

171008

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

TÜRKİYE'NİN BAZI YÖRELERİNDEN KESTANE VE ÇİÇEK BALLARININ
ANTIÖKSİDAN AKTİVİTELERİ VE MİNERAL İÇERİKLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI

Gıda Mühendisi Esra ULUSOY

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“Yüksek Lisans (Kimya)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 24.12.2004

Tezin Savunma Tarihi : 01.02.2005

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Orhan DEĞER

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Murat KÜÇÜK

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Emin Zeki BAŞKENT

Trabzon 2005

ÖNSÖZ

"Türkiye'nin Bazı Yörelerinden Kestane ve Çiçek Ballarının Antioksidan Aktiviteleri ve Mineral İçeriklerinin Karşılaştırılması" adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

Başta yüksek lisans çalışmamı, 2003.111.002.6 nolu proje ile maddi olarak destekleyen KTÜ Araştırma Fonu'na teşekkür ederim.

Çalışmamın planlanması ve yürütülmesinde her türlü maddi ve manevi desteğini esirgemeyen danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI'ya teşekkürü borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan başta değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Murat KÜÇÜK olmak üzere, Yrd. Doç. Dr. Ümmühan OCAK, Dr. Miraç OCAK, Öğr. Gör. Barbaros DİNÇER, Öğr. Gör. Dr. Celal DURAN, Arş. Gör. Ali GÜNDOĞDU ve diğer Biyokimya Anabilim Dalı ve Kimya Bölümü hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim. Manevi desteklerinden dolayı Derya DİNÇER, Barış KEMER ve Yaprak UYGUR'a da teşekkür ederim.

Ayrıca bilgilerinden ve laboratuvar imkanlarından yararlandığım Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Nurettin YAYLI'ya teşekkür ederim.

Ayrıca bal örneklerinin temin edilmesinde başta TEMA vakfına ve diğer bal üreticilerine teşekkür ederim.

Ayrıca maddi ve manevi destekleri ile hep yanımda olan başta sevgili eşim Servet ULUSOY'a, kardeşim Büşra Çiğdem ŞAHİNBAŞ'a ve aileme sonsuz teşekkür ederim.

Esra ULUSOY

Trabzon, 2005

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET	V
SUMMARY	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
TABLolar DİZİNİ	VIII
SEMBOLLER DİZİNİ.....	IX
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Serbest Radikaller ve Genel Özellikleri	1
1.3. Antioksidanlar Hakkında Bilgi	8
1.3.1. Bitkilerde Bulunan Biyolojik Aktif Bileşikler	9
1.3.2. Flavonoidler	10
1.4. Bal Hakkında Bilgi	16
1.4.1. Tarihçesi	16
1.4.2. Balın Bileşimi	16
1.4.3. Balın Yararları	18
1.5. Mineraller Hakkında Bilgi	19
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	22
2.1. Kullanılan Cihazlar	22
2.2. Kullanılan Çözeltiler	22
2.3. Örneklerin Toplanması	24
2.4. Bal Ekstraktlarının Hazırlanması	25
2.5. IC ₅₀ Değerlerinin Bulunması.....	25
2.6. Toplam Fenolik Madde Tayini.....	26
2.7. Süperoksit Anyonu Temizleme Aktivitesi Tayini	26
2.8. Peroksinitrit Temizleme Aktivitesi Tayini.....	27
2.9. DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini.....	28
2.10. Fe (III) İndirgeme Antioksidan Kuvveti (FRAP) Tayini.....	29

2.11.	Demir Bağlama Kapasitesi Tayini	29
2.12.	Potansiyel Serbest Radikal Reaksiyonlarına Karşı Toplam Antioksidan Güç (TAR) Tayini	30
2.13.	Mineral İçerik.....	32
3.	BULGULAR	33
3.1.	Toplam Fenolik Madde Miktarları	33
3.2.	Süperoksit Anyonu Temizleme Aktivitesi	34
3.3.	Peroksinitrit Temizleme Aktivitesi	35
3.4.	DPPH Radikal Temizleme Yeteneği	36
3.5.	Fe (III) İndirgeme Kuvveti (FRAP)	37
3.6.	Demir Bağlama Kapasitesi	38
3.7.	Potansiyel Serbest Radikal Reaksiyonlarına Karşı Toplam Antioksidan Güç (TAR)	39
3.8.	Mineral İçeriğinin Belirlenmesi	41
4.	TARTIŞMA	42
5.	SONUÇLAR	47
6.	ÖNERİLER	49
7.	KAYNAKLAR	50
	ÖZGEÇMİŞ	59

ÖZET

Son yılların önemli araştırma alanlarından biri de pek çok hastalığın oluşmasına ve yaşlanmaya neden olan serbest radikallerin temizlenmesinde rol oynayan antioksidanlar üzerine olmuştur. Antioksidan etkiye sahip maddelerin daha çok, sınırsız sayıda alifatik ve aromatik bileşik üretme yeteneğine sahip bitkiler tarafından üretildiği kabul edilmektedir. Bitkilerden toplanan özütlerden elde edilen bir besin maddesi olan bal potansiyel antioksidan olarak ilgi çekicidir. Bu amaçla planlanan bu çalışmada, Türkiye'nin değişik bölgelerinden toplanan kestane ve çiçek ballarının antioksidan özellikleri ve mineral bileşimi tespit edildi. Yapılan antioksidan aktivite ölçümlerinde balların toplam polifenolik madde miktarları, süperoksit anyonu, peroksinitrit ve DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali temizleme aktiviteleri, demir indirgeme kuvvetleri (FRAP), demir bağlama kapasiteleri, potansiyel serbest radikal reaksiyonlarına karşı toplam antioksidan güç (TAR) tayinleri yapıldı. Toplanan ballardan elde edilen metanol ekstraktlarının antioksidan özellikleri bazı standart antioksidanlar olarak kabul edilen Troloks[®], BHT ve askorbik asit ile karşılaştırmalı olarak incelendi. Balların mineral içerikleri Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi (AAS) ile tayin edildi. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde hemen hemen tüm bal örneklerinin antioksidan aktiviteye sahip oldukları, antioksidan aktivitenin konsantrasyonla ve balın fenolik madde miktarı ile doğru orantılı olarak değişim gösterdiği ve hiç bir örneğin prooksidan aktivite göstermediği belirlendi. Bunun yanında özellikle kestane ballarının çiçek ballarından daha iyi antioksidan aktivite gösterdiği ve daha yüksek mineral içeriğine sahip olduğu bulundu. Sonuç olarak, sağlıklı yaşamak için balın ve özellikle kestane balının antioksidanca zengin doğal bir ürün olarak daha fazla tüketilmesi önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan Aktivite, Peroksinitrit, DPPH, Süperoksit Anyonu, Demir İndirgeme Antioksidan Kuvveti, Demir Bağlama Kapasitesi, Toplam Antioksidan Güç, Mineral, Kestane ve Çiçek Balı

SUMMARY

A Comparative Study on the Antioxidant Activities and Mineral Composition of Chestnut and Flower honeys from Various Regions of Turkey

One of the important research fields of the recent years has been based on the antioxidants, which have a role in scavenging the free radicals that cause many diseases and ageing. The compounds having antioxidant effect are accepted to be produced on a wide range by plants, which have the capacity to produce infinite numbers of aliphatic and aromatic compounds. Honey, which is a nutrient obtained from the nectars collected from the plants, is interesting as an antioxidant source. In this study, planned for this purpose, the antioxidant properties and mineral content of the chestnut and flower honeys collected from various regions of Turkey were determined. In the analysis of antioxidant activity, superoxide anion, peroxy nitrite and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) scavenging activities, ferric reducing antioxidant power (FRAP), total antioxidant response against potent free radical reactions and the quantity of total phenolics were evaluated. The antioxidant properties of the methanol extracts obtained from the honeys were investigated comparatively with some standard antioxidants Trolox[®], BHT, and ascorbic acid. The mineral contents of honeys were analyzed by AAS. When the results were interpreted, it was determined that nearly all honey samples had antioxidant activity, and none of the samples showed prooxidant activity. In addition, it was identified that the chestnut honeys showed better antioxidant activity and higher mineral content, compared to the flower honeys. Consequently, it is suggested that for healthy living honey, especially chestnut honey, should be consumed more as a natural product rich in antioxidants.

Key Words: Antioxidant Activity, Peroxy nitrite, DPPH, Superoxide Anion, Ferric Reducing Antioxidant Power, Iron Chelating Capacity, Total Antioxidant Power, Mineral, Chestnut and Flower Honeys

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Solunum sisteminde oksijenin indirgenme metabolizması	3
Şekil 2. Nitrik oksit aracılığıyla 3-Nitrotirozin oluşturan mekanizmalar	6
Şekil 3. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalinin formülü	7
Şekil 4. Troloks® (a) ve BHT (b)'nin formülleri	9
Şekil 5. Sinnamik asit (a), Kafeik asit (b), Katekol ve (c) Pirogallol (d)'ün Formülleri	10
Şekil 6. Fenolik bileşiklerin biyosentetik metabolik yolu	11
Şekil 7. Flavonoidlerin temel yapısı (a) ve bazı substituentleri (b)	12
Şekil 8. Toplam fenolik madde tayini için kateşin standardı kullanılarak hazırlanan standart çalışma grafiği	33
Şekil 9. Kestane ve çiçek balı örneklerinin toplam polifenolik madde miktarları	34
Şekil 10. Kestane ve çiçek balı örneklerinin süperoksit anyon temizleme aktiviteleri..	35
Şekil 11. Kestane ve çiçek balı örneklerinin peroksinitrit temizleme aktiviteleri	36
Şekil 12. Kestane ve çiçek balı örneklerinin DPPH radikali temizleme aktiviteleri ...	37
Şekil 13. Kestane ve çiçek balı örneklerinin Fe (III) indirgeme kuvveti (FRAP).....	38
Şekil 14. Kestane ve çiçek balı örneklerinin % demir bağlama kapasiteleri	39
Şekil 15. Troloks® konsantrasyonuna bağlı TAR standart grafiği	39
Şekil 16. Kestane ve çiçek balı örneklerinin TAR tayini sonuçları	40

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. En sık karşılaşılan serbest radikaller ve serbest radikal üreten türlerin bazı özellikleri	2
Tablo 2. Flavonoidlerin genel karbon iskeletleri ve taşıdıkları substituentler	12
Tablo 3. Bazı mineral elementlerin günlük alınması gereken miktarları (RDA)	19
Tablo 4. Denemelerde kullanılan malzemeler	22
Tablo 5. Denemelerde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları	23
Tablo 6. Denemelerde kullanılan kimyasalların satın alındıkları firmaların ticari adları.....	24
Tablo 7. Denemelerde kullanılan bal örneklerinin alındığı bölgeler ve türleri	25
Tablo 8. Toplam polifenolik madde tayininde yapılan pipetleme işlemleri	26
Tablo 9. Süperoksit anyonu temizleme aktivitesi tayininin pipetleme işlemleri	27
Tablo 10. İndirgeme kuvveti tayini için deney şartları	29
Tablo 11. Demir bağlama aktivitesi tayini için deney şartları	30
Tablo 12. Potansiyel serbest radikal reaksiyonlarına karşı toplam antioksidan güç tayininde yapılan pipetleme işlemleri	31
Tablo 13. Kestane ve çiçek ballarının metal iyonu konsantrasyonları	41
Tablo 14. Kestane ve çiçek ballarının ortalama toplam fenolik madde miktarları, TAR değerleri ve radikal temizleme aktivitelerinin karşılaştırılması	41

SEMBOLLER DİZİNİ

AAS	: Atomik Absorpsiyon Spektrometrisi
BHA	: Butillenmiş hidroksianisol
Cl ⁻	: Klorür anyonu
BHT	: Butillenmiş hidroksitoluen
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPPH	: 2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil
ESR	: Elektron Spin Rezonans
GC-MS	: Gaz Kromatografisi - Kütle Spektrometrisi
GSH	: İndirgenmiş glutatyon
GPX	: Glutatyon peroksidaz
GST	: Glutatyon-S-transferazlar
HCA	: Hidroksi sinnamik asitler
HCO ₃ ⁻	: Bikarbonat
HMF	: Hidroksimetilfurfural
HO ₂ ⁻	: Perhidroksil radikali
HONOO	: Peroksinitröz asit
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IC ₅₀	: % 50 İnhibisyon konsantrasyonu
KAT	: Katalaz
MnO ₂	: Mangan dioksit
NaNO ₂	: Sodyum nitrit
NBT	: Nitro Blue Tetrazolium
NO [·]	: Nitrozo radikali
NO	: Azot monoksit (nitrik oksit)
NO ₂ [·]	: Azot dioksit radikali
¹ O ₂	: Singlet oksijen
³ O ₂	: Triplet oksijen
O ₂ ^{-·}	: Süperoksit radikalik anyonu

OH [·]	: Hidroksil radikali
ONOO ⁻	: Peroksinitrit anyonu
RDA	: Recommendend daily allowance (Önerilen günlük alım miktarı)
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
SNR	: Serbest azot radikalleri
TBA	: Tiyobarbiturik asit
TCA	: Trikloro asetikasit
Troloks [®]	: 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit



1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Antioksidanlar, düşük konsantrasyonlarda organik bileşiklerin serbest radikal mekanizmalı oksidasyonunu engelleyen bileşiklerdir. Son yıllarda besin kimyası ve koruyucu tıbbın bitkisel kaynaklı doğal antioksidanlara ilgisi artmıştır. Bunun sebebi sentetik antioksidanların kanserojenik olarak düşünülmesidir. Doğal antioksidanlar ise, insan organizması için genellikle zararsız olup yan etkileri bulunmamaktadır. Doğal antioksidanlar canlı organizmalardaki savunma sisteminde olduğu kadar gıda sanayinde de önemli derecede yararlıdırlar. Bu amaçla besinlerin bozulmasını önlemek, raf ömrünü artırmak, lipidlerin ve vitaminlerin parçalanmasını engellemek ve besin rengini korumak için kullanılan antioksidanlar önemli katkı maddeleridir. Doğal antioksidanların büyük çoğunluğu bitkisel kaynaklı olup daha çok polifenoller ve flavonoidler halinde bulunurlar (Rice-Evans, 1997). Yaşamın temel gereği olan oksijen, oksidasyon sırasında hücreye büyük zararlar verebilir. Vücuda giren oksijen, oksidasyon sırasında bir yandan enerji üretirken bir yandan da serbest radikaller adı verilen molekülleri oluşturur. Serbest radikaller, kararsız yapıda olup kolayca reaksiyon verebilen bileşiklerdir. Serbest radikalleri oluşturan kaynakların başlıcaları; radyasyon, virüsler, ultraviyole ışınlar, fosil kökenli yakıtların yanması sonucu oluşan ürünler, sigara dumanı ve strestir.

Bu çalışmada Türkiye'nin çeşitli yörelerinde üretilen balların serbest radikal temizleme aktiviteleri ve antioksidan aktiviteleri yanı sıra AAS ile mineral içerikleri incelenmiş ve bu çalışmalar sonucunda hangi tür balların daha etkili olduğu belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmalar esnasında kullanılan DPPH radikali satın alınmış olup, peroksinitrit radikali laboratuvarımızda tarafımızca sentezlenmiştir. Diğer radikaller ise çeşitli reaktifler ve enzimler kullanılarak reaksiyon ortamında oluşturulmuştur.

1.2. Serbest Radikaller ve Genel Özellikleri

Serbest radikaller bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküller olarak tanımlanırlar. Serbest radikallerin normal metabolizmaya ait bir ürün olduğu sonradan anlaşılmıştır. Bugün radikallerin pek çok hücrede moleküler değişimlere

ve gen mutasyonlarına yol açtığı artık iyi bilinmekte olup yaşlanma, hücrel hasar ve doku yıkımında rol aldığı kabul edilmektedir (Storz ve Imlay, 1999). Serbest radikallerin başlıca sigara, alkol ve lipid metabolizması ürünleri, virüsler, güneş ışınları, X ışınları ve kozmik ışınlar, sanayi atıkları, otomobil egzoz gazları, ozon, ağır metaller, kirli su ve havadan da oluşabildiği bilinmektedir (Sies, 1991).

Radikal reaksiyonlarının zincirleme reaksiyon oluşturma yeteneği, özellikle kontrolsüz radikal reaksiyonlarının gelişebileceğini ortaya koymuştur. Radikaller, oksijen içerip içermediğine göre, serbest oksijen radikalleri (SOR) ve oksijen içermeyen radikaller olarak ikiye ayrılır (Dündar ve Aslan, 2000). Tablo 1’de organizmalarda en çok oluşan ve tanınan serbest radikaller gösterilmektedir.

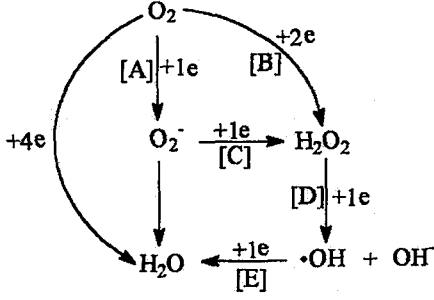
Tablo 1. En sık karşılaşılan serbest radikaller ve serbest radikal üreten türlerin bazı özellikleri

Radikal	Simgesi	Özelliği
Hidrojen radikali	H [•]	Bilinen en basit radikal
Süperoksit radikali	O ₂ ^{•-}	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü
Hidroksil radikali	OH [•]	En toksik (reaktif) oksijen metaboliti radikali
Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂	Reaktivitesi çok düşük, moleküler hasar yeteneği zayıf
Singlet oksijen	¹ O ₂	Yarılanma ömrü kısa, güçlü oksidatif form
Perhidroksil radikali	HO ₂ [•]	Lipidlerde hızlı çözünerek lipid peroksidasyonunu artırmaktadır
Peroksil radikali	ROO ^{•-}	Perhidroksile oranla daha zayıf etkili, lipidlere lokalize olma yeteneği
Triklorometil radikali	CCl ₃ [•]	CCl ₄ metabolizması ürünü, karaciğerde üretilen bir radikal
Tiyil radikali	RS [•]	Sülfürlü ve çiftlenmemiş elektron içeren türlerin genel adı
Alkoksil radikali	RO [•]	Organik peroksitlerin yıkımı ile üretilen oksijen metaboliti
Azot monoksit	NO	L – argininden <i>in vivo</i> üretilir
Azot dioksit	NO ₂	NO'in oksijen ile reaksiyonundan üretilir

Radikal metabolitler aslında aerobik organizmaların kaçınılmaz bileşikleri olup hücrelerde kontrollü kullanımları ile bir dizi enzimin sentezi ve bir çok organizmanın antibakteriyel savunmasında gereklidirler (Halliwell ve Gutteridge, 1990).

Biyolojik sistemlerdeki serbest radikallerin çoğunluğunu serbest oksijen radikalleri oluşturur. Bunların büyük kısmı aerobik solunum sırasında mitokondrielerde indirgenmiş karbon birimlerinden alınan elektronların çeşitli elektron taşıyıcılardan geçerek en son

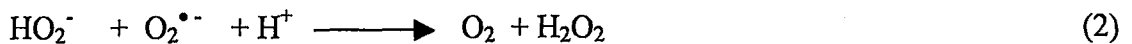
elektron alıcısı olan moleküler oksijene transferi esnasında meydana gelir. Oksijenin tam olarak indirgendiği reaksiyonlarda son ürün daima sudur. Oksijenin kısmi indirgenmesi sonucu serbest oksijen radikalleri oluşur. Bu indirgenme Şekil 1'de görülen mekanizmalarla, genellikle tek elektronların transferini içeren basamaklar halinde gerçekleşir (Winston, 1991).



Şekil 1. Solunum sisteminde oksijenin indirgenme metabolizması

Moleküler oksijen (O₂), iki çiftleşmemiş elektron içerir, bu sebeple kendisi de bir biriklidir. Bu özelliğinden dolayı diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girebilir. Moleküler oksijenin bir elektron indirgenmesiyle süperoksit (O₂^{•-}), iki elektron indirgenmesiyle hidrojen peroksit (H₂O₂) ve üç elektron indirgenmesiyle hidrosil radikali (•OH) meydana gelir (Şekil 1). Hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hipoklorik asit (HOCl) gibi bazı oksijen türevleri radikalik özellik göstermemesine rağmen son derece reaktif oluşları sebebiyle diğer oksijen radikalleri ile birlikte sınıflandırılırlar. Oluşan bu radikallerin bir kısmı lizozomlarda ve lökositlerde ksenobiyotik ve savunma mekanizmasında rol oynarlar (Halliwell ve Gutteridge, 1984). Temel haldeki oksijen triplet oksijendir ve ³O₂ olarak gösterilir.

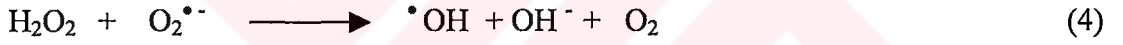
Süperoksit (O₂^{•-}), moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesiyle meydana gelen radikaldir. Daha çok O₂^{•-} veya O₂⁻ anyonu şeklinde gösterilir. Süperoksit radikali aerobik hücrelerde oldukça sık oluşur. Fakat daha çok elektron transfer sistemlerinde meydana gelir. Bunun yanında pek çok enzimatik ve enzimatik olmayan yollarla da meydana gelebilir (Halliwell vd., 1992).



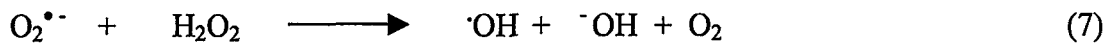
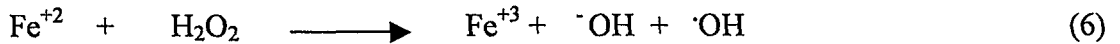


Süperoksit radikali, diğer radikallere nazaran daha az toksik etkiye sahiptir. Çünkü bu radikal, hücre membranından yüklü olduğu için doğrudan geçemez. Ancak eritrosit membranlarındaki anyon kanalından Cl^- ve HCO_3^- iyonlarının yer değiştirmesiyle geçebilmektedir. Süperoksit radikalının esas zararlı etkisi onun protonlanmasıyla meydana gelmektedir. Protonlanma ile çok daha aktif bir radikal olan perhidroksil radikali (HO_2^-) meydana gelir. Süperoksit radikali ile perhidroksil radikali birbirleriyle reaksiyona girdiklerinde biri yükseltgenirken diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonu sonucu ise oksijen molekülü ve hidrojen peroksit meydana gelir (2). Süperoksit radikali, oldukça reaktif bir molekül olup, iyi bir indirgeyici ve zayıf bir oksitleyici maddedir (Dündar ve Aslan, 2000; Fridovich, 1975).

Hidrojen peroksit bir radikal olmadığı halde doğrudan çeşitli radikallerin oluşumunda önemli bir rol oynar. Süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini oluşturur (4).



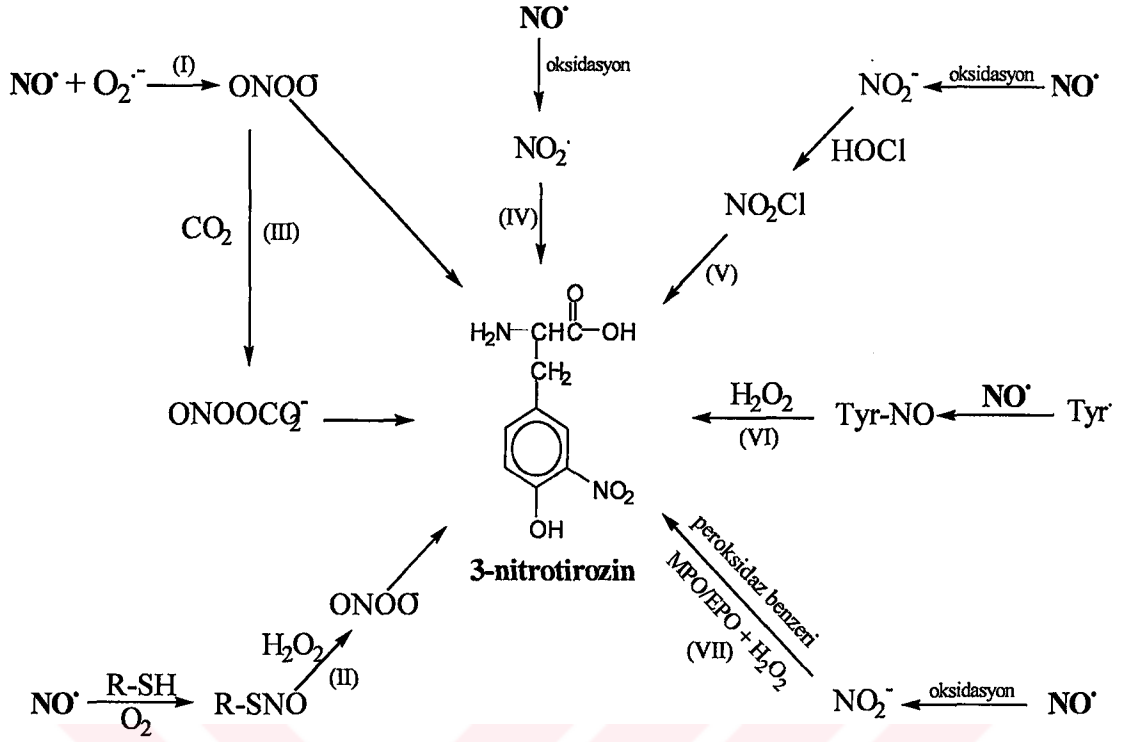
Bu reaksiyon Haber-Weiss Reaksiyonu diye adlandırılır. Haber-Weiss Reaksiyonu katalizörlü ya da katalizörsüz meydana gelebilir. Katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş olup, demir katalizörlüğündeki reaksiyon ise çok hızlıdır. Bu reaksiyonda önce Fe^{+3} süperoksit tarafından Fe^{+2} 'ye indirgenir (5). Daha sonra Fe^{+2} kullanılarak "Fenton Reaksiyonu" ile hidrojen peroksitin dismutasyonu sonucu OH^- ve OH^\cdot oluşur (6). Reaksiyon mekanizması şöyledir (Halliwell ve Gutteridge, 1990; Niki, 1987).



Biyolojik sistemlerde aerobik solunumun dışında ister enzimatik ister enzimatik olmayan pek çok yolla daha SOR oluşmaktadır. Bunlardan bir tanesi olan azot monoksit (veya nitrik oksit) (NO^\cdot), canlı sistemlerde üretilen serbest bir oksijen radiklidir. Nitrik

oksit birçok farklı fonksiyona sahip olan bir aracı moleküldür (Şekil 2). Sistemik kan basıncının düzenlenmesinde, sinir sisteminde ikincil mesajcı olarak, immun sistemin oluşmasında çeşitli fizyolojik rollere sahiptir (Tsuda vd., 2000; Edge, 1997). Patolojik şartlarda aşırı miktarlarda sentezlenen nitrik oksit hem yararlı işlevler arz edebilir, ki bunlar arasında antimikrobiyal etki gösterme sayılabilir, hem de hücre öldürücü etki gösterebilir ve doku hasarına neden olabilir. Nitrik oksit çeşitli hücrelerde fizyolojik ya da patofizyolojik uyarılara cevaben L-argininden sentezlenir. Bu sentez küçük bir enzim ailesi olan nitrik oksit sentazlar (NOS) aracılığıyla gerçekleşir.

Yüksek konsantrasyonlardaki nitrik oksit özellikle aynı merkezde süperoksit sentezi de artmışsa onunla reaksiyon vererek zararlı etkisi çok daha fazla olan peroksinitrit (ONOO^-) anyonuna dönüşür (Beckman ve Koppenol, 1996; Nedospasov, 1998). Nitrik oksit ve onun ürünü olan peroksinitritin seviyelerinin tespitinde temel belirteç dokulardaki 3-nitrotirozin miktarıdır. Nitrik oksit bir çok farklı yoldan 3-nitrotirozin oluşumuna neden olmaktadır (Kröncke, 2000).



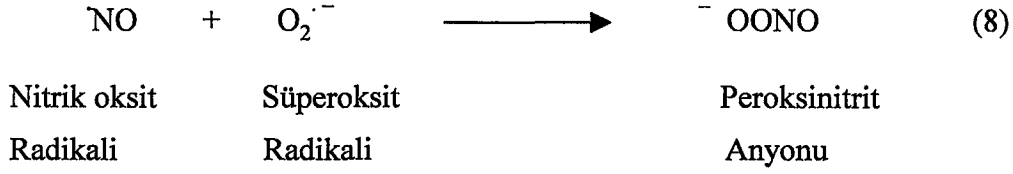
Şekil 2. Nitrik oksit aracılığıyla 3-Nitrotirozin oluşturan mekanizmalar¹

Peroksinitrit fizyolojik olarak sentezlenen ve bulunduğu ortamlarda daha çok zararlı etki gösteren, biyomoleküllerin birçoğunu modifiye edip fonksiyonlarını etkileyen bir anyondur. Radikal olmamasına rağmen sebep olduğu hasar onu oluşturan ön maddeler olan nitrik oksit ve süper oksidin oluşturduğu hasara oranla çok daha fazladır.

Peroksinitrit sentez reaksiyonu (Eşitlik 8) ikinci mertebeden bir reaksiyon olup, fizyolojik olarak nitrik oksit ve süperoksitten sentezlenmektedir.

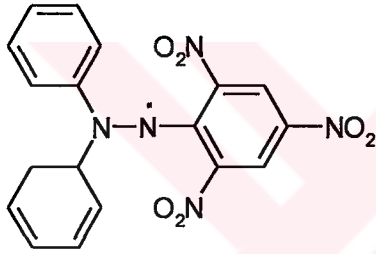
1

Peroksinitrit, NO^\bullet ve $\text{O}_2^{\bullet-}$ radikallerinin reaksiyonundan (I) ve S-nitrozo tiyollerin H_2O_2 'in aşırısıyla olan reaksiyonundan (II) elde edilebilir. Peroksinitrit ve onun CO_2 ile oluşturduğu küme (III) yanında, NO_2^\bullet (IV) ve NO_2Cl (V) de tirozin birimlerini doğrudan nitrolayabilir. Ayrıca NO^\bullet ' in tirozin radikalleri ile reaksiyon verip oluşan ürünün H_2O_2 ya da HOCl gibi oksidanlarla reaksiyona girmesi sonucu da nitrotirozin oluşabilir (VI). Bunlara ilaveten myeloperoksidaz (MPO) ve eozinofil oksidaz (EPO) gibi peroksidazlar H_2O_2 ve NO_2^- mevcudiyetinde nitrotirozin oluşumuna aracılık edebilir (VII).



NO[•] radikali ayrıca büyük bir çevresel kirlilik oluşturan sigara dumanında oksijen ile birleşerek NO₂[•] radikalini oluşturur ki bu radikal de yine lipid peroksidasyonuna ve pek çok hücrel hasarlara yol açmaktadır (Tsuda vd., 2000; Edge, 1997; Groves, 1999; Heijnen vd., 2000).

DPPH (Şekil 3) sulu veya metanolik çözeltilerde kararlı ve sentetik olarak üretilen ticari bir radikal olup lipid peroksidasyonuna sebep olmaktadır.



Şekil 3. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalinin formülü

Tüm bu oksijen radikalleri canlı sistemlerde bulunan proteinler, lipitler, karbohidratlar, nükleik asitler gibi biyomoleküllerin oksidasyonuna sebep olurlar. Dolayısıyla bu biyomoleküllerin üç boyutlu yapıları ve buna bağlı olarak fonksiyonları değişir. Tüm biyomoleküller üç boyutlu yapılarıyla fonksiyon gösterirler. Üç boyutlu yapının herhangi bir etkiyle değişmesi sonucu bu biyomoleküllerin fonksiyonları artar, azalır ya da durur.

Serbest radikallerin olumsuz etkilerinden en fazla zarar gören yapılar membranlardır. Serbest radikaller, membranlardaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları ile kolaylıkla reaksiyona girerek çeşitli peroksidasyon ürünleri meydana getirirken membranların yapısını ve fonksiyonunu bozup, enzimlerin inaktivasyonuna neden olurlar. Serbest radikaller özellikle yaşlanma, kanser, nörolojik hastalıklar, hipertansiyon, kardiovasküler (kalp-damar) hastalıklar, katarakt, deri hastalıkları, karaciğer hastalıkları ve ürolojik rahatsızlıklar gibi hastalıkları oluştururlar (Sies, 1991; Winston, 1991).

1.3. Antioksidanlar Hakkında Bilgi

Radikallerle oldukça çabuk reaksiyona girerek oto-oksidasyon veya peroksidasyonun ilerlemesini önleyen maddeler *antioksidan* olarak tanımlanırlar. Antioksidan savunma; radikal metabolit üretiminin önlenmesi, üretilmiş radikallerin temizlenmesi, oluşan hücre deformasyonunun onarılması, sekonder radikal üreten zincir reaksiyonlarının durdurulması ve endojen antioksidan kapasitenin artırılması olarak tanımlanan beş değişik mekanizmada işlem görür.

Antioksidanlar endojen ve eksojen antioksidanlar olarak iki gruba ayrılabilir. Endojen antioksidanlar buldukları ve etkinliklerini yerine getirdikleri yerlere göre de hücre içi, membranal ve hücre dışı antioksidanlar olarak üç sınıf altında toplanabilir. Antioksidanları enzimatik olanlar ve enzimatik olmayanlar ya da doğal antioksidanlar ve yapay antioksidanlar şeklinde sınıflandırmak toplamak mümkündür.

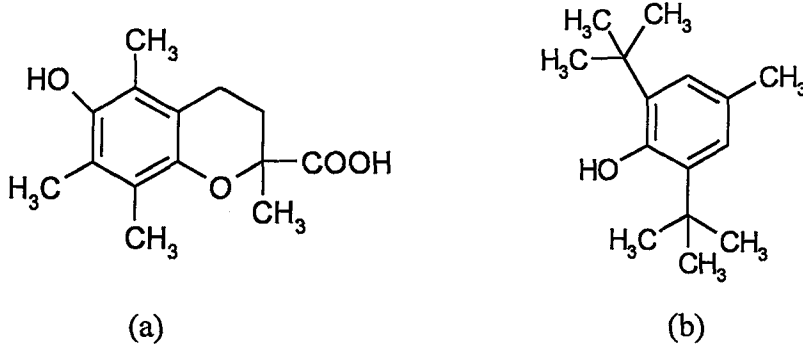
Süperoksit dismutaz (SOD) süperoksit radikallerinin dismutasyonundan sorumlu, glutatyon peroksidaz (GPX) hücre içersinde oluşan peroksit ürünlerin (R_2O_2) dismutasyonundan ve katalaz (KAT) yine H_2O_2 nin dismutasyonundan sorumlu birer enzimatik antioksidan olup etkinliklerini hücre içinde gösterirler (Matés, 1999; Halliwell vd., 1992).

Glutatyon (GSH), bilirubin, ürik asit, albumin, seruloplazmin, hemoglobin, ferritin birer endojen kaynaklı enzimatik olmayan antioksidan olup etkinliklerini hücre içinde gösterirler (Meister ve Anderson, 1983; Dündar ve Aslan, 2000).

Askorbik asit (C vitamin), α -tokoferol (E vitamin), β -karoten (A vitamin) ve polifenoller gibi moleküller hayvan organizmasında sentezlenmeyen ve bitkiler tarafından sekonder metabolit olarak üretilen maddeler olup radikallerin temizlenmesinde ve zincir reaksiyonlarının durdurulmasında etkili birer antioksidan olup yine enzimatik olmayan yollarla etkinliklerini sürdürürler (Chen vd., 1988; Edge vd., 1997).

Peroksinitritin zararlı etkilerinin engellenmesinde rol oynayan, organizmada bulunan ya da dışarıdan alınan bir çok antioksidan bileşik mevcuttur (Kondo vd., 1997; Heijnen vd., 2000). Peroksinitrit temizleme aktivitesi üzerinde çalışma yapılmış bileşikler arasında seleno-bileşikleri, flavonoidler, kateşinler, hidroksiguanidinler, metalotiyonein, indirgenmiş nikotinamid nükleotidleri ve ürik asit sayılabilir. Bazı bileşikler de peroksinitriti ortamdaki tüketmek şeklinde aktiviteden ziyade, peroksinitritin gerçekleştirdiği değişikliklerin geri dönüşümünü sağlamaktadır.

Süperoksit anyonunun temizlenmesinde en etkili antioksidan süperoksit dismutaz enzimi olup glutatyon, flavonoidler, çeşitli polifenoller de etkin rol oynamaktadırlar. Antioksidanlar konusunda en büyük ilgi bu özelliklere sahip maddelerin dizaynı üzerinde olmuştur. Bu türden geliştirilmiş en iyi örnekler BHA (butillenmiş hidroksi anisol), Troloks® ve BHT (butillenmiş hidroksi toluen veya 2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol) dir.



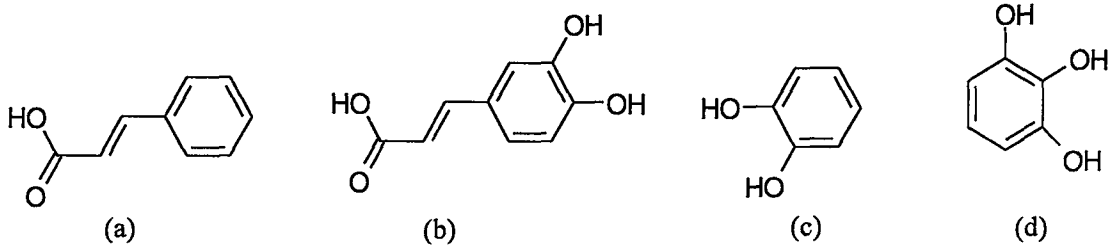
Şekil 4. Troloks® (a) ve BHT (b)'nin formülleri

1.3.1. Bitkilerde Bulunan Biyolojik Aktif Bileşikler

Doğal bileşiklere verilen önem her geçen gün artmaktadır. Bu bileşiklerin bir kısmı ise bitkiler tarafından ikincil metabolizma ürünleri olarak sentezlenen moleküller olup, sinyal (mesajcı) olarak ve mikroorganizma, insektisit, herbisit ve serbest radikallere karşı koruyucu olarak rol oynarlar. Bu nedenle (karbohidratlar, proteinler ve yağların sentezinden sonra) bunlar "ikincil bitki metabolitleri" veya "fitokimyasallar" diye adlandırılırlar. Bitkiler sınırsız aromatik ve alifatik madde sentezleyebilme kabiliyetine sahip olup bunların çoğu fenolik bileşikler veya bunların oksijen ile substituye olmuş halleridir. Bitkilerde bulunan başlıca polifenolik bileşikler basit fenoller, benzokinonlar, fenolik asitler, asetofenonlar, fenilasetil asitler, hidroksisinnamik asitler, fenilpropenler, kumarinler, naftakinonlar, kromonenler, ksantonlar, stilbenler, antrakınonlar, flavonoidler ve ligninlerdir. Fenolik bileşikler veya polifenoller bitkilerde en fazla bulunan yapılardan biri olup bitki aleminde 6000'den fazla fenolik yapının bulunduğu belirtilmektedir (Bravo, 1998). Polifenoller, bir grup bileşik sınıfı olup çeşitli meyve, sebze, kuruyemiş, tohum, çiçek, kök ve gövde kısımlarında doğal olarak sentezlenen maddelerdir (Wollgast ve Anklam, 2000).

Bu bileşiklerin bazıları terpenoidler gibi olup bitkiye koku ve tat verirken bazıları kinonlar ve tanenler gibi bitki pigmentlerini oluştururlar. Pek çok bileşik, bitkinin tadından sorumlu olup bunlardan bazıları gıda ve bazıları ise tıbbi amaçlar için kullanılmaktadır.

Basit fenoller ve fenolik bileşikler, tek bir fenolik halka içeren biyoaktif bileşikler olup sinnamik ve kaffeik asitler bu gruptandır. Katekol ve pirogallol ise hidroksillenmiş fenollerdir.

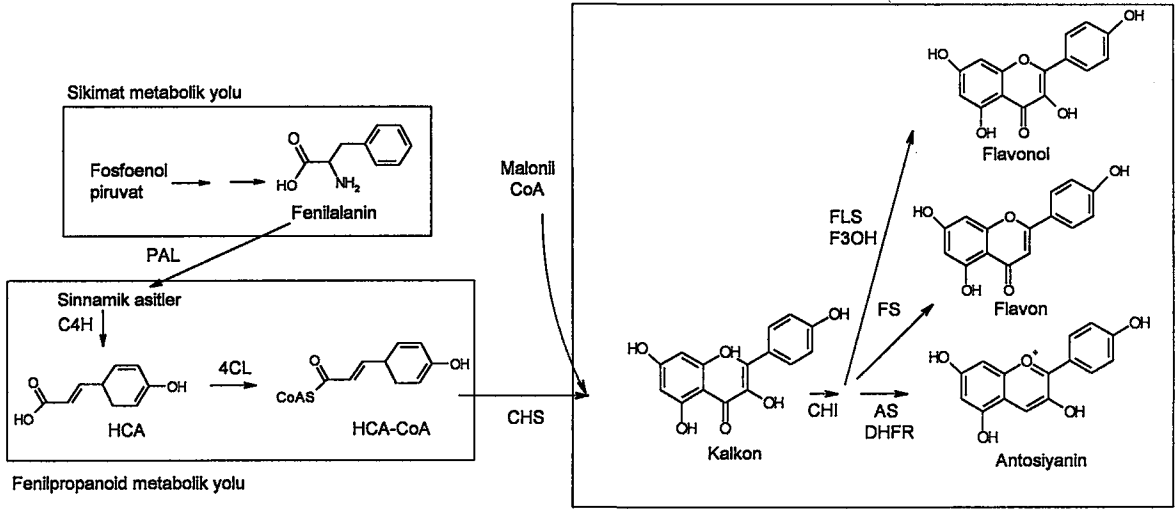


Şekil 5. Sinnamik asit (a), Kaffeik asit (b), Katekol ve (c) Pirogallol (d)'ün formülleri

1.3.2. Flavonoidler

Bitkilerdeki flavonoidler ve lignin gibi fenolik bileşikler potansiyel antioksidanlardır. C vitamini hem hayvan hem de bitkilerde enzimatik ve anenzimatik olmayan reaksiyonlarla reaktif oksijen türlerini temizleyen bir antioksidan olarak görev yapar. Flavonoidlerin etkili antioksidan olmaları geniş bir araştırma konusudur. 1937'de Nobel ödülü kazanmış olan Szent-Györgyi askorbati izole etmiş ve bir flavonoid olan hesperidin'in kapiler geçirgenliği sağlama konusunda askorbata benzer davranışlar gösterdiğini fark etmiştir. Bu gözleme dayanarak flavonoidlerin insanlar için gerekli besinler olduğunu öne sürmüştür (Bentsath vd., 1937).

Fenolikler en az bir aromatik halka (C6) ve bir veya daha fazla hidroksil grubuyla karakterize edilen kimyasal bileşiklerdir. Hidroksisinnamik asitler (HCA) ve flavonoidler sırasıyla C3-C6 ve C6-C3-C6 karbon iskeletine sahiptirler. HCA ve flavonoidler şikimat metabolik yolu, genel fenilpropanoid metabolik yolu ve spesifik flavonoid metabolik yollarıyla fenilalaninden üretilirler. Şekil 6 biyosentetik ilişkileri ve HCA ile flavonoidlerin temel yapılarını özetlemektedir.



Şekil 6. Fenolik bileşiklerin biyosentetik metabolik yolu ²

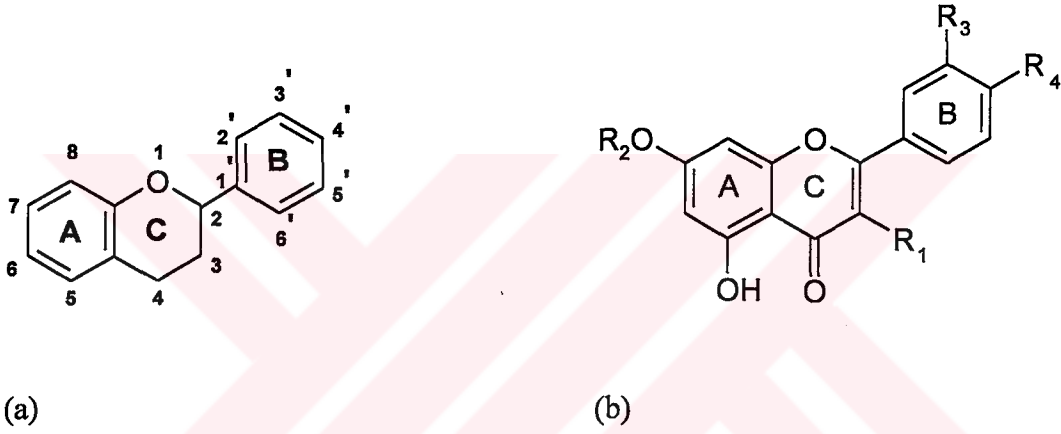
Flavonoidler genellikle çiçek, yaprak, gövde, kök, tohum ve meyve gibi bitki dokularının epidermal hücrelerinde glikozidik (glikozitler) veya glikozidik olmayan (aglikonlar) formda birikirler. Glikozitler başlıca vakuoller ve apoplastlar gibi hidrofilik bölgelerde bulunurlar (McClure, 1975; Wollenweber ve Dietz, 1981). Glutasyon-S transferazın (GST) fonksiyonu antosiyaninleri tanımak ve onların bitki hücre vakuollerine taşınmasına aracılık etmektir (Edwards vd., 2000). GST tarafından medikarpinin (bir isoflavonoid) glutasyon-S-konjugasyonu ve askorbat peroksidaz tarafından sinnamik asidin glutasyon-S-konjugasyonu kendilerinin glutasyon-S-konjugasyon pompaları vasıtasıyla membrana girmelerine izin verdiğini göstermektedir. Birkaç flavonoid glikoziti kloroplast ve etioplastlarda da bulunmaktadır.

2

Fenolik bileşiklerin biyosentetik metabolik yolu. HCA (hidroksisinnamik asit) ve flavonoidler, fenilalanin amonyaliaz (PAL) tarafından fenilalaninden üretilen sinnamik asitlerden üretilirler. Sinnamik asit sinamat-4-hidroksilaz (C4H) ve *o*-metiltransferaz tarafından HCA'ya dönüştürülür. 4-kumarat:CoA ligaz (4CL) enzimi hidroksisinnamol CoA (HCA-CoA)'nın oluşumunu katalizler. Aktive olmuş bu molekül lignin ve flavonoid biyosentezinde kullanılır. Flavonoid sentezi kalkon sentaz (CHS) tarafından katalizlenen HCA-CoA ve üç molekül malonil CoA'nın kondenzasyonu ile gerçekleşir. Kalkon daha sonra kalkon izomeraz (CHI), flavanon-3-hidroksilaz (F3OH), isoflavon sentaz (ISF), flavon sentaz (FS), flavonol sentaz (FLS), dihidroflavonol redüktaz (DHFR) ve antosiyenin sentazla (AS) diğer flavonoid altgruplarına dönüştürülür.

Aglikonların yağ bezleri ve mumsu tabakalar gibi lipofilik bölgelerde lokalize oldukları bildirilmiştir (Wollenweber ve Dietz, 1981).

Temel polifenol sınıflarından biri olan flavonoidler en önemli antioksidan özelliğe sahip grup olup kendi içinde 13 alt sınıfa ayrılır. Bunlar; kalkanlar, dihidrokalkanlar, auronlar, flavonlar, flavonollar, dihidroflavonollar, flavanonlar, flavanollar, flavandiollar, antosiyaninler, izoflavonoidler, proantosiyadinler (taninler) ve biflavonoidlerdir (Bravo, 1998). 1990 yılına kadar 5000 tane flavonoid yapısı bildirilmiştir. Flavonoidlerin karbon iskeletini iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan ve 15 karbon atomu içeren, A, B, C halkalarından ibaret difenilpropan (C₆-C₃-C₆) yapısı oluşturur (Şekil 7).



Şekil 7. Flavonoidlerin temel yapısı (a) ve bazı substituentleri (b)

Tablo 2. Flavonoidlerin genel karbon iskeletleri ve taşıdıkları substituentler

Flavonoid	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Luteonil	H	H	OH	OH
Luteonil-7-O-glukozit	H	glc	OH	OH
Kamferol-3-O-soforozit	O-soph	H	H	OH
Kuersetin-3-O-galaktozit	O-gal	H	OH	OH
Galaegin	OH	H	H	H
Kuersetin-4'-O-glukozit	OH	H	OH	O-glc
Kamferol	OH	H	H	OH
Kuersetin	OH	H	OH	OH

A halkası üç karbonlu bir bileşik olan malonil-CoA dan yani glukoz üzerinden fenil alanin ve sinnamik asitten sentezlenirken C ve B halkaları şikimat ve fenilpranoid metabolik yolu üzerinden yine glukozdan sentezlenir. Fenil halkalarının propan zincirine farklı pozisyonlarda bağlanması sebebiyle flavonoid alt sınıfları oluşur. Flavonoid yapılarında yer alan en yaygın substitüenler hidroksil gruplarıdır. Doğal flavonoidlerin yapısında en fazla yedi hidroksil grubu bulunduğu bildirilmiştir (Guliyev ve Harmandar, 2000). Bu hidroksil grupları, reaktif özellikte olup kolaylıkla alkillenebilir ve glikozillenebilirler. Ayrıca taşıdıkları farklı hidroksil gruplar ve onlara bağlı substitüenler flavonoidlerin farklı indirgenme potansiyeli kazanmasına ve bundan dolayı değişik antioksidan aktivite göstermelerine sebep olurlar. Örneğin; flavonoid radikallerinin indirgenme potansiyelleri alkil, peroksil ve süperoksit radikallerinin indirgenme potansiyellerine göre daha düşüktür. Bu nedenle flavonoidler bu oksit türlerini deaktive ederler ve reaksiyonlarının vereceği zararları engellerler. Flavonoidlerin ve *in vitro* metabolitlerinin antioksidan özellikleri nükleer yapılarındaki fonksiyonel grupların düzenlenmesine bağlıdır. Flavan iskeletinden çok substitüentlerin düzenlenmesi antioksidan aktivite için önemli bir faktördür. Çoğu polifenolik antioksidanla tutarlı olarak hidroksil gruplarının hem konfigürasyonu hem de sayısı antioksidan aktivite mekanizmalarını önemli ölçüde etkiler. Serbest radikal temizleme kapasitesi ilk olarak aşağıdaki reaksiyona katılan hidroksil gruplarının yüksek reaktivitesine bağlıdır:



Flavonoidlerin yapıları ile antioksidan aktiviteleri arasında yakın bir ilişki vardır. Örneğin; flavonoid yapısında C-4' pozisyonunda hidroksil grubunun bulunması antioksidan aktiviteyi artırırken serbest 4'-OH grubunun metoksil grubu ile substitüye olması aktiviteyi önemli derecede azaltır (Guliyev ve Harmandar, 2000; Havsteen, 2002). B halkasındaki hidroksil konfigürasyonu SOR ve SNR (serbest nitrojen radikalleri) temizlemede en önemli belirleyicidir. B halkasındaki hidroksil grupları hidroksil, peroksil ve peroksinitrit radikallerine hidrojen ve elektron vererek onları daha kararlı hale getirirler ve bu radikallere oranla daha kararlı flavonoid radikallerinin oluşmasına neden olurlar.

B halkasında 3'4'-katekol yapısı lipit peroksidasyonu inhibisyonunu artırır. Bu düzenlenme ayrıca hidroksil, peroksil ve peroksinitrit radikali temizleyicilerinin en çarpıcı özelliğidir. Bu yapıdaki flavonoidlerin radikalleri de kararlıdır.

A halkasındaki substitusyon antioksidan aktiviteyle zayıf korelasyon gösterir fakat 5-OH'in antioksidan aktiviteye katkısı bulunmaktadır. Flavonoidlerin serbest radikal temizleme aktiviteleri genellikle serbest 3-OH'in varlığına bağlıdır. 3-OH ve 3'4'-katekol yapısı içeren flavonoidlerin on kat kadar daha fazla antioksidan aktivite gösterdikleri bildirilmiştir. 3-OH grubunun flavonoidin kararlılığını artırması dolayısıyla bu etkiyi gösterdiği düşünülmektedir. 3-OH grubunun metil veya glikozil grubuyla yer değiştirmesi aktiviteyi düşürmektedir.

B halkası metoksi gruplarının pozisyonuna duyarlıdır ve metoksi gruplarının bulunduğu yere göre aktivite değişiklik gösterir. 6'-OH/4'-OMe konfigürasyonunu 6'-OMe/4'-OH ile değiştirmek DPPH radikalini temizleme aktivitesini engellemektedir. 3'4'-katekol yapısında 4'-O-metilasyonu antioksidan aktiviteyi düşürmektedir. Örneğin kuersetinin lipit peroksidasyonu inhibisyonu %98 iken 4'-O-metilasyonu ile oluşan tamariksetinin %2.6'dır. Kampferol-3',4'-dimetilelerin peroksil temizleme aktivitesi kampferolünkinin yaklaşık yarısı kadardır. Ayrıca A halkasında metoksi grubu bulunması B halkasının antioksidan aktivitesini etkilemektedir (Heim vd., 2002).

Bu durum göz önüne alındığında kuersetin, kateşin, luteolin ve rutin antioksidan olarak etkili flavonoidlerdendir. Flavonoidlerin sadece antioksidan aktivite değil aynı zamanda antimikrobiyal, antitoksik, antivirütik gibi değişik biyolojik aktivitelere de sahip olduğu bildirilmiştir (Cowan, 1999; Weston, 1999; Havsteen, 2002).

Bir flavonoid alt sınıfı olan antosiyaninler suda çözünen en önemli pigmentlerden olup yüksek yapılı bitkilerin çiçek ve meyve kısmında bulunurlar. Flavonoidlerin bir başka alt sınıfı olan kateşinler insan besininin genel bileşeni olarak tanımlanır ve yeşil çay yapraklarında (epikateşin, epikateşingallat, vs.) bulunmaktadır.

Kinonlar iki keton ile substituye olmuş aromatik halkalardır. Ubikinonlar doğada karakteristik olarak oldukça reaktif bileşiklerdir. Bu bileşikler meyve ve sebzelerin kesildikleri zaman kararmalarından sorumlu olup pek çok redoks reaksiyonda elektron taşıyıcı olarak rol oynayıp ayrıca koenzim rolleri de vardır.

Taninler oldukça hidroksillenmiş moleküller olup protein ve karbohidratlarla suda çözünmeyen kompleksler oluşturdukları için tanince zengin gıdalar teksif özelliğine sahip olup protein çöktürmek amacıyla dericilikte ve tekstil sanayinde kullanılırlar. Molekül ağırlıkları 500 ile 3000 g/mol arasında değişir ve bitkinin hemen her kısmında (kök, gövde, odun, yaprak, meyve) bulunurlar. Bitkisel taninler hidroliz olabilen ve kondanse olabilen taninler diye iki grupta toplanırlar. Hidrolizlenebilen taninler gallik asit içerirler ve

genellikle *D*-glukoz ile çeşitli esterler oluştururlarken kondanse tanninler veya proantosyanidinler, yüksek molekül ağırlığına sahip flavonoid monomerlerinden oluşurlar. Asit, alkali, sıcak su ile ve enzimatik yolla kolaylıkla hidroliz olurlar. Taninler belki de kondenzasyonla bitki dokusu odunun flavan türevlerini oluştururlar. Taninlerin bir başka adı da kinon polimerleridir (Wollgast ve Anklam, 2000).

Kumarinler, benzen ve α -piran halkası ile kaynaşmış fenolik bileşiklerdir. Samanın karakteristik kokusundan sorumludurlar. 1996 yılına kadar en az 1300 tane izole edilmiştir. Kumarinler antitrombotik, antiinflamatuvar ve vazodilatör özelliklere sahiptirler. En fazla kullanılan antikoagülandır.

Terpenoidler, yağ asidi benzeri asetat birimlerinden sentezlenirler. Fakat yağ asitlerinden, dallanmadan dolayı farklılık gösterirler. Bakterilere, virüslere, mantarlara ve protozoaya karşı etkilidirler.

Alkaloidlere heterosiklik azotlu bileşikler de denir. Tıbbi olarak ilk kullanılan alkaloid morfin olup 1805 yılında bulundu. Kodein ve heroin birer morfin türevidirler.

Lektin ve polipeptidler bir veya birden fazla şeker birimi içeren glikoproteinler veya oligomerik proteinler olup immün reaksiyona sebep olabilirler.

Bitkilerde bulunan bir başka bileşik olan propolis, çeşitli ağaçların balsam (koku verici, teskin edici) ham özüdür. Çoğu zaman arı yapışkanı olarak ağaçlardan toplanır. Kimyasal yapısı oldukça karmaşık olup yapısında yukarıda tanımlanan lateksler, terpenoidler, flavonoidler, benzoik asit ve esterleri, substitüye fenolik asitler ve esterler bulunur. Sentetik sinamik asitler propolis ile aynı olup influenza virüsünün hemaglutinasyon aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir (Amoros vd., 1992). HSV-1 mutantlarına, adenovirüslere, poliovirüs ve vesikular stomatitise karşı etkin oldukları da bildirilmiştir. Karışım dışında, bitkilerin çeşitli kısımlarında bulunan organik yapıları bileşiklerden bazıları poliaminler, izotiyosiyanatlar, tiyosülfinatlar ve glukozidlerdir.

Fenolik bileşikler enzimatik mekanizmayla veya direk radikal temizleme mekanizmalarıyla antioksidan fonksiyon gösterdiklerinde tek değerlikli kendi fenoksil radikallerine yükseltgenirler. Son zamanlara kadar, hızlıca radikal olmayan ürünlere dönüştükleri için bu radikalleri statik elektron spin rezonansla (ESR) tanımak güçtü. Zn^{+2} gibi divalent metallerin kullanımı, fenoksil radikaller üzerinde spin sabitleme etkisi yaparak onların yapısal ve kinetik özelliklerinin analizini mümkün kılmaktadır. Bu şekilde metalle spini sabitleştirilmiş fenoksil radikalleri bitki hücrelerinde prooksidan etki gösterebilir (Sakihama vd., 2002).

1.4. Bal Hakkında Bilgi

1.4.1. Tarihçesi

Balın özellikleri ve üretimiyle ilgili bilinen ilk kitap, Sir John Hill tarafından yazılmış 1759'da Londra'da basılmıştır. Arı ve balın tarihçesi incelendiğinde, nektar ve polen üreten çiçekli bitkiler ile bunlardan faydalanan böceklerin 100-150 milyon yıl önce, ilk memelilerin de mevcut olduğu Jurassic/Cretaceous devresinde ortaya çıktığı öne sürülmektedir. Bal üreten arılar 10-20 milyon yıl önce görülmüştür. Bal ile ilgili ilk resmi dokümanlar Anadolu'da Çatalhöyük'te bulunmuştur. M.Ö. 5000 yıllarında Sümerlerin yazılı belgelerinde bal üzerine bilgiler mevcuttur. Benzeri bilgiler Anadolu'daki başka bir uygarlık olan Hititlerin yazıtlarında da bulunmuştur. M.Ö. 3200'de Aşağı Mısır Kralı I. Dynasty, krallık sembolü olarak arıyı seçmiş ve krallığında bununla ilgili figürlere yer vermiştir. Musevi topluluklarında ise Tevrat ve Talmut'ta yazıldığı gibi Kur'anı Kerimde de balın yararlarından söz edilmektedir. Roma imparatorluğuna ait bazı yazıtlarda da bal ve arıcılık üzerine çeşitli bilgiler bulunmaktadır (Ötleş, 1995).

1.4.2. Balın Bileşimi

Türk Standartları Enstitüsüne göre bal, bitkilerin çiçeklerinden ya da diğer canlı kısımlarında bulunan nektar bezlerinden salgılanan nektarın ve bitki üzerinde yaşayan bazı böceklerin, bitkilerin canlı kısımlarından yararlanarak salgıladığı tali maddelerin, bal arıları (*Apis mellifera*) tarafından toplanması, vücutlarında bileşimlerinin değiştirilip petek gözlerine depo edilmesi ve buralarda olgunlaşması sonucunda meydana gelen tatlı bir üründür. Bal, arıların en önemli gıda maddesi olup bal olmadan arılar yaşamlarını sürdüremezler. Arılar kış aylarında aç kalmamak için petek gözlerini balla doldururlar. Genel olarak bileşimi toplandığı bitki kaynağına göre değişmekle birlikte % 16-20 'sı su geri kalanı ise karbohidratlar, enzimler, vitaminler ve minerallerden oluşmaktadır (Sönmez, 1979; Rodriguez vd., 2004).

Balın kuru maddesinin % 95'i karbohidratlardan oluşmuş olup başlıca şekerleri glukoz, fruktoz ve ribozdur. Sakkaroz (çay şekeri), laktoz (süt şekeri) ve maltoz (malt şekeri) daha az bulunan disakkaritlerdendir. Balın pH'sı 3.5-4.5 arasında değişim gösterip balda bulunan asitler formik asit başta olmak üzere asetik asit, biturik asit, sitrik asit, kaproik asit, laktik asit ve tartarik asitlerdir. Balda en fazla bulunan enzimlerden biri

diastaz (amilaz) olup invertaz, katalaz, glukoz oksidaz ve fosfatazların bir kısmı bitkiden bir kısmı arının midyesinden bala salgılanmaktadır. Bal vitamin deposu olup tiamin, riboflavin, folik asit, pridoksin, pantotenik asit, nikotinamid, biotin gibi B vitaminleri yanında askorbik asit ve karotenoidler ve α -tokoferollerini içermektedir. Balın mineral bileşimi % 0.02 ile % 1 arasında değişim gösterip başta K, Ca, P olmak üzere Fe, Cu, Zn, Se, F ve Cl bulunmaktadır (Rashed ve Soltan, 2004; Sönmez, 1979; Yao vd., 2004).

Arılar arı ürünü olarak balın yanında polen, arı sütü, propolis gibi yan ürünler üretirler. Polen, çiçekli bitkilerde çiçeklerin erkek organları olup protein, mineral maddeler, vitaminler ve iz elementler bakımından çok zengin bir besin maddesidir. İşçi arılar çiçekleri ziyaret ettiklerinde vücutlarına yapışan poleni arka ayaklarında kovana taşırlar. Arılar poleni yavruların ve genç işçi arıların beslenmesinde kullanırlar. Polen kovan önlerine yerleştirilen polen tuzakları ile toplanır, kurutularak veya taze olarak derin dondurucularda -18 °C 'de saklanıp saf olarak veya balla karıştırılarak tüketilir.

Propolis (bazen "arı zambkı" olarak da bilinir) bal arılarının bitki, tomurcuk ve filizlerinden topladığı reçinemsii maddenin genel ismidir (Chemid, 1996). Propolis ismi yunanca savunma anlamına gelmekte olup arıların ve kovanın korunmasından görevlidir (Ghisalberti, 1979). Ham propolisin tam bileşimi kaynağa göre değişir. Genelde %50 reçine ve sebze plesenki, %30 balmumu, %10 esansiyel ve aromatik yağlar, %5 polen ve %5 organik kalıntıları da içeren çeşitli diğer bileşiklerden oluşmuştur (Cisarino vd., 1987). Propolis tarafından iyileştirilebilen hastalıklar arasında nefes darlığı, egzema, göz enfeksiyonları, boğaz enfeksiyonları, ülser ve böbrek enfeksiyonları yer alır (Hill, 1977). %10 oranlarına kadar propolisle karıştırılmış bal satılmaktadır. Propolisin antibiyotik, antifungal, antiviral özelliklerinin olduğu ve bol miktarda flavanoid içerdiği için antioksidan etkisinin baldan ve BHT den 2 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (URL-1, 2004; Russo vd., 2004).

Arısütü, 6-12 günlük işçi arıların kafalarındaki çene altı (mandibular) ve hipofarenks bezlerinden salgılanan, besin değeri ve biyolojik aktivitesi çok yüksek değerli bir ürün olup kovan içerisindeki genç larvaların ve kraliçe arının beslenmesi için kullanılır. Hayatı boyunca arı sütü ile beslenen kraliçe arılar 3-4 yıl yaşayabilirler fakat bal ve polenle beslenen işçi arılar sadece 5-6 hafta yaşayabilirler. Arı sütü içerisindeki 10-hidroksi-dekanoik asit doğal bir antibiyotik olup bakterilerin, virüslerin ve fungusların çoğalmasını önlemektedir. Arı sütünün içinde proteinler, şekerler, serbest esansiyel amino asitler ve yağ

asitleri ile B vitaminleri, mineraller, iz elementler ve antioksidan maddelerin olduğu belirlenmiştir (Sönmez,1979; Nagai ve Inoue, 2004; Santos vd., 2005).

1.4.3. Balın Yararları

Enerji değeri çok yüksek bir besin olan bal bebeklerin, çocukların, sporcuların ve yaşlıların beslenmesinde kullanılır. Bal doğal bir antibiyotik gibidir ve binlerce yıldan beri yara ve yanıkların tedavisinde, mide rahatsızlıklarında ve cilt rahatsızlıklarında yoğun olarak kullanılmaktadır. Özellikle son yıllarda Avrupa'da ve Amerika'da yanık merkezlerinde tedavi amacıyla bal kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bal kanser de dahil olmak üzere bir çok hastalıkta enerji ve şifa kaynağı olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Dustmann, 1993 ; FAO, 1996; URL-1, 2004).

Balın gerçek özelliklerinden biri uzun süre bozulmadan kalmasını sağlayan antibiyotik özellikleridir. Buna ek olarak bal mikroorganizmalar nedeniyle bozulmasına direncini artıran yüksek osmatik basınca sahiptir (White, 1979). Balın mide ve bağırsakla ilgili bozukluklarda (Haffeejee vd., 1985; Ladas vd., 1995), yara ve yanıkların iyileşmesinde (Efem, 1988; Subrahmanyam, 1991) bir antimikrobiyal ajan olarak etkili olduğu (Ladas vd., 1995; Ali vd., 1991), akut ve kronik mide lezyonlarına karşı gastrik koruma sağladığı bildirilmiştir (Ali, 1991; Ali, 1995). Doğal antioksidanlar özellikle flavonoidler antibakteriyel, antialerjik, antitrombotik ve vazodilatör (kan damarı lümenlerinin genişlemesi ile ilgili) hareketleri kapsayan geniş bir aralıkta biyolojik etki gösterirler (Cook ve Sammon, 1996).

Balın antimikrobiyal aktivitesi balın doğasında bulunan glukoz oksidaz tarafından üretilen hidrojen peroksitle ve fenolik bileşiklerle ilişkilidir. Balın antioksidan aktivitesi yapısında bulunan askorbik asit, α -tokoferoller, β -karotenler gibi bileşikler yanında çok sayıda polifenolik bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Farklı botanik orijinli ballarda birçok fenolik bileşik tanımlanmaktadır (Frankel vd., 1998). Fenolik bir bileşik olan 3-aminoasetofenon kestane balının uçucu bir bileşeni olup kestane balının tanınmasında önemli bir işaret (markır) oluşturur (Bonaga ve Guimanini, 1986).

1.5. Mineraller Hakkında Bilgi

Mineral besin elementleri, canlıların gelişimi ve hayatlarını devam ettirebilmeleri açısından hayati önem taşırlar. Canlı sağlığı açısından, özellikle de insan sağlığı açısından mineral elementlerin çeşitli gıdalar aracılığı ile günlük belli oranlarda vücuda alınmaları zorunludur. Her bir mineral elementin hem bitki hem de insan bünyesinde birbirlerini tamamlayan farklı fonksiyonları vardır ve bu çok çeşitli mineral elementlerin sadece bir tanesinin bile eksikliği çok ciddi zararlara neden olabilmektedir. Mineraller, kan ve kemik oluşumu, vücut sıvılarının doğru oluşumu, sağlıklı sinir fonksiyonları gibi pek çok vücut fonksiyonu için gereklidir. Vitaminler gibi koenzim fonksiyonuna sahip mineraller, vücudun enerji üretimi, büyümesi ve iyileşmesi gibi fonksiyonlarını yerine getirmesine imkân verirler. Mineral açıdan zengin bitkisel kaynaklar, vücut için gerekli mineralleri temin etmede önemli rol oynarlar. Her bitki türü farklı sayıda ve farklı miktarlarda mineral içerir.

Vitaminlerin ve minerallerin günlük alınması gereken miktarları (RDA, Recommended Daily Allowance) American National Academy of Science tarafından tespit edilmiştir. Tablo 3 balda analizi yapılan minerallerin günlük alınması gereken mineral seviyelerini göstermektedir.

Tablo 3. Bazı mineral elementlerin günlük alınması gereken miktarları (RDA) (Collins, 2004; URL-2, 2004; Cheraskin, 2004; Snow, 2004)

Mineral Element	Normal Seviye	Tolere Edilebilir (Maksimum)
Kalsiyum (Ca)	800 – 1200 mg	2500 mg
Sodyum (Na)	500 mg	-
Potasyum (K)	2000 – 3500 mg	-
Demir (Fe)	10 – 18 mg	45 mg
Mangan (Mn)	2.5 – 7 mg	11 mg
Bakır (Cu)	1.5 – 3 mg	10 mg
Çinko (Zn)	12 – 15 mg	40 mg
Krom (Cr)	50 – 200 µg	1000 µg

Sodyum su dengesi ve etkin mide, sinir ve kas fonksiyonu için kan pH'sının seviyeleşmesi ve potasyumun hücre zarlarından dışarı pompalanması için uygun ortamı sağlamaya yardım eder. Sodyum azlığı mide krampları, iştahsızlık, dehidrasyon, depresyon, baş dönmesi, yorgunluk, hayal görme, baş ağrısı, kalp çarpıntısı, tat duygusu

bozukluğu, uyuşukluk, düşük kan basıncı, hafıza bozukluğu, kas zayıflığı, tikslenme, zayıf koordinasyon, nöbet ve kilo kaybına sebep olur.

Kalsiyum kemik ve dişlerin yapı, oluşum ve sürdürülmesinde temel bir mineraldir. Bu temel mineral aynı zamanda kan basıncının ayarlanması, kan pıhtılaşması, kas büyümesi, sinir geçirme, kanser önleme, enerji üretme, yağ parçalama gibi olaylarda etkin rol oynar. Azlığı eklem ağrıları, tırnak kırılması, depresyon, çarpıntı, hayal görme, yüksek kan kolesterolü, kalp çarpıntısı, yüksek tansiyon, hiperaktif egzama, uykusuzluk, kas krampları, sinirlilik, renk solukluğu, romatoid artirit, raşitizm ve diş çürütmesine yol açar.

Potasyum, kalsiyum ve fosfordan sonra vücutta en fazla bulunan üçüncü mineraldir. Potasyum vücut sıvılarının dengesinin sürdürülmesine, sinir sinyallerinin iletimine, insülinin serbest bırakılmasına ve kas gerilmesine yardımcı olur. Potasyum eksikliği yorgunluk, zayıflık, ruhsal depresyon, düşük tansiyon, kas yorgunluğu, tuz tutulması ve normal dışı kalp atışlarına sebep olur.

Demir, kırmızı kan hücrelerinde ve kas dokusu proteinlerinden hemoglobinde bulunur. Miyoglobinde bulunan bir kofaktördür. Demir eksikliği vücut dokularını oksijenden yoksun bırakır ve anemiye neden olur. Demir, bağışıklık fonksiyonunu güçlendirdiğinden, demir eksikliği aynı zamanda enfeksiyonlara karşı direncin düşmesine neden olur. Hamile kadınlar, iki yaş altı çocuklar, vejetaryenler ve hemoroidli ya da kanamalı mide ülserli ve kan vericiler gibi kanamalı durumdakiler, özel olarak dışarıdan yüksek oranda demir alması gereken insanlardır.

Çinko yaraların iyileşmesinde, hücrelerin yenilenmesinde rol oynadığı gibi karbonik anhidraz enziminin kofaktörüdür.

Kromun yağ asitleri metabolizması, damar tıkanıklığı ve kardiovasküler hastalıkları riskini azaltmada yardımcı bir rol oynadığına dair kanıtlar vardır. Krom yetersizliği, alkole karşı dirençsizlik, kan şekerinde yükselme ve diyabet benzeri belirtiler gösterir.

Bakır esansiyel bir element olup: kanda hemoglobin oluşumuna yardımcı; demirin absorpsiyonunu ve kullanımını düzenleyici, kan basıncının ve kalp atışlarının ayarlanmasına yardımcı, kan damarlarının, kemiklerin, tendonların ve sinirlerin güçlendirilmesi, normal deri ve saç pigmentasyonunun emniyet altına alınmasında rol oynar. Bakır eksikliği, kırılğan ve renksizleşen saçlar, vücut iskeletinde kusurlar, anemi, yüksek kan basıncı gibi belirtilerle ortaya çıkar.

Manganez minerali kemik oluşumu ve bakımı, beyin fonksiyonlarının normal çalışması, bazı enzimlerin üretimi ve bağ dokuları için çok gereklidir. Protein ve genetik

malzemelerin sentezine katkıda bulunur ve besinlerden enerji üretmeye yardımcı olur. Aynı zamanda antioksidan görevi görür ve normal kan pıhtılaşmasına yardımcı olur. Manganez, glikoz metabolizmasının anahtar enziminde önemli bir yardımcı faktördür. Azlığı diyabete ve sık sık pankreas sorunlu erken doğumlara sebep olabilmektedir. Ayrıca mangan eksikliği eklem ağrılarına, kanda şekerin yükselmesine, kemik problemlerine ve hafıza zayıflamasına da neden olabilmektedir (URL-3, 2004).



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmalarda kullanılan madde ve malzemelerin büyük bir kısmı proje kod no 2003.111.002.6 olan KTÜ Araştırma Fonu Projesinden temin edilmiş olup geri kalanları KTÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü laboratuvarlarından ve KTÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı'ndan temin edildi. Denemelerde kullanılan malzemeler ve satın alındıkları firmaları gösteren bilgiler Tablo 4'de verilmektedir.

Tablo 4. Denemelerde kullanılan malzemeler

Malzeme ve Cihaz Adı	Markası
Uv-vis spektrofotometre	LaboMed ve LKB Ultraopec K4053
Rotary evaporatör	Buchi 461 Water Bath
İnkübatör	Nüve
Vorteks karıştırıcı	Heidof
Su banyosu	Nüve
Santrifüj	MSE Mistral 2000
Etüv	Nüve
Derin dondurucu	Bosch
Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi	ATI Unicam 929 model AAS

2.2. Kullanılan Çözeltiler

Denemelerde kullanılan çözeltilerin hazırlanışları Tablo 5'de özetlenmiş olup tüm reaktifler analitik saflıkta olup çözeltiler bidistile ve deiyonize suda hazırlandı. Denemelerimizde kullandığımız kimyasal maddelerin satın alındıkları ticari firmaların adları Tablo 6'da gösterilmektedir.

Tablo 5. Denemelerde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları

0.2 N Folin-Ciocalteu	2 N Folinden 1:10 oranında distile su ile seyreltilerek kullanıldı.
% 2 Na ₂ CO ₃	2 g Na ₂ CO ₃ 100 mL bidistile suda çözüldü.
0.2 M pH 7.0 Fosfat tamponu	1.488 g NaH ₂ PO ₄ , 1.080 g NaHPO ₄ , 50-70 mL distile suda çözüldü pH 7.0'ye ayarlanıp 100 mL'ye distile su ile tamamlandı.
Stok BHT (10 mg/ mL)	100 mg BHT 10 mL etanol:aseton karışımında çözüldü.
Stok Troloks® (10 mg/mL)	100 mg Trolox 10 mL etanol karışımında çözüldü .
Stok Askorbik asit(10 mg/mL)	100 mg askorbik asit 10 mL etanol : su (1:1) karışımında çözüldü.
0.6 M HCl	5.3 mL %37 HCl (d=1.19 g/mL) saf suda çözüldürülerek 100 mL'ye tamamlandı.
0.6 M NaNO ₂	4.14 g NaNO ₂ saf suda çözümlenerek 100 mL çözelti hazırlandı.
1.3 M NaOH	Ayarlı NaOH suda seyreltilerek elde edildi.
0.3 M NaOH	Ayarlı NaOH suda seyreltilerek elde edildi.
pH 7.4 0.2 M KH ₂ PO ₄ -K ₂ HPO ₄	10.672 g KH ₂ PO ₄ ve 17.25 g Na ₂ HPO ₄ alınıp ayrı ayrı distile suda çözümlenerek pH 7.4 seyreltik asit veya baz ile pH ile ayarlandı ve 1L'ye tamamlandı.
2.5 mM tirozin	0.3263 g tirozin 0.1 M pH 7.4 fosfat tamponu ile 500 mL'ye tamamlandı.
pH 7.8 50 mM Fosfat tamponu	0.347 g KH ₂ PO ₄ ve 1.411 g Na ₂ HPO ₄ ayrı ayrı alınıp 50 mL distile suda çözülür ve çözeltiler birleştirilip pH 7.8'e ayarlandı ve 250 mL'ye tamamlandı.
0.2 mM FeCl ₂ .4H ₂ O	3.976 mg FeCl ₂ .4H ₂ O alınarak 100 mL'ye tamamlandı.
0.05 mM Ksantin	0,38 mg alınıp 10 mL pH 7.8 fosfat tamponu, 5 mL metanol, 0.5 mL Tween-20 çözülür ve 50 mL'ye distile su ile tamamlanır
0.05 U /mL Ksantin Oksidaz	110 µL Ksantin oksidaz 10 U enzimden alınıp 4 mL ye tamponda seyreltildi.
0.75 mM NBT	5 mg NBT 8 mL distile suda çözüldü.
10 mM peroksinitrit	10 mL stok peroksinitrit (25 mM) çözeltisi 1 M NaOH ile 25 ml'ye tamamlandı.
% 10 trikloroasetik asit (TCA)	10 g TCA 100 mL distile suda çözüldü.
0.1 mM DPPH	3.943 mg DPPH 100 mL metanolde çözüldü.
%1 K ₃ Fe(CN) ₆	1 g K ₃ Fe(CN) ₆ distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
%1 FeCl ₃	1 g FeCl ₃ distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
B reaktifi	4.4728 g KCl bir miktar distile suda çözülür ve üzerine 1.282 mL HCl eklenip pH 1.8'e ayarlanarak distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

Tablo 6. Denemelerde kullanılan kimyasalların satın alındıkları firmaların ticari adları

Madde Adı	Satın Alındığı Firma
Askorbik asit	Sigma
TCA (trikloroasetikasit)	Merck
Folin-ciocalteau reaktifi	Fluka
Troloks® (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit)	Aldrich
K ₃ Fe(CN) ₆	Merck
FeCl ₂ .4H ₂ O	Sigma
FeCl ₃	"
NaH ₂ PO ₄	Merck
Na ₂ HPO ₄	"
Na ₂ CO ₃	"
NaOH	"
MnO ₂	"
HNO ₃	"
H ₂ O ₂	"
HCl	"
Kateşin	Sigma
Etanol	Merck
Metanol	"
Aseton	"
Ksantin	"
Ksantin Oksidaz (10 U)	Calbiochem
NBT (Nitro blue tetrazolium chloride)	"
<i>n</i> -piridin	"
DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)	Calbiochem
BHT(2,6-di-tert-bütül-4-metilfenol)	Merck
Sodyum Borat (Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O)	Sigma
MSTFA (N,O-Bis(trimetilsilil)trifloroasetamid) +	Sigma
%1 TMCS (trimetilklorosilan)	
R ₁ (o-dianisidin+Fe ⁺² çözeltisi)	Abbott
R ₂ (H ₂ O ₂ çözeltisi)	Abbott

2.3. Örneklerin Toplanması

Tek floralı beş adet kestane balı örneği (*Castanea sativa*) ve çeşitli dağ çiçeklerinden oluşan altı adet karışık floralı bal örnekleri Türkiye'nin çeşitli yörelerinden toplanmıştır. Kestane balları Doğu Karadeniz Bölgesinden, karışık floralı ballar Karadeniz Bölgesi, İç Anadolu ve Doğu Anadolu bölgesinden toplanmıştır. Rus kestane balı ise Trabzon'daki Rus Pazarından satın alınmıştır. Çalışılan balların üç tanesi TEMA vakfı tarafından sağlanmıştır. Bu ballar Tema Vakfı'nın Artvin-Camili'de yürüttüğü "Doğal Varlıkları Koruma Amaçlı Kırsal Kalkınma Projesi" kapsamında üretilen katkısız, doğal ballardır.

Doğayı tahrip etmeden yöre halkına gelir sağlamayı da amaç edinen proje, çevre kirliliğinden tamamen korunmuş bu bölgede saf ve sağlıklı bal üretme misyonunu da üstlenmiştir. Tema balı kestane, kekik-geven, yayla balı olmak üzere üç değişik türde olup Tema vakfı tarafından satılmaktadır.

Tablo 7. Denemelerde kullanılan bal örneklerinin alındığı bölgeler ve türleri

İlçe-Şehir	Bölge	Bal tipi
Sürmene(Trabzon)	Doğu Karadeniz Bölgesi	Kestane
Anzer (Rize)	Doğu Karadeniz Bölgesi	Çiçek
Yomra(Trabzon)	Doğu Karadeniz Bölgesi	Kestane
Artvin (Tema)	Doğu Karadeniz Bölgesi	Çiçek (Kekik-geven)
Artvin (Tema yayla)	Doğu Karadeniz Bölgesi	Kestane
Artvin (Tema)	Doğu Karadeniz Bölgesi	Çiçek
Trabzon (Rus Pazarı)	Doğu Karadeniz Bölgesi	Kestane
Yozgat	Doğu Anadolu Bölgesi	Çiçek
Trabzon	Doğu Karadeniz Bölgesi	Kestane
Kırıkkale	İç Anadolu Bölgesi	Çiçek
Iğdır	Doğu Anadolu Bölgesi	Çiçek

2.4. Bal Ekstraktlarının Hazırlanması

Bal örneklerinden 20'şer gram tartılıp destile metanolle 100 mL'ye tamamlandı. Metanolle yeterli ekstraksiyon yapılabilmesi için çalkalayıcıda 4 saat çalkalandıktan sonra metanolde çözünmeyen kısım süzülerek uzaklaştırıldı. Bu şekilde %20'lik (0.2 g/mL) metanolik bal stok çözeltileri hazırlanarak şişelendi ve gerekli denemelerde kullanılmak üzere +4 °C'de saklandı.

2.5. IC₅₀ Değerlerinin Bulunması

IC₅₀ değerlerinin bulunması için farklı konsantrasyonlarda çalışmak gereklidir. Bu nedenle çalışmalarımızda dört veya beş konsantrasyonda ölçüm yapıldı. Numunelerin yeterli miktarda farklı konsantrasyonları hazırlanıp absorbans ölçümleri yapılır ve absorbanslar konsantrasyona karşı grafiğe geçirilir. Maksimum absorbansın yarısına karşılık gelen konsantrasyon miktarı IC₅₀ değerini verir. IC₅₀ µg/mL, mg/ mL veya g/mL gibi birimlerle ifade edilir.

2.6. Toplam Fenolik Madde Tayini

Metot, suda ve diğer organik çözücülerde çözünmüş olan fenolik bileşiklerin folin reaktifi ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan mor-nenekşe renkli kompleks 700 nm'de maksimum absorbans oluşturur (Slinkard ve Singleton, 1977). Sonuçların karşılaştırılması amacıyla standart fenolik bileşik olarak kateşin kullanıldı. Tayine başlamadan önce kateşinin 0.625, 0.312, 0.156, 0.078, 0.039 ve 0.0195 mg/mL'lik konsantrasyonları hazırlandı. Konsantrasyona karşılık gelen absorbans değerleri bulunarak standart grafik çizildi. Standart grafiğe göre bal örneklerinin de toplam fenolik madde miktarları mg/ml cinsinden hesaplandı. Her bir örnek ve değişen konsantrasyonlarda standart için uygulanan pipetleme işlemleri Tablo 8'de özetlenmiş olup absorbanslar 700 nm'de ölçülerek grafik çizildi.

Tablo 8. Toplam polifenolik madde tayininde yapılan pipetleme işlemleri

	Kör	Standart	Test
Distile su	0.1 mL	-	-
Standart (değişik konsantrasyonlarda)	-	0.1 mL	-
Bal numunesi (0.2 g/mL)	-	-	0.1 mL
Distile su	5 mL	5 mL	5 mL
0.2 N Folin Reaktifi	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL
%2 Na ₂ CO ₃	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL
Tüpler vorteks ile karıştırıldı ve 3 dakika sonra 700 nm'de köre karşı absorbans okundu			

2.7. Süperoksit Anyonu Temizleme Aktivitesi Tayini

Robak ve Gryglewski (1988)'nin metodu modifiye edilerek kullanıldı. Süperoksit anyonu ksantin-ksantin oksidaz sistemi kullanılarak oluşturuldu. Reaksiyon ortamına ilave edilen NBT süperoksit anyonu ile renkli kompleks (formazan) vermekte ve ortama konulan test numunesi bu rengi ne kadar azaltırsa o kadar yüksek aktivite göstermektedir. Tablo 9'daki pipetleme işlemleri yapılarak ve beş farklı konsantrasyonda (0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 g/mL) paralel çalışılarak 560 nm'de absorbans değerleri okundu. Konsantrasyona karşı absorbanslar gelecek şekilde grafik çizildi ve her bir örnek için %50 süperoksit anyonu inhibisyonunu gerçekleştiren numune konsantrasyonları (IC₅₀) bulundu. IC₅₀ değeri en düşük olan örnek en etkili olanıdır.

Tablo 9. Süperoksit anyonu temizleme aktivitesi tayininin pipetleme işlemleri

	Kör	Test	Standart
Tampon	1.9 mL	1.8 mL	1.8 mL
Ksantin	100 µL	100 µL	100 µL
Ksantin Oksidaz	-	100 µL	100 µL
NBT	100 µL	100 µL	100 µL
Numune (değişik konsantrasyonlarda)	100 µL	-	-
Standart (değişik konsantrasyonlarda)	-	-	100 µL

10 dakika 25 °C’de inkübasyondan sonra 560 nm’de absorbans okundu.

2.8. Peroksinitrit Temizleme Aktivitesi Tayini

Peroksinitrit temizleme aktivitesi için gerekli olan peroksinitritin sentezi laboratuarda gerçekleştirildi. Bu amaçla Beckman ve arkadaşlarının geliştirdiği metodun Koppenol vd., (1996) ile daha sonra Saha vd., (1998) tarafından geliştirilen metodun modifikasyonu ile gerçekleştirildi. 0.7 M HCl içeren 0.6 M H₂O₂ çözeltisinin 0.6 M NaNO₂ ile karıştırılmasıyla oluşan peroksinitröz asit (HONOO), kararlılığı çok düşük olduğundan dolayı 1.3 M NaOH çözeltisi ile karıştırılarak nispeten çok daha kararlı olan bazik pH’ya sahip peroksinitrit (ONOO⁻) çözeltisi elde edildi. Her bir erlenedeki çözeltinin sistemdeki akışı 10 mL/s olacak şekilde ayarlandı. Akış hızının sabit tutulmasını sağlayabilmek için de vakum oluşturmada su trompu yerine vakum pompası tercih edildi. Bu şekilde mümkün olan en yüksek konsantrasyonda peroksinitrit ve en düşük miktarda yan ürün elde edilmeye çalışıldı. Bir tuzak şişesi kullanılarak sentez sırasında ilk gelen kısım toplama erleni döndürülmek suretiyle alınmadı ve çözelti rengi tamamen sarıya döndükten sonraki kısım toplama kabında biriktirildi.

Düzenekte 150 mL’lik erlenler ve 1 mm çapında plastik borular kullanıldı. Çözelti hacimleri ise 100 mL olarak hazırlandı. Sentezlenen peroksinitritin bozunmasını yavaşlatmak amacıyla soğuk ortamlarda daha kararlı olduğu bildirildiğinden toplama kabı buz banyosunda muhafaza edildi. Reaktif çözeltiler de benzer şekilde buz banyosunda soğutuldu.

Elde edilen bazik peroksinitrit çözeltisi, ortamdaki fazla hidrojen peroksitten kurtulmak için MnO₂ ile muamele edildi. Bu amaçla sentezlenen peroksinitrit çözeltisi bir erlen içinde MnO₂ ile 10 dakika buz banyosunda karıştırıldı ve sonra ince gözenekli süzgeç

kağıdı kullanılmak suretiyle süzülerek tayinlerde kullanılan peroksinitrit çözeltisi elde edildi.

Sentezlenen peroksinitritin konsantrasyonunu belirlemek amacıyla spektrofotometrik yöntem kullanıldı. Bunun için peroksinitrit çözeltisinin 302 nm dalga boyunda gösterdiği absorbans ölçüldü. Lambert-Beer eşitliğine göre (Eşitlik 10) ışın yolu (b) 1 cm alınarak, ölçülen absorbans (A) peroksinitritin bu dalga boyundaki molar absorptivite katsayısı (ϵ_{302}) olan $1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 'e bölünerek konsantrasyon belirlendi.

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c \quad \rightarrow \quad c = \frac{A}{\epsilon \cdot b} \quad (10)$$

Peroksinitrit çözeltisinin her kullanımdan önce mutlaka spektrofotometrik yöntemle konsantrasyonu belirlendi. Çalışma sırasında çözelti buz banyosunda bekletildi. Bu sayede istenilen konsantrasyonda peroksinitrit ile çalışılması mümkün oldu.

Peroksinitrit temizleme aktivitesi Ketsawatsakul vd., (2000) ve Beckman ve Chen (1994) tarafından önerilen metodların modifikasyonu ile tayin edildi. 0.8 mL 0.1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ tamponu (pH 7.4) 100 μL 'lik değişik konsantrasyonlarda (0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 g/mL) numune çözeltileriyle karıştırıldı ve 0.1 M fosfat tamponuyla hazırlanmış 0.8 mL 2.5 mM tirozin çözeltisiyle karıştırıldı. 100 μL peroksinitrit (70 mM) ve ona eşdeğer miktarda 100 μL 0.21 M HCl çözeltisi ile karıştırılıp hızlıca vortekslendi. Reaksiyon karışımları 37 °C'de 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda karışımların pH'sı 2 mL 0.2 M sodyum borat ilavesiyle pH 9.5 ile 10 arasına getirildi. Karışımların hacimleri distile su ile 4 mL'ye tamamlanarak 430 nm'de absorbanslar okundu. Absorbanslar konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek $y=ax+b$ denklemlerinden her bir örneğin IC_{50} değerleri hesaplandı. IC_{50} peroksinitrit konsantrasyonunu %50 oranında azaltan madde miktarı olarak tanımlanır.

2.9. DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini

DPPH radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak satın alınabilen bir radikal olup denelerimizde satın alınan bu radikalın 0.1 mM'lık metanolik çözeltisi kullanıldı. Denemelerde Hatano vd., (1989) metodu kullanıldı. Metanolik bal numuneleri değişik konsantrasyonlarda hazırlandı (0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 g/mL). Eşit hacimde DPPH çözeltisi ve numuneler karıştırılıp oda sıcaklığında 50 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre

sonunda DPPH'nin maksimum absorbans verdiği 517 nm'de absorbanslar okundu. Kör olarak DPPH çözeltisi ve numunenin çözüldüğü çözücü kullanıldı. Bulunan absorbanslar ve karşılık gelen konsantrasyonlar grafiğe geçirilerek IC₅₀ değerleri g/mL cinsinden hesaplandı.

2.10. Fe (III) İndirgeme Antioksidan Kuvveti (FRAP) Tayini

Oyaizu (1986) tarafından geliştirilen metoda göre indirgeme kuvveti numunelerin dolaylı olarak toplam indirgeme potansiyelini göstermekte olup Fe⁺³ → Fe⁺² indirgenmesi ile meydana gelen Fe⁺², K₃(Fe)CN₆ 700 nm'de absorbans veren renkli kompleks oluşturur. Sonuçlar, indirgeme potansiyeli yüksek ve aynı zamanda standart bir antioksidan madde olan askorbik asit ile karşılaştırılmak suretiyle yorumlandı. Konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizildi. Bu metotta artan absorbans artan indirgeme kuvvetini gösterir. Denemelerde üç farklı konsantrasyonda (0.05, 0.1, 0.2 g/mL) çalışılmış olup yapılan pipetleme işlemleri Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. İndirgeme kuvveti tayini için deney şartları

	Hacimler (mL)		
	Kör	Standart	Test
Distile su	1.0	-	-
Standart (değişik konsantrasyonlarda)	-	1.0	
Numune (değişik konsantrasyonlarda)	-	-	1.0
0.2 M KH ₂ PO ₄ -K ₂ HPO ₄ tamponu (pH 6.6)	2.5	2.5	2.5
%1 K ₃ Fe(CN) ₆	2.5	2.5	2.5
50 °C'de 20 dakika inkübasyon			
%10 TCA	2.5	2.5	2.5
3000 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve üst fazdan 2.5 mL alınarak			
Distile su	2.5	2.5	2.5
%1 FeCl ₃	0.5	0.5	0.5
FeCl ₃ eklendikten tam 4 dakika sonra 700 nm'de absorbans okundu.			

2.11. Demir Bağlama Aktivitesi Tayini

Demir bağlama aktivitesi tayini Dinis vd., (1994) metoduna göre yapıldı. Ortama miktarı belli oranda Fe⁺² katılmakta ve ortama katılan test numunesi Fe⁺² bağlama kapasitesi oranında Fe⁺²'yi bağlamaktadır. Daha sonra ortama demir ile şelat oluşturmak

üzere 593 nm'de renkli kompleks veren ferrozin ilave edilmekte ve test numunesinin bağlayamadığı demir, ferrozin tarafından bağlanmaktadır. En yüksek absorbanası kör vermektedir. Numune ve standartların demir bağlama oranları köre oranla % olarak verilmektedir ve aşağıdaki formüle göre hesaplanmaktadır (Eşitlik 11).

$$\% \text{ Demir bağlama aktivitesi} = \frac{\text{Körün absorbanası} - \text{Numunenin absorbanası}}{\text{Körün absorbanası}} \times 100 \quad (11)$$

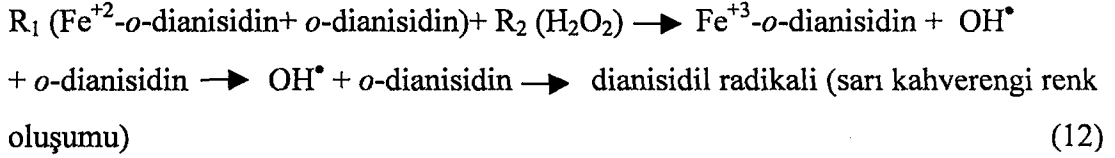
Deney esnasında yapılan pipetleme işlemleri Tablo 11'deki gibi olup numuneler dört farklı konsantrasyonda (0.0125, 0.025, 0.05, 0.2 g/mL'lik metanolik bal çözeltileri) ve paralel olarak çalışılmıştır.

Tablo 11. Demir bağlama aktivitesi tayini için deney şartları

	Kör	Test	Standart
Numune (değişik konsantrasyonlarda)	-	0.2 mL	-
Standart (değişik konsantrasyonlarda)	-	-	0.2 mL
Distile su	1.2 mL	1 mL	1 mL
0.2 mM FeCl ₂ .4H ₂ O	0.2 mL	0.2 mL	0.2 mL
Ferrozin	0.4 mL	0.4 mL	0.4 mL
Karışımlar vortekslendi ve tam 10 dakika sonra 562 nm'de absorbanas okundu.			

2.12. Potansiyel Serbest Radikal Reaksiyonlarına Karşı Toplam Antioksidan Güç (TAR) Tayini

Bu tayin Erel (2003) metodu modifiye edilerek yapılmıştır. Fe⁺²-o-dianisidin çözeltisi ve H₂O₂ çözeltisi Fenton tipi bir reaksiyon vererek OH[•] radikalini oluşturmaktadır. Oluşan bu radikal düşük pH'larda renksiz o-dianisidin moleküllerini, sarı-kahverengi rengindeki dianisidil radikallerine oksitlemektedir (Şekil 8). Dianisidil radikalleri üzerinden başlayan bu oksidasyon sonucu dianisidil radikalleri de kendi aralarında reaksiyona girerek büyük kompleksler oluşturmakta, diğer oksidasyonlara neden olmakta ve zincirleme oksidasyon reaksiyonları gerçekleşmekte ve oluşan renk giderek koyulaşmaktadır. Fakat ortama katılan ve antioksidan özellik gösteren bir madde bu oksidasyon reaksiyonlarını durdurmakta ve dolayısıyla rengin koyulaşmasını da engellemektedir.



Yukarıda bahsedilen zincirleme oksidasyon reaksiyonları giderek artan renk vermelerinden dolayı spektrofotometrik yöntemle izlenebilmektedir ve belirli bir süreden sonra absorbans maksimum olmakta ve bundan sonra absorbans değişmemekte yani reaksiyonlar tamamlanmaktadır. Bu nedenle R₁, R₂ ve B reaktiflerinden oluşan karışım spektrofotometreye bir küvet içerisinde yerleştirildi ve bu maksimum absorbansın ne kadar sürede gerçekleştiği bulundu. Bizim denememizde 55 dakikada maksimum absorbansa ulaşıldı ve diğer tüm denemelerde bu süre kullanıldı.

R₁ ve R₂ reaktifleri satın alınmış olup denemede kullanılacak olan B reaktifi spektrofotometrik ölçümlerin yapılabilmesi için gerekli hacimleri elde etmek için seyreltme çözeltisi olarak kullanıldı.

Standart olarak Troloks[®]'un 0.25 (S₅), 0.125 (S₄), 0.0625 (S₃), 0.0312 (S₂), 0.0156 (S₁) ve 0 (S₀) mg/mL'lik konsantrasyonları kullanıldı. Absorbansa karşı konsantrasyon grafiğe geçirilmiş ve standart grafik elde edildi. Diğer numunelerin sonuçları da bu grafik kullanılarak Troloks[®]'a eşdeğer miktar olarak mg/mL cinsinden verildi. Tablo 12'de TAR metoduna göre yapılan pipetleme işlemleri verilmektedir.

Tablo 12. Potansiyel serbest radikal reaksiyonlarına karşı toplam antioksidan güç tayininde yapılan pipetleme işlemleri

	Hacimler (µL)						Test
	S ₀	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	
B reaktifi	1265	1265	1265	1265	1265	1265	1265
R ₁ reaktifi	200	200	200	200	200	200	200
Standart (belirtilen konsantrasyonlarda)	25	25	25	25	25	25	-
Numune (0.2g/mL)	-	-	-	-	-	-	25
	Karışım vortekslendi ve 444 nm'de absorbans okundu.						
R ₂ reaktifi	10	10	10	10	10	10	10
	Karışım vortekslendi ve 55 dakika sonra 444 nm'de absorbans okundu.						

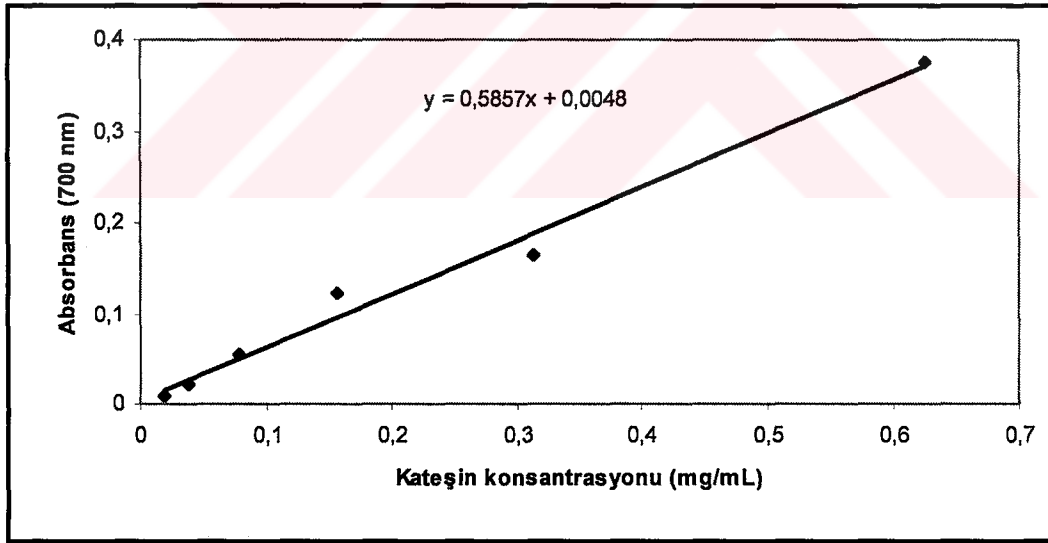
2.13. Mineral İçeriğinin Belirlenmesi

Mineral içeriklerinin belirlenmesi analizinde 5 g bal numunesi alınıp üzerine 10 mL konsantre nitrik asit ilave edilerek yaklaşık 1 saat 95 °C’de sarı renkli zelti elde edilene kadar ısıtıldı. Karışım soğutulduktan sonra 5 mL konsantre HNO₃ ilave edilip 180 °C’ye ısıtıldı ve gerekli durumlarda 1 mL daha HNO₃ eklenerek berrak renk veya soluk saman rengi elde edilinceye kadar ısıtma işleminde devam edildi. Soğutulduktan sonra 1 mL H₂O₂ (500 g/L) ilave edilerek 200 °C’de ısıtıldı ve kahverengi pis kokulu gazlar bitene kadar bu aşama tekrarlandı. Soğutma işleminden sonra 10 mL distile su ve 0.5 mL konsantre HNO₃ eklenerek beyaz renkli pis kokulu gazlar elde edilinceye kadar yavaş yavaş 200 °C’de ısıtıldı. Tekrar soğutma işlemi yapıldıktan sonra 10 mL distile su ve 1 mL H₂O₂ (500 g/L) ilave edilerek beyaz renkli pis kokulu gazlar oluşana kadar yavaşça 240 °C’de ısıtıldı. Sonuçta elde edilen kısım soğutulup 25 mL’lik balon jofeye aktarılarak AAS’ye verildi (Dean, 2003). Örneklerin mineral içerikleri daha önceden analiz edilmiş konsantrasyonu bilinen standart zeltiyle karşılaştırılarak bulundu. Sonuçlar ppm (mg/kg) olarak verildi.

3. BULGULAR

3.1. Toplam Fenolik Madde Miktarları

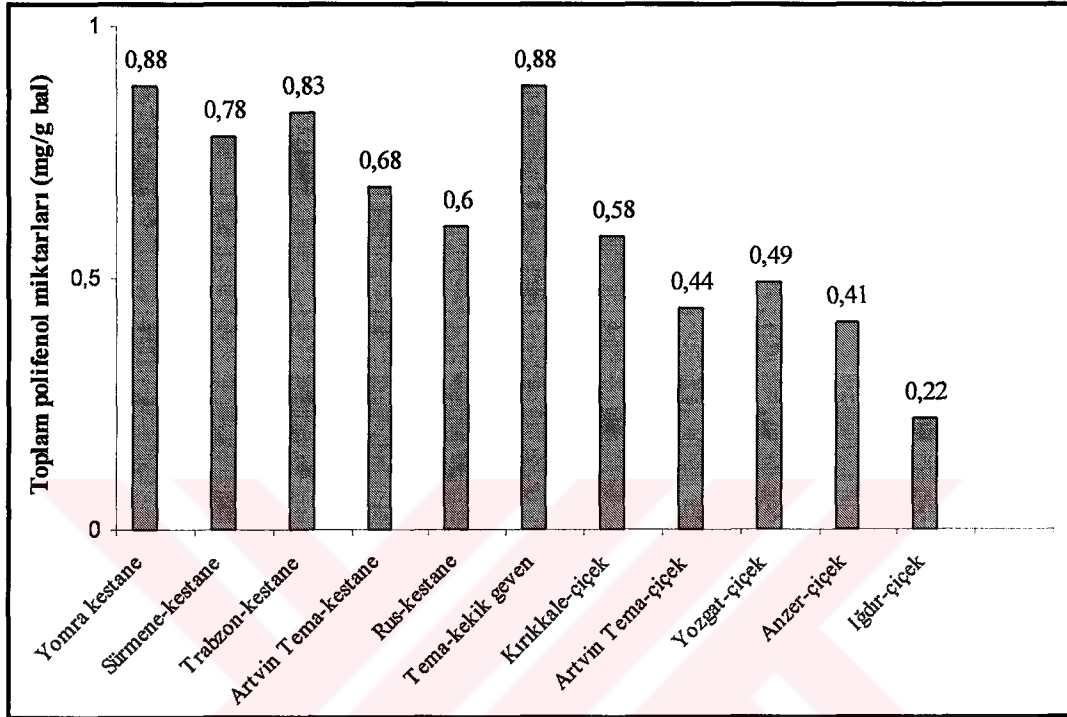
Hazırlanan metanolik bal ekstraktlarında gerekli olan seyreltme işlemleri yapıldıktan sonra toplam fenolik veya polifenol madde miktarları kateşin standardına göre tayin edildi. Konsantrasyon tayini için değişik konsantrasyonlarda hazırlanan (0.0195-0.625 mg/mL) standart kateşin çözeltileri ile Bölüm 2.6'da anlatılan metoda göre toplam fenolik madde miktarları tayin edildi. Elde edilen 700 nm'deki absorbans değerleri y-ekseninde ve konsantrasyon değerleri ise x-ekseninde olacak şekilde bir standart çalışma grafiği hazırlandı. Elde edilen standart çalışma grafiğinde absorbans (Şekil 8) konsantrasyonla doğru orantılı olup, elde edilen doğru denklemi $y = 0.5857x + 0.0048$ olarak tespit edildi. Hazırlanan standart çalışma grafiği kullanılarak 1 g balın içerdiği mg cinsinden polifenol miktarı (Şekil 9), 700 nm'de ölçülen absorbans değerleri kullanılarak belirlendi.



Şekil 8. Toplam fenolik madde tayini için kateşin standardı kullanılarak hazırlanan standart çalışma grafiği (Tayinler en az üç kez tekrar edilmiş olup grafikte kullanılan değerler bunların aritmetik ortalamalarıdır.)

Metanolik bal numunelerinin içerdiği toplam fenolik madde miktarları Şekil 9'da verilmektedir. Toplam fenolik madde miktarının en yüksek olduğu numuneler Yomra kestane balı ve Artvin tema çiçek (kekik-geven) balı iken en düşük fenolik madde

miktarına sahip numuneler Anzer çiçek ve Iğdır çiçek balları olarak bulundu. Genel olarak kestane ballarının (0.792 ± 0.085 mg/g) çiçek ballarına (0.503 ± 0.21 mg/g) kıyasla daha fazla toplam fenolik madde içerdiği bulundu.

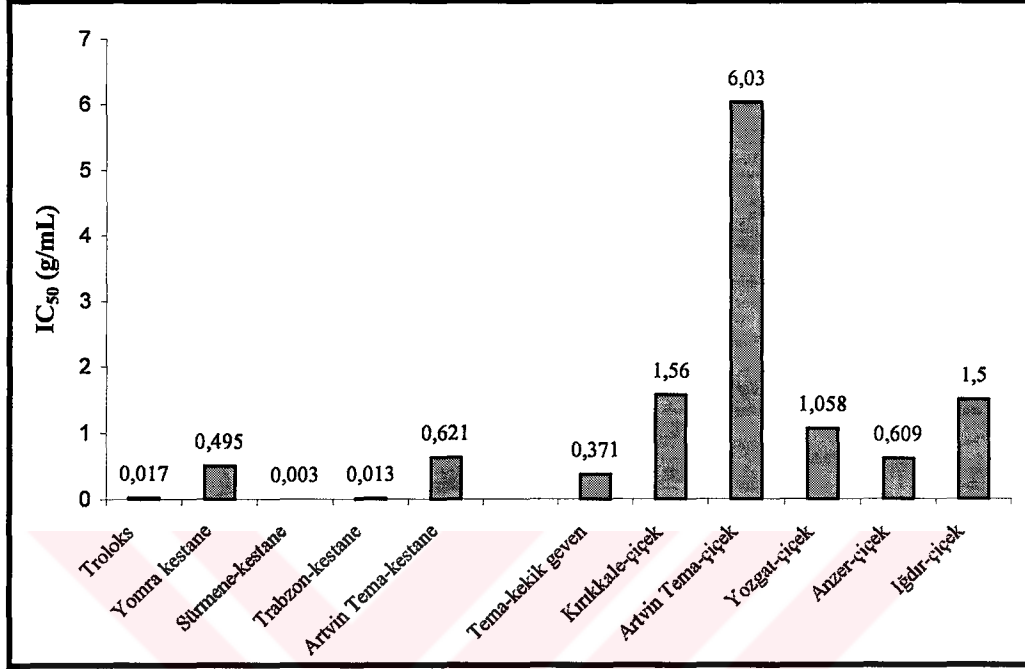


Şekil 9. Kestane ve çiçek balı örneklerinin toplam polifenolik madde miktarları

3.2. Süperoksit Anyonu Temizleme Aktivitesi

Tayinde Trolox® standart olarak kullanıldı ve tüm tayinler paralel olarak çalışıldı. Ksantin-ksantin oksidaz sisteminde oluşturulan süperoksit anyonu NBT ile renkli kompleks oluşturur. % 50 süperoksit oluşumunu engelleyen ya da inhibe eden ekstrakt miktarı IC_{50} olarak belirlendi. IC_{50} miktarı ne kadar düşük ise süperoksit temizleme aktivitesi o kadar yüksek demektir. En düşük IC_{50} değerine sahip örnekler Sürmene kestane balı (0.003 g/mL) ve Trabzon kestane balı (0.013 g/mL) olup standart Trolox®'tan (0.017 g/mL) daha aktif oldukları görüldü. En düşük süperoksit temizleme aktivitesine sahip örneğin ise Artvin tema çiçek balı olduğu bulundu. Bütün örnekler ve standart için süperoksit temizleme aktivitesi tayininden elde edilen IC_{50} değerleri Şekil 10'da verilmiş olup sonuçlara bakıldığında kestane ballarının aktivitesinin çiçek ballarından çok daha

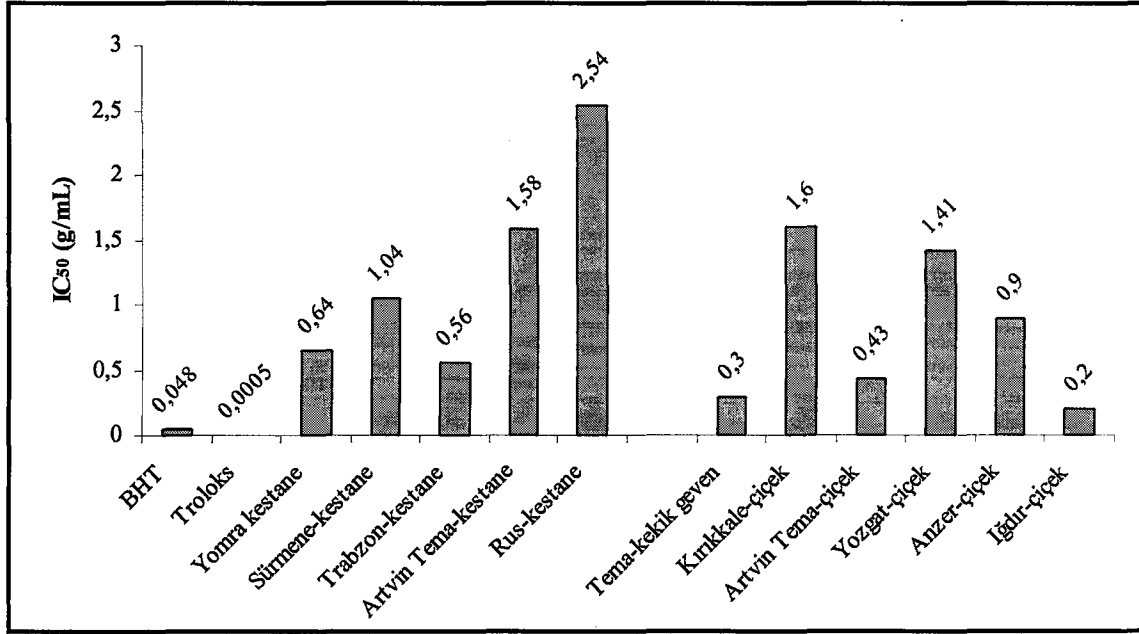
yüksek olduğu ve iki kestane balının standart Troloks®'tan daha iyi aktivite gösterdiği gözlemlendi.



Şekil 10. Kestane ve çiçek balı örneklerinin süperoksit anyon temizleme aktiviteleri

3.3. Peroksinitrit Temizleme Aktivitesi

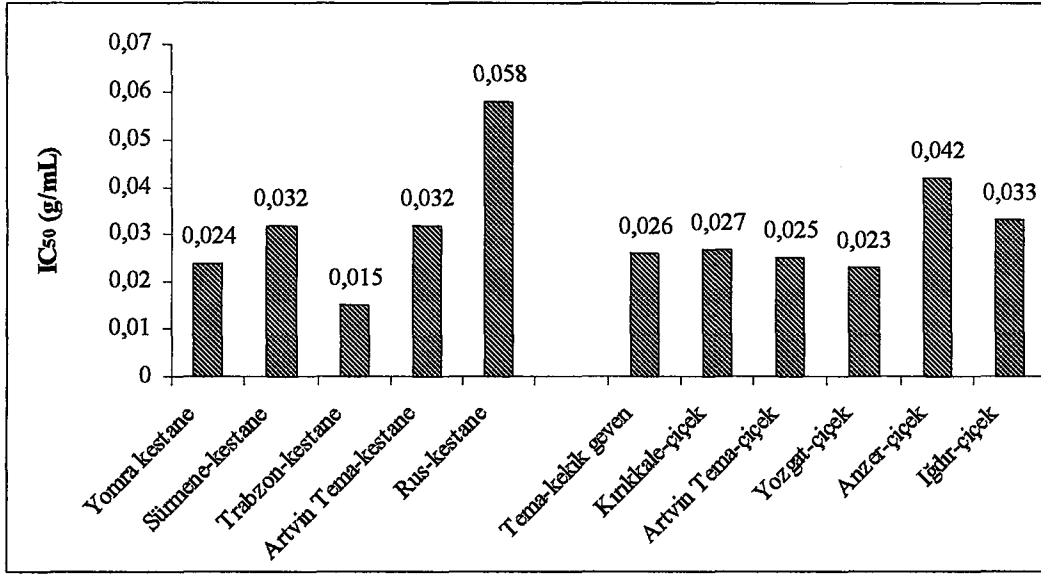
Metanolik bal ekstraktlarının peroksinitrit temizleme aktivitesi 0.125, 0.25, 0.5, 0.1, 0.2 g/mL arasında değişen beş ayrı konsantrasyonda çalışıldı. Ballar için elde edilen IC₅₀ değerleri standart antioksidanlara ait IC₅₀ değerleri ile karşılaştırıldığında metanolik bal örneklerinin çoğunun standartlardan çok daha düşük peroksinitrit temizleme yeteneğine sahip olduğu görüldü (Şekil 11). Yüksek IC₅₀ değerleri düşük peroksinitrit temizleme aktivitesini ve düşük IC₅₀ değerleri ise yüksek peroksinitrit temizleme aktivitesini gösterir. Buna göre çalışılan bal örnekleri arasında yüksek peroksinitrit temizleme yeteneğine sahip bal örneklerinin Iğdır çiçek ve Tema (kekik-geven) çiçek balı olduğu görüldü. Yüksek peroksinitrit temizleme aktivitesine sahip ballardan Artvin tema çiçek balının standart BHT ile hemen hemen aynı aktiviteye sahip olduğu bulundu. En düşük aktiviteye sahip bal örneğinin ise Rus balı olduğu görüldü.



Şekil 11. Kestane ve çiçek balı örneklerinin peroksinitrit temizleme aktiviteleri (IC₅₀ peroksinitritin tirozine oksidasyonunu % 50 oranında azaltan g/mL cinsinden konsantrasyon miktarıdır. Standart antioksidan olarak BHT ve Troloks® kullanılmıştır)

3.4. DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi

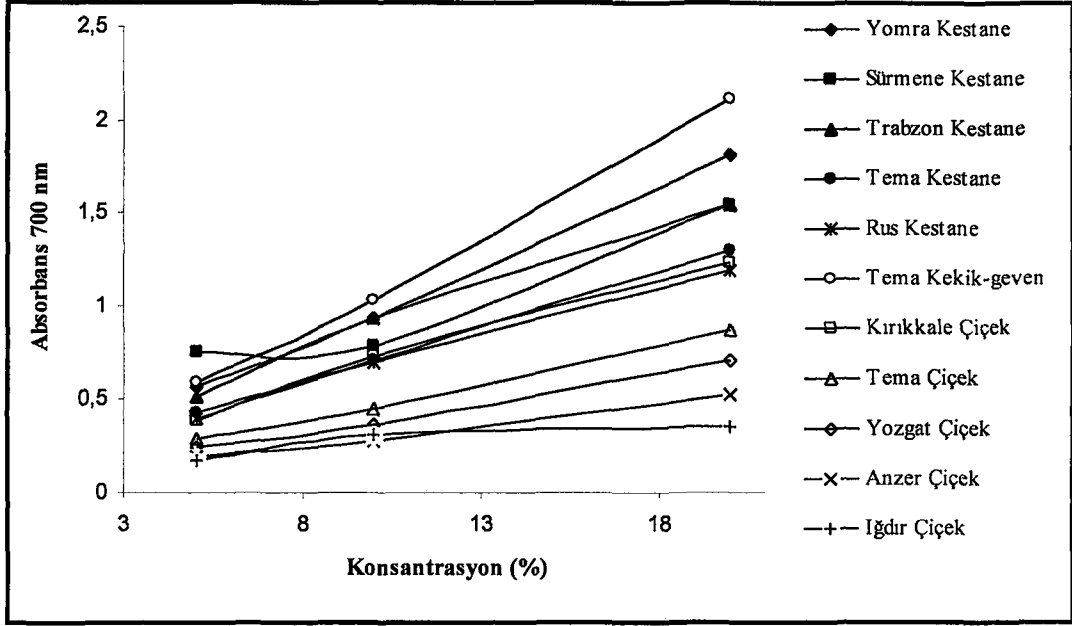
DPPH sulu veya metanolik çözeltilerde kararlı ve sentetik olarak üretilen ticari bir radikal olup lipid peroksidasyonuna sebep olmaktadır. Hazırlanan 0.1 mM'lık metanolik DPPH çözeltisi mor renklidir. DPPH çözeltisine eşit miktarda eklenen değişen konsantrasyonlardaki bal çözeltileri DPPH radikalini temizleyerek DPPH'ın mor rengini açmaktadır. 517 nm'de absorbanslar okunarak konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi ve % 50 DPPH miktarını inhibe eden madde miktarı (IC₅₀) belirlendi (Şekil 12). Sonuçlara bakıldığında en yüksek aktiviteyi Trabzon kestane balının en düşük aktiviteyi de Rus kestane balının gösterdiği bulundu. Sonuçlara genel olarak bakıldığında tüm balların birbirine yakın oranlarda DPPH radikali temizleme aktivitesine sahip olduğu görüldü.



Şekil 12. Kestane ve çiçek balı örneklerinin DPPH radikali temizleme aktiviteleri (IC₅₀ değeri DPPH miktarını % 50 oranında azaltan g/mL cinsinden madde miktarıdır.)

3.5. Fe (III) İndirgeme Kuvveti (FRAP)

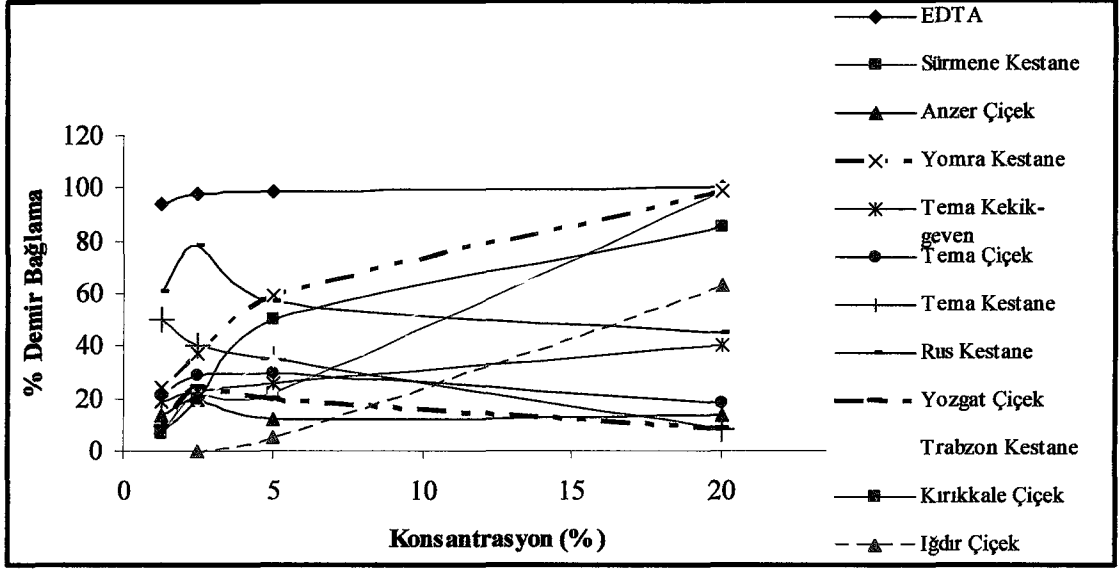
Radikal zincir reaksiyonlarının kırılma kapasitesini yansıtan Fe (III) indirgeme kuvveti testi, antioksidan kapasitenin iyi bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Gülçin vd., 2003). Bu metotta artan absorbans yüksek Fe⁺³ indirgeme kuvvetini göstermektedir. Şekil 13'ten de görüldüğü gibi çiçek ballarına oranla genelde kestane balları daha yüksek absorbanslar verdiler yani daha yüksek aktivite gösterdiler. Bu metotta yapılan testte bal örnekleri arasında en yüksek aktiviteyi bir çiçek balı olan tema kekik geven balı gösterdi. Bu yüksek aktivite tema kekik geven balının yüksek fenolik madde içeriğiyle açıklanabilir (Şekil 9). En düşük fenolik madde içeriğine sahip olan Iğdır çiçek balı en düşük FRAP aktivitesini gösterdi. İndirgeme kuvveti testinde tüm bal örnekleri konsantrasyonla doğru orantı gösterdi. Konsantrasyon arttıkça indirgeme kuvvetlerinde de artış görüldü. Elde edilen bu sonuçlar bu metodun balların antioksidan kapasitesini değerlendirmede kullanılabileceğinin bir kanıtıdır.



Şekil 13. Kestane ve çiçek balı örneklerinin Fe (III) indirgeme kuvveti (FRAP)

3.6. Demir Bağlama Kapasitesi

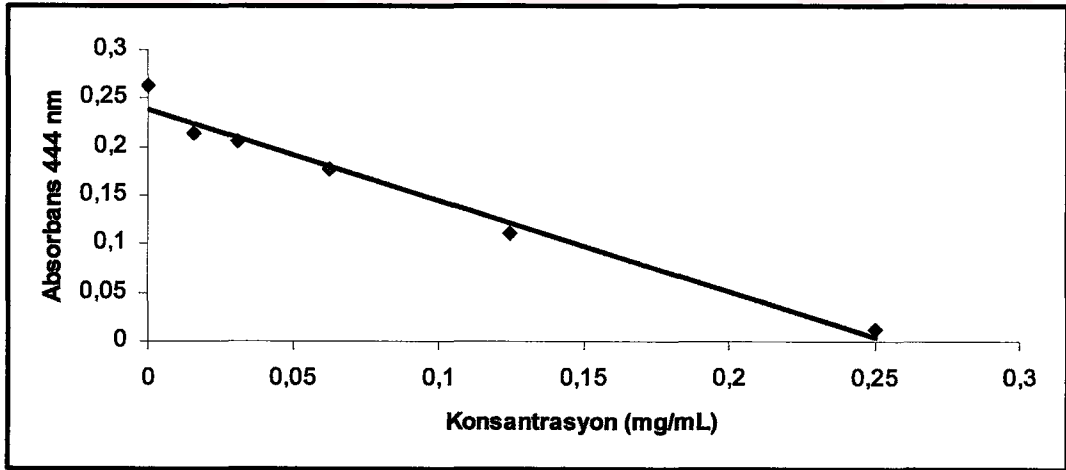
Bal örneklerinin antioksidan kapasitesini belirlemede kullanılan diğer genel bir metot ise demir bağlama aktivitesi tayinidir. Ortama belli miktarda katılan Fe^{+2} , demir bağlama kapasitesi olan maddeler tarafından bağlanmaktadır. Ortamda bağlanmadan kalan serbest Fe^{+2} ortama şelatlayıcı olarak katılan ferrozin ile renkli kompleks oluşturarak 593 nm'de absorbans vermektedir. Dolayısıyla düşük absorbans yüksek demir bağlama kapasitesini ifade etmektedir. Sonuçlar yüksek metal bağlama kapasitesine sahip olduğu bilinen EDTA ile karşılaştırılarak elde edildi. Yapılan çalışmalar sonucunda kestane ballarının çiçek ballarından daha yüksek demir bağlama kapasitesine sahip olduğu bulundu. Ayrıca konsantrasyonla demir bağlama kapasitesi arasında bazı bal örneklerinde doğru orantı gözlenirken bazılarında gözlenmemiştir. Bu metotta en yüksek aktiviteyi standart olarak kabul edilen EDTA göstermiştir. Tüm örneklerin demir bağlama kapasitelerinin sonuçları Şekil 14'te özetlendi.



Şekil 14. Kestane ve çiçek balı örneklerinin % demir bağlama kapasiteleri

3.7. Potansiyel Serbest Radikal Reaksiyonlarına Karşı Toplam Antioksidan Güç (TAR)

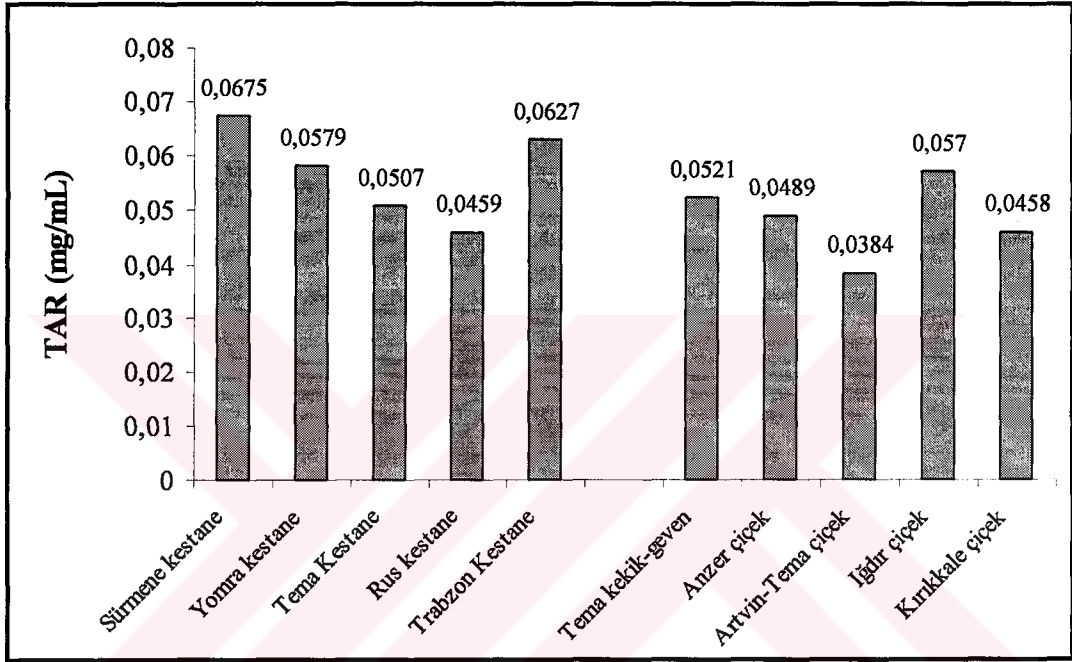
Bu tayinde satın alınan reaktiflerle maksimum oranda radikal oluşması sağlandı ve daha sonra ortama katılan numunelerin bu radikalleri ne oranda temizlediğine bakıldı. Tayinde standart olarak Troloks® kullanıldı ve standart grafik elde edildi (Şekil 15).



Şekil 15. Troloks® konsantrasyonuna bağlı TAR standart grafiği

Bal ekstraktlarında Erel (2003) tarafından yeni geliştirilmiş bir metodla yapılan potansiyel serbest radikal reaksiyonlarına karşı toplam antioksidan güç tayininin sonuçları

Şekil 16'da verildi. Sonuçlar Troloks®'a eşdeğer mg/mL cinsinden madde miktarları olarak verildi. Örneklerin Troloks® eşdeğer miktarları ne kadar yüksekse aktiviteleri o derecede yüksek anlamına gelmektedir. Sonuçlara bakıldığında en yüksek aktiviteyi sürmene kestane balının en düşük aktiviteyi ise Artvin tema çiçek balının gösterdiği görüldü. Genel olarak kestane ballarının TAR aktivitesi çiçek ballarından daha yüksek bulundu.



Şekil 16. Kestane ve çiçek balı örneklerinin TAR tayini sonuçları

Tablo 13'te kestane ve çiçek ballarının farklı antioksidan metodlara göre bulunan aritmetik ortalama ve standart sapma değerleri verilmektedir. Buna göre kestane ballarının toplam fenolik madde miktarları çiçek ballarından % 50 daha fazla bulundu. Ayrıca toplam antioksidan kuvvet (TAR) ise kestane ballarında anlamlı derecede yüksek bulundu. Radikal temizleme yönünden sadece süperoksit radikali temizleme aktivitesi tayininde kestane ballarının düşük IC_{50} değerine sahip olduğu, DPPH ve peroksinitrit temizleme aktivitesi yönünden ortalamaların çok farklı olmadığı bulundu. Rus kestane balı güvenilirliği olmadığından ve standart sapmayı çok etkilediğinden dolayı kestane ballarının ortalaması hesaplanırken hesaba katılmadı.

Tablo 13. Kestane ve çiçek ballarının ortalama toplam fenolik madde miktarları, TAR değerleri ve radikal temizleme aktivitelerinin karşılaştırılması

Örnek	Toplam Polifenol (mg/mL)	TAR (mg/mL)	Radikal Temizleme Aktivitesi		
			DPPH (IC ₅₀ : g/mL)	Süperoksit (IC ₅₀ : g/mL)	Peroksinitrit (IC ₅₀ : g/mL)
Kestane Balları (n=4)	0.792±0.085	0.0597±0.007	0.0257±0.008	0.283±0.321	0.955±0.466
Çiçek Balları (n=6)	0.503±0.21	0.0484±0.007	0.0293±0.007	1.855±2.09	0.806±0.594

3.8. Mineral İçerik

Bal örneklerinin ortalama mineral içerikleri (mg/kg yaş bal) Tablo 14'te gösterildi. Genelleme yapılacak olursa kestane ballarının mineral içerikleri çiçek ballarından daha fazla bulundu. Kestane ballarının özellikle potasyum, kalsiyum ve magnezyum bakımından zengin olduğu gözlemlendi. Metal analiz sonuçlarının ortalama bağlı % standart sapması %3-5 arasında olduğu tespit edildi.

Tablo 14. Kestane ve çiçek ballarının metal iyonu konsantrasyonları (Konsantrasyon değerleri ppm (mg/kg) olarak verilmiştir. ND AAS'de belirleme limitinin altında kalmış olan küçük değerlerdir.)

Örnek ve Tipi	Na	K	Ca	Fe	Cu	Zn	Mn	Cr	
Anzer	Çiçek	80	1595	395	5,05	0,08	2,12	2,11	ND
Iğdır	Çiçek	113	305	108	0,77	0,19	0,72	0,13	ND
Kırıkkale	Çiçek	55	1168	315	3,83	0,30	0,83	0,32	ND
Tema-çiçek	Çiçek	58	750	205	1,57	0,12	0,70	2,07	ND
Tema-kekik geven	Çiçek	58	695	215	3,19	0,46	1,71	0,58	ND
Yozgat	Çiçek	33	223	90	0,49	ND	0,50	0,14	ND
Mineral içeriklerin ortalama değerleri	Çiçek	66	789	221	2,48	0,23	1,10	0,89	
Standard Sapma (±)		25	476	107	1,67	0,14	0,60	0,86	
Tema-Artvin	Kestane	65	1595	415	2,78	0,20	0,83	6,79	ND
Sürmene	Kestane	75	3700	870	1,01	0,37	0,93	25,79	ND
Rus	Kestane	38	668	205	0,63	0,03	0,34	2,11	ND
Yomra	Kestane	80	3268	803	10,17	0,55	1,56	12,32	0,89
Mineral içeriklerin ortalama değerleri	Kestane	65	2308	573	3,65	0,29	0,92	11,75	
Standard Sapma (±)		16	1231	275	3,85	0,19	0,43	8,87	

4. TARTIŞMA

Bal arıları (*Apis mellifera*) tarafından üretilen değerli bir gıda maddesi olan bal, bitki florası, iklim, arı türleri ve diğer çevresel faktörlere bağlı olarak bileşiminde bulunan maddeler açısından değişiklik gösterir (Kaur Bath ve Singh, 1999). Bal Türkiye’de ve Orta Doğu’da çok üretilen ve tüketilen bir üründür. Değişik coğrafi iklim özelliklerine sahip ülkemiz oldukça zengin bitki florasına sahip olup tek bir floradan oluşan ballar üretildiği gibi karışık floralı ballarda üretilmektedir (Üren vd., 1998). Özellikle Batı ve Doğu Karadeniz bölgesinde bol miktarda üretilen kestane balları acımtırak bir tada sahip olduğu için halk arasında fazla tercih edilmez. Fakat son yıllarda bu balın solunum yolları hastalıkları özellikle astım ve bronşit tedavisinde kullanıldığı bildirilmektedir (Orhan vd., 2003). Fenolik bir bileşik olan 3-aminoasetofenon kestane balının uçucu bir bileşeni olup kestane balının tanınmasında önemli bir işaret (markır) oluşturur (Bonaga ve Guimanini, 1986; Guyot vd., 1998).

Arılar balı üretmek için gerekli olan maddeleri ve polenleri çiçeklerden topladığı için, bitkilerin antioksidan kapasiteleri ile balın antioksidan kapasitesi arasında bire bire ilişki bulunmaktadır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar sonucu bitkisel gıdaları fazla tüketen toplumlarda kanser riskinin azaldığı belirtilmektedir (Balachandran ve Govindarajan, 2005; Riboli ve Norat, 2003). Zincirleme bir reaksiyonda okside olabilen bir substratın oksidasyonunu durduran veya geciktiren antioksidanlar koruyucu tıbbın vazgeçilmez ilaçları arasında kabul edilmektedir (Halliwell vd., 1992). Yüksek antioksidan madde içermesinden dolayı doğal bileşiklere verilen önem her geçen gün artmaktadır. Doğal bir bileşik olan bal bu nedenle ilgi çekici bir karışım oluşturmaktadır. Türkiye’de çok çeşitli ballar üretiliyor olmasına rağmen kestane ballarının biyolojik özellikleri hakkında detaylı bilgiler kısıtlıdır (Sorkun vd., 2001). Bu amaçla yapılan bu çalışmada Türkiye’nin çeşitli yörelerinden toplanan tek floralı beş adet kestane balı (*Castanea sativa*) ile çeşitli dağ çiçeklerinden oluşan altı adet karışık floralı bal örneklerinin antioksidan kapasiteleri incelendi. Anklem (1998), balların biyolojik aktiviteleri ve kesin kalitelerini ölçecek doğrudan parametreler olmadığını ve uygulanan rutin kimyasal testlerin balların kalitesi hakkında güvenilebilir bilgiler sağlamayacağını bildirmiştir. Örneğin HMF (hidroksimetilfurfural) ve diastaz sayısı bal analizlerinde rutin yapılan testlerden olup balların biyolojik etkinliğini değil ancak

sadece tazeliğinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Yapılan bu çalışmada doğal bileşiklerin karışımı olan kestane ve çiçek ballarının radikal temizleme yeteneği dolayısıyla antioksidan kapasitesi ile balların mineral bileşimleri incelenmiştir.

Reaktif oksijen türlerine karşı bitkilerde savunma mekanizmasında görev yapan ve bitkiler tarafından ikincil ürünler olarak sentezlenen antioksidan bileşikler, daha çok fenolik yapıda bitkilerde bulunurlar (Rice-Evans vd., 1997). Fenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteleri; hidrojen verici, singlet oksijen tutucu, metal iyonlarını bağlayıcı (şelat oluşturma), H_2O_2 , O_2^- , ve OH^- gibi radikalleri dismutasyona uğraticı gibi farklı mekanizmalardan ileri gelmektedir. Bu amaçla toplam fenolik madde miktarı, TAR ve FRAP tayinleri toplam antioksidan aktiviteyi gösterirken, DPPH, süperoksit ve peroksinitrit temizleme aktiviteleri serbest radikal temizleme yeteneklerini gösteren testler olarak çalışmada kullanıldı.

Folin reaktifi ile renkli kompleks oluşturmaya dayanan toplam fenolik madde tayininde kestane ballarının çiçek ballarından daha yüksek fenolik madde içerdiği bulundu. Çalışmada kullanılan balların rengi karşılaştırıldığında kestane ballarının koyu renkli olduğu görüldü. Dolayısıyla fenolik madde miktarı ile balın rengi arasında pozitif ilişki bulunmaktadır. Koyu renk, balın antioksidan özelliğe sahip karotenoidler ve flavonoidler gibi pigment içeriğini yansıtmaktadır (Frankel vd., 1998; Havsteen, 2002; Peterson ve Dwyer, 1998; Wollgast ve Anklam, 2000; Robards vd., 1999).

Bir redoks reaksiyonu olan ve kısaca demir indirgeme kuvveti (FRAP) olarak adlandırılan test, biyolojik materyallerin toplam antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılabilir. İndirgeme kuvveti örnekte bulunan bütün bileşiklerin indirgeme potansiyellerinin toplamını oluşturur. Bu metotta yüksek absorbans yüksek Fe^{+3} indirgeme kuvvetini göstermektedir. Buna göre kestane ballarının genelde çiçek ballarından daha yüksek absorbansa sahip oldukları bulundu. En yüksek FRAP aktivitesine sahip balın Tema vakfı tarafından üretilen bir çiçek (Kekik-Geven) balına ait olduğu ve buna bağlı olarak da yine en yüksek fenolik madde miktarına sahip balın aynı bal olduğu bulundu. Yine benzer şekilde en düşük fenolik madde içeriğine sahip Iğdır çiçek balının düşük FRAP aktivitesine sahip olduğu bulundu. Nitekim Katalini vd., (2004) ve Guo vd., (2003) yaptıkları çalışmalarda toplam fenolik madde miktarı ile toplam antioksidan aktivite arasında paralellik olduğunu göstermişlerdir. Kestane ballarının fenolik bir madde olan asetofenon, 1-feniletanol ve 2-aminoasetofenon içerdiğini bildirilmiştir (Guyot vd., 1998).

Polifenollerin özellikle de flavonoidlerin Fe^{+2} , Cu^{+2} ve Zn^{+2} gibi geçiş metalleri bağladığı, elektron transferini katalizlediği ve serbest radikalleri temizlediği bilinmektedir (Peterson ve Dwyer, 1998; van Acker vd., 1998). Yüksek Fe^{+2} -bağlama özelliği iyi antioksidan aktivitenin bir göstergesidir çünkü serbest Fe (II) iyonları redoks aktif türler olup ve Fenton reaksiyonları aracılığıyla serbest radikal oluşumlarına ve lipid peroksidasyonlarına yol açarlar (Ferrali vd., 1997; van Acker vd., 1998). Yaptığımız çalışmada kestane ballarının çiçek ballarından daha yüksek demir bağlama kapasitesine sahip oldukları bulundu. Ayrıca örnek konsantrasyonuna bağlı olarak demir bağlama kapasitesinin daha çok kestane ballarında doğru orantı olduğu gözlemlendi. Bu da bize yine toplam fenolik madde miktarı ile demir bağlama kapasitesi arasında pozitif ilişkinin bulunduğunu göstermektedir. Nitekim Gülçin vd., (2003); Ferrali vd., (1997) ve van Acker (1998) de benzer sonuçları bulmuşlardır.

Solunum sırasında oksijenin eksik indirgenmesiyle oluşan süperoksit anyonu tam bir radikal olmayıp radikalik anyon şeklinde anyon kanallarından kolayca hücreye geçebilmektedir. Fakat Haber-Weis reaksiyonuna göre süperoksit anyonu hidrojen peroksit ile reaksiyon vererek çok daha toksik olan hidroksil radikalinin oluşmasına sebep olabilir (Matés vd., 1999). Test ortamında *in vitro* olarak oluşturulan süperoksit anyonunu temizleme aktivitesi ile bal konsantrasyonları arasında pozitif ilişki bulunmuş olup kestane ballarının süperoksit temizleme aktiviteleri çiçek ballarından daha yüksek bulunmuştur. Özellikle Sürmene ve Trabzon yöresine ait kestane ballarının Trolox®'tan daha yüksek süperoksit temizleme aktivitesine sahip olduğu bulundu. Bu metot da bize yüksek fenolik madde miktarı içeren kestane ballarının yüksek süperoksit temizleme yeteneğine sahip olabileceğini göstermektedir (Selloum vd., 2001; Jin Jun vd., 2001).

DPPH sulu, etanolik veya metanolik ortamlarda bozunmadan kalabilen sentetik orijinli bir radikaldir. Tüm serbest radikaller lipid peroksidasyonunun başlamasına neden olabilirler. Bal örneklerinin potansiyel DPPH temizleme aktiviteleri (IC_{50} değerleri) g/mL cinsinden Şekil 12'de gösterilmiştir. Tüm ekstraktların DPPH radikal temizleme yeteneğine sahip olduğu ancak en yüksek aktiviteyi Trabzon kestane balının en düşük aktiviteyi de Rus kestane balının gösterdiği bulundu. Trabzon kestane balının DPPH aktivitesine paralel olarak yüksek süperoksit temizleme yeteneğine sahip olduğu ve bunun yine toplam fenolik madde miktarı ile orantılı olduğu görülmektedir.

Metanolik bal ekstraktlarının bir başka radikalik anyon olan ve *in vitro* olarak laboratuvar ortamında sentezlenen peroksinitrit anyonunu temizleme yetenekleri de incelendi. Peroksinitrit canlı organizmalarda fizyolojik veya patolojik olarak oluşan bir radikal

türü olup daha çok proteinlerdeki tirozin ve metiyonin gibi aminoasitlerin nitrolanmasına ve proteinlerin üç boyutlu yapılarının bozulmasına neden olabilmektedir (Crow, 2000). Ballar için elde edilen IC_{50} değerleri standart antioksidanlara ait IC_{50} değerleri ile karşılaştırıldığında metanolik bal örneklerinin standartlardan çok daha düşük peroksinitrit temizleme yeteneğine sahip olduğu görülmektedir (Şekil 11). En yüksek peroksinitrit temizleme yeteneğine sahip bal örneklerinin Iğdır çiçek balı ve Tema çiçek (kekik-geven) balına ait olduğu görülmektedir. En düşük aktiviteye sahip bal örneği ise Rus balıdır.

Yeni bir toplam antioksidan aktivite ölçüm metodu olan potansiyel serbest radikal reaksiyonlarına karşı toplam antioksidan güç (TAR) tayininde sonuçlar Troloks® eşdeğer madde miktarı cinsinden mg/mL cinsinden hesaplanmış olup yüksek TAR miktarı yüksek aktiviteyi göstermektedir. Elde edilen sonuçlara göre kestane ballarının çiçek ballarına göre daha yüksek TAR aktivitesine sahip olduğu bulundu. Özellikle Trabzon kestane (0.0627 mg/mL) ve Sürmene kestane (0.0675 mg/mL) ballarının Troloks® eşdeğer miktarları yüksek olup en iyi aktiviteyi bu iki bal göstermiştir (Şekil 16). Trabzon ve Sürmene yöresine ait kestane ballarının antioksidan aktiviteleri diğer çalışılan metotlardakine paralel olarak TAR metodunda da yüksek antioksidan aktivite gösterdikleri bulundu.

Sonuç olarak antioksidan aktivite yönünden bir değerlendirme yapıldığında ballarda antioksidan aktivitenin toplam fenolik madde miktarı ile ilişkili olduğu ve yüksek fenolik madde içeriğine sahip kestane ballarının daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulundu.

Kas kasılmasında, sinir iletiminde, enzim aktivasyonunda, kan pıhtılaşmasında vs. gibi çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal olayların yürütülmesinde rol alan mineraller canlılar için vazgeçilmez elementlerdir (Campbell, 2001). Sodyum, potasyum, kalsiyum ve magnezyum en bol bulunan minerallerden olup, demir, bakır, çinko, mangan ve krom eser elementlerdendir. Yaş çözünürleştirme metodu ile tayin edilen bal örneklerinden kestane ballarının hemen hemen iki kat daha yüksek mineral maddeye sahip olduğu bulundu. Balın mineral bileşimi balın toplandığı bölgenin florasına, toprak yapısına ve coğrafi ve iklim yapısına bağlı olarak değişir (Hardisson vd., 2001). Nitekim Yılmaz ve Yavuz, (1999) da yaptıkları çalışmada Güney Doğu Anadolu bölgesinin kestane ballarının mineral içeriklerinin çiçek ballarından daha yüksek olduğunu buldular.

Yapılan çalışmayı özetleyecek olursak yüksek polifenolik madde içeriğine Yomra kestane, Trabzon kestane ve Tema kekik-geven balı, yüksek süperoksit anyonu temizleme aktivitesine Sürmene kestane ve Trabzon kestane balı, yüksek peroksinitrit temizleme aktivitesine Iğdır çiçek ve Tema (kekik-geven) çiçek balı, yüksek DPPH radikali temizleme aktivitesine Trabzon kestane balı, yüksek demir indirgeme kuvvetine Tema kekik-geven balı, yüksek demir bağlama aktivitesine Yomra kestane balı, yüksek TAR aktivitesine Trabzon kestane ve Sürmene kestane balı, yüksek mineral içeriğine ise kestane ballarının sahip olduğu belirlendi. Gülçin vd., (2003) ve Siddhuraja vd., (2002) yaptıkları çalışmalarda indirgeme kuvveti, total antioksidan aktivite, süperoksit radikal temizleme aktivitesi ve DPPH radikal temizleme aktivitelerinin aynı ekstraktta farklı farklı olduğunu gösterdiler. Örneğin, süperoksit radikal temizleme aktivitesi yüksek olan bir ekstraktın hidroksil radikal temizleme aktivitesini düşük buldular. Örneklerin farklı radikal temizleme kapasiteleri onların yapılarında bulunan antioksidan test bileşiğinin yapısına bağlı olarak değişmektedir. Örneğin bir polifenol veya flavonoid DPPH radikali üzerinde etkili olurken bir başka tür fenolik madde süperoksit anyonu üzerinde etkili olmaktadır. Bu tamamen moleküllerin üç boyutlu yapıları ve dolayısıyla onların indirgenme potansiyelleri ile ilgilidir (Fukumoto ve Mazza, 2000; Rice-Evans vd., 1997). Ayrıca buna benzer olarak kullanılan standart antioksidanların da farklı serbest radikal temizleme yeteneklerine sahip olduğu görüldü. Yine standart antioksidanların kapasitelerinin kullanılan metoda göre değişim gösterdiği, örneğin askorbik asidin oksijen temizleme yönünden sekonder antioksidan olarak etkili olduğu, çoğu antioksidan metotta ise BHT'nin diğer standartlara göre daha etkili olduğu bildirilmektedir (Fukumoto ve Mazza, 2000; Kolaylı vd., 2003).

Sonuç olarak yüksek antioksidan kapasitesinden dolayı günlük diyeteye ilave edilecek birkaç kaşık bal vücudun antioksidan kapasitesini artırdığı gibi mineral ihtiyacını da karşılayabilecektir.

5. SONUÇLAR

1. Farklı bal örneklerinden elde edilen metanolik ekstraktlarının farklı miktarlarda polifenol içerdiği, herbir ekstraktın farklı antioksidan aktiviteye sahip olup hiçbir ekstaktın oksidasyonu artırıcı özelliğinin olmadığı bulundu.

2. Bal ekstraktlarının antioksidan aktivitelerinin bal konsantrasyonları ile uyumlu olduğu ve dolayısıyla yapılan çalışmaların anlamlı olduğu gözlemlendi.

3. En yüksek fenolik madde miktarına sahip bal ekstraktının Yomra kestane ve Tema (kekik-geven) balları olduğu ve en düşük fenolik madde miktarına sahip balın Iğdır çiçek balı olduğu bulundu.

4. En yüksek süperoksit anyonu temizleme aktivitesine sahip balın Sürmene kestane ile Trabzon kestane balının ve en düşük aktiviteye sahip balın ise Artvin (Tema) çiçek balı olduğu bulundu.

5. En yüksek peroksinitrit temizleme aktivitesine sahip örneğin Iğdır çiçek ile Tema (kekik-geven) çiçek balları olduğu ve en düşük aktiviteye sahip örneğin Rus balı olduğu bulundu.

6. DPPH radikali temizleme aktivitesi tayinine göre en yüksek aktiviteyi Trabzon kestane balının en düşük aktiviteyi de Rus kestane balının gösterdiği bulundu.

7. Fe (III) indirgeme kuvveti (FRAP) testine göre en yüksek aktiviteyi Tema kekik-geven (çiçek) balı gösterirken en düşük FRAP aktivitesine sahip balın Iğdır çiçek balı olduğu bulundu.

8. Demir bağlama aktivitesi tayininde en iyi demir bağlama aktivitesini Yomra kestane ve Sürmene kestane balları gösterirken en düşük demir bağlama aktivitesine sahip örneğin Yozgat çiçek balı olduğu tespit edildi.

9. Potansiyel serbest radikal reaksiyonlarına karşı toplam antioksidan güç (TAR) tayininde en yüksek aktiviteyi Sürmene ve Yomra kestane balları gösterirken en düşük aktiviteyi Artvin (Tema) çiçek balı gösterdi.

10. Çalışılan farklı antioksidan metodlarda antioksidan aktiviteler ile örneğin toplam fenolik madde konsantrasyonu arasında pozitif korelasyon bulundu.

11. Farklı metotlara göre çalışılan antioksidan aktivitelerden TAR ve FRAP metotları örneklerin toplam antioksidan kapasitelerini ortaya koyarken diğer metotlar (süperoksit, peroksinitrit, DPPH radikali temizleme vs.) farklı radikallere karşı örneklerin farklı

mekanizmalar ile davrandığını gösterdi. Bu sonuç bize, çalışılan örneğin antioksidan kapasitesinin bir veya iki metotla belirlemenin ne kadar zor olduğunu ve metotların artırılması ile antioksidan kapasitenin daha doğru ölçülebileceğini göstermektedir.

12. Çalışılan bal örneklerinin mineral yönünden oldukça zengin olduğu fakat kestane ballarının mineral içeriğinin çiçek ballarından daha zengin olduğu bulundu.



6. ÖNERİLER

1. Çalışmayı yaptığımız sırada elimizde yeterince numune bulunmadığından kullanılan bal örneklerinin (kestane ve çiçek balları) sayısının artırılması ile (15-20 adet) daha doğru ve kesin sonuçlar elde edilebilir.
2. Antioksidan kapasite ölçümünde çalışılan antioksidan metotların sayısı her ne kadar çok olsa bile birkaç farklı metot daha kullanılarak sonuçların daha kesin olması sağlanabilir.
3. Çalışılan bal örneklerinin GC-MS (Gaz-Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi) ile analizleri yapılarak balların bileşimleri tespit edilebilir.
4. Preparatif amaçlı HPLC (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi) kullanılarak balların farklı elusyonlarına göre bileşimi (GC-MS) ile antioksidan kapasiteleri karşılaştırılıp antioksidan aktiviteyi artıran madde veya maddeler tanımlanabilir.

7. KAYNAKLAR

- Ali, A. T., Chowdhury, M. N. ve Al-Humayyd, M. S., Inhibitory effect of natural honey on *Helicobacter pylori*, Trop. Gastroenterol., 12 (1991) 73-77.
- Ali, A. T., Prevention of ethanol-induced gastric lesions in rats by natural honey, and its possible mechanism of action, Scand. J. Gastroenterol., 26 (1991) 281-288.
- Ali, A. T., Natural honey exerts its protective effects against ethanol-induced gastric lesions in rats by preventing depletion of glandular nonprotein sulfhydryls, Trop. Gastroenterol., 16 (1995) 18-26.
- Al-Mammary, M., Al-Meer, A. ve Al-Habori, M., Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey, Nutr. Res., 22 (2002) 1041-1047.
- Amoros, M., Sauvager, L. ve Cornier, M., *in vitro* Antiviral activity of propolis, Apidologie, 23 (1992) 231-240.
- Anklem, E., A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey, Food Chem., 63, 2 (1998) 549-562.
- Balachandran, P. ve Govindarajan, R., Cancer: an ayurvedic perspective, Pharmacol. Res., 51, 1 (2005) 19-30.
- Beckman, J. S., Chen, J., Ischiropoulos, H. ve Crow, J. P., Oxidative chemistry of peroxynitrite, Method Enzymol., 223 (1994) 229-240.
- Beckman, J. S. ve Koppenol, W. H., Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: The good, the bad, and the ugly, Am. J. Phys., 271 (1996) 1424-1437.
- Bensath, A., Rusznyak, S. ve Szent-Györgi, A., Vitamin, P. Nature, 139 (1937) 326-327.
- Bravo, L., Polyphenol chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance, Nutr. Rev., 56, 11 (1998) 317-333.
- Bonaga, G. ve Giumanini, A. G., Chemical composition of chestnut honey: analysis of the hydrocarbon fraction, J. Agr. Res., 25 (1986) 113-120.
- Campbell, J. D., Lifestyle, minerals and health, Med. Hypotheses, 57, 5 (2001) 521-531.
- Chemid, 1996. A chemical database sponsored by the National Library Of Medicine. Bethesda, ND.
- Chen, L. H., Boissonneault, G. A. ve Glauert, H. P., Vitamin C, Vitamin E and Cancer (Review), Anticancer Res., 8 (1988) 739-748.

- Cheraskin, E., Ken Ward's health and nutrition pages, vitamin and mineral supplements, recommended daily allowance (RDA) and suggested optimum nutritional allowance (SONA), Dr. Emanuel Cheraskin of the University of Alabama http://www.trans4mind.com/personal_development/nutrition.htm, 22 Aralık 2004.
- Cisarino, L., Pisati, A. ve Fasani, F., Contact dermatitis from propolis, Contact Dermatitis, 16 (1987) 110-111.
- Cocker, L. J., The enzymic production of acidic honey, J. Sci. Food Agric., 2 (1951) 411.
- Collins, A., 2004 (a), Information about mineral nutrition and deficiency, recommended daily allowance, best food sources, <http://www.annecollins.com/nutrition/minerals.htm>, 21 Aralık 2004.
- Cook, N. C. ve Sammon, S., Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, Nutr. Biochem., 7 (1996) 66-76.
- Cowan, M. M., Plant products as antimicrobial agents, Clin. Microbiol. Rev., 12, 4 (1999) 564-582.
- Crow, J. P., 2000. Peroxynitrite scavenging by metalloporphyrins and thiolates. Free Radical Bio. Med., 28, 1487-1494.
- Davidson, P. M., 1993. Parabens and phenolic compounds, In: Davidson, P. M., Branen, A. L., (Eds.), Antimicrobial in Foods, 2nd edn. Marcel Dekker, New York, 1993.
- Dean, J. R. Methods for environmental trace analysis, Northumbria University, Newcastle, UK, 2003.
- Dinis, T. C. P., Madeira, V. M. C. ve Almeida, L. M., Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers, Arch. Biochem. Biophysics, 315 (1994) 161-169.
- Dustmann, J. H., Honey, quality and its control, Am. Bee J., 133 (1993) 648-651.
- Dündar, Y. ve Aslan, R., Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar, I. Basım, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyon, 2000.
- Edge, R., Mc Garvey, D. J. ve Truscott, T. G., The carotenoids as antioxidants-a review, J. Photoc. Photobio., 41 (1997) 189-200.
- Edwards, R., Dixon, D. P. ve Walbot, V., Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health, Trends Plant Sci., 5 (2000) 193-198.
- Effem, S. E., Clinical observations on the wound healing properties of honey, Br. J. Surg., 75 (1988) 679-681.

- Erel, O., A novel automated method to measure total antioxidant response against free radical reactions, Clin. Biochem., 37 (2004) 112-119.
- Esterbauer, G. H., Schaur, R. J. ve Zollner, H., Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes, Free Radical Biol. Med., 11 (1991) 81-128.
- FAO, Value-added products from beekeeping. FAO Agricultural service bulletin, Rome, Italy, 1996.
- Ferrali, M., Signorini, C., Caciotti, B., Sugherini, L., Ciccoli, L., Giachetti, D. ve Comporti, M., Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity, FEBS letters, 416 (1997) 123-129.
- Ferreres, F., Andrade, P., Gil, M. I. ve Thomas-Barberian, F. A., Floral nectar phenolics as biochemical markers for the botanical origin of heather honey, Z. Lebensm.-Unters. Forsch., 202 (1996) 40-44.
- Frankel, S., Robinson, G. E. ve Berenbaum, M. R., Antioxidant content and correlated characteristics of 14 monofloral honeys, J. Appic. Res., 37 (1998) 27-31.
- Fridovich, I., Superoxide Dismutases, Annu. Rev. Biochem., 44 (1975) 147-159.
- Fukumoto, L. R. ve Mazza, G., Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds, J. Agr. Food Chem., 48 (2000) 3597-3604.
- Gazzani, G., Papetti, A., Daglia, M., Berte, F. ve Gregotti, C., Protective activity of water soluble comonents of some common diet vegetables on rat liver microsomes and the effect of thermal treatment, J. Agr. Food Chem., 46 (1998) 123-127.
- Ghisalberti, E. L., Propolis a review, Bee World, 60 (1979) 59-84.
- Gil, M. I., Ferreres, F., Ortiz, A., Subra, E. ve Thomas-Barberian, F. A., Plant phenolics metabolites and floral origin of rosemary honey, J. Agr. Food Chem., 43 (1995) 2833-2838.
- Glavind, J., Hartmann, S., Clemmesen, J., Jessen, K. E. ve Dam, H., Studies on the role of lipo-peroxides in human pathology. II. The presence of peroxidized lipids in the atherosclerosis aorta, Acta. Pathol. Microbiol. Scand., 30 (1952) 1-6.
- Groves, J. T., Peroxynitrite: reactive, invasive and enigmatic, Curr. Opin. Chem. Biol., 3, 2 (1999) 226-235.
- Guliyev, V. ve Harmandar, M., Flavonoidler, Aktif Yayınevi, İstanbul, 2000.
- Guo, C., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J. ve Jiang, Y., Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay, Nutr. Res., 23 (2003) 1719-1726.

- Gülçin, İ., Büyükonuroğlu, M. E., Oktay, M. ve Küfrevioğlu, Ö. İ., Antioxidant and analgesic activities of Turpentine of *Pinus nigra* Arn.subsp.pallsiana (Lamb.) Holmboe, J. Ethnopharmacol., 2856 (2003) 1-8.
- Haffeejee, I. E. ve Moosa, A., Honey in the treatment of infantile gastroenteritis, BMJ, 290 (1985) 1886-1887.
- Hall, C. A. ve Cuppet, S. L., Structure-activities of natural antioxidants. In: Aruoma, O. I. ve Cuppet, S. L. Editors. Antioxidant methodology in vivo and in vitro concepts, Champaign, IL, 1997.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J. M. C., Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, Biochem. J., 219 (1984) 1-14.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J. M. C., Free radicals in biology and medicine. Calendon Press, Oxford, UK, 1989.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease, Method Enzymol., 186 (1990) 1-80.
- Halliwell, B., How to characterize a biological antioxidant, Free Radical Res. Commun., 9 (1990) 1-32.
- Halliwell, B., Gutteridge J. M. ve Cross, E. C., Free radical, antioxidants, and human disease: Where are we now?, J. Lab. Clin. Med., 119, 6 (1992) 598-620.
- Hardisson, A., Rubio, C., Martin, M., Alvarez, R. ve Diaz, E., Mineral composition of the banana (*Musa acuminata*) from the island of Tenerife, Food Chem., 73 (2001) 153-161.
- Havsteen, B. H., The biochemistry and medical significance of the flavonoids, Pharmacol. Exp. Ther., 96 (2002) 67-202.
- Hatano, T., Edamatsu, R., Hiramatsu, M., Mori, A., Fujita, Y., Yasuhara, T., Yoshida, T. ve Okuda, T., Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, Chem. Pharm. Bull., 37 (1989) 2016-2021.
- Heijnen, C. G. M., Haenen, G. R. M. M., Wiseman, S. A., Tijburg, L. B. M. ve Bast, A. The interaction of tea flavonoids with the NO-system: Discrimination between good and bad NO, Food Chem., 70 (2000) 365-370.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R. ve Bobilya, D. J., Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, J. Nutr. Biochem., 13 (2002) 572-584.
- Hill, R., Propolis: The natural antibiotic, Thorsons Publishers Ltd., Wellingborough, UK 1977.

- Hudson, B. J. F., Food antioxidants, Elsevier applied science, London, 1990.
- Jin Jun, W., Han, B. K., Yu, K. W., Kim, M. S., Chang, I. S., Kim, H. Y. ve Cho, H. Y., Antioxidant effects of *Origanum majorana* L. on superoxide anion radicals, Food Chem., 75 (2001) 439-444.
- Katalini, V., Milos, M., Modun, D., Musi, I. ve Boban, M., Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin, Food Chem., 86 (2004) 593-600.
- Kaur Bath, P. ve Singh, N., A comparison between *Helianthus annuus* and *Eucalyptus lanceolatus* honey, Food Chem., 67 (1999) 389-397.
- Ketsawatsakul, U., Whiteman, M. ve Halliwell, B., A reevaluation of the peroxynitrite scavenging activity of some dietary phenolics, Biochem. Bioph. Res. Co., 279 (2000) 692-699.
- Kolaylı, S., Küçük, M., Duran, C., Candan, F. ve Dinçer, B., Chemical and antioxidant properties of *Laurocerasus officinalis* Roem. (Cherry laurel) fruit grown in Black Sea Region, J. Agr. Food Chem., 51 (2003) 7489-7494.
- Kondo, H., Takahashi, M. ve Niki, E., Peroxynitrite-induced hemolysis of human erythrocytes and its inhibition by antioxidants, FEBS Letters, 413 (1997) 236-238.
- Koppenol, W. H., Kissner, R. ve Beckman, J. S., Synthesis of peroxynitrite: to go with the flow or on solid grounds?, Method Enzymol., 269 (1996) 296-302.
- Kröncke, K. D., Suschek, C. V. ve Kolb-Bachofen, V., Implications of inducible nitric oxide synthase expression and enzyme activity, Antioxidants and Redox Signaling, 2, 3 (2000) 585-605.
- Ladas, S. P., Haritos, D. N. ve Raptis, S. A., Honey may have a laxative effect on normal subjects because of incomplete fructose absorption, Am. J. Clin. Nutr., 62 (1995) 1212-1215.
- Larson, R. A., The antioxidants of higher plants, Phytochemistry, 27 (1988) 969-978.
- Marcucci, M. C., Propolis : chemical composition, biological properties and therapeutic activity, Apidologie, 26 (1995) 89-99.
- Matés, J. M., Pérés-Gomez, C. ve de Castro, I. N., Antioxidant enzymes and human diseases, Clin. Biochem., 32, 8 (1999) 595-603.
- Meister, A. ve Anderson, M. E., Glutathion, Annu. Rev. Biochem., 52 (1983) 711-60.
- McClure, J. W., Physiology and functions of flavonoids, The Flavonoids, Academic Press, New York, 1975.
- Molan, P. C., The antibacterial activity of honey: 1. The nature of the antibacterial activity, Bee World, 73 (1992) 5-28.

- Nagai, T. ve Inoue, R., Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly, Food Chem., 84, 2 (2004) 181-186.□
- Nedospasov, A. A., Review: Competition Involving Biogenic NO, Biochemistry, 63, 7 (1998) 744-881.
- Niki, E., Antioxidant in relation to lipid peroxidation, Chem. Phys. Lipids, 44 (1987) 227-253.
- Orhan, F., Sekerel, B. E., Sackesen, C., Adalioğlu, G. ve Tuncer, A., Complementary and alternative medicine in children with asthma, Ann. Allerg. Asthma Im., 90, 6 (2003) 611-616.
- Oyaizu, M., Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine, Jap. J. Nutr., 44 (1986) 307-315.
- Ötleş, S., Bal ve bal teknolojisi kimyası ve analizleri, Alaşehir Meslek Yüksek Okulu, Yayın No:2, Ege Üniversitesi Matbaası, İzmir, 1995.
- Peterson, J. V. ve Dwyer, J., Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity, Nutr. Res., 18, 12 (1998) 1995-2018.
- Rashed, M. N. ve Soltan, M. E., Major and trace elements in different types of Egyptian mono-floral and non-floral bee, J. Food Comp. Anal., 17, 6 (2004) 725-735.
- Retsky, K. L., Freeman, M. W. ve Frei, B., Ascorbic acid oxidation products protect human low density lipoprotein against atherogenic modification-oxidant rather than prooxidant activity of vitamin C in the presence of transition metal ions, J. Biol. Chem., 268 (1993) 1304-1309.
- Riboli, E. ve Norat, T., Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk, Am. J. Clin. Nutr., 78, 3 (2003) 559-569.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. ve Paganga, G., Antioxidant properties of phenolic compounds, Trends Plant Sci., 2, 4 (1997) 152-159.
- Robak, J. ve Gryglewski, R. J., Flavonoids are scavengers of superoxide anions, Biochem. Pharmacol., 37 (1988) 837-841.
- Robards, K., Prenzlere, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P. ve Glover, W., Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits, Food Chem., 66 (1999) 401-436.
- Rodriguez, G. O., Ferrer, B. S., Ferrer, A. ve Rodriguez, B., Characterization of honey produced in Venezuela, Food Chem., 84, 4 (2004) 499-502.

- Russo, A., Cardile, V., Sanchez, F., Toroncoso, N., Vanella, A. ve Garbarino, J. A., Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines, Life Sci., 76, 5 (2004) 545-558.
- Saha, A., Goldstein, S., Cabell, D. ve Czapski, G., Determination of optimal conditions for synthesis of peroxyxynitrite by mixing acidified hydrogen peroxide with nitrite, Free Radical Biol. Med., 24, 4 (1998) 653-659.
- Sakihama, Y., Cohen, M. F., Grace, S. C. ve Yamasaki, H., Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants, Toxicology, 177 (2002) 67-80.
- Santos, K. S., Santos, L. D., Mendes, M. A., Souza, B. M., Malaspina, O. ve Palma, M. S., Profiling the proteome complement of the secretion from hypopharyngeal gland of Africanized nurse-honeybees (*Apis mellifera* L.), Insect Biochem. Molec., (2005) Article in Press.
- Selloum, L., Reichl, S., Muller, M., Sebihi, L. ve Arnhold, J., Effects of flavonols on the generation of superoxide anion radicals by xanthine oxidase and stimulated neutrophils, Arch. Biochem. Biophys., 395 (2001) 49-56.
- Sorkun, K., Doğan, C. ve Başoğlu, N., Physicochemical characteristics and composition of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh honey produced in Turkey, Apiacta., 36, 4 (2001) 182-189.
- Storz, G. ve Imlay, J., Oxidative stress, Current Opin. Microbiol., 2 (1999) 188-194.
- Slinkard, K. ve Singleton, V. L., Total phenol analysis: automation and comparison with manuel methods, Am. J. Enol. Viticult., 28 (1977) 49-55.
- Sies, H., Oxidative stress from basic research to clinical application, Am. J. Med., 9 (1991) 31-37.
- Siddhuraja, P., Mohan, P. S., ve Becker, K., Studies on the antioxidant activity of Indian Labarnum (*Cassia fistula* L.). A preliminary assesment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp, Food Chem., 79, 1 (2000) 61-67.
- Snow, W., 2004. Minerals: Recommended intake levels, 30 Haziran 2004, http://www.supplementquality.com/news/multi_mineral_chart.html, 21 Aralık 2004.
- Snowdon, J. A. ve Cliver, D. O., Microorganisms in honey, Int. J. Food Microbiol., 31 (1996) 1-26.
- Sönmez, R., Arıcılık, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi yayınları no: 125, II. Baskı, Balpazar yayınları, Bornova, İzmir, 1979.
- Subrahmanyam M., Topical application of honey in the treatment of burns, Br. J. Surg., 78 (1991) 497-498.

- Tsuda, T., Kato, Y. ve Osawa, T., Mechanism for the peroxynitrite scavenging activity by anthocyanins, FEBS Letters, 484 (2000) 207-210.
- TS 3036, Bal, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara, 2002.
- URL-1, Arı Ürünleri, <http://www.arisan-arge.com/AriUrun-tr.htm>, 11 Kasım 2004.
- URL-2, All about minerals: A reference and information guide, 1996–2004 by AlphaOmega Marketing, <http://www.aomega.com/minerals/minerals.htm>, 21 Aralık 2004.
- URL-3, 2004. Hangi Mineral Ne İşe Yarar?, <http://www.anatolya.net/Content.asp?idx=Oo17rZ4>, 21 Aralık 2004.
- Üren, A., Şerifoğlu, A. ve Sarıkahya, Y., Distribution of elements in honeys and effect of a thermoelectric power plant on the element contents, Food Chem., 61 (1998) 185-190.
- Van Acker, S. A. B. E., Van Balen G. P., Van den Berg, D. J., Bast, A. ve Van der Vijgh, W. J. F., Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids, Biochem. Pharmacol., 56 (1998) 935-943.
- Weston, R. J., Mitchell, K. R. ve Allen, K. L., Antibacterial phenolic components of New Zealand Manuka honey, Food Chem., 64 (1999) 295-301.
- Weston, R. J., The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review, Food Chem., 71 (2000) 235-239.
- Weston, R. J., Brocklebank, L. K. ve Lu, Y., Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand honeys, Food Chem., 70 (2000) 427-435.
- White, J. W., Composition of honey. In: Crane. E. (Ed.) Honey: A comprehensive survey. Heinemann, London, 1979.
- White J. W., Subers, M. H. ve Schepartz, A. I., The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidases system, Biochim. Biophys. Acta., 73 (1963) 57-70.
- Winston, G. W., Oxidant and antioxidants, in aquatic animals, Comp. Biochem. Phys., 100 (1991) 173-176.
- Woollenweber, E. ve Dietz, V. H., Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants, Phytochemistry, 20 (1981) 869-932.
- Wollgast, J. ve Anklam, E., Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification, Food Res. Int., 33 (2000) 423-347.

Yao, L., Jiang, Y., Singanusong, R., Data, N. ve Raymont, K., Phenolic acids and abscisic acid in Australian Eucalyptus honeys and their potential for floral authentication, Food Chem., 86, 2, 169-177.

Yılmaz, H. ve Yavuz, Ö., Content of some trace metals in honey from South-eastern Anatolia, Food Chem., 65 (2004) 475-476.

Zumla, A. ve Lulat, A., Honey-a remedy rediscovered, J. R. Soc. Med., 82 (1989) 384-385.



ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında İstanbul'un Eminönü ilçesinde doğdu. 1996 yılında Çemberlitaş Kız Lisesi'nden mezun oldu. 1996 yılında Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'ne girdi. 2001 yılında bu bölümden gıda mühendisi unvanı ile mezun oldu. 2002 yılında KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Programı'na başladı. 2002 yılında Kimya bölümünde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı, halen de bu göreve devam etmektedir. Yabancı dili İngilizce'dir. Evlidir.

