
- Rice-Evans, C., Burdon, R., 1993. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Progress in Lipid Research*, 32 (1), 71-110.
- Ruch, R.J., Cheng, Klaunig, J.E., 1989. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, 10 (6), 1003-1008.
- Shetty, K., McCue, P., 2003. Phenolic antioxidant biosynthesis in plants for functional food application: Integration of systems biology and biotechnological approaches. *Food Biotechnology I.*, 17 (2), 67-97.
- Sinha, A., Sharma, K., Sharma, U.K., Nandini, 2008. A Comprehensive review on vanilla flavor: Extraction, isolation, and quantification of vanillin and others constituents. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59 (4), 299-326.

- Somogyi, A., Rosta, K., Pusztai, P., Tulassay, Z. and Nagy, G., 2007. Antioxidant measurements. *Physiological Measurement*, 28 (4), R41- R55.
- Terao, J., Murota, K., Kawai, Y., 2011. Conjugated quercetin glucuronides as bioactive metabolites and precursors of aglycone in vivo. *Food & Function*, 2 (1), 11-17.
- Wijeratne, S.S.K., Cuppet S.L., 2006. Antioxidant activities of carnosol and carnosic acid in food and biological model systems. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 17 (6), 7-10.
- Yang, S.F. and Hoffman., N.E., 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 35, 155-189.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Erzurum’da doğdu. İlköğrenimini Erzurum ilinin Oltu ilçesinde ve lise öğrenimini ise Erzurum Nevzat Karabağ Anadolu Öğretmen Lisesinde tamamladı. 2003 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi, Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi, Fen Bilgisi Öğretmenliği Bölümü’nden 2007 yılında mezun oldu. 2003-2007 yılları arası Erzurum’da 4 Yıl Fen Bilgisi ve Matematik alanlarında Gözlemci ve Yardımcı Rehber öğretmenlik yaptı. 2007-2010 yılları arası Şubat ayına kadar Erzurum’da sözleşmeli öğretmen olarak çalıştı. Ekim 2008’de Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde Yüksek Lisans öğrenimine başladı.

Halen Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalında bilimsel çalışmalarına devam etmektedir. Evli ve bir çocuk babasıdır.