



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ASİT İLAVE EDİLMİŞ
FARKLI ÇÖZÜCÜLERDE HAZIRLANAN
Laurocerasus officinalis Roemer (Karayemiş)
EKSTRAKTLARININ ANTİOKSİDAN
KAPASİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Feyza DEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU

TRABZON – 2014



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ASİT İLAVE EDİLMİŞ
FARKLI ÇÖZÜCÜLERDE HAZIRLANAN
Laurocerasus officinalis Roemer (Karayemiş)
EKSTRAKTLARININ ANTİOKSİDAN
KAPASİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Feyza DEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU

TRABZON – 2014

ONAY

Bu tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Asım ÖREM

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

.....

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Feyza DEMİR'in hazırladığı “**Asit İlave Edilmiş Farklı Çözücülerde Hazırlanan *Laurocerasus officinalis* Roemer (Karayemiş) Ekstraktlarının Antioksidan Kapasitesinin Değerlendirilmesi** başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca, kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU _____

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU

Prof. Dr. Orhan DEĞER

Prof. Dr. Mehmet YILDIRIM

Tarih: 25/12/2014

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 9/12/2014. tarih ve 37 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ahmet KALKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağılı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eseri olduğunu, tezde yer alan, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi, kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışının olmadığını beyan ederim.

25. 12. 2014
Feyza DEMİR

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca desteğini esirgemeyen tez danışmanım çok değerli hocam Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU başta olmak üzere bilgilerinden faydalandığım anabilim dalımızın saygıdeğer hocaları Prof. Dr. E. Edip KEHA, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. Caner KAHRAMAN, Prof. Dr. Ahmet ALVER, Prof. Dr. Birgül KURAL, Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE, Yrd. Doç. Dr. Fulya B. YÜCESAN'a deneysel çalışmalarım sırasında yardımını esirgemeyen Giresun Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Hüseyin ŞAHİN'e, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitü Sekreteri Ömer DOĞAN'a yazı işlerinde görev yapan Hülya YÜCESAN ve Yeliz BİRİNCİ'ye çalışmalarımın bütün aşamalarında yardımlarını aldığım, bana her zaman destek olan, çok sevdiğim arkadaşlarım Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Arş. Gör. Gülsen YILMAZ ve KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Uğur TOPRAK'a, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki Arş. Gör. Ayşe A. ŞENTÜRK, Arş. Gör. Tuğba N. ÇAKIROĞLU, Arş. Gör. Selim DEMİR ve bütün çalışma arkadaşlarıma, ayrıca hayatım boyunca sevgilerini ve desteklerini her an hissettiğim, annem Emriye DEMİR ve ablam Şeyma ER' e teşekkürlerimi sunarım.

Yük. Lis. Öğr. Feyza DEMİR

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İç kapak Sayfası	
KABUL ve ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER	vii
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. <i>Laurocerasus officinalis</i> Roem.(Karayemiş)	6
4.1.1. Karayemiş Meyvesinin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği	7
4.1.2. Fenolik Bileşikler (Polifenoller)	10
4.1.2.1 Fenolik Asitler	10
4.1.2.2 Flavonoidler	12
4.1.2.2.1. Antoksaninler	14
4.1.2.2.2. Antosiyaninler	15
4.2. Radikal Kavramı ve Oksidatif Stres	16
4.2.1. Serbest Radikal Kavramı	16
4.2.1.1. Serbest Radikal Oluşum Nedenleri	16
4.2.1.2. Serbest Radikallerin Genel Reaksiyonları	18
4.2.1.3. Serbest Radikal Türleri	18
4.2.1.4. Serbest Oksijen Radikalleri	19
4.2.1.4.1. Süperoksit Radikalleri	20
4.2.1.4.2. Hidroksil Radikalleri	20
4.2.1.4.3. Hidrojen Peroksit	21
4.2.1.4.4. Singlet Oksijen	22
4.2.1.4.5. Nitrik Oksit	22
4.2.1.5. Serbest Radikallerin Etkileri	23
4.2.1.5.1. Membran Lipidlerine Etkileri	23

4.2.1.5.2. Proteinlere Etkileri	24
4.2.1.5.3. Karbohidratlara Etkileri	24
4.2.1.5.4. Nükleik Asitlere Etkileri	24
4.2.2. Oksidatif Stres	25
4.3. Antioksidan Savunma Sistemleri	25
4.3.1. Doğal Antioksidanlar	27
4.3.1.2. Vitaminler	27
4.3.1.3. Karotenoidler	28
4.3.1.4. Fenolik Bileşikler	28
4.4. Bitkisel Ekstraktların Önemi	29
4.4.1. Bitkisel Kaynaklı Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu İçin Kullanılan Teknikler	29
4.4.1.1. Soxhlet Ekstraksiyonu	30
4.4.1.2. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu	30
4.4.1.3. Basınçlı Çözücü Ekstraksiyonu	30
4.4.1.4. Katı-Faz Ekstraksiyonu	31
4.4.1.5. Çözücülerle Ekstraksiyon	31
5. GEREÇ ve YÖNTEM	33
5.1. Kullanılan Cihaz, Alet, Malzeme ve Kimyasallar	33
5.1.1. Cihazlar ve Malzemeler	33
5.1.2. Kimyasal Maddeler	34
5.2. Deney Hazırlığı ve Metodlar	35
5.2.1. <i>Laurocerasus officinalis</i> Roem. (Karayemiş) Meyve Ekstraktının Hazırlanması	35
5.2.2. Toplam Polifenol İçerik Tayini	35
5.2.3. Toplam Flavonoid İçerik Tayini	36
5.3. Antioksidan Aktivitelerin Belirlenmesi	37
5.3.1. Demir (Fe^{+3}) İndirgeyici Güç Tayini (FRAP)	37
5.3.2. DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesi	39
5.4. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	41
6. BULGULAR	42
6.1. Toplam Polifenol İçerik Tayini Sonuçları	42
6.2. Toplam Flavonoid İçerik Tayini Sonuçları	44
6.3. Antioksidan Aktivitelerin Belirlenmesi Sonuçları	46
6.3.1. Demir (Fe^{+3}) İndirgeyici Güç Tayini (FRAP) Sonuçları	46
6.3.2. DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesi Sonuçları	48

7. TARTIŞMA ve SONUÇ	51
8. KAYNAKLAR	59
9. ÖZGEÇMİŞ	70

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Karayemişin kimyasal bileşenleri	8
Tablo 2. Serbest radikallerin kaynakları	17
Tablo 3. En sık karşılaşılan serbest oksijen radikalleri	19
Tablo 4. Antioksidan Savunma Sistemi	26
Tablo 5. Kullanılan cihaz, alet ve malzemeler	33
Tablo 6. Kullanılan kimyasal maddeler	34
Tablo 7. Toplam fenolik içerik tayininde yapılan işlemler	36
Tablo 8. Toplam flavonoid içerik tayininde yapılan işlemler	37
Tablo 9. Demir (Fe^{+3}) indirgeyici güç tayininde yapılan işlemler	39
Tablo 10. DPPH [*] yöntemi için pipetleme prosedürü	40

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Karayemişin yapısında bulunan bazı flavonoidler ve fenolik asitler	9
Şekil 2. Hidroksisinnamik ve Hidroksibenzoik asitler	11
Şekil 3. Flavonoidlerin genel yapısı ve flavonoid yapılarında substituentlerin en yaygın yerleşme pozisyonları	12
Şekil 4. Flavonoid gruplarının temel kimyasal yapıları	13
Şekil 5. Prosiyanidinlerin genel kimyasal yapısı	15
Şekil 6. Toplam polifenol içerik tayini için gallik asit standart grafiği	42
Şekil 7. Karayemişin sulu, etanollü, DMSO'lu ve bu çözücülerin asit ilave edilmiş ekstraktlarındaki toplam polifenol içerik ($X \pm SD$ mg GA / g karayemiş)	43
Şekil 8. Toplam flavonoid içerik tayini için kuersetin standart grafiği	44
Şekil 9. Karayemişin sulu, etanollü, DMSO'lu ve bu çözücülerin asit ilave edilmiş ekstraktlarındaki toplam flavonoid içerik ($X \pm SD$ mg K / g karayemiş)	45
Şekil 10. Demir (Fe^{+3}) indirgeyici güç tayini için vitamin C standart grafiği	46
Şekil 11. Karayemişin sulu, etanollü, DMSO'lu ve bu çözücülerin asit ilave edilmiş ekstraktlarındaki demir (Fe^{+3}) indirgeyici güç ($X \pm SD$ mg vit C / g karayemiş)	47
Şekil 12. Vitamin C standart çalışma grafiği	48
Şekil 13. DPPH yöntemine göre, karayemiş meyvesinin bütün ekstraktlarına ait Numune konsantrasyonu - absorbans grafikleri (KYM = karayemiş)	49
Şekil.14. Karayemiş meyvesinin bütün ekstraktlarının 517 nm'deki DPPH• radikali temizleme aktivitesi analizi sonucu ($SC_{50} \pm SD$ mg/mL)	50

Kısaltmalar

BHA	Butillenmiş hidroksianisol
BHT	Butillenmiş hidroksitoluen
Ca	Kalsiyum
Cu	Bakır
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH•	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EGKG	(-)-Epigallokateşingallat
EK	(-)-epikateşin
FADH₂	Flavin adenin dinükleotit
Fe	Demir
FMN	Flavin mononükleotid
GC-MS	Gaz kromatografisi- kütle spektrometresi
GKG	(-)-gallokateşingallat
HPLC/MS	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi
K	Potasyum
KG	(-)-kateşingallat
LPO	Lipid peroksidasyonu
MDA	Malondialdehit
Mg	Magnezyum
Mn	Mangan
Mo⁵⁺	Molibden
Na	Sodyum
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid
SOD	Süperoksitdismutaz
SOR	Serbest Oksijen Radikalleri
Zn	Çinko

Formüller

$\text{Al}(\text{NO}_3)_3$	Alüminyum nitrat
AlCl_3	Alüminyum klorür
BH	Tetrahidrobiyopterin
Fe_3EDTA	Ferriketilendiamintetraasetik asit
FeCl_3	Demir (III) klorür
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
$\text{HO}_2^\cdot$	Perhidroksi Radikali
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	Potasyum ferrisiyanür
KCH_3COO	Potasyum asetat
Na_2CO_3	Sodyum karbonat
Na_2CO_3	Sodyum karbonat
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Disodyum hidrojenfosfat dihidrat
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Sodyum dihidrojenfosfat dihidrat
$\text{NO}^\cdot$	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
$^1\text{O}_2$	Singlet Oksijen
O_2	Moleküler Oksijen
$\text{O}_2^\cdot$	Süperoksit radikali
$\text{OH}^\cdot$	Hidroksil radikali
$\text{R}^\cdot$	Karbon Merkezli Organik Radikaller
$\text{RCOO}^\cdot$	Organik Peroksitler
$\text{RS}^\cdot$	Tiyil Radikali
TCA	Trikloroasetik asit

1. ÖZET

Asit İlave Edilmiş Farklı Çözücülerde Hazırlanan *Laurocerasus officinalis* Roemer (Karayemiş) Ekstraktlarının Antioksidan Kapasitesinin Değerlendirilmesi

Laurocerasus officinalis Roemer yerel ismiyle ‘Karayemiş’ 6 metre boya ulaşabilen, yaprak dökmeyen küçük bir ağaç türüdür. Karayemiş meyveleri çekirdekli ve sulu olup, meyve eti açık pembe veya krem rengindedir. Karayemişin taze meyvesi kimyasal ve antioksidan özellikleri bakımından test edilmiş; yüksek miktarda su, protein, pektin ve şeker yanında çeşitli fenolik bileşenler ve mineraller içerdiği belirlenmiştir. Karayemişin güçlü antioksidan özelliği sayesinde, birçok hastalığın oluşumunun ve gelişmesinin önlenmesinde faydası olduğu, biyolojik aktivitesinden ise yapısındaki çok sayıda flavonoid, aromatik asit ve fenolik bileşiğin sorumlu olduğu öne sürülmüştür.

Bu çalışmada zengin polifenol kaynağı olarak bilinen karayemiş meyvesinin çekirdeği çıkartılarak, farklı çözücülerde (su, etanol ve DMSO) hazırlanan ekstraktlarına HCl ilave edilerek, hidroliz edilmiş ve edilmemiş örnekleri hazırlandı. Bu örnekler arasındaki antioksidan kapasite, toplam polifenoller, toplam flavonoidler, demir (III) indirgeyici antioksidan potansiyeli ve serbest radikal yakalama aktivitesi yöntemiyle belirlenip, karşılaştırılması yapıldı. Çalışma sonucunda normal ekstraktlarda en yüksek antioksidan kapasitenin, DMSO’lu ekstraktlarda daha sonra sulu ve son olarak da etanollü ekstraktlarda olduğu görüldü. Asit ilave edilerek hazırlanan ekstraktlarda ise en yüksek antioksidan kapasitenin yine DMSO’lu ekstraktlarda daha sonra etanollü ve son olarak da sulu ekstraktlarda olduğu görüldü. DMSO’lu ve etanollü ekstraktlarda, asit ilavesi sonucunda, antioksidan kapasitenin asit ilave edilmemiş DMSO’lu ve etanollü ekstraktlara göre anlamlı bir artış gösterdiği belirlendi. Ama aynı karşılaştırma sulu ekstraktlar için yapıldığında, asit ilavesinin bu ekstraktlarda anlamlı bir fark yaratmadığı belirlendi. Yapılan bu çalışma sonucunda, karayemiş meyvesinde asit hidrolizinin antioksidan aktivite üzerinde pozitif yönde önemli derecede etkisi olduğu görüldü. Ayrıca ekstraktların antioksidan potansiyeli, polifenol ve flavonoid içerikleri ile orantılı olarak bulundu.

Anahtar Sözcükler: antioksidan, flavonoidler, *Laurocerasus officinalis* Roemer, polifenoller

2. SUMMARY

Evaluation of Antioxidant Capacity in *Laurocerasus officinalis* Roemer (Cherry laurel) Extracts Prepared with Different Acid-Added Solvents

Laurocerasus officinalis Roemer known as local name "Karayemiş" can reach 6 m height and evergreen tree species. Cherry laurel have juicy fruits with seeds inside in it and its pulp is light pink or cream colour. Fresh fruits of cherry laurel have tested in terms of its chemical and antioxidant properties; besides the high proportion of water, protein, pectin and sugar, it is determined to contain several phenolic compounds and minerals. Cherry laurel, thanks to its powerful antioxidant properties, is helpful to inhibit occurrence of many diseases and thier progression, it is suggested that a large number of flavonoid, aromatic acid and phenolic compounds which are responsible for it's biological activity in the structure of cherry laurel.

In this study, the hydrolyzed and non-hydrolyzed samples were prepared by adding HCl to extracts that prepared in different solvents (water, ethanol and DMSO) by extracting cherry laurel fruits known as the rich source of polyphenol. The capacity of antioxidant between these samples were determined and compared by methods of total polyphenols, total flavonoids, iron (III) reducing antioxidant potential and free radical scavenging activity. As a result of study, DMSO extracts has the highest antioxidant capacity among normal extracts then water and at last ethanol extracts. The highest antioxidant capacity has seen among the extracts which are prepared by adding acid, again DMSO extracts then ethanol and at last water extracts. As a result of adding acid, significant increase were seen at antioxidant capacity of DMSO and ethanolic extracts than non-acid added extracts. But when the same comparison is made for the aqueous extracts, it was determined that adding acid to these extracts did not make a significant difference. As a result of this study, acid hydrolysis of Cherry laurel fruits showed significant positive effect on antioxidant activity. Moreover, antioxidant potential of extracts was found proportional with polyphenol and flavonoid contents.

Key Words: antioxidant , flavonoids, *Laurocerasus officinalis* Roemer, polyphenols

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Günümüzde son yıllarda artan hastalıklara karşı sentetik yapılı ilaçların yetersiz kalması ve yan etkilerinin saptanması dolayısıyla, doğal ürünlere duyulan ihtiyaç giderek artmaktadır. Bu amaçla birçok bitki, sebze ve meyvede bulunan doğal ekstraktlar antioksidatif, antibakteriyel, antiviral ve antifungal etkileri bakımından farmakolojik yönlerden çok yönlü olarak araştırılmaktadır.

Karayemiş, *Laurocerasus officinalis* Roemer ismiyle bilinen *Laurocerasus* Duhamel. cinsine ait bir türdür (1). Ülkemizde yaygın ismiyle ‘karayemiş’ ya da ‘taflan’ olarak adlandırılan bu bitkinin, Türkiye’de yetiştiriciliği için en uygun iklim şartları, Karadeniz’in doğu kıyı bölgeleri başta olmak üzere Kuzey ve Doğu Marmara, Toroslar ve Kafkaslar olarak bilinmektedir (2).

Karayemiş, Karadeniz Bölgesi’nde deniz seviyesinden 20-1700 m’ye kadar olan yükseklikte yetişen, 6 metre boya ulaşabilen, yaprak dökmeyen küçük bir ağaç türüdür. Karayemiş meyveleri 8 mm çapında, çekirdekli, sulu olup meyve eti açık pembe veya krem rengindedir. Olgunlaşan meyveler kırmızı veya koyu mor renktedirler (3-5).

Karayemişin besin değeri yüksek bir meyve olmasının yanında antioksidan maddelerce zengin olduğu bilinmektedir. Karayemişin taze meyvesi kimyasal olarak incelenmiş ve yapısında su, pektin, askorbik asit, bol miktarda protein ve karbohidrat yanında çeşitli fenolik bileşenler ve mineraller içerdiği belirlenmiştir (4). Olgun karayemiş meyvesindeki bazı düşük molekül ağırlıklı karbohidratlar gaz kromatografisi ile belirlenmiş, fruktoz, glukoz, sorbitol yüksek oranda olmak üzere ksiloz ve arabinoz varlığı tespit edilmiştir. Mannitol varlığı da araştırılmış fakat bulunamamıştır (6, 7).

Meyvenin fenolik asit kompozisyonu incelendiğinde hidroksibenzoik asitler ve hidroksisinnamik asitler saptanmıştır. Karayemişin radikal yakalama kapasitesi bakımından fenolik içeriği askorbik asit gibi referans bileşiklerden daha yüksek bulunmuştur. Karayemişin HPLC/MS/MS ile flavonoid analizi yapıldığında fenoliklerin yaklaşık % 24-32 oranını antosiyaninlerin oluşturulduğu görülmüştür. Bu bakımdan karayemiş zengin bir antosiyanin kaynağıdır (2, 8, 9).

Karayemiş bitkisinin faydalanıldığı kısımları yaprağı, çekirdeği ve meyvesidir. Meyveler taze olarak tüketilebileceği gibi kurutularak, kavrularak, reçel, pekmez, tuzlama ve turşu şeklinde de tüketilmektedir. Güçlü antioksidan özelliği sayesinde birçok hastalığın oluşumunu ve gelişmesini önlemesinde faydası olduğu görülmüştür. Karayemiş meyvelerinin

halk arasında mide ülseri ve bağırsak tembelliği başta olmak üzere, sindirim sistemi hastalıkları, idrar rahatsızlıkları, egzama, Alzheimer, şeker hastalığı, doku ve cilt bozuklukları, bronşit ve kanser gibi bazı hastalıkların tedavisine iyi geldiği bilinmektedir (2, 10).

Fenolik bileşikler ya da daha yaygın olarak kullanılan ismi ile ‘polifenoller’ bitkiler aleminin çok büyük bir kısmında bulunan, sekonder metabolitlerdir. Fenolik bileşikler bitkilerin renk, koku ve tadından sorumlu olmakla beraber güçlü antioksidanlardır ve aktiviteleri kimyasal yapılarına bağlıdır (11). Bitki metabolizmasında bol miktarda bulunan fenolik bileşikler genel olarak fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki gruba ayrılır (12, 13).

Flavonoidler bitkiler tarafından üretilen, bitkinin tohum, yaprak, meyve ve çiçeklerinde bol miktarda bulunan doğal bileşiklerdir. Bitkileri ultraviyole ışınlarına ve mikroorganizmalara karşı korurlar. Ayrıca farmakolojik, antimikrobiyal, antioksidan, antikanserojen özelliklerinin olduğu da bilinmektedir (14, 15).

Flavonoidlerin hidroksil grupları reaktif özelliklerinden dolayı kolaylıkla glikozillenir. Bu nedenle flavonoidler doğada aglikon şeklinde değil glikozid formları şeklinde bulunur (16). Glikozit birimi genellikle glukozdur. Besinsel flavonoidler genellikle glikozillenmiştir. İnsan vücuduna alındıklarında bağırsaklarda hidroliz edilerek aktif aglikonlara dönüşürler. İnsan ve hayvanlarda mide-bağırsak sisteminden emilirler veya değişmeden ya da metabolitleri halinde idrar ve dışkı ile atılırlar (17, 18).

Serbest radikaller, dış atomik orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulunduran yüksek enerjili, kararlı olmayan atom veya moleküllerdir. Yapılarında eşleşmemiş elektronları olması, serbest radikallere oldukça reaktivite kazandırır (19, 20). Serbest radikaller canlılık için gereklidir. Elektron transferi, enerji üretimi ve pek çok diğer metabolik işlevde temel oluştururlar. Ama diğer moleküllerle reaksiyona girdiklerinde bir dizi zincir reaksiyonu başlatır. Eğer zincir reaksiyonu kontrolsüz bir davranış gösterirse hücredeki protein, lipid, nükleik asitler gibi birçok biyolojik metabolite zarar vermektedirler (21).

Canlı organizmalarda, serbest radikallerin neden olduğu hasarı, engelleyen, geciktiren, etkisini azaltan ve vücudun iç dengesinin korunmasına yardımcı olan birçok savunma mekanizması gelişmiştir. Bunlar ‘antioksidan savunma sistemleri’ ya da ‘antioksidanlar’ olarak adlandırılır (22, 23).

Fenolik bileşikler içinde, hidrojen verici, serbest radikal yakalayıcı ve zincir kırma özelliklerinden dolayı en etkili antioksidanlar flavonoidler olarak belirlenmiştir. Flavonoidler antioksidan etkileri sayesinde süperoksit anyonunu, peroksil, hidroksil radikalini ve singlet oksijeni yakalayabilir (24, 25).

Flavonoidlerin aglikon formları ve bunların glikozit formları antioksidan aktivite açısından değerlendirildiğinde glikozitlerin daha az etkili olduğu görülmüştür. Genel olarak flavonoidlerin antioksidan etkileri hidroksillenme derecesine göre artarken, yapıya bağlanan şekere ve cinsine göre de azalır (26).

Antioksidan olarak fenolik bileşikler kanser, kalp hastalıkları, katarakt, göz hastalıkları ve alzheimer gibi hastalıkları engellemektedir. Yapılan birçok çalışma sonucunda fenolik bileşiklerin antialerjik, antienflamatuar, antidiyabetik, antimikrobiyal, antipatojenik, antiviral ve antirombotik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (27, 28).

Bu çalışmada zengin polifenol kaynağı olarak bilinen ve ülkemizde Karadeniz Bölgesinde yaygın olarak yetişen, yaz meyvesi olduğu halde kurutulup kış meyvesi olarak da tüketilen karayemiş meyvesinin, farklı çözücülerde hazırlanan ekstraktlarına HCl ilave ederek hidroliz edilmiş ve edilmemiş ekstraktları arasındaki antioksidan kapasitenin toplam polifenoller, toplam flavonoidler, demir indirgeyici antioksidan potansiyeli ve DPPH• radikal temizleme aktivitesi belirlenip, karşılaştırılması amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. *Laurocerasus officinalis* Roem. (Karayemiş)

Karayemiş, *Spermatopyta* bölümü, *Magnoliatae* sınıfı, *Rosaceae* familyası, *Laurocerasus* Duhamel. cinsine ait bir tür olup *Laurocerasus officinalis* Roemer veya *Prunus laurocerasus* (L.) Mill. gibi isimlerle bilinmektedir (1). Ülkemizde yaygın ismiyle ‘karayemiş’ ya da ‘taflan’ olarak adlandırılan bu bitkinin, dünyada değişik formlarına Kuzey İran, Avrupa’nın güneydoğusu ve Balkanlar’da rastlanmaktadır. Türkiye’de karayemiş bitkisinin yetiştiriciliği için en uygun iklim şartları, Karadeniz’in doğu kıyı bölgeleri başta olmak üzere Kuzey ve Doğu Marmara, Toroslar ve Kafkaslar olarak bilinmektedir. Bu bölgeler içerisinde karayemiş, Rize, Trabzon (Maçka-Meryemana Vadisi), Giresun, Sinop (Ayancık), Zonguldak (Devrek), Kastamonu, Bartın, Bolu, İzmit (Keltepe), Adapazarı, İstanbul (Belgrat Ormanı, Alemdağ), Bursa (Uludağ) ve Osmaniye (Gâvurdağları)’de orman veya orman kıyılarında doğal olarak yetişmektedir. Bitkinin bol ürün vermesi için bulunduğu bölgenin güneşli, nemli ve ılıman iklim koşullarına sahip olması gerekmektedir. Sahip olduğu özellikler ve bulunduğu yerin rakım şartlarına bağlı olarak Şubat-Mart aylarında erken çiçek açarak, bahar geç donlarından zarar görmesi dolayısıyla bazı yıllar az ürün elde edilebilmektedir (2).

Karayemişin doğal ve kültür formları mevcuttur. Karayemişin doğal formu, Karadeniz Bölgesi’nde deniz seviyesinden 20-1700 m’ ye kadar olan yükseklikte yetişen, 6 metre boyutlarında, yaprak dökmeyen küçük bir ağaç türüdür. Karayemiş meyveleri 8 mm çapında, çekirdekli, sulu olup meyve eti açık pembe veya krem rengindedir. Olgunlaşan meyveler kırmızı veya koyu mor renktedir (3-5).

Karayemişin kültür formları 5-10 hatta 15-20 m boyunda ağaçlardır. Kültür formları yaprak şekli ve boyutunun yanında meyve rengi ve boyutları bakımından da birbirinden farklı özellikler göstermektedir (5).

Ülkemizde şu ana kadar yapılan morfolojik ve sitolojik karakterizasyon çalışmalarında, karayemişin hem morfolojik hem de sitolojik olarak, meyve ve yaprak içerikleri bakımından farklılıklar gösterdiği ‘Oxygemmis’, ‘Globigemmis’, ‘Angustifolia’ olmak üzere üç kültür formu tespit edilmiştir. Bu formlardan Oxygemmis’in meyvelerinin iri ve olgunlaştığında parlak siyah renkte, meyve tadının ise acı ve mayhoş olduğu; Globigemmis’in meyvelerinin Oxygemmis’in meyvelerine göre daha ince mezokarplı, sert ve olgunlaştığında siyah renkte olup tadı Oxygemmis’e göre daha iyi ve az mayhoş olduğu ve bu

formun meyvelerinin yemek için daha çok tercih edildiği bildirilmiştir. Bu üç formdan daha geniş bir dağılım gösteren *Angustifolia*'nın Avrupa'da süs bitkisi olarak kullanıldığı ve bu formun yaprak yüzeyinin parlak, koyu yeşil, yaprak boyunun 12 cm, eninin 4 cm olduğu ifade edilmiştir (29).

Karayemiş bitkisinin faydalandığı kısımları yaprağı, çekirdeği ve meyvesidir. Kültür formlarında ise sadece meyve kısımlarından yararlanılır. Meyveler taze olarak tüketilebileceği gibi kurutularak, kavrularak, reçel, pekmez, tuzlama ve turşu şeklinde de tüketilmekte ve koku ve tat kazandırmak için kompostolara ve pastalara katılmaktadır. Meyvelerin insanı tok tutmasının yanında sindirimi de kolaydır. Güçlü antioksidan özelliği sayesinde birçok hastalığın oluşumunun ve gelişmesinin önlenmesinde faydası olduğu görülmüştür. Karayemiş meyvelerinin halk arasında mide ülseri ve bağırsak tembelliği başta olmak üzere, sindirim sistemi hastalıkları, idrar rahatsızlıkları, egzama, alzheimer, şeker hastalığı, doku ve cilt bozuklukları, bronşit ve kanser gibi bazı hastalıkların tedavisine iyi geldiği bilinmektedir. Karayemişin taze yaprakları ise, çay gibi demlenip elde edilen suyun öksürük kesici, spazm dindirici ve bulantı giderici özelliği bulunmaktadır. Ayrıca sindirim bozukluklarına da yararlı olduğu bilinmektedir (2, 10).

4.1.1. Karayemiş Meyvesinin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği

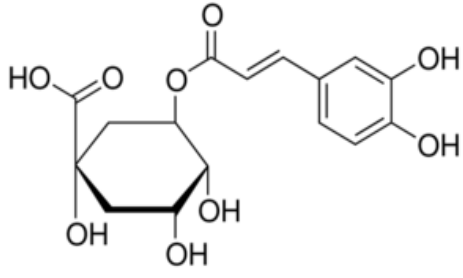
Karayemiş besin değeri yüksek bir meyve olmasının yanında antioksidan maddelerce zengin olduğu bilinmektedir. Karayemişin taze meyvesi kimyasal olarak incelenmiş ve yapısında su, pektin, askorbik asit, bol miktarda protein ve karbohidrat yanında çeşitli fenolik bileşenler ve mineraller içerdiği belirlenmiştir. Mineraller açısından incelendiğinde yüksek oranda potasyum (K), magnezyum (Mg), kalsiyum (Ca), sodyum (Na), mangan (Mn) ve eser miktarda bakır (Cu), çinko (Zn), ve demir (Fe) içerdiği görülmüştür (4).

Olgun karayemiş meyvesindeki bazı düşük molekül ağırlıklı karbohidratlar gaz kromatografisi ile belirlenmiştir. Fruktoz, glukoz, sorbitol yüksek oranda olmak üzere ksiloz ve arabinoz varlığı tespit edilmiştir. Mannitol varlığı da araştırılmış fakat bulunamamıştır. Olgunlaşmış karayemiş meyvesinin ve üç farklı kültürünün (*Angustifolia*, *Globigemmis*, *Oxygemmis*) GC-MS analizi ile yağ asidi çeşitlerine bakılmış, zengin linoleik asit miktarı yanında palmitik, stearik ve oleik asit varlığı da tespit edilmiştir (6, 7). Tablo 1'de karayemişde bulunan başlıca bileşenler verilmiştir.

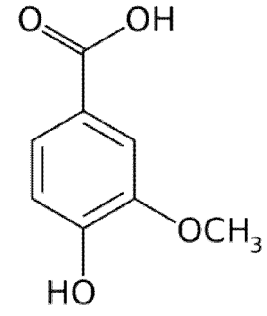
Tablo 1. Karayemişin kimyasal bileşenleri

Fenolik bileşikler		Diğer maddeler
Fenolik Asitler	Klorojenik Asit Hidroksibenzoik Asitler Hidroksisinnamik Asitler	Su
Flavonoidler	Antosiyanin Siyanidin glukozit Siyanidin rutinozit Pelargonidin glukozit Kumarik asit Kateşinler Kuersetin rutinozit	Pektin Karbohidrat (glukoz, fruktoz, sorbitol, ksiloz, arabinoz) Protein Yağ (linoleik asit, palmitik asit, stearik asit, oleik asit) Askorbik asit
Organik Asitler	Malik asit Quinik asit Sitrik asit Fumarik asit	Mineraller (K, Mg, Ca, Na, Mn, Cu, Zn, Fe)

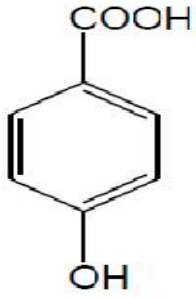
Karayemiş meyvesi organik asit bakımından incelendiğinde malik asitin baskın olduğu bunu sırasıyla quinik asit, sitrik asit ve fumarik asitin izlediği görülmüştür. Meyvenin fenolik asit kompozisyonu incelendiğinde klorojenik asitin baskın olmasıyla beraber ayrıca hidroksibenzoik asitler (gallik asit, protokateşik asit, p-hidroksibenzoik asit, vanilik asit ve siringik asit) ve hidroksisinnamik asitler de (kafeik asit, p-kumarik asit, ferulik asit ve 0-kumarik asit) saptanmıştır. Karayemişin radikal yakalama kapasitesi bakımından fenolik içeriği askorbik asit gibi referans bileşiklerden daha yüksek bulunmuştur. Karayemişin HPLC/MS/MS ile flavonoid analizi yapıldığında fenoliklerin yaklaşık % 24-32 oranını antosiyaninlerin (siyanidin glukozit, siyanidin rutinozit, pelargonidin glukozit, kuersetin-3-galaktozit, kuersetin rutinozit, kuersetin glukozit, kumarik asit, kaemferol-glukozit, (-)-gallokateşingallat (GKG), (-)-epikateşin (EK), (-)-kateşingallat (KG), (-)-Epigallokateşingallat (EGKG)) oluşturulduğu görülmüştür (Şekil 1). Bu bakımdan karayemiş zengin bir antosiyanin kaynağıdır (2, 8, 9). Ayrıca flavonoidlerin alt grubu olan kateşinlerin, yüksek antioksidan etkileri ile serbest radikalleri yok ederek, sağlık üzerinde çok sayıda yararının olduğu belirtilmiştir (30, 31).



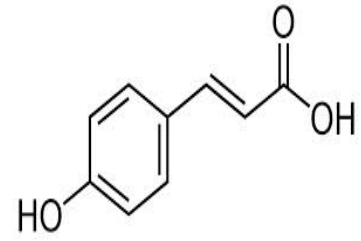
klorojenik asit



vanilik asit



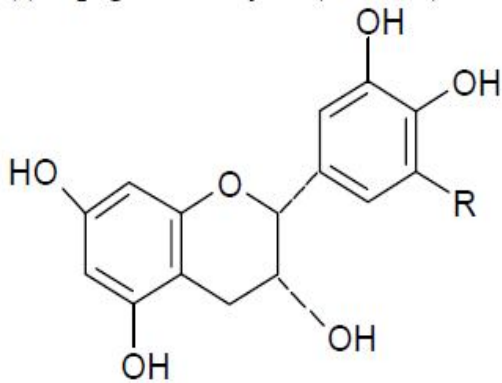
kumarik asit



p- Hidroksibenzoik asit

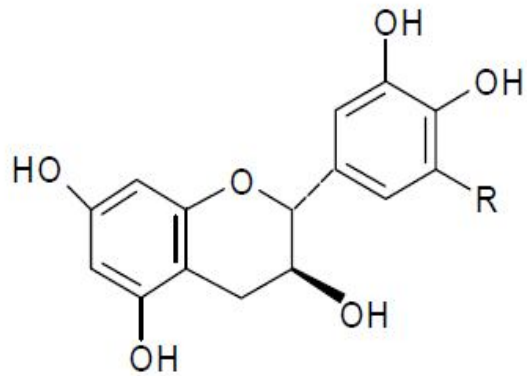
(-)-Epikateşin: (R= H)

(-)-Epigallokateşin: (R= OH)



(+)-Kateşin: (R= H)

(+)-Gallokateşin: (R= OH)



Şekil 1. Karayemişin yapısında bulunan bazı flavonoidler ve fenolik asitler (32, 33)

4.1.2. Fenolik Bileşikler (Polifenoller)

Fenolik bileşikler ya da daha yaygın olarak kullanılan ismi ile ‘polifenoller’ bitkiler aleminin çok büyük bir kısmında bulunan, sekonder metabolitlerdir. Fenolik bileşikler bitkilerin renk, koku ve tadından sorumlu olmakla beraber güçlü antioksidanlardır ve aktiviteleri kimyasal yapılarına bağlıdır (11). Yapısal olarak aromatik halkasında bir veya daha fazla hidroksil (-OH) grubu içeren bileşiklerdir. Yapısında tek hidroksil grubu bulunduran fenol, en basit fenolik bileşiktir. Diğer tüm fenolik bileşikler, fenol yapısındaki benzen halkasına farklı radikal grupların bağlanmasıyla oluşmuşlardır. Bitki metabolizmasında bol miktarda bulunan fenolik bileşikler genel olarak fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki gruba ayrılır (12, 13).

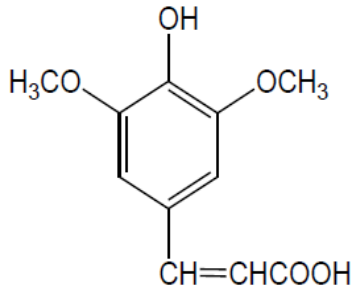
4.1.2.1 Fenolik Asitler

Bitkilerde yaygın olarak bulunan fenolik asitler, hidroksibenzoik asit ve hidroksisinnamik asit türevlerinden oluşmaktadır (34).

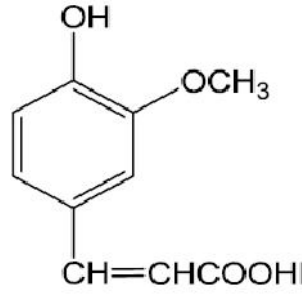
Hidroksisinnamik asitler; C_6-C_3 karbon yapısına sahip olup, kafeik asit, p-kumarik asit, klorojenik asit, t-sinnamik asit, 5-hidroksiferulik asit, kafeik asit, ferulik asit ve sinapik asit örnek olarak verilebilir. Hidroksisinnamik asitler ve türevlerinin yan zincirlerindeki çift bağ, bu bileşiklerin cis ve trans izomerleri halinde bulunmasını sağlamaktadır.

Hidroksisinnamik asitler bitkilerde çok az miktarda serbest halde görülür. Çoğunlukla, şeker esteri veya tartarik asit, kuinik asit ve şikimik asitin esterleri halinde bulunurlar. Örneğin, çoğu bitkide bulunduğu tespit edilen klorojenik asit, kafeik asit ve kuinik asitin esteridir.

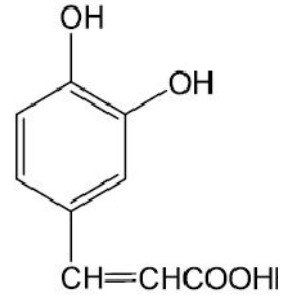
Hidroksibenzoik asitler; C_6-C_1 karbon yapısına sahip olup, p-hidroksibenzoik asit, protokateşik asit, vanilik asit, siringik asit ve gallik asit örnek verilebilir (Şekil 2). Bitkisel gıdaların yapısında genellikle iz miktarlarda bulunan renksiz bileşiklerdir (35).



Sinapik asit

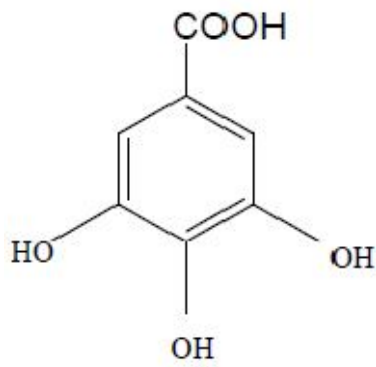


Ferulik asit

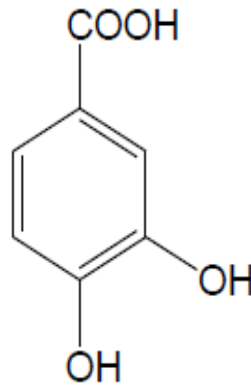


Kafeik asit

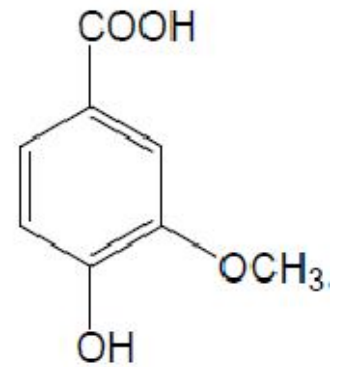
Hidroksisinnamik asitler



Gallik asit



Protokateşik asit



Vanilik asit

Hidroksibenzoik asitler

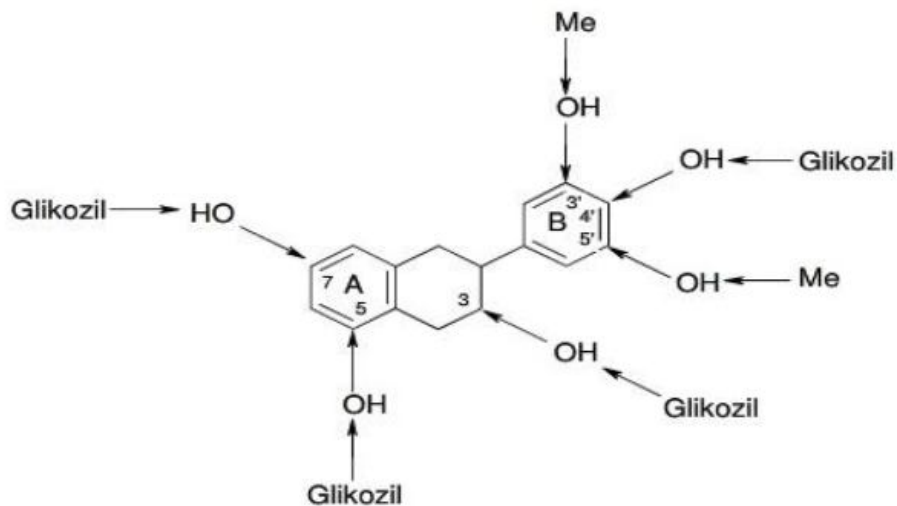
Şekil 2. Hidroksisinnamik ve Hidroksibenzoik asitler

Bitkilerde çok fazla bulunan fenolik asitler doğal antioksidan maddelerdir. Fenolik asitlerin antioksidan etkileri, aromatik halkada taşıdıkları hidroksil gruplarının sayısına, bağlanma yerine ve pozisyonlarına bağlı olarak değişir (36, 37). Yapılarındaki hidroksil grubu sayısı arttıkça antioksidan etkinin de arttığı görülmüştür (38).

4.1.2.2 Flavonoidler

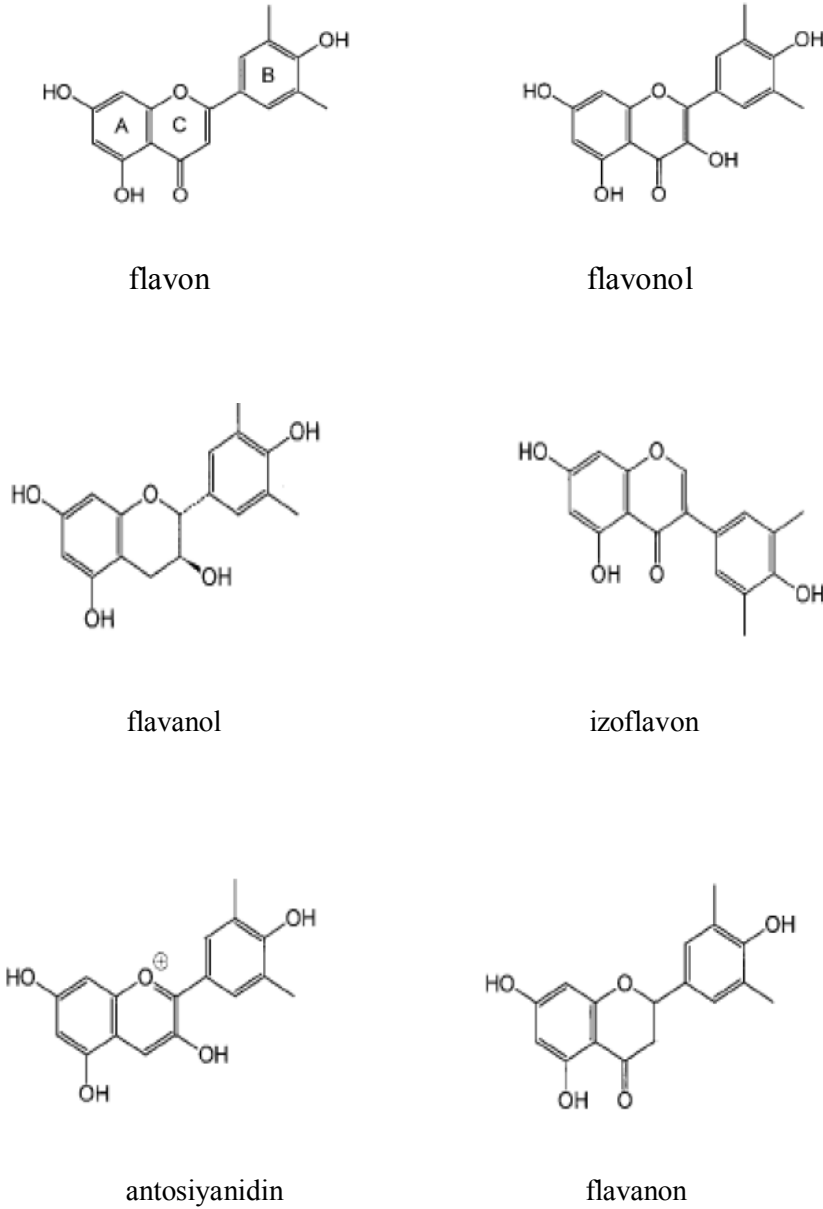
Flavonoidler bitkiler tarafından üretilen, bitkinin tohum, yaprak, meyve ve çiçeklerinde bol miktarda bulunan doğal bileşiklerdir. Bitkileri ultraviyole ışınlarına ve mikroorganizmalara karşı korurlar. Ayrıca farmakolojik, antimikrobiyal, antioksidan, antikanserojen özelliklerinin olduğu da bilinmektedir (14, 15). Bitki fenollerinin en geniş sınıfını oluşturan flavonoidlerin karbon iskeleti, bir oksijen içeren heterosiklik altı üyeli orta halka ve bu halkaya üç karbonlu zincir ile bağlı iki fenil halkasından oluşur (Şekil 3). 15 karbon atomu içeren flavonoidler difenilpropan $C_6-C_3-C_6$ yapısındadır (39).

Flavonoid yapılarına bağlanan en yaygın substituentler hidroksil gruplarıdır. Reaktif özelliklerinden dolayı çok aktif olan hidroksil grupları kolaylıkla alkillenir veya glikozillenir. Bu nedenle flavonoidler doğada aglikon şeklinde değil glikozid formları şeklinde bulunurlar. Aglikonların, glikozillenme derecesi, şeker kalıntılarının aglikona bağlanma pozisyonları, şekerlerin oksit halkasının yapısı ve glikozit bağlarının konfigürasyonu flavonoidlerin çeşitliliğini arttıran sebeplerdendir (16). Glikozit birimi genellikle glukozdur ancak glukoramnoz, galaktoz, arabinoz ve L-ramnoz da bulunabilmektedir. Besinsel flavonoidler genellikle glikozillenmiştir. İnsan vücuduna girdiklerinde bağırsaklarda hidroliz edilerek aktif aglikonlara dönüşürler. İnsan ve hayvanlarda mide-bağırsak sisteminden emilirler veya değişmeden ya da metabolitleri halinde idrar ve dışkı ile atılırlar (17, 18).



Şekil 3. Flavonoidlerin genel yapısı ve flavonoid yapılarında substituentlerin en yaygın yerleşme pozisyonları (33)

Flavonoidler; antosiyaninler ve antoksantrinler şeklinde sınıflandırılır. Antoksantrinler, renksiz veya beyazdan sarıya dönük renkte olurlar ve flavonlar, flavonoller, flavanon, izoflavonlar ve flavanoller (kateşinler) olarak sınıflandırılır (Şekil 4) (40). Çeşitli flavonoid sınıfları arasındaki farklar; heterosiklik halkanın oksidasyon derecesinden, yapıya bağlanan hidroksil gruplarının sayısından ve yapının doymamışlık derecesinden kaynaklanmaktadır (8, 41).



Şekil 4. Flavonoid gruplarının temel kimyasal yapıları

4.1.2.2.1. Antoksanter

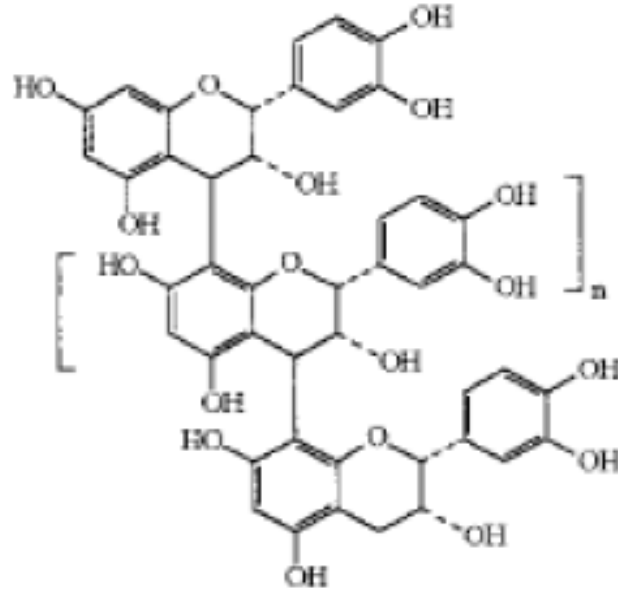
a) Flavonlar: Flavonoidler arasında en yaygın olarak bulunan sınıftır. Bitkilerde hem serbest (aglikon), hem de glikozitleri halinde bulunurlar. Yapılarında yalnız oksijen fonksiyonu içermelerinden dolayı, bu grup bileşiklere, oksijenli veya O- substitue flavonlar da denilir. Flavonların O- substitue türevleri doğada yaygındır (16).

b) Flavonoller: Kristalsi veya amorf özellikli olup, yapılarında bulunan hidroksil ve/veya metoksil gruplarının sayısına bağlı olarak gruplandırılabilirler. Şekerlerle glikozit halinde bağlanmış olarak bulunan flavonollere, örnek olarak kaemferol, kuersetin verilebilir (41).

c) Flavanonlar: Çoğunlukla glikozillenmiş türevlerine rastlanan bu sınıf, özellikle turuncgillerde yaygın olarak bulunur. En önemlilerine örnek olarak naringin, hesperidin ve naringenin verilebilir. Elma ve armutlarda bulunan dihirokalkon yapısındaki bileşiklerden floretin ve floridzin önemlidir (42).

d) İzoflavonoidler: Bazı meyve ve sebzelerde, başta soya fasulyesi olmak üzere çeşitli baklagillerde bulunan bileşiklerdir. Genistein, daidzein ve glisitein soya fasulyesinde bulunan izoflavonoidlerin üç temel aglikon formudur (43).

e) Flavanoller (kateşinler): Hemen her meyvede bulunan kateşinler, flavonoid biyosentezinde ara ürün olarak yer alırlar. Hem kimyasal hem de enzimatik olarak havadaki oksijen ile kolaylıkla reaksiyona girerler. Reaksiyon sonunda kondense olarak proantosiyanidinleri oluştururlar (Şekil 5) (42). Proantosiyanidinlerin moleköl ağırlıkları 7000 Dalton'a kadar ulaşabilmektedir. Bu bileşiklerin buruk veya acı tadı moleköl ağırlıklarına bağlıdır. Kısa zincir uzunluğundaki moleküller renksiz olduğu halde polimerizasyon dereceleri yükseldikçe renkleri sarıdan kahverengine dönüşmektedir. Ancak asitli ortamda ısıtıldıklarında antosiyanidinlere dönüşerek tipik, kırmızı-mor bir renk alırlar. Bu nedenle proantosiyanidin adı verilmektedir (44).



Şekil 5. Prosiyanidinlerin genel kimyasal yapısı

4.1.2.2.2. Antosiyaninler

Suda çözünebilen antosiyaninler, doğada aglikon halde değil antosiyanidinlerin (aglikonların) glikozitleri halinde bulunur (45). Antosiyaninler kendi içinde siyanidin (kırmızı), paenodin (açık kırmızı), delphinidin (koyu mavi), petunidin (mavi-mor), malvidin (mor) ve pelargonidin (turuncu) olmak üzere farklı renkler içeren formlara ayrılır (46). Meyve ve sebzelerin kırmızı, mavi, mor gibi çeşitli renklerde olmasını sağlayan doğal renk maddeleridir (47). Doğada birbirinden farklı yüzlerce antosiyanin bulunmaktadır. Bu antosiyaninler arasındaki farklılık, temel antosiyanidin iskeletindeki hidroksil ve metoksil gruplarının yeri ve sayısı, bağlanan şeker grubunun yapısı, sayısı ve bağlanma yeri, açillenme durumundan kaynaklanmaktadır (48). Antosiyaninler arasındaki bu yapısal farklılık antioksidan aktivitelerini de etkilemektedir. İnsan beslenmesinde önemli yer tutan bu bileşiklerin antioksidan aktiviteleri vitamin C ve E'den daha yüksek olduğu bilinmektedir (49). Antosiyaninlerin obezite, kalp-damar hastalıklarının önlemesi, antikanserojen ve antienflamatuar etkisi çoğunlukla antioksidan aktivitelerine bağlanmaktadır (50).

4.2. Radikal Kavramı ve Oksidatif Stres

4.2.1. Serbest Radikal Kavramı

Serbest radikaller, dış atomik orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulunduran yüksek enerjili, kararlı olmayan atom veya moleküllerdir. Yapılarında eşleşmemiş elektronları olması serbest radikallere oldukça reaktivlik kazandırır. Ancak eşleşmemiş elektronlara sahip oldukları halde Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} ve Mo^{5+} gibi geçiş metalleri serbest radikal olarak kabul edilmezler. Ama radikal oluşumunda önemli rol oynamaktadırlar. Organizmada geçiş metallerini (Fe^{2+} ve Cu^{2+} gibi metaller) içeren enzimler vasıtasıyla, moleküler oksijene tek elektronlarının transferi suretiyle, oksidasyon reaksiyonları meydana gelir (19, 20). Serbest radikaller katyon, anyon veya elektriksel olarak nötral olabilirler (51). Diğer moleküllerle elektron alışverişinde bulunabilen bu moleküllere ‘radikal’ veya ‘oksidan moleküller’ de denilir. Tek olan bu elektron yapıları, genellikle üst kısma yazılan bir nokta ($O^{\cdot}$) veya çizgi ($O^{\cdot-}$) ile gösterilir (51, 52).

Serbest radikaller canlılık için gereklidir. Elektron transferi, enerji üretimi ve pek çok diğer metabolik işlevde temel oluştururlar. Ama diğer moleküllerle reaksiyona girdiklerinde bir dizi zincir reaksiyonu başlatırlar. Eğer zincir reaksiyonu kontrolsüz bir davranış gösterirse hücredeki protein, lipid, nükleik asitler gibi birçok biyolojik metabolite zarar vermektedirler (21).

4.2.1.1. Serbest Radikal Oluşum Nedenleri

Serbest radikaller, hücrenin normal metabolizması sırasında oluşabildikleri gibi, antineoplastik ilaçlar, anestezi maddeler, aromatik hidrokarbonların hücre içindeki metabolizması sırasında ve dış etkenler (ısı, ışık, radyasyon, hava kirliliği, sigara) etkisiyle de oluşabilmektedirler (53). Bu nedenle serbest radikal artırıcı faktörler endojen ve eksojen olmak üzere iki grupta toplanabilir. Tablo 2’de Serbest radikallerinin kaynakları verilmiştir.

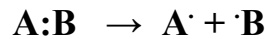
Tablo 2. Serbest radikallerin kaynakları (54)

Endojen kaynaklar
• Mitokondrial elektron transport sistemi • Mikrozomal elektron transport sistemi • Kloroplast elektron transport sistemi • Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemi • Oksidan enzimler ➤ Ksantin oksidaz ➤ Triptofan dioksijenaz ➤ Galaktoz oksidan ➤ Siklooksijenaz ➤ Lipooksijenaz • Fagositik hücreler ➤ Nötrofiller ➤ Monosit ve Makrofajlar ➤ Eozinofiller ➤ Entotelyal hücreler • Otooksidasyon reaksiyonları
Eksojen Kaynaklar
• Redoks potansiyelli maddeler (paraquat, doksarubisin, alloksan) • İlaç oksidasyonları (parasetamol, karbontetraklorür) • Sigara • İyonize radyasyon • Güneş ışığı • Isı şoku • Okside glutatyon

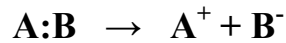
4.2.1.2. Serbest Radikallerin Genel Reaksiyonları

Serbest radikaller hücre içindeki olayların haricinde belirli dış etmenlerden nedeniyle de oluşabilir. Atomların orbitallerinde hareket eden elektronlar, birbirine zıt yönde ve aynı orbitalde en fazla iki elektron içermelidir. Bu durumda serbest radikaller üç farklı yolla oluşabilir (55, 56).

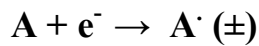
1. Molekülün kovalent bağının homolitik parçalanması sonucu oluşan serbest radikaller. Bu bölünme sonucu, her bir atomda ortak bağdaki elektrolardan eşit sayıda kalır.



2. Normal bir molekülden dışarıya bir tane elektron verilmesiyle veya molekülün ortak bağının heterolitik olarak parçalanması sonucu oluşan serbest radikaller. Heterolitik parçalanmada kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomlardan herhangi birisinde kalır.



3. Bir molekül veya atom dışarıdan bir elektron alarak serbest radikal haline gelebilir. Elektron alan molekül veya atom önceden yüklü halde bulunabilir.



Biyolojik sistemlerde serbest radikaller, en fazla elektron transferi sonucu meydana gelir (57).

4.2.1.3. Serbest Radikal Türleri

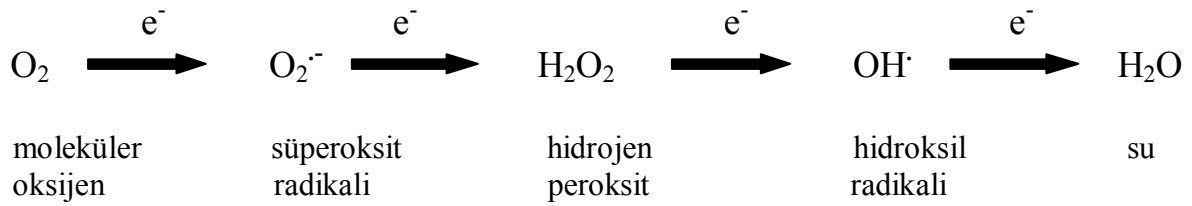
Canlılar, solunum olaylarını devam ettirebilmek için, oksidasyon tepkimelerinde rol alan havadaki oksijen molekülünü kullanır. Paralel durumda iki tane eşleşmemiş elektrona sahip oksijen molekülünün büyük bir kısmı elektron taşıma sisteminde, çok az kısmı ise diğer olaylarda kullanılmaktadır. Moleküler oksijen (O_2) solunum zincirinde, enerji kaynağı olarak kullanılan moleküllerden (karbohidratlar, yağlar ve proteinler) meydana gelen NADH ve FADH_2 ’ den dört elektron alarak suya indirgenir. Sahip olduğu eşleşmemiş elektronlar moleküler oksijenin kendisini de aynı zamanda ‘biradikal’ yapmaktadır. Biradikal oksijen

molekölü serbest radikallerle çok kolay ve hızlıca reaksiyona girmesine karşın, radikal olmayan gruplarla etkileşimi az ve yavaş gerçekleşmektedir (55, 58).

Radikaller oksijen içerip içermediğine göre, serbest oksijen radikalleri (SOR) ve oksijen içermeyen radikaller olmak üzere ikiye ayrılır (59).

4.2.1.4. Serbest Oksijen Radikalleri

Biyolojik sistemlerde en önemli serbest radikaller moleküler oksijenin tam indirgenmemiş oksijen metabolitleri olan serbest oksijen radikalleridir (60). Oksijen türevli bu radikallerden bazıları süperoksit radikali, hidroksil radikali, hidrojen peroksit, singlet oksijen ve nitrik oksit şeklinde sıralanabilir (61). En sık karşılaşılan serbest oksijen radikalleri Tablo 3’de gösterilmiştir. Moleküler oksijen ve oksijenin en stabil formu olan H₂O ile arasında üç ara basamak bulunmaktadır. Aşağıda moleküler oksijenin bir dizi tepkime ile suya kadar indirgenmesi sonucu ortaya çıkan reaktif oksijen türleri gösterilmektedir (62).



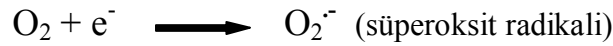
Tablo 3. En sık karşılaşılan serbest oksijen radikalleri (63)

Radikaller	Non - radikaller
Süperoksit radikali (O ₂ ^{·-})	Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)
Hidroksil radikali (OH [·])	Hipokloröz asidi, HOCl
Peroksil, RO ₂ [·]	Ozon, O ₃
Alkoksil, RO [·]	Singlet oksijen, ¹ O [·]
Hidroperoksil, HO ₂ [·]	Peroksinitrit, ONOO [·]
Nitrik oksit, NO [·]	Hidroperoksit, L(R)OOH

4.2.1.4.1. Süperoksit Radikalleri ($O_2^{\cdot-}$)

Tüm aerobik hücrelerin mitokondrisinde gerçekleşen elektron transferinde, oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit radikalleri oluşur (64). Süperoksit oluşumu ortamdaki oksijen konsantrasyonuna bağlı olup bu radikallerin yarı ömrü uzundur. Ayrıca lipofilik özelliğinden dolayı oluştuğu yerden uzak bölgelere difüzyonla yayılabilmektedir (65).

Düşük pH'da daha etkin olan süperoksit radikalının zarar verici etkisi oldukça azdır. Bu zayıf radikalın asıl önemi, hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi kuvvetli bir radikale kaynak olmasıdır. Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) radikali ile perhidroksil ($HO_2^{\cdot}$) radikali birbirleriyle dismutasyon tepkimesine girerler ve biri okside olurken diğeri indirgenir. Bu reaksiyon sonucunda moleküler oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelir (62, 64, 66).



Süperoksit radikali nanenzimatik elektron alışverişiyle veya enzimler vasıtasıyla meydana gelebilir. Bu oksijen merkezli radikal, geçiş metallerinin iyon hallerini, ferriketilendiamintetraasetik asit (Fe_3EDTA) ve sitokrom C gibi demir kompleksli bileşikler indirgeme özelliğine sahiptir. Ayrıca Askorbik asit'in sulu çözeltisini oksitleyebilmektedir (67).

4.2.1.4.2. Hidroksil Radikalleri ($OH^{\cdot}$)

Hidroksil radikali, serbest radikallerin en reaktif formudur. Hemen hemen bütün biyomoleküllerle (lipid, protein ve nükleik asitler) reaksiyona girebilir. Hidroksil ($OH^{\cdot}$) radikali suyun iyonize radyasyona maruz kalarak iyonlarına ayrışması sonucu oluşabilir (51).



Ayrıca bu reaktif radikal, 'fenton' reaksiyonu sonucu oluşan hidrojen peroksidin Fe^{+2} ve diğer geçiş elementleri varlığında (Cu, Mn, Zn, Cr, Co, Ni, Mo) indirgenmesiyle oluşabildiği gibi, Haber-Weis reaksiyonu oluşan H_2O_2 'nin $O_2^{\cdot-}$ radikali ile reaksiyona

girmesiyle de oluşmaktadır. Haber-Weis reaksiyonu katalizör varlığında ya da katalizörsüz gerçekleşebilir. Katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaştır (68, 69).



Fenton Reaksiyonu

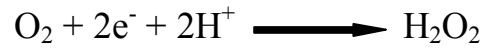


Hidroksil ($\text{OH}^\cdot$) radikalleri olduğu yerlerde tiyoller ve yağ asitleri gibi farklı moleküllerden bir proton alarak, tiyil adı verilen radikaller ($\text{RS}^\cdot$), karbon merkezli organik radikaller ($\text{R}^\cdot$), organik peroksitler ($\text{RCOO}^\cdot$) gibi hasar verici ikincil radikalleri oluştururlar (58, 62).

Hidroksil radikalının yarılanma ömrü çok kısadır. Canlı metabolizmasında oluştukları anda ciddi hasarlara sebep olurlar. DNA'nın şeker ve baz yapılarında hasarlar oluşturarak DNA'da zincir kırıkları oluştururlar. Bu hasarlar çok derin olması durumunda mutasyonlar ve hücre ölümleri meydana gelebilir (70, 71).

4.2.1.4.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit, moleküler oksijenin iki elektron ve iki tane proton (H^+) almasıyla veya Süperoksitin dışarıdan bir elektron alıp, iki proton (H^+) ile birleşmesi sonucu meydana gelir.

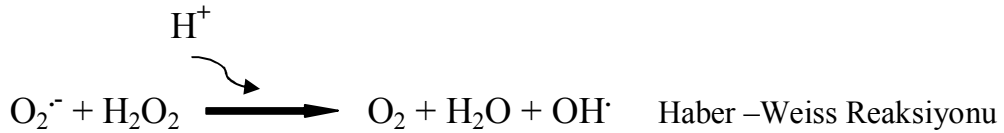
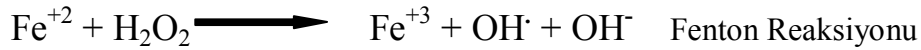


Canlı organizmalarda süperoksit dismutaz tarafından katalizlenen dismutasyon reaksiyonu sonucunda H_2O_2 oluşur. Bu reaksiyonda iki süperoksit radikali, iki elektron ve iki

proton alarak H_2O_2 ve moleküler oksijeni oluşturur. Reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden bu bir dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir (72, 73).



Yapısında eşleşmemiş elektron içermediğinden radikal özelliği taşımaz ve reaktif bir tür değildir. Ama biyolojik membranlara kolaylıkla girebilmesinden dolayı oldukça önemlidir (51, 72). Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde serbest oksijen radikalleri grubuna dâhildir. Çünkü bu molekül, serbest radikallerin oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır. Hidrojen peroksit, Fe^{+2} veya diğer geçiş metallerinin varlığında ‘Fenton tepkimesi’ sonucu ya da süperoksit radikalinin ($\text{O}_2^{\cdot-}$) bir proton alarak ‘Haber-Weiss’ tepkimesi yoluyla reaktivitesi ve zarar verme eğilimi çok büyük olan hidroksil radikalini ($\text{OH}^{\cdot}$) oluşturur (74).



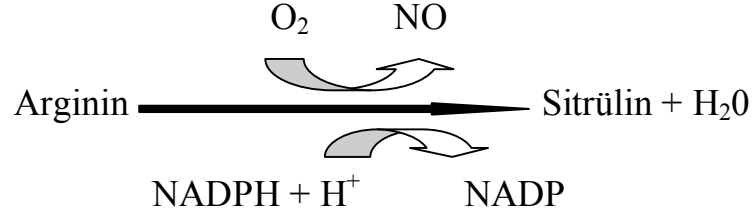
4.2.1.4.4. Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$)

Serbest radikal reaksiyonlarını başlatan singlet oksijen, ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Doymuş yağ asitleri ile doğrudan tepkimeye girerek peroksit radikalini ($\text{ROO}^{\cdot}$) meydana getirir ve lipid peroksidasyonunu (LPO) başlatabilir (68).

4.2.1.4.5. Nitrik Oksit ($\text{NO}^{\cdot}$)

Memeli hücrelerinde NO , nitrik oksit sentaz (NOS) denilen enzim ailesi tarafından, bir aminoasit olan L-arginin’in terminal guanidin grubunun moleküler oksijen varlığında sitrülün ve NO ’e çevrilmesiyle üretilir. Bu oluşum, moleküler oksijen ile kofaktör olarak, nikotinamid adenin dinükleotid (NADPH), flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin

mononükleotid (FMN) ve tetrahidrobiyopterin (BH₄)'e ihtiyaç duyar. Bu şekilde üretilen ve işlevini yerine getiren NO, hızla hemoglobin, metilen mavisi ve süperoksit anyonu tarafından nötralize edilir veya 10 saniye içinde nitrat veya nitritlere dönüştürülür (75, 76).



4.2.1.5. Serbest Radikallerin Etkileri

Canlı metabolizmasında radyasyon, yaşlanma, oksijen basıncı, kimyasal maddeler gibi çeşitli sebeplerle oluşan serbest radikaller, tüm hücre bileşenleriyle etkileşir. Bu etkileşim hücre bileşenlerin kimyasal modifikasyonlarında hücre ölümüne kadar gidebilecek metabolik ve yapısal değişiklikler meydana getirir. Metabolizmadaki önemli fizyolojik fonksiyonların sonucu oluşan oksijen türevi serbest radikaller, proteinlere, yağlara, karbohidratlara ve nükleik asitlere zarar verebilir (54, 77, 78).

4.2.1.5.1. Membran Lipidlerine Etkileri

Membranda bulunan yağ asitleri ve kolesterolün doymamış bağlarının serbest radikallerle reaksiyona girmesiyle başlayan reaksiyonlar dizisine 'lipid peroksidasyonu' denir. Lipid peroksidasyonu sonucunda, alkol, aldehit, hidroksi asit, etan ve pentan gibi çeşitli ürünler meydana gelir. Plazma membranları, serbest radikal reaksiyonlarının en önemli hedefidir. Peroksidasyon, organizmada oluşan serbest oksijen radikalın, membran yapısındaki doymamış yağ asitin yan zincirindeki metilenik karbonlardan hidrojen atomunu çıkarmasıyla başlar (79).

Lipid peroksidasyonu, hücrelerde membranların akıcılığının kaybolmasını, spesifik olmayan iyon geçirgenliğinde artışı (K⁺, Ca⁺⁺) ve membran transport mekanizmasının bozulmasını sağlayarak membranların anatomik bütünlüğünün bozulmasına ve işlevini kaybetmesine neden olur (80, 81).

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan Malondialdehit (MDA) ve aldehit gibi ürünler, üretildikleri yerden difüzyonla diğer yerlere ulaştırılarak hasara yol açarlar (47). MDA, membran komponentlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmalarına neden olur. Ayrıca

MDA diffüze olabildiğinden, DNA'nın nitrojen bağları ile reaksiyona girebilir. Malondialdehit sahip olduğu bu özelliklerinden dolayı mutajenik, genotoksik ve karsinojenik bir bileşiktir (82).

4.2.1.5.2. Proteinlere Etkileri

Proteinler serbest radikal etkisine doymamış yağ asitlerinden daha az hassastır. Çok yoğun bir saldırı olmadıkça, başlayan zincir reaksiyonlarının hızla ilerleme ihtimali daha azdır (51). Serbest radikallerin proteinlere etkisi aminoasit içeriklerine göre değişmektedir. Doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden moleküllerin serbest oksijen radikalleri ile reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin ve sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Aminoasit moleküllerinin yapılarındaki sülfidril ya da amino gruplarının serbest radikallerle etkileşmesi sonucunda aminoasitlerin modifikasyonu, proteinlerin fragmatasyonu, agregasyonu ve çapraz bağlanmaları gibi yapısal değişiklikler oluşur (57, 68).

4.2.1.5.3. Karbohidratlara Etkileri

Serbest radikallere glikoz ve mannoz gibi monosakkaritlerin etkisiyle H_2O_2 , peroksitler ve okzalaldehytler gibi çeşitli ürünler meydana gelir ve bu ürünler çeşitli patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar. Karbohidratlar, okzalaldehytler, DNA, ribonükleik asit ve proteinlere bağlanıp antimitotik etki göstererek diyabet komplikasyonlarının gelişimi, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, romatoid arterit, kanser gibi birçok hastalıkta rol oynarlar (57, 83, 84).

4.2.1.5.4. Nükleik Asitlere Etkileri

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest oksijen radikalleri, nükleik asitleri ve DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açar. Hidroksil radikali deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit, membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Süperoksit maruz kalan DNA molekülleri ise antijenik özellik gösterir. Bu nedenlerle DNA, serbest oksijen radikallerinin kolay zarar verdiği önemli bir hedeftir. Sonuç olarak serbest oksijen radikalleri etkisiyle DNA zincirinde kopmalar, bazlarda ve deoksiribozlarda kırılmalar ve hasar oluşur (51, 57, 70).

4.2.2. Oksidatif Stres

Ultraviyole ışınları, ilaçlar, radyasyon, stres, sigara, alkol ve biyokimyasal redoks reaksiyonları gibi pek çok yolla serbest radikal üretilmektedir. Bu bileşikler, organizmada kontrollü kullanımları durumunda, birçok enzimin sentezi ve birçok organizmanın antibakteriyel savunmasında önemlidir (70). Vücudumuzda serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların savunma sistemleri tarafından nötralize edilme hızı arasında bir denge vardır ve bu durum ‘oksidatif denge’ olarak tanımlanır. Organizma bu oksidatif dengeyi sağlandığı sürece, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Ancak bazı durumlarda reaktif oksijen ürünlerinin aşırı üretimi veya yetersiz transferi olduğunda hücrenin savunma sistemi serbest radikallerin etkisini tamamen önleyemez ve denge bozulur. Serbest radikallerin artışı sonucu dengenin oksidanlar lehine bozulması ve bu radikallerin hücre fonksiyonları üzerinde yaptığı olumsuz etkiye ‘oksidatif stres’ denilir (85, 86). Oksidatif stres, lipid peroksidasyonuna, protein oksidasyonuna, DNA mutasyon ve kırıklarına, sitotoksik etkilere ve sinyal iletilerinde bozulmaya neden olabilir. Oksidatif stresin, hücre hasarına bağlı yaşlanma süreci ve dejeneratif hastalıklarında, ateroskleroz, katarakt, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar, immun sistem bozuklukları, kanser oluşumu ve gelişiminde önemli rol oynadığı bilinmektedir (87).

4.3. Antioksidan Savunma Sistemleri

Sağlıklı bireylerde oluşan serbest radikaller ile antioksidan savunma sistemi arasında bir denge söz konusudur. Bu dengenin bozulması oksidatif strese neden olmaktadır. Canlı organizmalarda, serbest radikallerin neden olduğu hasarı, engelleyen, geciktiren, etkisini azaltan ve vücudun iç dengesinin korunmasına yardımcı olan birçok savunma mekanizması gelişmiştir. Bunlar ‘antioksidan savunma sistemleri’ ya da ‘antioksidanlar’ olarak adlandırılır (22, 23). İyi bir antioksidan; serbest radikallerin etkinliğini spesifik olarak ortadan kaldıracak, redoks metalleriyle şelat yapabilmeli, antioksidan ağındaki diğer antioksidanlarla ilişkide bulunarak onları rejenere edebilmeli, doku ve vücut sıvılarında uygun fizyolojik seviyelerde bulunmalı, hem sıvı ortamlarda hem membranlarda fonksiyon gösterebilmelidir (88).

Antioksidanlar başlıca dört farklı mekanizma ile oksidanları etkisizleştirir.

A. Scavenging (temizleme) etkisi: Oksidanları etkileyerek, onları daha zayıf bir moleküle çevirme veya tutma işlemidir. Antioksidan enzimler ve küçük moleküller bu tip etki gösterir.

B. Bastırıcı (quenching) etki: Oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirerek aktivitelerini azaltan etkidir. Vitaminler ve flavonoidler bu tarz bir etkiye sahiptir.

C. Onarıcı (repair) etki: Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması onarıcı etkidir. Antioksidan özelliğe sahip polifenolik bileşiklerin, DNA tamir enzimlerinin aktivitelerini ve ekspresyonlarını indüklediği ortaya konulmuştur.

D. Zincir kırıcı (chain breaking) etki: Oksidanları kendilerine bağlayıp zincirlerini kırarak, fonksiyonlarını engelleyici bir etki olarak gösterirler. Bu etki hemoglobinin, seruloplazmin, E vitamini ve mineraller tarafından yapılır (89-92).

Organizmada serbest oksijen radikalleri ve antioksidan savunma sistemi arasında bir denge vardır. Bazı durumlarda hücrelerde serbest oksijen radikallerinin konsantrasyonları antioksidan madde konsantrasyonunu geçmektedir. Bu şekilde dengenin bozulması oksidatif stresle sonuçlanmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda oksidatif stres ile mücadelede vücuda alınan antioksidan miktarının önemli olduğu gözlenmiştir. Dengenin oksidanlar lehine bozulduğu durumlarda vücudun kendisinin serbest radikallere karşı ürettiği enzimatik antioksidan savunma mekanizmaları devreye girmektedir. Bu antioksidanlara ‘endojen antioksidanlar’ denilir. Eğer bu enzimler yetersiz kalırsa o zaman dışarıdan alınan doğal antioksidanlar veya yapay antioksidanlar ile vücut savunması güçlendirilmektedir. Bu tür antioksidanlara ise ‘ekzojen antioksidanlar’ denilir. Organizmayı oksidatif etkilere karşı dengede tutabilmek için gerekli olan endojen ve ekzojen antioksidanların toplam etkisi antioksidan kapasiteyi oluşturmaktadır (57, 93, 94). Antioksidan savunma sisteminde yer alan enzimatik ve non-enzimatik moleküller Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4. Antioksidan Savunma Sistemi (95)

Enzimatik	Non - Enzimatik
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutasyon Bilirubin
Katalaz (CAT)	α - tokoferol (vit E) Ürik asit
Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)	Askorbik asit (vit C) Melatonin β - karoten
Glutasyon S- transferaz (GST)	Haptoglobin,
Mitokondrial stokrom oksidaz	Transferrin Seruplazmin Albümin
	Flavonoidler

Endojen antioksidanlar sentezlendiği organizmada etki gösteren antioksidanlardır. Hücre içi radikal toplayıcı enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlarlar. Enzimatik antioksidanlara, hücrenin çeşitli organellerinde etki gösteren süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon S-transferaz, sitokrom oksidaz gibi enzimler örnek olarak verilebilir. Bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementler ise bu enzimlerin fonksiyonları için gereklidir (96).

Sentetik olarak üretilen yapay antioksidanlara Butillenmiş hidroksianisol (BHA) ve butillenmiş hidroksitoluen (BHT) örnek olarak verilebilir. Bu antioksidanlar yiyeceklerin bozulmasını engellemek ve lipid peroksidasyonu sonucunda DNA'da meydana gelebilecek hasarları önlemek amacıyla gıdalara katılır (97, 98).

4.3.1. Doğal Antioksidanlar

Antioksidanlar; vücut hücreleri tarafından üretildikleri gibi, gıdalar yoluyla da alınabilmektedir. Gıdalarda mevcut olan başlıca doğal antioksidanlar; vitaminler (C, E ve A vitaminleri), karotenoidler ve fenolik bileşiklerdir (99).

4.3.1.2. Vitaminler

Vitamin A, vitamin C (Askorbik asit) ve vitamin E (Tokoferoller) antioksidan olarak bilinen vitaminlerdir. A vitamini görme olayında görev alan diğer adıyla retinol olarak bilinen bir vitamindir. Yağda çözünebilen A vitamini görme yanında epitel dokusunun sağlamlığı, üreme, büyüme ve bağışıklık sisteminin güçlenmesini sağlar. Potansiyel antikanserojen etkisi de olduğu görülmüştür. Ancak uzun süreli kullanımı hipervitaminoza neden olabileceği için kullanımı kısıtlı kalmıştır (100, 101).

C vitamini, diğer adıyla askorbik asit, suda eriyebilen bir vitamindir. Kan ve plazmada serbest radikallere karşı ilk savunmayı sağlar (102). Membran içindeki ve ekstraselüler dokulardaki Lipit Peroksidasyonunu'nu önler. Güçlü bir indirgeyici ajan ve antioksidan olup, semidehidroaskorbat radikal ara ürünü üzerinden kolaylıkla dehidroaskorbik aside okside olabilmektedir. Hidroksil ve süperoksit radikalleri ile kolayca reaksiyona girebilir. Böylece ortamda bulunan radikalleri temizleyebilir (103, 104).

E vitamini, diğer adıyla tokoferol en önemli antioksidandır. Hücre membranlarında ve gezinen lipoproteinlerde bulunur (105). Zincir kırıcı antioksidan olarak bilinen Vitamin E, süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksit radikallerini ve diğer radikalleri indirger. Başlıca antioksidan fonksiyonu lipid peroksidasyonunu sonlandırmasıdır (106, 107).

4.3.1.3. Karotenoidler

A vitamini'nin ön maddesi olup iyi incelenmiş olanı potent bir antioksidan olan β karotendir. β -karotenin singlet oksijeni bastırabildiği, süperoksit radikalini temizlediği ve peroksit radikalleriyle direkt olarak etkileşerek antioksidan görev gördüğü saptanmıştır. Karotenin küçük bir bölümünün A vitaminine dönüşmesi sayesinde plazma dengesi sağlanır ve A hipervitaminoz engellenir. β karoten hipodermiste birikmesiyle deriye bronz renk verir (100, 105).

4.3.1.4. Fenolik Bileşikler

Doğal antioksidan kaynaklarının büyük bir çoğunluğunu bitki fenolik bileşikleri oluşturmaktadır. Bu bileşikler bitkileri mikroorganizmalar ve ultraviyole ışınlarına karşı korumanın yanında, insan metabolizmasında antioksidan etki göstererek birçok hastalığın oluşumunu ve gelişimini önler (108, 109).

Fenolik bileşikler içinde, hidrojen verici, serbest radikal yakalayıcı ve zincir kırma özelliklerinden dolayı en etkili antioksidanlar flavonoidler olarak belirlenmiştir. Flavonoidler antioksidan etkileri sayesinde süperoksit anyonunu, peroksil, hidroksil radikalini ve singlet oksijeni yakalayabilirler. Diğer etkileri ise metal bağlama ve lipoksigenaz inhibisyonu olarak sıralanmaktadır. Demir iyonları ile kompleks oluşturup, Fenton reaksiyonunu baskılayarak hidroksil radikalinin oluşmasını engeller (24, 25).

Flavonoidler $C_6-C_3-C_6$ difenil propan yapısında olup, fenil grupları arasındaki üçlü karbon köprüsü, oksijenle halka oluşturmaktadır. Flavonoidlerin ve metabolitlerinin antioksidan aktivitesi halkalı çekirdeksel yapılarındaki fonksiyonel grupların yerleşmesine bağlıdır. Flavonoidlerin yapılarındaki substituentlerin yerleşimi itibarıyla antioksidan aktiviteleri, flavan iskeletinin tek başına göstermiş olduğu aktiviteden daha yüksek olabilmektedir. Birçok fenolik antioksidan birbirleriyle karşılaştırıldığında, hem konfigürasyonun hem de toplam hidroksil grupların, antioksidan aktivitesini büyük oranda etkilediği görülmüştür. Genellikle yapıdaki hidroksil gruplarının sayısının artması antioksidan aktiviteyi artırmaktadır (110, 111). Flavonoidlerin maksimum aktivite göstermesi için B halkasında 3'-4' dihidroksi yapısı, C halkasında 4-oxo grubu ve 2,3 çift bağı; C halkasında 3-OH ve A halkasında 5-OH yapısının bulunması gerekmektedir (112). Serbest radikal süpürme kapasitesinin hidroksil substituentlerinin yüksek reaktivitesine bağlı olduğu aşağıdaki reaksiyonda görülmektedir:



Flavonoidler yapılarındaki hidroksil grupların reaktif özelliklerinden dolayı kolaylıkla glikozitlenirler. Aglikonlar ve bunların glikozit formları antioksidan aktivite açısından değerlendirildiğinde glikozitlerin daha az etkili olduğu görülmüştür. Genel olarak flavonoidlerin antioksidan etkileri hidroksillenme derecesine göre artarken, yapıya bağlanan şekere ve cinsine göre de azalır (26).

Antioksidan etki, fenolik bileşiklerin en önemli biyolojik özelliğidir. Meyve ve sebze ağırlıklı beslenenlerde kan basıncının düştüğü, meyve ve sebzelerin bu etkiyi yapılarında bulunan antioksidanlarla sağladıkları görülmüştür. Bu etkinin diğer doğal kaynaklı antioksidanlardan (vitaminler, karotenoidler) daha çok fenolik bileşiklerden kaynaklandığı görülmüştür (113-115). Antioksidan olarak fenolik bileşikler kanser, kalp hastalıkları, katarakt, göz hastalıkları ve Alzheimer gibi hastalıkları engellemektedir. Yapılan birçok çalışma sonucunda fenolik bileşiklerin antialerjik, antienflamatuvar, antidiyabetik, antimikrobiyal, antipatojenik, antiviral ve antirombotik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (27, 28).

4.4. Bitkisel Ekstraktların Önemi

Sentetik antioksidanların kanserojen olması riskinden dolayı insanlar doğal ürünlere yönelmişlerdir (116). Meyve sebzelerde bol miktarda bulunan fenolik bileşikler gibi doğal antioksidanlar, serbest oksijen radikallerle reaksiyona girerek insan vücudunda birçok hastalığın oluşumunu engeller (117). Doğal antioksidanlar insan organizması için genellikle zararsız olup yan etkileri bulunmamaktadır. Bu antioksidanlar canlı organizmalardaki savunma sisteminde, gıda sanayinde ise besinlerin bozulmasını önlemek, raf ömrünü uzatmak, lipidlerin ve vitaminlerin parçalanmasını engellemek ve besin rengini korumak için kullanılan önemli katkı maddeleridir (118). Endüstriyel uygulamalarda kullanılmak üzere; meyve ve sebzelerin tohum, meyve, yaprak, kök, kabuk gibi kısımları kullanılarak antioksidanca zengin ekstraktlar tanımlamak üzere yapılmış çok sayıda çalışma vardır (119-121).

4.4.1. Bitkisel Kaynaklı Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu İçin Kullanılan Teknikler

Bu teknikler, soxhlet ekstraksiyonu, süperkritik akışkan ekstraksiyonları, basınçlı çözücü ekstraksiyonu, Katı-Faz ekstraksiyonu ve çözücülerle ekstraksiyon olmak üzere beş kısımda ele alınabilir.

4.4.1.1. Soxhlet Ekstraksiyonu

Çoğunlukla kuru numunelerin ekstraksiyonunda kullanılan, çözücü olarak genellikle organik çözücülerin kullanıldığı bir tekniktir. Cam balona konulan çözücü bir mantolu ısıtıcı yardımıyla ısıtılır ve böylece çözücü buharlaştırılır. Çözücü buharı geri soğutucuya geldiğinde yoğunlaşarak filtre kağıdına sarılı numunenin üzerine damlalar halinde düşer. Numunenin bulunduğu ekstraksiyon tüpünün çözücüyle dolmasıyla, geri devir kolunun seviyesine ulaşılır ve burada sifon oluşarak çözücü cam balona boşalır. Ekstraksiyonda gerçekleşen bu olaylar ekstraksiyon tüpünün içerisindeki çözücü renksiz oluncaya kadar devam eder. Ekstraksiyonda, döngü sırasında ekstraksiyon tüpünde bulunan numunedeki hedef bileşen çözücüde çözünür. Sifon ile çözücü ve hedef bileşen cam balona geçer. Isıtılan cam balonda yalnızca çözücü buharlaştığı için hedef bileşen tekrardan döngüye katılmaz. Bu olay, Soxhlet ekstraksiyon tekniğinin en önemli özelliğidir. Burada, yalnızca saf çözücü katı numuneyi ekstrakte etmek için buharlaşır ve yoğunlaşarak döngüye katılır. Böylece Soxlet ekstraktörüyle yapılan ekstraksiyon verimi daha yüksek olmaktadır. Bu ekstraksiyon metodunda kolaylıkla buharlaşabilen çözücüler kullanıldığından dolayı, hedef bileşen ile çözücü birbirinden kolaylıkla ayrılmaktadır (122).

4.4.1.2. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu

Kendi kritik sıcaklık ve basıncının üstünde sıcaklık ve basınçta olan, bulunduğu kabın hacmini alan ve sıkışma özeliği gösteren akışkanlara ‘süperkritik akışkan’ denir (123). Süperkritik akışkan ekstraksiyonu kullanımının geleneksel ekstraksiyonlara göre daha kısa sürede yapılması ve akışkanın viskozitesi düşük olmasından dolayı da daha iyi bir kütle transferi özeliği sağlanmaktadır. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu, esansiyel yağlar, tıbbi bileşikler, yağlar, karotenler, alkaloidler gibi polar nitelikte olmayan çeşitli bileşik gruplarına uygulanmaktadır (124).

4.4.1.3. Basınçlı Çözücü Ekstraksiyonu

Basınçlı çözücü ekstraksiyonu, genelde katı numunelerdeki hedef bileşenleri ekstrakte etmek için kullanılan bir tekniktir. Bu teknikte numunedeki hedeflenen bileşenleri iyi bir şekilde çözebilmek için çözücüye yüksek sıcaklık ve yüksek basınç uygulanarak çözücünün çözme özeliği değiştirilmektedir. Sıcaklığın etkisiyle viskozitenin düşürülmesi sonucu çözücünün ıslatabilme yeteneği artırılmaktadır. Normal şartlarda su ile ekstrakte edilemeyen hedef bileşenler için bu teknik kullanılarak, sıcaklığın ve basıncın etkisi ve suyun çözme özeliğinin değiştirilmesiyle kolaylıkla ekstrakte edilebilmektedir. Çözücü olarak çoğunlukla

suyun kullanılması, toksik olmaması, çevreye zarar vermemesi ve suyun ucuz bir çözücü olması tekniğin avantajlarından bazılarıdır (125). Geleneksel ekstraksiyon tekniklerine alternatif olarak geliştirilen bu teknik, ekstraksiyon süresi, çözücü tüketimi, ekstraksiyon verimi ve uygulanan yöntemin tekrarlanabilirliği bakımından da diğer ekstraksiyon tekniklerine göre üstünlükler sunmaktadır (126).

4.4.1.4. Katı-Faz Ekstraksiyonu

Birçok geleneksel ekstraksiyon metoduna göre daha hızlı gerçekleşen ve daha duyarlı bir ekstraksiyon tekniğidir. Katı-faz ekstraksiyonu tekniği ile numune hazırlama oldukça basittir. Bu teknikte katı faz için, C₈, C₁₈, C₁₈-ters-faz, iyon değiştirici, poliamid gibi ekstraksiyon kartuşları kullanılmaktadır. Bu ekstraksiyonda, hareketli faz olarak da metanol, asetonitril, etil asetat tetrahidrofuran, metanoldimetilsülfoksit karışımı gibi çözücüler kullanılmaktadır. Katı-faz ekstraksiyonunda bir analitteki fenollerin, dedektör duyarlığında ve seviyelerindeki değişim, farklı teknikleri gerektirebilir. Örneğin kan portakalı suyundaki flavonon glikozitler basit ekstraksiyonla geri kazanılırken, trans-sinamik asit ters-faz katı ekstraksiyonuyla örnek hazırlama ve numune konsantrasyonu tek bir adımda olacak şekilde geri kazanılabilmektedir (127, 128).

4.4.1.5. Çözücülerle Ekstraksiyon

Bitki ekstraktlarında biyoaktif bileşenlerin belirlenmesi için evrensel bir ekstraksiyon metodu bulunmamaktadır. Kullanılan en yaygın metod, çözücülerle yapılan ekstraksiyondur. Bu yöntem kullanımı kolay, etkili, ve geniş uygulama alanı olması sebebiyle tercih edilmektedir. Ekstraksiyon işleminde, öncelikle ekstre edilecek fenolik bileşiklerin kimyasal yapısına ve fiziksel özelliklerine uygun şartlar saplanmalı ve uygun çözücünün seçilmesi önemlidir. Ayrıca ekstraksiyon zamanı, sıcaklık, çözücü ve çözünen oranı en az diğer şartlar kadar önemlidir. Seçilen çözücü istenen maddeyi çözmeli fakat istenmeyen diğer maddeleri çözmemelidir. Bitkilerde bol miktarda bulunan fenolik bileşikler, yapılarında karbohidratlar gibi fenolik olmayan kısım da içerirler. Ekstraksiyon işleminde fenolik yapıdan bu şeker birimlerinin uzaklaştırılması için ek bir adıma ihtiyaç vardır (129).

Bitkisel kaynaklı ekstraksiyonlarda fenolik bileşik tayininde en yaygın olarak kullanılan çözücüler metanol, etanol, aseton, etil asetat ve sudur. Doğru çözücüyü seçmek polifenol ekstraktının miktarını ve oranını etkiler (130). Bu çözücülere asit ilavesi yapılarak hazırlanan ‘asitli organik çözücü’ ise yapıdaki şeker birimlerinin uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Kullanılan asit çeşidi olarak formik asit, asetik asit, sitrik asit, tartarik asit,

fosforik asit gibi zayıf organik asitlerin yanında güçlü asitlerin zayıf konsantrasyonları kullanılabilir. Çok fazla konsantrasyonlarda asit kullanımı yapının stabilizesinin kaybolmasına ve ayrıca yapının bozulup sahip olduğu özellikleri etkilemesinden dolayı tercih edilmemektedir. Örnek olarak trifloroasetik asitin % 0.5- % 3.0 arasında ve hidroklorik asitin ise %1 den daha az oranda ilave edilmesi verilebilir (131-133).

Yapısında birçok fenolik bileşik çeşidi ihtiva eden karayemiş meyvesi, bu bileşiklerle doğal antioksidan özelliği göstermektedir. Bu meyvenin asit ilave edilmiş farklı çözücülerle hazırlanan ekstraksiyonları, yapıdaki fenolik bileşiklere bağlı olarak bulunan karbohidratları uzaklaştırmıştır. Bu şekilde aglikan kısımların antioksidan kapasitelerine bakılmıştır.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Kullanılan Cihaz, Alet, Malzeme ve Kimyasallar

5.1.1. Cihazlar ve Malzemeler

Tezde kullanılan cihaz, alet ve malzemeler Tablo 5’de verilmiştir.

Tablo 5. Kullanılan cihaz, alet ve malzemeler

Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	Üretici Firma
Derin dondurucu, -20 °C	Altus
Derin dondurucu, -80 °C	Thermo Electron Corporation
Etüv	Heraeus
Çalkalayıcı	Eppendorf Thermo Mixer Comfort
Hassas analitik terazi	Mettler Toledo AB204 -S
Manyetik karıştırıcı	Termal
Çeşitli hacimlerde otomatik pipetler	Eppendorf
Pipet pompası	JetPip Pipette Aid
Mikropleyt okuyucu	Molecular Devices Versa
15 mL’lik ve 50 mL’lik steril falkon tüpler	TPP, Greiner
0.5 ve 1.5 mL’lik eppendorf tüpler	Greiner
Çalkalayıcı inkübatör	ShelLab/Sheldon S14-2
pH metre	Hanna Instruments, HI 9321
Vorteks (Karıştırıcı)	IKA Genius 3
Cam malzemeler (beher, erlen, balon joje, cam şişe	Isolab
Buzdolabı, +4 °C	Altus

5.1.2. Kimyasal Maddeler

Tezde kullanılan kimyasal maddeler Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6. Kullanılan kimyasal maddeler

Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	Üretici Firma
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Merck
Etanol	Sigma - Aldrich
Gallik asit	Sigma, G7384
Kuersetin dihidrat	Fluka
Sodyum Karbonat (Na_2CO_3)	Merck, A97598
Folin& Ciocalteu’s fenol reaktifi	Sigma-Aldrich, F9252
Aluminyum nitrat nonahidrat ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)	Fluka, 06274
Potasyum asetat (KCH_3COO)	Merck, K32043020
Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck, K1305445
Disodyum hidrojen fosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck, K16290176
Potasyum hekzasiyanoferrat (III) ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$)	Lancaster, 13746-66-2
Trikloroasetik asit	ABCR, AB119247
Demir (III) klorür	Sigma-Aldrich, F7134
Hidroklorik asit	Merck
DPPH	Sigma-Aldrich D9132

5.2. Deney Hazırlığı ve Metodlar

5.2.1. *Laurocerasus officinalis* Roem. (Karayemiş) Meyve Ekstraktının Hazırlanması

Olgun karayemiş meyvesi 2013 Ağustos ayında Trabzon merkezden toplandı ve kurutuldu. Kurutulmuş meyve örneklerinin çekirdekleri çıkarılarak meyvenin sadece etli kısımları blendırda toz haline getirilip, toz karışım elde edildi.

Kurutulmuş toz karayemiş örneğinden hassas terazide 0.5'er g tartılıp 50 ml'lik altı ayrı falkon tüpüne aktarıldı. İlk üç falkon tüpüne 10'ar ml saf haldeki su, etanol ve dimetil sülfoksit (DMSO), son kalan üç falkon tüpüne saf çözücüyle beraber saf çözücünün % 0.05'i olacak miktarda (5 mikrolitre) HCl ilave edildi. Saf çözücü ve saf çözücüyle beraber asit ilave edilmiş karayemiş örnekleri vortekslendi ve çalkalayıcı inkübatörde 60 °C'de 150 rpm'de 24 saat süreyle çözünmesi için sürekli çalkalanarak inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyon sonrası karayemiş ekstraktları süzgeç kağıdı yardımıyla süzüldü. Böylece 50 mg/ml'lik farklı çözücülerde hazırlanmış stok karayemiş ekstraktları hazırlanmış oldu. Bu stok karayemiş örnekleri daha sonra kullanılmak üzere buzdolabında +4 °C'de karanlıkta saklandı.

5.2.2. Toplam Polifenol İçerik Tayini

Yöntem, suda ve organik çözücülerde çözünmüş olan fenolik bileşiklerin Folin reaktifi ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan mor-menekşe renkli kompleks 700 nm'de maksimum absorbands oluşturur. Toplam polifenol içeriğinin belirlenmesi amacıyla standart olarak gallik asit kullanılır (134).

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

- % 20'lik Na_2CO_3 Çözeltisi: 10 g Na_2CO_3 tartıldı, saf su ile çözülüp hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- 1:10 Folin-Ciocalteu Reaktifi: 1 mL 2 N Folin-Ciocalteu reaktifi, 9 mL saf su eklenerek 1:10 oranında seyreltilti. Tayin öncesi hazırlandı ve taze olarak kullanıldı.
- Standart: 0.01 g gallik asit 1 mL saf su ile çözülerek 10 000 $\mu\text{g/mL}$ 'lik gallik asit standardı elde edildi.

Deneyin Yapılışı

Hazırlanan 10 000 µg/mL’lik gallik asit standardından 1000 µg/mL’lik standart hazırlanarak saf su ile çözülmüş 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 ve 3.125 µg/mL’lik gallik asit standartları meydana getirildi. Ekstraktlar ve körler 1:50 oranında saf su ile seyreltildi. Tablo 7’deki pipetlemeler 96 kuyucuklu mikroyetide yapıldı (135).

Tablo 7. Toplam fenolik içerik tayininde yapılan işlemler

	Kör	Numune	Standart
Su/etanol/DMSO	12.5 µL	-	-
Ekstrakt	-	12.5 µL	-
Standart	-	-	12.5µL
1:10 Folin- Ciocalteu Reaktifi	62.5 µL	62.5 µL	62.5 µL
% 20’lik Na ₂ CO ₃	125 µL	125 µL	125 µL
Oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.			
700 nm’de mikroyet okuyucuda absorpsiyon ölçüldü.			

5.2.3. Toplam Flavonoid İçerik Tayini

Ekstraktların toplam flavonoid içeriği, Alüminyum klorür kolorimetrik metodu ile belirlenmiştir. Metodun prensibi, AlCl₃’ün flavonlar ve flavonollerin C-4 keto grubu ve C-3 veya C-5 hidroksil grupları ile asitte kararlı kompleksler oluşturması esasına dayanmaktadır. Buna ek olarak AlCl₃, flavonoidlerin A- veya B- halkalarının orto-dihidroksil grupları ile kompleks oluşturur (48). Bu metoda göre standart olarak kuersetin kullanılır (136).

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

- % 80’lik Etanol Çözeltisi: 80 mL’lik saf etanolün hacmi saf su ile 100 mL’ye tamamlandı.
- % 10’luk Al(NO₃)₃ Çözeltisi: 2.5 g Al(NO₃)₃ tartıldı, saf su ile çözülüp hacmi 25 mL’ye tamamlandı.
- 1 M KCH₃COO Çözeltisi: 2.454 g KCH₃COO tartıldı, saf su ile çözülüp hacmi 25 mL’ye tamamlandı.
- Standartlar : 0.01 g kuersetin 802 µL saf etanol ile çözülerek hacmi saf su ile 1000 µL’ye tamamlandı. 10 000 µg/mL’lik kuersetin standardı elde edildi.

Deneyin Yapılışı

Hazırlanan 10000 µg/mL’lik kuersetin standardından, 1000 µg/mL’lik standart hazırlanarak % 80’lik etanol ile çözülmüş 100, 75, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 ve 1.5625 µg/mL’lik kuersetin standartları meydana getirildi. Ekstraktlar ve körler 1:20 oranında saf su ile seyreltildi. Tablo 8’deki pipetlemeler 96 kuyucuklu mikropleytte yapıldı (137).

Tablo 8. Toplam flavonoid içerik tayininde yapılan işlemler

	Kör	Numune	Standart
Su/etanol/DMSO	20 µL	-	-
Ekstrakt	-	20 µL	-
Standart		-	20 µL
% 80’lik Etanol	172 µL	172 µL	172 µL
% 10’luk Al(NO ₃) ₃	4 µL	4 µL	4 µL
1 M KCH ₃ COO	4 µL	4 µL	4 µL
Oda sıcaklığında, karanlıkta 40 dakika inkübe edildi			
415 nm’de mikropleyt okuyucuda absorbands ölçüldü			

5.3. Antioksidan Aktivitelerin Belirlenmesi

5.3.1. Demir (Fe⁺³) İndirgeyici Güç Tayini (FRAP)

Bu yöntemle göre indirgeme kuvveti, antioksidanlar gibi indirgen maddelerin dolaylı olarak toplam indirgeme potansiyelini göstermekte olup, Fe⁺³-ferrisiyanür kompleksinin Fe⁺²’ye indirgenmesine neden olmaktadır. Bu metoda göre, test edilen örneğin indirgenme gücüne bağlı olarak test çözeltisinin rengi sarıdan yeşile döner. Oluşan yeşil renk 700 nm’de maksimum absorbands verir ve artan absorbands artan indirgenme kuvvetini gösterir (138). Bu metoda göre standart olarak vitamin C kullanılmıştır.

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

- 0.2 M pH: 6.6 Fosfat Tamponu: 2.137 g NaH₂PO₄.2H₂O ve 1.121 g Na₂HPO₄.2H₂O tartılarak karıştırıldı. Saf su eklenerek 90 mL’ye kadar çözüldü. Daha sonra pH’ı 6.6’ya ayarlanarak hacmi saf su ile 100 mL’ye tamamlandı.

- % 1'lik $K_3Fe(CN)_6$ Çözeltisi: 1 g $K_3Fe(CN)_6$ tartıldı, saf su ile çözölüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- % 10'luk TCA Çözeltisi: 5 g TCA tartıldı, saf su ile çözölüp hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- % 0.1'lik $FeCl_3$ Çözeltisi: 0.1 g $FeCl_3$ tartıldı, saf su ile çözölüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- Standart: 0.001 g vitamin C 1 mL saf etanol ile çözölerek 1000 $\mu g/mL$ 'lik vitamin C standardı elde edildi.

Deneyin Yapılışı

Hazırlanan 1000 $\mu g/mL$ 'lik vitamin C standardından saf etanol ile çözölümüş 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.813, 3.906, 1.953 ve 0.977 $\mu g/mL$ 'lik vitamin C standartları hazırlandı. Ekstraktlar ve körler 1:100 oranında saf su ile seyreltildi. Deney modifiye edilerek spektrofotometrik kuvvetler yerine Tablo 9'daki pipetlemelerin ilk altı aşaması 1.5 mL'lik ependorflarda, sonraki aşamalar ise 96 kuyucuklu mikropleytte yapıldı.

Tablo 9. Demir (Fe^{+3}) indirgeyici güç tayininde yapılan işlemler

	Kör	Numune	Standart
Su/etanol/DMSO/ %80'lik Etanol	40 μL	-	-
Ekstrakt	-	40 μL	-
Standart	-	-	40 μL
0.2 M pH: 6.6 Fosfat Tamponu	100 μL	100 μL	100 μL
%1'lik $\text{K}_3(\text{CN})_6$	100 μL	100 μL	100 μL
50 °C'de 20 dakika inkübe edildi ve soğutuldu.			
% 10'luk TCA	100 μL	100 μL	100 μL
3000 g'de 10 dakika santrifüj edildi.			
Üstteki fazlardan 100' er μL alınarak 96 kuyucuklu mikropleyte aktarıldı.			
Saf su	100 μL	100 μL	100 μL
% 0.1'lik FeCl_3	20 μL	20 μL	20 μL
Oda sıcaklığında, karanlıkta 5 dakika inkübe edildi.			
700 nm'de mikropleyt okuyucuda absorbans ölçüldü.			

5.3.2. DPPH' Radikal Temizleme Aktivitesi

DPPH' radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak satın alınan bir radikaldir. Yapılan deneylerde Cuendet vd. (1997) yöntemi kullanıldı. Antioksidan madde veya maddelerle muamele edildiğinde, DPPH' 'den kaynaklanan mor rengin şiddeti azalarak absorbans değerlerinin düşmesine neden olmaktadır. DPPH' radikalinin 4 mg/100 mL olacak şekilde metanolik çözeltisi kullanıldı. Numune ve standart (vitamin C) için testlerden önce hangi konsantrasyonlarda çalışılacağı belirlenmesi için DPPH çözeltisi ile ön denemeler yapıldı. Ön denemelerde belirlenen konsantrasyon asıl deneylerde kullanılacak olan en konsantre numune ve standart konsantrasyonudur. Bu değerden başlanarak karayemiş ekstraktların ve standart çözeltisinin farklı konsantrasyonları hazırlandı ve tüplere pipetlendi. Eşit hacimde DPPH çözeltisi, numune çözeltileri üzerine eklenerek vortekslendi. Daha sonra oda sıcaklığında ve karanlıkta 50 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı (Tablo 10). Süre sonunda DPPH'in maksimum absorbans verdiği 517 nm'de absorbanslar okundu. Kör olarak

DPPH çözeltisi ve numunenin çözöldüğü çözöcö kullanıldı. Asit ihtiva eden numuneler için bir de numune körü (numune + numune çözöcösü) kullanıldı. Hesaplamalarda numune absorbansından numune körü absorbansı çıkarıldı. Bulunan absorbanslara karşılık gelen konsantrasyonlar grafiğe geçirilerek SC₅₀ değeri mg/mL cinsinden hesaplandı.

Tablo 10. DPPH' yöntemi için pipetleme prosedürü

	Kör	Numune körü	Numune	Standart
Su / Etanol / DMSO	750 µL	750 µL	-	-
DPPH Çözeltisi	750 µL	-	750 µL	750 µL
Ekstrakt (değişik konsantrasyonlarda)	-	750 µL	750 µL	-
Standart (değişik konsantrasyonlarda)	-	-	-	750 µL
Oda sıcaklığında, karanlıkta 50 dakika inkübe edildi				
517 nm'de mikroyekt okuyucuda absorbans ölçöldü				

SC₅₀ Değerlerinin Bulunması

SC₅₀ ortamda bulunan radikal miktarını yarıya indiren numune konsantrasyonudur. SC₅₀ değeri bulunması için farklı konsantrasyonlarda çalışmak gerekir. Analizde standart olarak vitamin C toplam konsantrasyonu 1 mg/mL olarak belirlendi. Numunelerin 5 farklı konsantrasyonu hazırlanıp absorbans ölçömleri yapıldı ve absorbanslar konsantrasyona karşılık grafiğe geçirildi. Maksimum absorbansın yarısına karşılık gelen yani absorbansı yarıya düşüren konsantrasyon miktarı SC₅₀ değeri vermektedir. SC₅₀ değeri ortamda varolan DPPH' radikalinin yarısını süpüren, temizleyen numune yada standart konsantrasyonudur. SC₅₀ değeri mg/mL veya mM gibi birimlerle ifade edilmektedir.

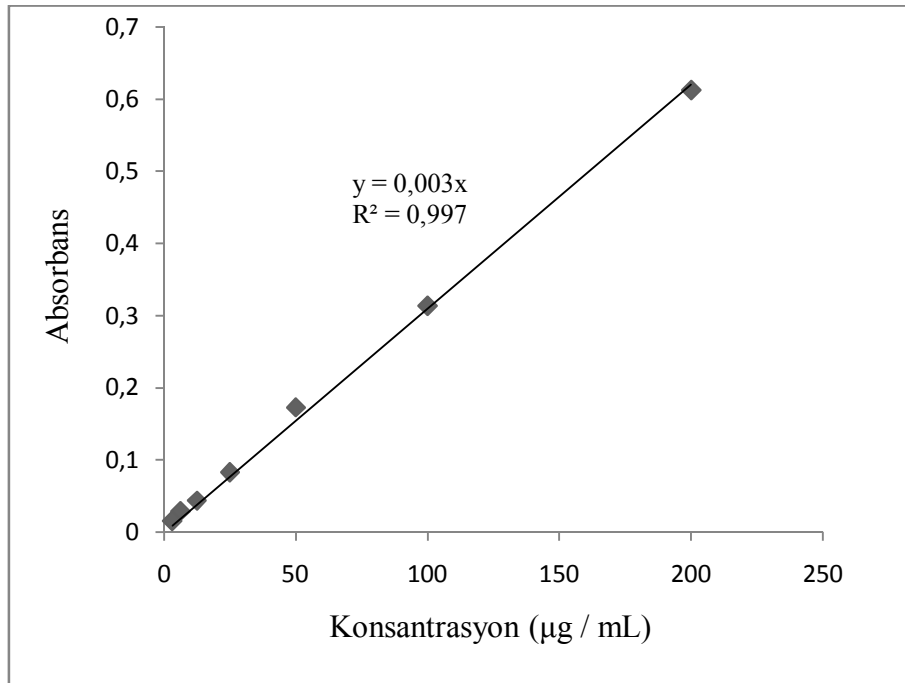
5.4. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Elde edilen değerler, aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma ($x \pm SD$) olarak ifade edildi. Gruplar arasındaki ilişkinin ortaya konulabilmesi için One Way ANOVA ve post-hoc Tukey analizleri kullanıldı. DPPH tayini ile ilgili verilerinin su, etanol, DMSO ve bu çözücülerin asit ilave edilmiş karayemiş ekstraktları ve edilmemiş ekstraktları arasında karşılaştırılma yapıldı. Tüm tayinler 3 kez çalışıldı ve $p < 0.05$ olanlar anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Toplam Polifenol İçerik Tayini Sonuçları

Karayemiş meyvelerinin toplam polifenol içeriği Folin- Ciocalteu reaktifi ile belirlenmiştir. Standart olarak gallik asit kullanılmıştır. Sonuçlar gallik asit standart grafiğinden yararlanılarak $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplandı. mg Gallik asit/ g karayemiş şekline Denklem 1’de verilen formülle dönüştürüldü. Standart grafiğindeki x-ekseni konsantrasyon, y-ekseni ise absorbans değerlerini gösterir. Her örnek üç kere tekrarlandı (n=3). Gallik asit için standart grafik Şekil 6’da gösterilmiştir.

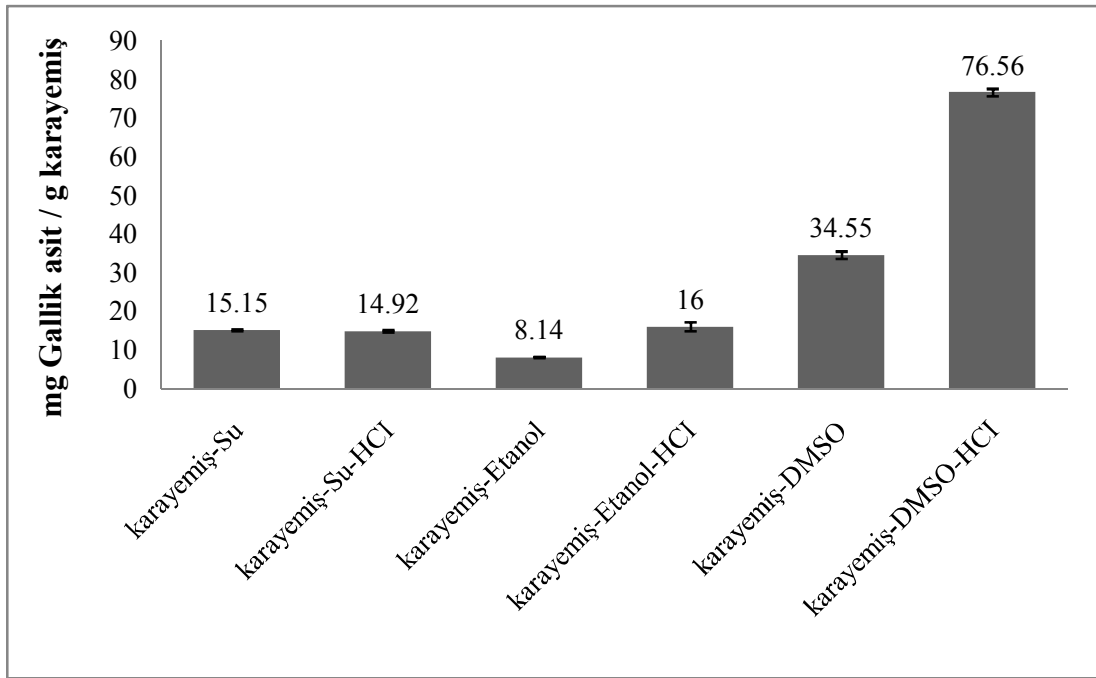


Şekil 6. Toplam polifenol içerik tayini için gallik asit standart grafiği

Net absorbans = Ortalama absorbans – Kör absorbansı

$$\frac{\text{Net absorbans}}{\text{Standart grafiğindeki } x' \text{ in katsayısı}} \times \frac{\text{Dilüsyon katsayısı (50)}}{50} \quad \text{Denklem 1}$$

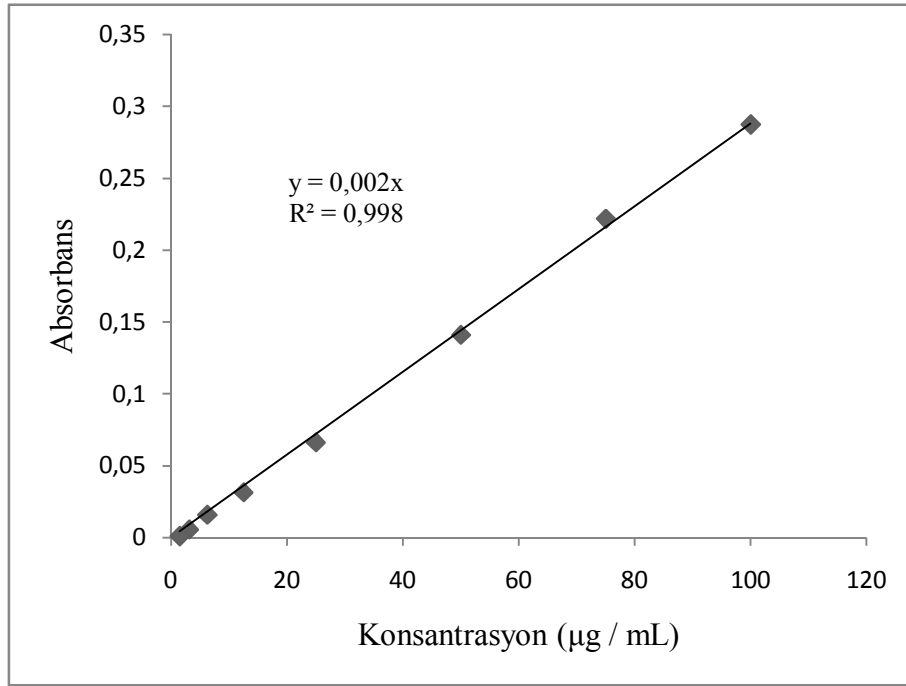
Karayemişin DMSO'lu ekstraktlarındaki toplam polifenol içeriği (34.55 ± 0.94 mg GA/ g karayemiş) etanollü (8.14 ± 0.11 mg GA/ g karayemiş) ve sulu (15.15 ± 0.26 mg GA/ g karayemiş) ekstraktlarındaki toplam polifenol içeriğinden daha fazla bulundu. Asit ilave edilerek hazırlanan ekstraktlardan, DMSO'lu ekstraktın toplam polifenol içeriği (76.56 ± 0.94 mg GA/ g karayemiş), etanollü (16.00 ± 1.16 mg GA/ g karayemiş) ve sulu (14.92 ± 0.26 mg GA/ g karayemiş) ekstraktlardaki toplam polifenol içeriğinden daha fazlaydı. Normal ekstraktlarda en az toplam polifenol içerik etanollü ekstraktlarda görülürken, asit ilave edilmiş ekstraktlarda sulu ekstraktlarda görülmüştür. Karayemişin asit ilave edilerek hazırlanan etanollü ve DMSO'lu ekstraktlarındaki toplam polifenol içerik, asit ilave edilmeden hazırlanan etanollü ve DMSO'lu ekstraktlarındaki toplam polifenol içeriğinin 2 katı olarak hesaplandı (etanol için $p=0.007$, DMSO için $p=0.001$). Fakat karayemişin sulu ekstraktları ile asit ilave edilerek hazırlanan sulu ekstraktları arasında toplam polifenol içeriği bakımından anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.368$). Ekstraktlarda toplam polifenol içerik tayini sonuçları Şekil 7'de verilmiştir.



Şekil 7. Karayemişin sulu, etanollü, DMSO'lu ve bu çözücülerin asit ilave edilmiş ekstraktlarındaki toplam polifenol içerik ($X \pm SD$ mg GA / g karayemiş)

6.2. Toplam Flavonoid İçerik Tayini Sonuçları

Bu metoda göre standart olarak kuersetin kullanılmıştır. Sonuçlar kuersetinin standart grafiğinden yararlanılarak $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplandı. mg kuersetin / g karayemiş şekline Denklem 2’de verilen formülle dönüştürüldü. Standart grafiğindeki x-ekseni konsantrasyon, y-ekseni ise absorbans değerlerini gösterir. Her örnek üç kere tekrarlandı ($n=3$). Kuersetin için standart grafik Şekil 8’de gösterilmiştir.

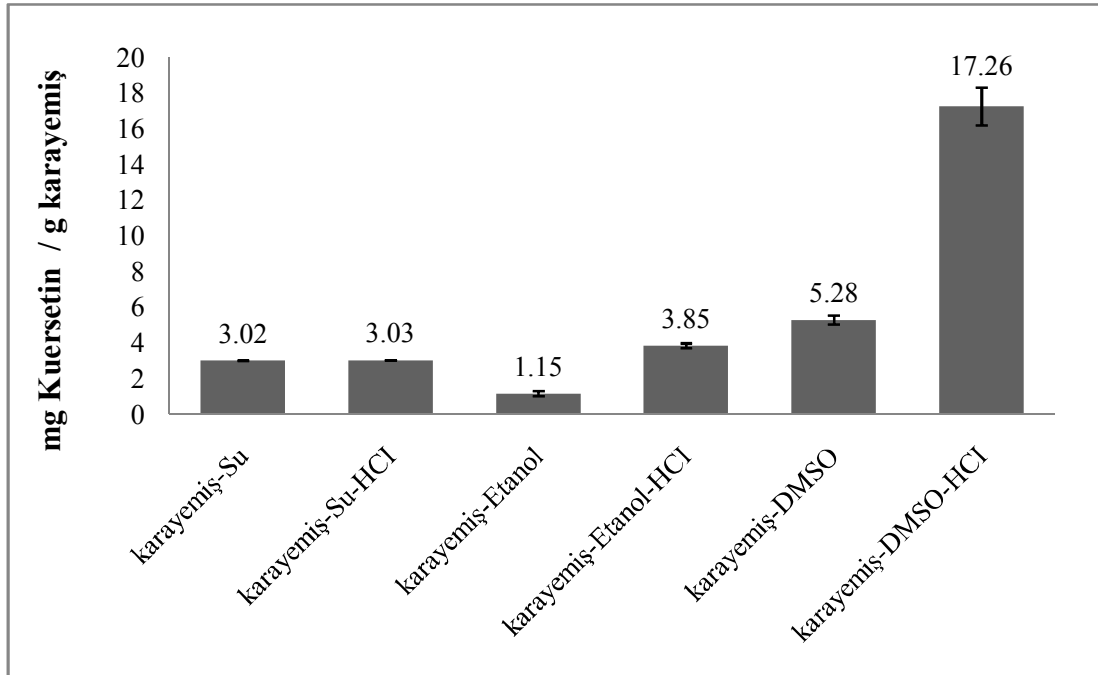


Şekil 8. Toplam flavonoid içerik tayini için kuersetin standart grafiği

Net absorbans = Ortalama absorbans – Kör absorbansı

$$\frac{\text{Net absorbans}}{\text{Standart grafiğindeki x'in katsayısı}} \times \frac{\text{Dilüsyon katsayısı (20)}}{50} \quad \text{Denklem 2}$$

Karayemişin DMSO'lu ekstraktındaki toplam flavonoid içeriği (5.28 ± 0.25 mg K/ g karayemiş) etanollü (1.15 ± 0.14 mg K/ g karayemiş) ve sulu (3.02 ± 0.02 mg K/ g karayemiş) ekstraktlarındaki toplam flavonoid içeriğinden daha fazla bulundu. Asit ilave edilerek hazırlanan ekstraktlardan, DMSO'lu ekstraktın toplam flavonoid içeriği (17.26 ± 1.06 mg K/ g karayemiş), etanollü (3.85 ± 0.13 mg K/ g karayemiş) ve sulu (3.03 ± 0.01 mg K/ g karayemiş) ekstraktlardaki toplam flavonoid içeriğinden daha fazlaydı. Normal ekstraktlarda en az toplam flavonoid içerik etanollü ekstraktlarda görülürken, asit ilave edilmiş ekstraktlarda sulu ekstraktlarda görülmüştür. Karayemişin asit ilave edilerek hazırlanan etanollü ve DMSO'lu ekstraktlarındaki toplam flavonoid içerik, asit ilave edilmeden hazırlanan etanollü ve DMSO'lu ekstraktlarındaki toplam flavonoid içeriğinin 3 katı olarak hesaplandı (etanol için $p=0.001$, DMSO için $p=0.002$). Fakat karayemişin sulu ekstraktları ile asit ilave edilerek hazırlanan sulu ekstraktları arasında toplam flavonoid içeriği bakımından anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.678$). Ekstraktlarda toplam flavonoid içerik tayini sonuçları Şekil 9'da verilmiştir.

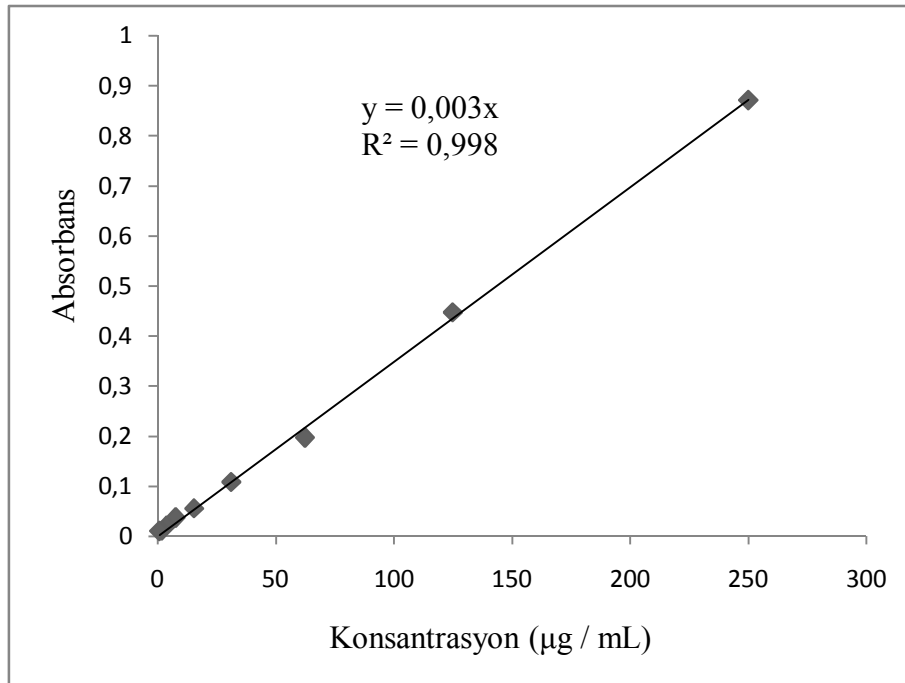


Şekil 9. Karayemişin sulu, etanollü, DMSO'lu ve bu çözücülerin asit ilave edilmiş ekstraktlarındaki toplam flavonoid içerik ($X \pm SD$ mg K / g karayemiş)

6.3. Antioksidan Aktivitelerin Belirlenmesi Sonuçları

6.3.1. Demir (Fe^{+3}) İndirgeyici Güç Tayini (FRAP) Sonuçları

Bu metoda göre test edilen örneğin indirgenme gücüne bağlı olarak test çözeltisinin rengi sarıdan yeşile döner. Oluşan yeşil renk 700 nm’de maksimum absorbands verir ve artan absorbands artan indirgeme kuvvetini gösterir. Bu metoda göre standart olarak vitamin C kullanılmıştır. Sonuçlar vitamin C standart grafiğinden yararlanılarak $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplandı. mg vitamin C / g karayemiş şekline Denklem 3’de verilen formülle dönüştürüldü. Standart grafiğindeki x-ekseni konsantrasyon, y-ekseni ise absorbands değerlerini gösterir. Her örnek üç kere tekrarlandı ($n=3$). Vitamin C için standart grafik Şekil 10’da gösterilmiştir.



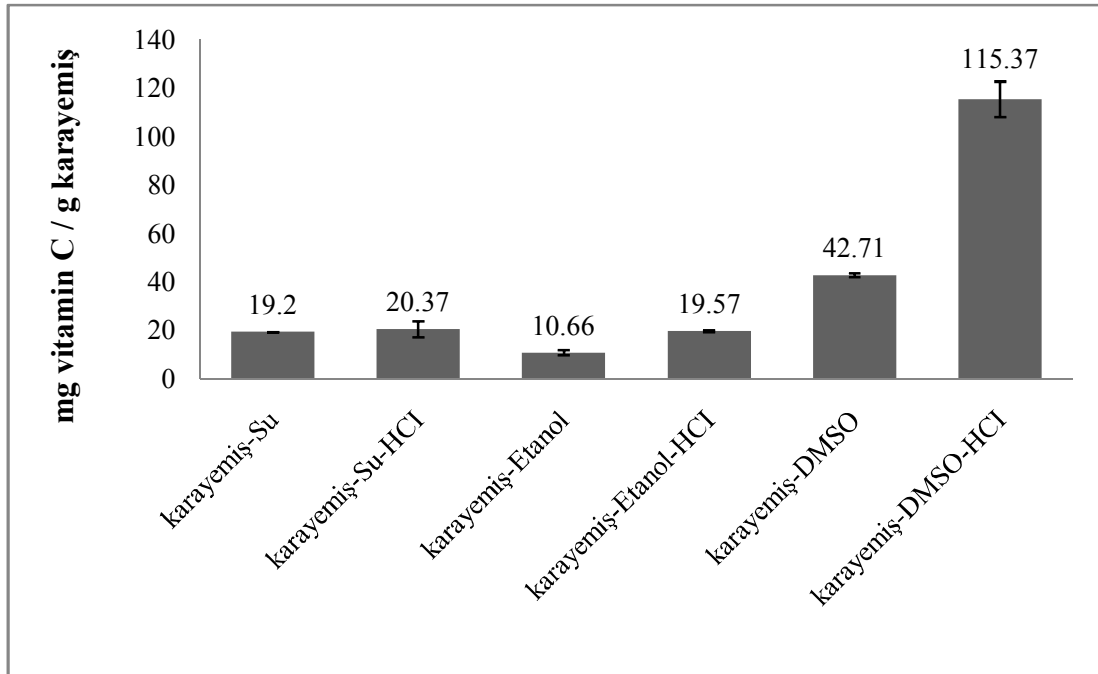
Şekil 10. Demir (Fe^{+3}) indirgeyici güç tayini için vitamin C standart grafiği

Net absorbans = Ortalama absorbans – Kör absorbansı

$$\frac{\text{Net absorbans}}{\text{Standart grafiğindeki } x \text{'in katsayısı}} \times \frac{\text{Dilüsyon katsayısı (100)}}{50} \quad \text{Denklem 3}$$

Denklem 1, 2 ve 3'deki 50 rakamı çalışmamızda kullanılan 50 mg/ml'lik karayemiş ekstraktından dolayıdır.

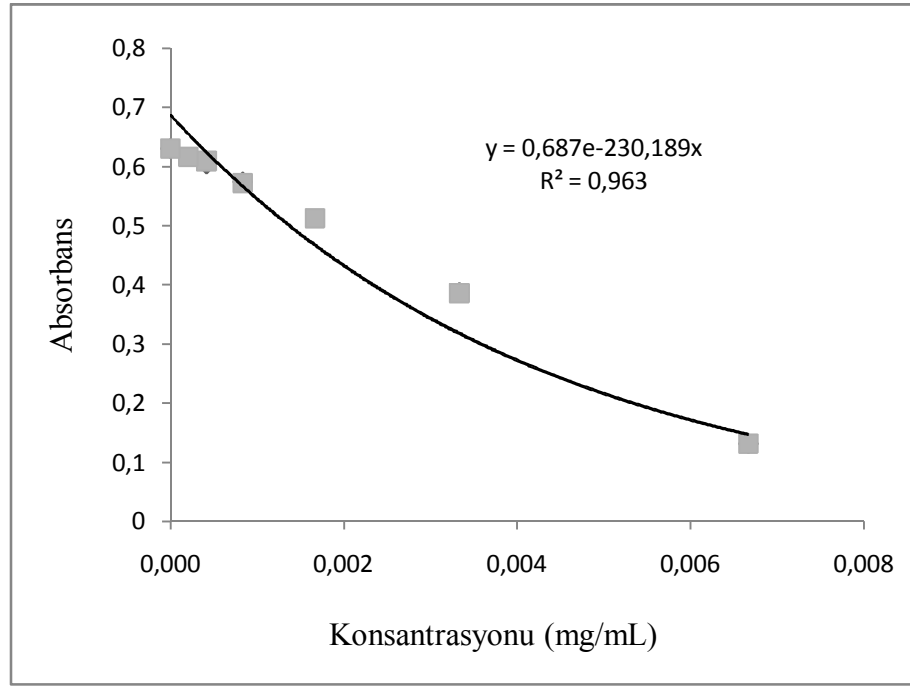
Karayemişin DMSO'lu ekstraktının demir indirgeyici gücü (42.71 ± 0.83 mg vit C / g karayemiş) etanollü (10.66 ± 1.00 mg vit C / g karayemiş) ve sulu (19.20 ± 0.06 mg vit C / g karayemiş) ekstraktlarındaki demir indirgeyici güçten daha yüksek bulundu. Asit ilave edilerek hazırlanan ekstraktlardan, DMSO'lu ekstraktın demir indirgeyici gücü (115.37 ± 7.37 mg vit C / g karayemiş), etanollü (19.57 ± 0.39 mg vit C / g karayemiş) ve sulu (20.37 ± 3.27 mg vit C / g karayemiş) ekstraktlardaki demir indirgeyici güçten daha yüksekti. Normal ekstraktlarda en az demir indirgeyici güç etanollü ekstraktlarda görülürken, asit ilave edilmiş ekstraktlarda sulu ekstraktlarda görülmüştür. Karayemişin asit ilave edilerek hazırlanan etanollü ve DMSO'lu ekstraktlarındaki demir indirgeyici güç, asit ilave edilmeden hazırlanan etanollü ve DMSO'lu ekstraktlarındaki demir indirgeyici gücün 2 katı olarak hesaplandı (etanol için $p=0.002$, DMSO için $p=0.003$). Fakat karayemişin sulu ekstraktları ile asit ilave edilerek hazırlanan sulu ekstraktları arasında demir indirgeyici güç bakımından anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.567$). Ekstraktlarda demir indirgeyici güç tayini sonuçları Şekil 11'de verilmiştir.



Şekil 11. Karayemişin sulu, etanollü, DMSO'lu ve bu çözücülerin asit ilave edilmiş ekstraktlarındaki demir (Fe^{+3}) indirgeyici güç ($X \pm \text{SD}$ mg vit C / g karayemiş)

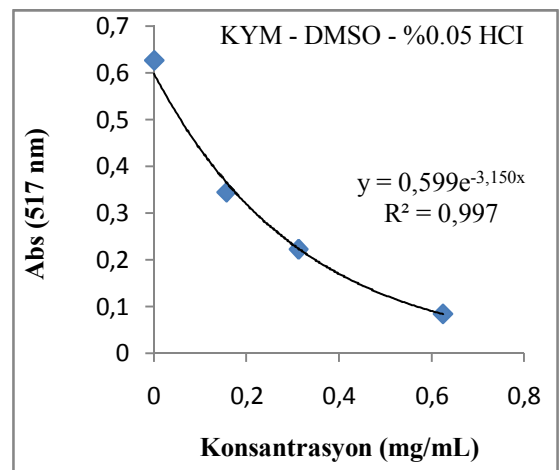
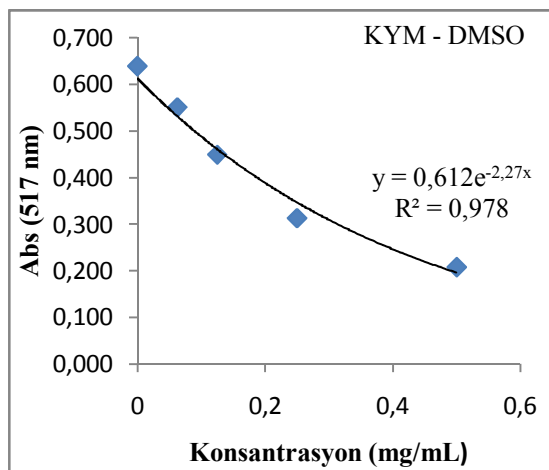
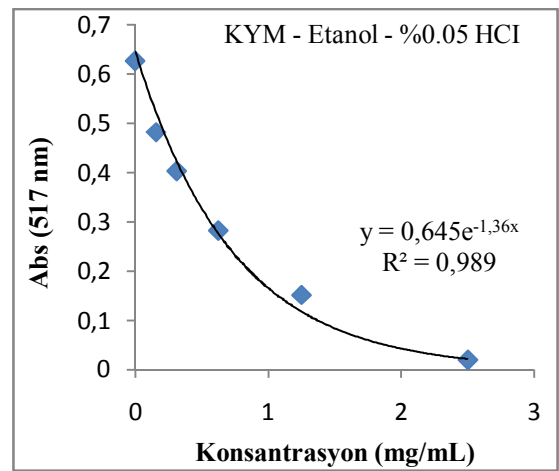
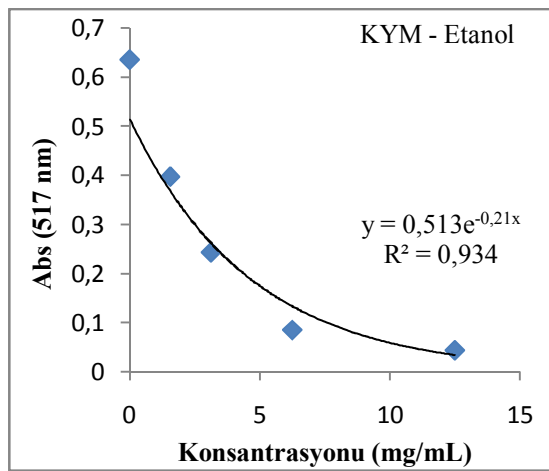
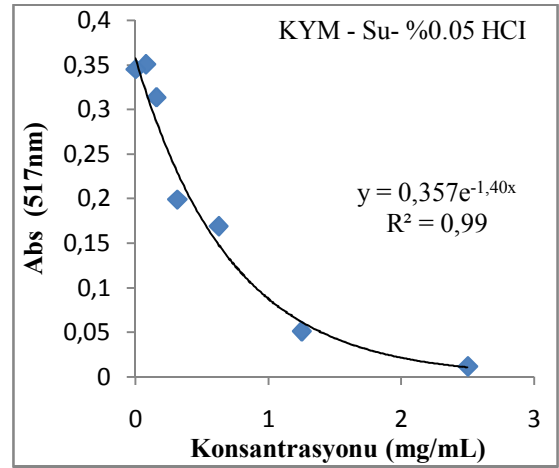
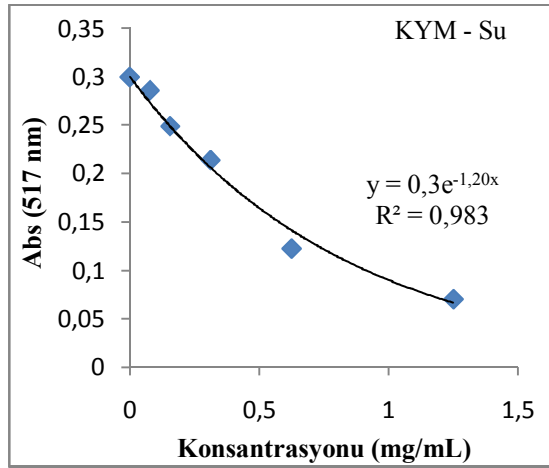
6.3.2. DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesi Sonuçları

Artan numune konsantrasyonuna karşı 517 nm'deki absorbanslar grafiğe geçirilerek elde edilen grafiklerden antioksidan kapasiteler kantitatif olarak ifade edilmiştir. Antioksidan aktivite, numunenin SC₅₀ değeri belirlenerek standartla karşılaştırılmıştır (Şekil 12).

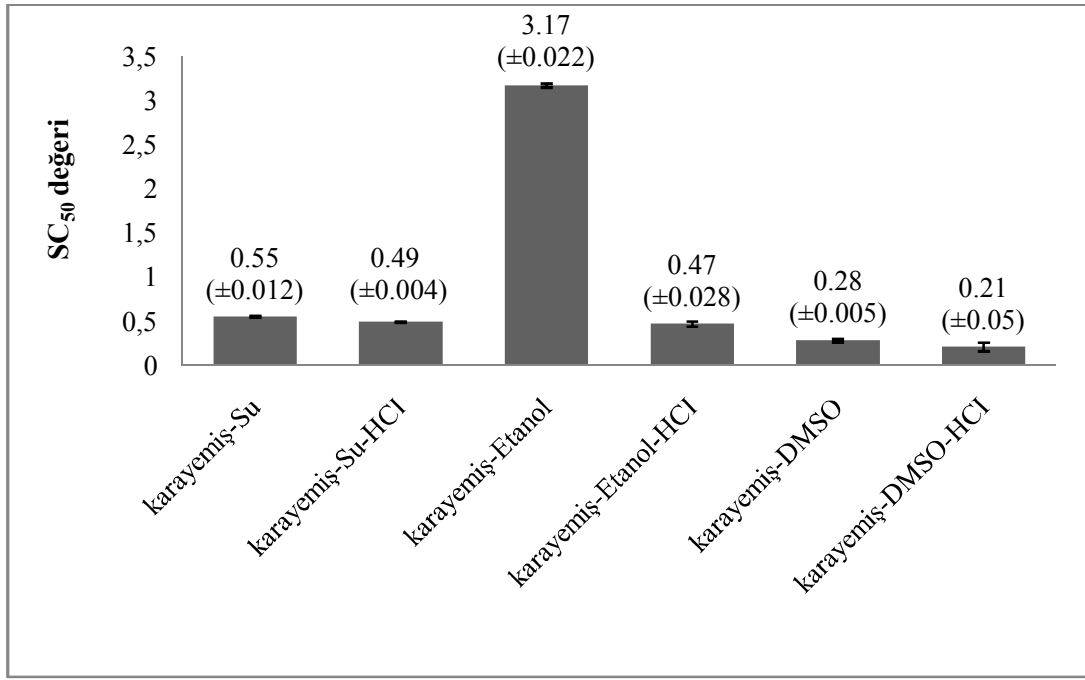


Şekil 12. Vitamin C standart çalışma grafiği

SC₅₀, başlangıç DPPH• radikal konsantrasyonunu (kontrolün absorbansını) yarıya düşüren numune konsantrasyonudur. Sonuçlar mg/mL cinsinden verildi. Standart olarak vitamin C kullanılmıştır. Standardının SC₅₀ değeri 0.003±0.00 bulunmuştur. Karayemiş numunelerine ait numune konsantrasyonu - absorbans grafikleri Şekil 13'de verilmiştir.



Şekil 13. DPPH yöntemine göre, karayemiş meyvesinin bütün ekstraktlarına ait Numune konsantrasyonu - absorbans grafikleri (KYM = karayemiş)



Şekil.14. Karayemiş meyvesinin bütün ekstraktlarının 517 nm’deki DPPH• radikali temizleme aktivitesi analizi sonucu (SC₅₀±SD mg/mL)

DPPH• radikali temizleme aktivitesi yönteminde sonuçlar SC₅₀ değeri (radikali yarıya indiren numune konsantrasyonu) olarak verildi. SC₅₀ değerinin düşük olması antioksidan aktivitenin yüksek olduğunu göstermektedir. Karayemişin DMSO’lu ekstraktının DPPH• radikali temizleme aktivitesi (0.282±0.005 mg/mL) etanollü (3.174±0.022 mg/mL) ve sulu (0.55±0.012 mg/mL) ekstraktlarındakinden daha yüksek bulundu. Asit ilave edilerek hazırlanan ekstraktlardan, DMSO’lu ekstraktın DPPH• radikali temizleme aktivitesi (0.213±0.05 mg/mL), etanollü (0.474±0.028 mg/mL) ve sulu (0.49±0.004 mg/mL) ekstraktlardaki DPPH• radikali temizleme aktivitesinden daha yüksekti. Normal ekstraktlarda en az DPPH• radikali temizleme aktivitesi etanollü ekstraktlarda görülürken, asit ilave edilmiş ekstraktlarda ise sulu ekstraktlarda görülmüştür. Karayemişin sulu ekstraktları ile asit ilave edilerek hazırlanan sulu ekstraktları arasında DPPH• radikali temizleme aktivitesi bakımından anlamlı bir fark bulunamadı. Ekstraktlarda DPPH• radikali temizleme aktivitesi tayini sonuçları Şekil 14’de verilmiştir.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Karayemiş, Karadeniz Bölgesi'nde yetişen yaprak dökmeyen küçük bir ağaç türüdür. Karayemiş meyveleri, çekirdekli, sulu olup meyve eti açık pembe veya krem rengindedir. Olgunlaşan meyveler kırmızı veya koyu mor renktedirler (3, 4, 5).

Karayemiş bitkisinin faydalandığı kısımları yaprağı, çekirdeği ve meyvesidir. Meyveler taze olarak tüketilebileceği gibi kurutularak da tüketilmektedir. Güçlü antioksidan özelliği sayesinde birçok hastalığın oluşumunun ve gelişmesinin önlenmesinde faydası olduğu görülmüştür. Karayemiş meyvelerinin halk arasında mide ülseri ve bağırsak tembelliği başta olmak üzere, sindirim sistemi hastalıkları, idrar rahatsızlıkları, egzama, Alzheimer, şeker hastalığı, doku ve cilt bozuklukları, bronşit ve kanser gibi bazı hastalıkların tedavisine iyi geldiği bilinmektedir (2, 10).

Kolaylı ve ark. Karayemişin taze meyvesini kimyasal olarak incelenmiş ve yapısında su, pektin, askorbik asit, bol miktarda protein ve karbohidrat yanında çeşitli fenolik bileşenler ve mineraller içerdiğini belirlemiştir. Mineraller bakımından önemli oranda potasyum, magnezyum, kalsiyum, sodyum, manganez ve eser miktarda bakır, çinko ve demir içerdiğini gözlemlemiştir. Karayemişin besin değeri yüksek bir meyve olmasının yanında antioksidan maddelerce zengin olduğu belirtilmiştir. Toplam fenolik içeriğinin radikal yakalama kapasitesi, bazı referans bileşiklerden (askorbik asit gibi) daha fazla olduğu görülmüştür (4).

Ülkemizde şu ana kadar yapılan morfolojik ve sitolojik karakterizasyon çalışmalarında, karayemişin hem morfolojik hem de sitolojik olarak, meyve ve yaprak içerikleri bakımından farklılıklar gösterdiği 'Oxygemmis', 'Globigemmis' ve 'Angustifolia' olmak üzere üç kültür formu tespit edilmiştir (6).

Ayaz ve ark. karayemişin yabani formunda ve kültürlerinde (Oxygemmis, Globigemmis, Angustifolia) GC-MS ile bazı fenolik asitler, yağ asitleri ve şeker kompozisyonu araştırmış ve tüm tiplerde vanilik asit ve linoleik asitin baskın olduğu görülmüştür (6, 7). Olgun karayemiş meyvesinin etanol ve sulu ekstraktlarında, bazı düşük molekül ağırlıklı karbohidratları gaz kromatografisi ile belirlemiştir. Fruktoz ve glukoz, yüksek oranda olmak üzere sorbitol ve sakkaroz saptamıştır. Mannitol varlığı da araştırılmış fakat bulunamamıştır (139).

Alasalvar ve ark. ise şeker kompozisyonu bakımından glukoz, fruktoz ve sorbitol yanında ksiloz ve arabinoz varlığını bildirmişlerdir. Ayrıca pekmezde az miktarda sakkaroz varlığı da gözlenmiştir. Ayrıca yapılan bu çalışmada iki doğal karayemiş tipi ve bunlardan

elde edilen pekmezin bileşimi ve bu bileşimin antioksidan aktiviteye etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda bazı hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asitler belirlenmiştir. Asit ve alkali hidrolizi sonucunda da fenolik asitler saptanmıştır. Hidroksisinnamik asit türevlerinin serbest ve alkali hidrolizde, hidroksibenzoik asit ve türevlerinin ise asit hidrolizde baskın oldukları bildirilmiştir (9).

Ayaz ve ark. Oxygemmis karayemişin meyvelerinin olgunlaşması esnasında fenolik asit içeriğindeki değişimleri incelemiştir. Meyvede p-kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit, benzoik asit, 4-hidroksibenzoik asit, vanilik asit ve 3,4 hidroksibenzoik asit miktarına bakmıştır. Çiçeklenmeden 40 gün sonra başlayan çalışmada yüksek değer gösteren fenolik asitler, benzoik, kafeik ve vanilik asit olarak görülmüştür (140).

Karayemiş meyvesi organik asit bakımından incelendiğinde malik asitin baskın olduğu bunu sırasıyla quinic, sitrik ve fumarik asitin izlediği görülmüştür. Meyvenin fenolik asit kompozisyonu incelendiğinde, klorojenik asitin baskın olmasıyla beraber ayrıca hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asitler de saptanmıştır. Karayemişin HPLC/MS/MS ile flavonoid analizi yapıldığında fenoliklerin yaklaşık % 24-32 oranını antosiyaninlerin oluşturulduğu görülmüştür. Bu bakımdan karayemiş zengin bir antosiyanin kaynağıdır (2, 8, 9). Ayrıca flavonoidlerin alt grubu olan kateşinlerin, yüksek antioksidan etkileri ile serbest radikalleri yok ederek, sağlık üzerinde çok sayıda yararının olduğu belirtilmiştir (30, 31).

Literatürde, karayemiş bitkisinin asit ilavesiyle antioksidan kapasitenin değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanılmamakla birlikte, bitkilerin yapılarındaki fenolik bileşiklerin aglikon ve glikozit formları arasında antioksidan kapasiteleri ve fenolik bileşik içeriklerinin karşılaştırıldığı çeşitli çalışmalar mevcuttur.

Yean-Yean Soong ve ark. mango çekirdeklerinin hidroliz ve hidrolizsiz metanollü ekstraktlarında gallik ve ellagik asit miktarlarına bakmıştır. İlk olarak dondurulmuş mango çekirdekleri tartılmış ve tartılan çekirdekler üzerine metanol ilave edildikten sonra 70 °C 1 saat bekletilmiştir. Bu şekilde 3 tane hazırlanan ekstraksiyondan ilk ikisine HCl ilave edilmiştir. HCl ilave edilen iki ekstraksiyonun bir tanesi 35 °C 16 saat diğeri ise 85 °C 'de 2 saat bekletilerek hidroliz edilmiştir. Kalan 3 ekstraksiyon örneği ise, mango çekirdeklerinin çözücü ilave edilmeden önce 160 °C 'de ısıtılıp daha sonra bu ısıtılmış mango çekirdeklerine metanol ilave edilerek yine 70 °C 'de 1 saat bekletilerek hazırlanmıştır. Bu üç örnekten ilk iki tanesine yukarıdaki işlemler aynen uygulanarak toplamda 6 farklı ekstrakt hazırlanmıştır. Hazırlanan bu ekstraktlarda gallik asit miktarına bakıldığında donmuş (163 mg/100 g çekirdek) ve ısıtılmış (838 mg/100 çekirdek) mango çekirdekleriyle hazırlanan ekstraktlarda

en yüksek miktarın hidroliz edilmiş örneklerden 85 °C'de 2 saat bekletilmiş ekstraktta olduğu görülmüştür. Ellagik asit miktarına bakıldığında ise donmuş (6.2 mg/100 g çekirdek) ve önceden ısıtılmış (74.5 mg/100 çekirdek) mango çekirdekleriyle hazırlanan ekstraktlarda da en yüksek miktarın hidroliz edilmiş örneklerden 85 °C'de 2 saat bekletilmiş ekstraktta görülmüştür. Bu çalışmada ayrıca mango çekirdeklerinin antioksidan kapasitesi araştırılmış ve sonuçlar gallik ve ellagik asit içeriği ile benzerlik göstermiştir. Donmuş mango çekirdekleri ile hazırlanan ekstraktlarda en yüksek antioksidan kapasite hidroliz edilmiş örneklerden 85 °C 'de 2 saat bekletilmiş ekstraktta ($713 \pm 74.9 \mu\text{mol g}^{-1}$) görülürken en düşük kapasite hidroliz edilmemiş ekstraktta ($575 \pm 23.5 \mu\text{mol g}^{-1}$) görülmüştür. Bu karşılaştırma önceden ısıtılarak hazırlanan mango çekirdekleriyle yapıldığında ise en yüksek kapasite hidroliz edilmiş örneklerden 85 °C 'de 2 saat bekletilmiş ekstraktta ($1496 \pm 190 \mu\text{mol g}^{-1}$) görülürken en düşük kapasite hidroliz edilmemiş ekstraktta ($1130 \pm 216.0 \mu\text{mol g}^{-1}$) görülmüştür (141).

Draženka ve ark. tıbbi bitkiler (zeytin yaprakları, ısırgan otu, lavanta, böğürtlen yaprakları, kekik ve limon yağı) olarak adlandırılan 6 ayrı bitkinin fenolik bileşik içeriklerine ve antioksidan kapasitelerine, hidrolizin ve ekstraksiyon zamanının etkisi araştırmıştır. Öncelikle bitkilerin hidrolizsiz ekstraksiyonlarını hazırlamak için her bir bitkinin üzerine kaynamış su dökülerek 5 ve 15 dakika bekletilmiştir. Hidrolizli ekstraksiyonları hazırlamak için ise her bir bitki, etanol ve HCl'de çözünerek 95 °C'de 2 saat bekletilmiştir. Sonuç olarak 6 bitki çeşidinde de en yüksek toplam polifenol ve toplam flavonoid içerik hidroliz edilmiş örneklerde görülmüştür. Hem 5 dakika hem de 15 dakika bekletilmiş hidroliz edilmemiş ekstraktlarda en yüksek toplam polifenol içerik limon yağında (5 dakika: 791.33 mg GAE/L, 15 dakika: 929.33 mg GAE/L) görülürken, en düşük içerik zeytin yapraklarında (5 dakika: 88.67 mg GAE/L ve 15 dakika= 182.67 mg GAE/L) görülmüştür. Bu sonuçlara bakılarak uzun ekstraksiyon zamanının toplam polifenol içeriği olumlu derecede etkilediği sonucuna varılmıştır. Hidroliz edilmiş örneklerde ise en yüksek toplam polifenol içerik böğürtlen yapraklarında görülürken (2160.00 mg GAE/L), en düşük içerik ısırgan otunda (566.67 mg GAE/L) görülmüştür. Toplam flavonoid içeriğine bakıldığında, hem 5 dakika hem de 15 dakika bekletilmiş hidroliz edilmemiş ekstraktlarda en düşük içerik zeytin yapraklarında görülmüştür. Hidroliz edilmiş örneklerde ise en yüksek toplam flavonoid içeriğin böğürtlen yapraklarında (946.67 mg GAE/L) olduğu görülmüştür.

Çalışmada spektrofotometrik metotla her iki ekstrakt çeşidinde de tanen ve flavan-3-ol (vanilin ve *p*-dimethylamminocinnamaldehyde (*p*-DAC) içeriğine bakılmıştır.

Zeytin yapraklarında (4.65 ± 0.77 mg (+)-catechin/L), ısırgan otu yapraklarında (8.53 ± 1.78 mg (+)-catechin/L) ve lavanta bitkisinde (4.94 ± 0.29 mg (+)-catechin/L) vanilin miktarı, hidroliz edilmiş ekstraktlarda, hidroliz edilmemiş ekstraktlardakinden daha fazla miktarda bulunmuştur. Üç bitki çeşidinde de hidroliz edilmemiş her iki ekstrakta da p-DAC saptanamazken, hidroliz edildikten sonra saptanmıştır. Ayrıca bu üç bitkinin tanen içeriğine bakıldığında hidroliz edilmiş ekstraktlarda en yüksek miktarda saptanmıştır.

Böğürtlen yaprakları, kekik ve limon yağında tanen, vanilin ve p-DAC içeriklerine bakıldığında her üç bitkinin de hidroliz edilmiş ve hidroliz edilmemiş bütün ekstrakt içeriklerinde bu maddeler saptanmıştır. Üç bitki çeşidinde de, bu maddelerin en yüksek içeriği hidroliz edilmiş ekstraktlarda belirlenmiştir. Hidroliz edilmiş ekstraktlarda en yüksek flavan-3-ol içeriğe kekik (4.35 ± 0.27 mg (+)-catechin/L) bitkisinde olduğu belirlenirken, en yüksek tanen miktarının ise böğürtlen yapraklarında (%16.31) olduğu belirlenmiştir.

Altı çeşit bitkide yine bu çalışmada rosmarinik, klorojenik, kafeik, p- kumarik, ferulik, t-sinamik asit gibi fenolik asit içeriklerine bakılmıştır. Ayrıca bu analizlere ek olarak bitkilerdeki flavon (luteolin) ve flavonol (kaemferol, mirisetin, kuersetin, izoramnetin) miktarlarına da bakılmıştır.

Zeytin yapraklarında, hidroliz edilmiş ve hidroliz edilmemiş her iki ekstrakta da ferulik ve kumarik asit belirlenmiştir. Ferulik asit (6.76 ± 0.03 mg/L) ve kumarik (1.72 ± 0.06 mg/L) asit içeriği hidroliz edilmiş zeytin yapraklarında hidroliz edilmemiş ekstraktlardan daha yüksek çıkmıştır. Bu değerlere ilaveten zeytin yaprakların, bir flavon çeşidi olan luteolin miktarı (37.67 ± 1.75 mg/L) hidroliz edilmiş örneklerde, hidroliz edilmemiş ekstraktlardan daha yüksek bulunmuştur

Isırgan otunda, klorojenik, p-kumarik ve ferulik asitin en yüksek içeriği hidroliz edilmiş ekstraktlarda görülmüştür. Kafeik asit (8.64 ± 0.85 mg/L) ve İzoramnetin (0.22 ± 0.03 mg/L) hidroliz edilmemiş ekstraktlarda bulunmazken, hidroliz sonucunda görülmüştür.

Lavanta bitkisinde rosmarinik (4.04 ± 0.06 mg/L) ve ferulik asit (8.41 ± 0.79 mg/L) hidroliz edilmiş ekstraktlarda, en yüksek içerikte saptanmıştır. Kafeik asit (1.02 ± 0.31 mg/L) ve Luteolin (1.64 ± 0.24 mg/L) hidroliz edilmemiş ekstraktlarda belirlenemezken, hidroliz edilmiş ekstraktlarda belirlenmiştir.

Böğürtlen yapraklarında ferulik asit (1.32 ± 0.28 mg/L) hidroliz edilmemiş ekstraktlarda belirlenemezken, hidroliz edilmiş ekstraktlarda belirlenmiştir. Hidroliz edilmiş ekstrakttaki p-kumarik asit içeriği (8.67 ± 0.35 mg/L) 5 dakika ve 15 dakika bekletilmiş

hidroliz edilmemiş ekstraktlardan daha fazla bulunmuştur. Luteolin ve kaemferol hidroliz edilmemiş ekstraktlarda belirlenemezken, hidroliz sonucunda belirlenmiştir.

Kekik bitkisinde, rosamirik, klorojenik, kafeik asit ve luteolin hidroliz edilmiş ekstraktlarda, daha yüksek miktarda bulunmuştur. Hidroliz edilmemiş ekstraktlarda p-kumarik asit (1.45 ± 0.07 mg/L) ve Kuersetin (8.99 ± 0.67 mg/L) belirlenemezken, hidroliz edilmiş ekstraktlarda belirlenmiştir.

Limon yağında ise, hidroliz edilmiş ekstraktlardaki rosamirik ve kafeik asit miktarı hidroliz edilmemiş ekstraktlara göre daha yüksek bulunmuştur. Limon yağının flavonoid içeriğine bakıldığında ise diğer bitkilerden farklı olarak, luteolin miktarının 15 dakika (1.21 ± 0.20 mg/L) bekletilmiş hidroliz edilmemiş ekstraktlarında, hidroliz edilmiş ve 5 dakika bekletilmiş hidroliz edilmemiş ekstraktlarından daha yüksek çıkmıştır. Kuersetin (0.45 ± 0.01 mg/L) ise hidroliz edilmemiş ekstraktlarda belirlenmezken, hidroliz sonucunda belirlenmiştir.

Bu sonuçlardan yola çıkarak altı farklı bitkide de toplam fenolik asit miktarı hidroliz edilmiş örneklerde daha yüksek miktarda bulunmuştur. Limon yağı dışında kalan bütün bitki çeşitlerinde de hidroliz sonucunda flavonoid miktarları yüksek çıkmıştır. Ayrıca bazı maddeler hidroliz edilmemiş ekstraktlarda belirlenemezken, hidroliz sonucunda belirlenmiştir.

Bu çalışmada bu bitkilerin FRAP ve ABTS olmak üzere iki farklı metotla da antioksidan kapasiteleri araştırılmıştır.

ABTS radikal temizleme aktivitesi sonuçlarına göre, lavanta ve kekik bitkisinin hidroliz edilmeyen ekstraksiyonlarında 5 ya da 15 dakika bekletmenin radikal temizleme aktivitesi bakımından herhangi bir farklılık göstermezken, kalan dört bitkide 15 dakika bekletilerek hazırlanan hidroliz edilmeyen ekstraksiyonlarda radikal temizleme aktivitesinin daha etkili olduğu görülmüştür. Hidroliz edilen ekstraktlarda ise ABTS radikali temizleme aktivitesi en iyi limon yağında (7.01 mM Troloks) görülürken, en düşük aktivite kekik (1.82 mM Troloks) bitkisinde görülmüştür. Böğürtlen yaprakları hariç bütün bitkilerin hidroliz edilmiş ekstraktlarındaki ABTS radikal temizleme aktivitesi en yüksek olarak bulunurken, böğürtlen bitkisinde hidroliz sonucunda radikal temizleme aktivitesi düşmüştür.

Yapılan çalışmadaki FRAP sonuçlarına göre, 5 dakika bekletilmiş ekstraktlarda en yüksek antioksidan aktivite limon yağında (11.76 mM Troloks) görülürken, en düşük aktivite ısırgan otunda (1.34 mM Troloks) görülmüştür. 15 dakika bekletilmiş ekstraktlardaki en yüksek antioksidan aktivite yine limon yağında görülürken (11.03 mM Troloks), en düşük

aktivite zeytin yapraklarında (1.06 mM Troloks) görülmüştür. Bütün bitki çeşitlerinde hidroliz sonucunda antioksidan aktivite kapasitesi artmıştır (142).

Ismaila Muhammad ve ark. tarafından kahverengi pirinç bitkisinin metanolde hazırlanan ekstraktına HCl ve NaOH ilave edilerek, bu bitkinin normal, asidik ve bazik ekstraksiyonları hazırlanmıştır. Bu üç ekstraksiyonun toplam polifenol, toplam flavonoid miktarları ve ayrıca ABTS, FRAP ve DPPH metotları ile antioksidan kapasitesi belirlenerek karşılaştırılması yapılmıştır. Sonuç olarak toplam polifenol ve toplam flavonoid içerik bakımından en yüksek içeriğin asidik ekstraksiyonda olduğu belirlenmiştir. DPPH radikal temizleme aktivitesinde de en yüksek etkinlik asidik ekstraksiyonda görülmüştür. Buna karşılık ABTS radikal temizleme aktivitesi ve FRAP metodu sonucunda ise en yüksek antioksidan aktivite bazik ekstraksiyonda görülmüştür. Bu araştırmada ayrıca bazı fenolik bileşikler (gallik, hidroksisinnamik, klorojenik, kafeik, vanilik, siringik, protokateşik, p-kumarik ve ferulik asit) HPLC-UV ile analiz edilmiştir. Bu sonuçlara göre vanilik asit ($3.319 \pm 0.53 \mu\text{g/g}$) sadece asitle hidroliz edilmiş ekstraksiyonda görülmüştür. Ferulik asit ise bazla hidroliz edilmiş ekstraksiyonda görülmezken, asitle hidroliz edilmiş ekstraksiyondaki miktarı ($13.212 \pm 0.82 \mu\text{g/g}$) hidroliz edilmemiş ekstraksiyona ($7.96 \pm 0.662 \mu\text{g/g}$) göre daha yüksek çıkmıştır. Gallik asit hidroliz edilmemiş ekstraksiyonda görülmemişken, bazikle hidroliz edilmiş ekstraksiyonundaki miktarı ($13.822 \pm 1.88 \mu\text{g/g}$), asitle hidroliz edilmiş ekstraksiyonundan ($9.516 \pm 0.412 \mu\text{g/g}$) daha yüksek çıkmıştır. Hidroksisinnamik, kafeik, siringik, protokateşik asit sadece baz ile hidroliz edilmiş ekstraksiyonunda görülmüştür. Klorojenik asit hiçbir ekstraksiyon çeşidinde görülmemiştir. Son olarak p-kumarik asit ($9.122 \pm 0.94 \mu\text{g/g}$) bütün ekstraksiyon çeşitlerinde görülürken, en yüksek miktarı baz ile hidroliz edilmiş ekstraksiyonda görülmüştür (143).

Yukarıda bahsedilen çalışmalardan elde edilen ortak sonuç, asit ilave edilmiş ekstraktlarda toplam polifenol ve flavonoid içerikle birlikte antioksidan kapasitenin de asit ilave edilmemiş ekstraktlara göre daha yüksek olduğu ortaya çıkmıştır. Bizim çalışmamızda da asit ilave edilmiş ekstraktlardan elde edilen bulgular bu çalışmalarla uyumlu bulunmuştur.

Yapılan birçok in vitro çalışma sonucunda karayemiş meyvesinin, yapısında bulunan çeşitli fenolik bileşikler sayesinde, yüksek oranda antioksidan etkisi olduğunu görülmüştür. Bu çalışmada zengin polifenol kaynağı olarak bilinen ve ülkemizde Karadeniz bölgesinde yetişen, çekirdeği çıkarılmış kuru karayemiş meyvesinin sulu, etanollü ve DMSO'lu ekstraktlarına HCl ilave ederek hidroliz edilmiş ve edilmemiş ekstraktları arasındaki

antioksidan kapasitesi, toplam fenolik içerik, toplam flavonoid içerik, demir indirgeyici güç ve DPPH• radikali temizleme aktivitesi bakımından belirlenmiştir.

Toplam fenolik madde miktarı tayin yönteminde; normal ekstraktlarda ve asit ilave edilmiş ekstraktların her ikisinde de en fazla polifenol içerik DMSO'lu ekstraktında, görülmüştür. Normal ekstraktlarda en az toplam polifenol içerik etanollü ekstraktlarda görülürken, asit ilave edilmiş ekstraktlarda sulu ekstraktlarda görülmüştür. Karayemişin asit ilave edilerek hazırlanan etanollü ve DMSO'lu ekstraktlarındaki toplam polifenol içerik, asit ilave edilmeden hazırlanan etanollü ve DMSO'lu ekstraktlarındaki toplam polifenol içeriğinin 2 katı olarak hesaplandı. Fakat karayemişin sulu ekstraktları ile asit ilave edilerek hazırlanan sulu ekstraktları arasında toplam polifenol içeriği bakımından anlamlı bir fark bulunamadı.

Toplam flavonoid madde miktarı tayin yönteminde; fenolik madde miktarı tayinine benzer sonuçlar elde edilmiştir. Normal ekstraktlarda ve asit ilave edilmiş ekstraktların her ikisinde de en fazla flavonoid içerik DMSO'lu ekstraktında görülmüştür. Normal ekstraktlarda en az toplam flavonoid içerik etanollü ekstraktlarda görülürken, asit ilave edilmiş ekstraktlarda sulu ekstraktlarda görülmüştür. Karayemişin hidroliz edilmiş etanollü ve DMSO'lu ekstraktlarındaki toplam flavonoid içerik, hidroliz edilmeden hazırlanan etanollü ve DMSO'lu ekstraktlarındaki toplam flavonoid içeriğinin 3 katı olarak hesaplandı. Fakat karayemişin sulu ekstraktları ile asit ilave edilerek hazırlanan sulu ekstraktları arasında toplam flavonoid içeriği bakımından anlamlı bir fark bulunamadı.

Demir (III) indirgenme / antioksidan aktivite kuvveti (FRAP) yöntemine göre, en yüksek antioksidan aktivite, normal ekstraktlarda ve asit ilave edilmiş ekstraktların her ikisinde de klasik yöntemler de olduğu gibi, DMSO'lu ekstraktında görülmüştür. Normal ekstraktlarda en az demir indirgeyici güç etanollü ekstraktlarda görülürken, asit ilave edilmiş ekstraktlardan sulu ekstraktlarda görülmüştür. Karayemişin asit ilave edilerek hazırlanan etanollü ve DMSO'lu ekstraktlarındaki demir indirgeyici güç, asit ilavesi yapılmadan hazırlanan etanollü ve DMSO'lu ekstraktlarındaki demir indirgeyici gücün 2 katı olarak hesaplandı. Fakat karayemişin sulu ekstraktları ile asit ilave edilerek hazırlanan sulu ekstraktları arasında demir indirgeyici güç bakımından anlamlı bir fark bulunamadı.

Son olarak kullanılan DPPH• radikali temizleme aktivitesi yönteminde ise, en yüksek antioksidan aktivite, normal ekstraktlarda ve asit ilave edilmiş ekstraktların her ikisinde de klasik yöntemler olduğu gibi, DMSO'lu ekstraktında görülmüştür. Normal ekstraktlarda en az DPPH• radikali temizleme aktivitesi etanollü ekstraktlarda görülürken, asit ilave edilmiş ekstraktlarda sulu ekstraktlarda görülmüştür. Karayemişin sulu ekstraktları ile asit ilave

edilerek hazırlanan sulu ekstraktları arasında DPPH• radikali temizleme aktivitesi bakımından anlamlı bir fark bulunamadı.

Trabzon merkezinden toplanan karayemişin DMSO'lu etanollü ve sulu ekstraktlarında toplam polifenol, toplam flavonoid, demir (Fe^{+3}) indirgeyici güç ve DPPH• radikali temizleme aktivitesi tayinleri yapıldı. Aynı tayinler asit ilave edilerek hazırlanan DMSO'lu etanollü ve sulu ekstraktlarda da yapıldı. Ekstraktların antioksidan potansiyeli, polifenol ve flavonoid içerikleri ile orantılı olarak bulundu.

Çalışma sonucunda karayemiş ekstraktlarının toplam polifenol, toplam flavonoid, demir (Fe^{+3}) indirgeyici güç ve DPPH• radikali temizleme aktivitesi tayinlerinden yola çıkarak normal ekstraktlarda hangi çözücüde en iyi çözüldüğü konusunda bir sıralama yapıldığında; en iyi DMSO'da daha sonra su ve son olarak da etanolde çözüldüğü belirlendi. Asit ilave edilerek hazırlanan ekstraktlarda da en iyi çözünmenin DMSO'da daha sonra etanolde ve son olarak da suda gerçekleştiği belirlendi. DMSO'lu ve etanollü ekstraktlarda asit ilavesi sonucunda, antioksidan kapasitenin asit ilave edilmemiş DMSO'lu ve etanollü ekstraktlara göre anlamlı derecede arttığı görülmüştür. Ama aynı karşılaştırma sulu ekstraktlar için yapıldığında asit ilavesinin bu ekstraktlarda anlamlı bir fark yaratmadığı görülmüştür.

Literatürde kuru karayemiş meyvesinin asit ilavesi ile antioksidan kapasitesinin değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmadığı için, çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar direkt olarak herhangi bir literatür ile karşılaştırılamadı. Bu yönüyle çalışmamız bir ilk çalışma özelliği göstermektedir. Çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan karayemişin bu özellikleri fenolik madde bileşimine bağlanmaktadır.

Yaptığımız çalışmada bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin aglikan ve bunların glikozit kısımları arasındaki toplam polifenol ve flavonoid içerik yanında antioksidan kapasiteleri karşılaştırılmış ve sonuçta çoğunlukla aglikan kısımların daha etkili olduğu görülmüştür. Bu şekilde karayemişin in vitro ortamda su, etanol, DMSO gibi çözücülere asit ilave edilerek elde edilen ekstraktları bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerle in vivo koşullarda yapılacak antioksidan kapasite çalışmalarında kullanılabilir. Ayrıca bu çalışma pek çok farklı çalışmaya yeni bir bakış açısı kazandıran ön çalışma niteliğinde değerlendirilebilir.

8. KAYNAKLAR

1. Özbek S (1978). Genel meyvecilik. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Kitabı No:31, 386
2. İslam A (2005). Karayemiş yetiştiriciliği ve önemi. Ege Karadeniz Dergisi, Yıl: 2, Sayı: 4.
3. İslam A (2002). Cherry laurel (*Prunus Laurocerasus*). New Zeal J Crop Hort 30, 301-302.
4. Kolaylı S, Küçük M, Duran C, Candan F, Dinçer B (2003). Chemical and antioxidant properties of *Laurocerasus officinalis* Roem. (cherry laurel) fruit grown in the Black Sea Region. J Agric Food Chem 51, 7489-7494.
5. Turna İ, Güney D (2006). Karayemiş (*Laurocerasus officinalis* Roemer)'in Genel özellikleri ve odun dışı orman ürünü olarak değerlendirilmesi. 1st International Non Wood Forest Products Symposium, Trabzon.
6. Ayaz FA, Kadioğlu A, Reunanen M, Var M (1997a). Sugar composition in fruits of *Laurocerasus officinalis* Roem. and its three cultivars. J Food Compos and Anal 10, 82-86.
7. Ayaz FA, Kadioğlu A, Reunanen M, Var M (1997b). Phenolic acid and fatty acid composition in the fruits of *Laurocerasus officinalis* Roem. and its cultivars. J Food Compos and Anal 10, 350-357
8. Özbey A (2009). Karayemiş meyvesinin fenolik kompozisyonunun belirlenmesi ve meyve suyu üretiminin optimizasyonu. Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü , Ankara
9. Alasalvar C, Al-Farsi M, Shahidi F (2005). Compositional characteristics and antioxidant components of cherry laurel varieties and pekmez. J Food Sci 70: S47-S52.
10. Karadeniz F, Koca N, Burdurlu HS (2004). Karadeniz Bölgesine özgü bir meyve, Karayemiş, geleneksel gıdalar sempozyumu (23-24 Eylül 2004, Van) kitabı, 284-287.
11. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996). Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Bio & Med, 20, 933-956.

12. Evrenesoğlu Y (2002). Ateş yanıklığına duyarlı ve dayanıklı bazı armutların fenolik ve mineral madde içeriklerinin belirlenmesi üzerine bir araştırma. Doktora tezi, E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, 188s, İzmir.
13. Karaçalı İ (2002). Bahçe ürünlerinin muhafazası ve pazarlanması. Ege Üniv. Ziraat Fakültesi Yayınları No:494, İzmir.
14. Havsteen, BT (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Therapeutics* 96, 67–202.
15. McClure JW (Eds. Cody V. Middleton E. And Harborne JB.) Alan R. Liss (1986). Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical pharmacological and structure-activity relationships. New-York, 77-85.
16. Ercebi HS (2012). Flavonoidlerin yapıları ve onların fizikokimyasal özellikleri. Yüksek Lisans tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon 59s.
17. Kuhnau, J (1976). The Flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. *Wld Rev Nutr Diet* 24, 117-191.
18. Cook, NC, Samman, S (1996). Flavonoids –chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *J Nutr Biochem* 7, 66-76.
19. Aliyazıcıoğlu Y, Değer O, Ovalı E, Barlak Y, Hosver I, Tekelioglu Y, Karahan SC (2005). Effects of turkish pollen and propolis extracts on respiratory burst for K- 562 cell lines. *Intl Immun* 5: 1652-1657.
20. Basaga HS (1990). Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol* 68:989-98.
21. Okur G (2008). Fındık tüketiminin hiperkolesterolemik şahısların eritrosit membranı lipid ve protein oksidasyonuna etkisi. Yüksek Lisans tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon.
22. Vermerris W, Nicholson K (2006). Phenolic compounds and their effects on Human health. Springer Netherlands, 235-255.
23. Akay-Diri H (2006). *Salvia candidissima* Vahl. Uçucu bileşenlerinin karakterizasyonu ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans tezi, Mugla Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Mugla.

24. Merken HM and Beecher GR (2000). Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: A review. J Agric Food Chem 48(3), 577-599.
25. Agrawal AD (2011). Pharmacological activities of flavonoids: a review. Int J Pharm Sci 4 (2): 1394-1398.
26. Shahidi F, Wanasundara P.KJ (1992). Phenolic antioxidants. Crit Rev Food Sci Nutr 32, 67-103
27. MacDougall DB (2002). Colour in food improving quality. Woodhead Publishing Limited. Cambridge, England, 179-221.
28. Aras Ö (2006). Üzüm ve üzüm ürünlerinin toplam karbonhidrat, protein, mineral madde ve fenolik bileşik içeriklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
29. Sandallı C (2002). Karayemiş (*Laurocerasus officinalis* Roem.) bitkisinin RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markırları ile karakterizasyonu. Yüksek Lisans tezi, KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon
30. Chen C, Hoo C (1995). Antioxidant properties of polyphenols extracted from green and black teas. J Food Lipids 2, 35–46.
31. Elbling L, Weiss RM, Teufelhofer O, Uh M, Knasmueller S, Schulte-Hermann R, Berger W, Micksche M (2005). Green tea extract and (-) Epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant, but lack antioxidant activities. The Federation of American Societies for Experimental Biology 19, 807–809.
32. Nizamoğlu NM (2010). Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler; yapıları ve önemleri. Gıda Teknolojileri Dergisi 5: 20-35.
33. Shahidi F, Naczki M (1995). Food phenolics. Technomic Publishing Company Book, Lancaster, USA, 199-225.
34. Chirinos R, Betalleluz-Pallardel I, Huaman A, Arbizu C, Pedreschi R, Campos D (2009). HPLC-DAD characterisation of phenolic compounds from Andean oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) tubers and their contribution to the antioxidant capacity. Food Chem 113: 1243-1251.
35. Demirci (2001). Gıda Kimyası. Trakya Üniversitesi Tekirdağ Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, s.61–78, Tekirdağ.
36. Sroka Z, Cisowski W (2003). Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and antiradical activity of some phenolic acids. Food Chem Toxicol 41, 753-758.

37. Robbins RJ (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. Food Composition Laboratory, Beltsville Human Nutrition Research Center, USA, 10, 2866-2887.
38. Fukumoto LR, Mazza G (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. J Agric Food Chem 48, 3597-3604.
39. Cao G, Sofic E, Prior RL (1997). Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. Free Radical Bio Med 22, 5, 749–760.
40. Cadenas E, Packer L (2002). Handbook of antioxidants, Marcel Dekker, New York-Basel, 0-8247-0547-5.
41. Sefer F (2000). Acı ve tatlı kayısılarda bazı sekonder metabolitlerin düzeylerinin araştırılması. Doktora Tezi, E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir 136s.
42. Saldamlı İ (2007). Gıda Kimyası. Hacettepe Üniversitesi Yayınları. Ankara, 463-492.
43. Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB (1995). The relative activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. Free Radical Res 22, 375-383.
44. Acar J, Gökmen V (2005). Fenolik bileşikler ve doğal renk maddeleri. Gıda Kimyası, ed: Saldamlı, İ. Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Basımevi, Ankara, pp: 463-96.
45. Damodaran, S. Parkin, KL (2008). Fennema's Food Chemistry. O.R. CRC Pres, USA.
46. Hulme, AC (1971). The biochemistry of fruits and their products. A.R.C. Food Research Institute, Norwich, England. Vol.2, 172–205.
47. Cemeroğlu B (2004). Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi. 1. Cilt. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No: 35, Ankara, 77-88.
48. Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL (2006). Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. J Agric Food Chem 54, 4069-4075.
49. Castaneda-Ovando A, de Lourdes Pacheco-Hernández M, Paez-Hernandez ME, Rodriguez JA, Galan-Vidal CA (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review, Food Chem 113, 859–871.
50. Prior RL, Wu X (2006). Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. Free Radical Res 40, 1014–1028.
51. Cheeseman KH, Slater TF (1993). An introduction to free radical biochemistry. Br Med Bull 49:481-93.

52. McCord JM (1993). Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. Clin Biochem 26(5):351-7.
53. Cadenas E (1998). Mechanisms of antioxidant action. In: Tomris Özben, editor. Free radicals, oxidative stress and antioxidants. New York: Plenum Press 237-251.
54. Freeman BA, Crapo JD (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. Lab Invest 47:412-26.
55. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE (1992). Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? J Lab Clin Med 119 (6), 598-6
56. Halliwell B, Gutteridge JMC (2001). Free radicals in biology and medicine. Third Edition, Oxford Science Publications, 22-24.
57. Akkuş İ (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları, Konya
58. Dreher D, Junod AF (1996). Role of oxygen free radicals in cancer development. Eur J Cancer; 32A:30
59. Dündar Y, Aslan R (2000). Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar. I. Basım, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyon.
60. Halliwell B (1996). Antioxidants in human health and disease. Annu Rev Nutr 16, 33-50.
61. Bulkley G.B (1987). Radical-Mediated Reperfusion Injury: A Selective Review. 55; 66-73.
62. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı (1997). Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. Türk Nef Diyaliz ve Transpl Der 3-4;92-95.
63. Özden S (2006). Bazı pestisidlerin oksidatif stres oluşturma potansiyellerinin ve antioksidan sistemler üzerine etkilerinin sıçanlarda araştırılması. Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
64. Stadtman ER. (2002). Importance of individuality in oxidative stress and aging. Free Radical Bio Med 33 (5), 597–604.
65. Turan İ (2012). Türk propolis ekstraktlarının fibroblast hücre serilerinde genotoksisite üzerine etkisinin DNA tamir enzimleri vasıtasıyla incelenmesi. Doktora tezi, K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
66. İşbilir ŞS (2008). Yaprakları salata-baharat olarak tüketilen bazı bitkilerin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi. Doktora tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.

67. Ak Tuba (2006). Curcuminin antioksidan ve antiradikal özelliklerinin incelenmesi. Yüksek Lisans tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
68. Reiter R, Tang L, Garcia JJ, Munoz-Hoyos A (1997). Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci* 60(25):2255-71.
69. Das DK, Maulik N (1994). Antioxidant effectiveness in ischemia-reperfusion tissue injury. *Methods Enzymol* 233:601-10.
70. Halliwell B (1994). Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews*, 52: 253-265.
71. Tokaç D (2007). Bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin oksidatif DNA hasarına etkileri. Yüksek Lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
72. Gutteridge JM (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem Dec* 41(12 Pt 2):1819-28.
73. Tekkeş Y (2006). Streptozotosin ile diabet oluşturulmuş farelerde aspirin ve E vitaminin dokularda lipid peroksidasyonu ve antioksidan sisteme etkisinin araştırılması. Yüksek Lisans tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
74. Özden S (2006). Bazı pestisidlerin oksidatif stres oluşturma potansiyellerinin ve antioksidan sistemler üzerine etkilerinin sıçanlarda araştırılması. Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
75. Star RA (1993). Nitric oxide. *Am J Med Sci* 306 (5): 348-58.
76. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs A (1991). Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharm Rev* 43 (9): 109-37.
77. Dinçer Y. ve Akçay T (2000). DNA Hasarı. *Türk Biyokimya Dergisi* 25(2): 73-79.
78. Erden M (1992). Serbest radikaller. *T Klin Tıp Bilimleri Dergisi* 12:201-207.
79. Valenzuela A (1991). The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sci* 48(4):301-9.
80. Basaga HS (1990). Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol* 68:989-98.
81. Parks DA, Bulkley GB, Granger DN (1983). Role of oxygen-derived free radicals in digestive tract diseases. *Surgery* 94:415-22.
82. Stahl W, Sies H (1997). Antioxidant defense: vitamins E and C and carotenoids. *Diabetes*. 46 Suppl 2:S14-8.

83. Granot I, Dekel N (1997). Developmental expression and regulation of the gap junction protein and transcript in rat ovaries. *Mol Reprod Dev* 47:231-239.
84. Chopineau J, Sommier MF, Sautou V (1994). Evaluation of free radical production in an ischaemia-reperfusion model in the rabbit using a tourniquet. *J Pharm* 46 (6):519-20.
85. Mazlum T (2009). Hiperkolesterolemik bireylerde fındık tüketiminin serum ve plazmada oksidan- antioksidan dengeye etkisinin incelenmesi. Yüksek Lisans tezi, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
86. Polidori MC, Stahl W, Eichler O, Nistroj I and Sies H (2001). Profiles of antioxidants in human plasma. *Free Rad Bio & Med* 30, No.5, 456- 462
87. Percival M (1998). Antioxidants. *Clin Nut Insights* 10:1-4.
88. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress- induced cancer. *Chem Biol Interact* 160: 1-40.
89. Miller HE, Rigelhof F, Marquart L, Prakash A, Kanter M (2000). Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables. *J Am Coll Nutr* 19, 3, 312-319
90. Visioli F, Galli C (1995). Natural antioxidants and prevention of coronary heart disease: The potential role of olive oil and its minor constituents. *Nutr Metab Cardiovas* 5, 4, 306-314
91. Schwenke DC (1998). Antioxidants and atherogenesis. *J Nutr Biochem* 9, 8, 424-445.
92. Auroma. OI (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J Am Oil Chem Soc* 75, 2, 199-212.
93. Omarma A (2004). Pathological Roles Of Reactive Oxygen Species And Their Defence Mechanisms. *Saudi Pharm J*;12:1–18.
94. Karadağ A (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Anal Methods* 2:41–60.
95. Demir S (2010). Propolis ekstraktlarının fibroblast hücre serilerinde H₂O₂ ile uyarılmış DNA hasarı (genotoksisite) üzerine etkisinin comet assay yöntemi ile araştırılması. Yüksek Lisans tezi, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
96. Halliwell B (1995). Antioxidant characterization methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol* 49 (10), 1341-1348.
97. Yağcı C, Toker MC, Toker G (2008). Bitki doku kültürü yoluyla üretilen flavonoidler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 1 (1): 47-58.

98. Öztürk N, Tunalier Z, Koşar M, Başer KH (2002). Petroselinum crispum, Anethum Graveolens ve Eruca sativa'nın antioksidan etki ve fenolik bileşikler yönünden incelenmesi. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, Eskişehir.
99. Rice-evans CA. Miller NJ. Paganga G (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends Plant Sci 2, 152-159.
100. Fusco D, Colloca G, Lo Monaco MR, Cesari M (2007). Effects of antioxidant supplementation on the aging process. Clinical Interventions in Aging 2(3): 377-87.
101. Traber M.G (2007). Vitamin regulatory mechanisms. Annu Rev. Nutr. 27:347-362.
102. McArdle F, Rhodes LE, Parslew R (2002). UVR-induced oxidative stress in human skin in vivo: effects of oral vitamin C supplementation. Free Radic Biol Med 33(10): 1355-1362.
103. Carr A, Frei B (2000). The Role Of Natural Antioxidants in preserving the biological activity of endothelium-derived nitric oxide. Free Radic Biol Med 28(12):1806-14.
104. Frei B (1999). On the role of vitamin c and other antioxidants in Atherogenesis and vascular dysfunction. Proc Soc Exp Biol Med 222(3):196-204.
105. Podda M, Grundmann- Kollmann M (2001) Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing. Clin Exp Dermatol 26: 578-582.
106. Chao JC, Huang CH, Wu SJ, Yang SC, Chang NC, Shieh MJ (2002). Lo PN: Effects of beta-carotene, vitamin C and E on antioxidant status in hyperlipidemic smokers. J Nutr Biochem 13:427-434
107. Singh U (2004). Jialal I: Anti-inflammatory effects of alpha-tocopherol. Ann N Y Acad Sci 1031:195-203
108. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress- induced cancer. Chemico_Biological Interactions 160: 1-40.
109. Williams RJ, Spencer JPE, ve Rice- Evans C (2004). Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? Free Radical Bio Med 36, 7, 838-849.
110. G. Cao, E. Sofic RL. Prior (1997). Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure-activity relationships. Free Radical Bio Med 22, 749-760.
111. S. Burda W. Oleszek (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. J Agr Food Chem 49, 2774-2779.
112. Yanishlieva-Maslarova, NV (2001). Inhibiting oxidation. Antioxidants in food, Practical applications. Pokorný, J. Yanishlieva, N. Gordon, M. (eds), Woodhead Publishing Ltd, USA, p. 47.

113. Hertog MGL (1993). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J Agr Food Chem* 40, 2379-2383.
114. Wang H, Cao G, Prior RL (1996). Total antioxidant capacity of fruits. *J Agr Food Chem* 44,701-705.
115. Wetherilt H. (1996). Beslenme ve cilt sağlığı. *Gıda Teknolojisi* 1(6), 84-88.
116. Ito N, Hirose M, Fukushima S, Tsuda H, Shirai T, Tatematsu M (1986). Studies on antioxidants: their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. *Food Chem Toxico* 24(10/11), 1071-1082.
117. Halvorsen BL, Holte K, Myhrstad MCW, Barigmo I, Hvattum E, Remberg SF (2002). A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *J Nutr* 132(3), 461-471
118. Lindley MG (1998). The impact of food processing on antioxidants in vegetable oils, fruits and vegetables. *Trends Food Sci Tech* 19: 336-340
119. Karpinska M, Borowski J, Danowska-Qziewich (2001). The use of natural antioxidants in ready-to-serve food. *Food Chem* 72, 5-9.
120. Tepe B, Sökmen M, Akpulat HA, Sökmen A (2006). Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* speices from Turkey. *Food Chem* 95, 200-204
121. Chen HY, Lin YC, Hsieh CL (2007). Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. *Food Chem* 104, 1418-1424.
122. Klejdus B, Vacek J, Adam V, Zehnalek J, Kizek R, Trnkova L, Kuban V (2004). Determination of isoflavones in soybean food and human urine using liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr* 806: 101-111
123. Majors RE (1991). Supercritical Fluid Extraction: An Introduction. *LC-GC-Mag Sep Sci* 9 (2), 78,
124. Jarvis AP, Morgan D (1997). Isolation of Plant Products by Supercritical- Fluid Extraction. *Phytochem Analysis*, 8, 217-22
125. Benthin B, Danz H, Hamburger M (1999). Pressurized liquid extraction of medicinal plants. *J Chromatogr A* 837:211-219
126. Kaufmann B, Christen P (2002). Recent extraction techniques for natural products: microwaveassisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochem Analysis* 13: 105–113

127. Mouly PP, Gaydou EM, Faure R, Estienne JM (1997). Blood orange juice authentication using cinnamic acid derivatives. variety differentiations associated with flavanone glycoside content. J Agr Food Chem 45 373-77
128. Coulibaly K, Jeon IJ (1996). An overview of solid-phase extraction of food flavor compounds and chemical residues. Food Rev Int 12, 131– 51
129. Dai J, Mumper RJ (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules 15: 7313-7352.
130. Xu BJ, Chang SK (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. J Food Sci 72, S159-166
131. Nicoue EE, Savard S, Belkacemi K (2007). Anthocyanins in wild blueberries of Quebec: extraction and identification. J Agr Food Chem 55, 5626-5635.
132. Revilla E, Ryan JM, Martin-Ortega G (1998). Comparasion of several produres used for the extraction of anthocyanins from red grapes. J Agr Food Chem 46, 4592-4597.
133. Dai J, Mumper RJ (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules 15: 7313-7352.
134. Horzic D, Komes D, Belscak A, Ganic KK, Ivekovic D, Karlovic D (2009). The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. Food Chem 115: 441-448
135. Lotito SB and Frei B (2004). Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: contrasting *in vitro* and *in vivo* effects. Free Radical Bio Med 36(2): 201-211
136. Lin JY, Tang CY (2007). Determination of total phenolic and flavonoid contents in selectedfruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. Food Chem 101: 140-147
137. Moreno MIN, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA (2000). Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. J Ethnopharmacol 71: 109-114, 2000.
138. Moreira L, Dias, LG, Pereira JA, Estevinho L (2008). Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. Food Chem Toxico 46: 3482-3485,
139. Ayaz FA., Kadioğlu A. Hayırlioğlu-Ayaz S (1998). Determination of some low molecular weight carbohydrates in the fruits of wild Cherry Laurel (*Laurocerasus officinalis* Roem.) Using gas chromatography. Tr J Of Botany 22: 65-68 Tübitak.

140. Ayaz FA (2001). Changes in phenolic acids of Cherry Laurel (*Laurocerasus officinalis* 'Oxygemmis') fruit during maturation. Acta Biol Cracov Bot 43: 23-26.
141. Soong Y-Y, Barlow PJ (2006). Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed and mango (*Mangifera indica* L.) kernel and their effects on antioxidant activity. Food Chem 97: 524-530.
142. Komes D, Belščak-Cvitanović A, Horžić D, Rusak G, Likić S, Berendika M (2010). Phenolic composition and antioxidant properties of some traditionally used medicinal plants affected by the extraction time and hydrolysis. Phytochem Analysis 22: 172-180.
143. Sani I M, Iqbal S, Chan KW, Ismail M (2012). Effect of acid and base catalyzed hydrolysis on the yield of phenolics and antioxidant activity of extracts from germinated brown rice (GBR). Molecules 17: 7584-7594.

9. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : DEMİR, Feyza
Uyruğu :T.C.
Doğum tarihi ve yeri :Trabzon 01. 01. 1986
Medeni hali : Bekar
E-Posta :demirfeyza_@hotmail.com
Yazışma adresi :Kuran kursu Mah. Efsane sok.
No: 8 Merkez TRABZON

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Devam ediyor
Lisans	Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü	2010
Lise	Trabzon Fatih Lisesi	2003

YABANCI DİL: İngilizce