

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**ERZİNCAN ÜZÜMÜNÜN (*Vitis vinifera* ssp. , CİMİN) FARKLI DOKULARINA  
AİT EKSTRAKTLARIN ANTIOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN İN VİTRO  
İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Kimyager Arife Pınar EKİNCİ**

**AĞUSTOS 2008  
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**ERZİNCAN ÜZÜMÜNÜN (*Vitis vinifera* ssp. , CİMİN) FARKLI DOKULARINA AİT  
EKSTRAKTLARIN ANTIOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN İN VİTRO İNCELENMESİ**

**Kimyager Arife Pınar EKİNCİ**

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

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 03.07.2008**

**Tezin Savunma Tarihi : 05.08.2008**

**Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Avni UYDU**

**Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK**

**Jüri Üyesi : Prof. Dr. Orhan DEĞER**

**Enstitü Müdürü Vekili : Doç. Dr. Salih TERZİOĞLU**

**Trabzon 2008**

## ÖNSÖZ

‘Erzincan Üzümünün (*Vitis vinifera* ssp., Cimin) Farklı Dokularına Ait Ekstraktların Antioksidan Özelliklerinin İn Vitro İncelenmesi’ adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

Her şeyden önce bana bu konuda çalışma olanağı sağlayan ve çalışmamı başından sonuna kadar sürekli takip edip, bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Avni UYDU’ ya teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında bana yardımcı olan arkadaşlarım Arş. Gör. Emine AKYÜZ, Arş. Gör. Songül AKBULUT ve Mehtap BİLİCİ’ ye teşekkür ederim. Ayrıca istatistik analizlerin hesaplanmasında yardımcı olan Rize Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi öğretim üyeleri Sayın Yrd. Doç. Dr. Ali BİLGİN ve Yrd. Doç. Dr. Nurhayat ÖZDEMİR’e teşekkür ederim.

Çalışmalarımın bir kısmını yaptığım ÇAYKUR Atatürk Çay ve Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü’ne ve bana yardımcı olan Gıda Mühendisi Sayın Nesrin Sağlam’ a teşekkür ederim.

Araştırma görevlisi olarak çalıştığım Rize Üniversitesi Rektörü Sayın Prof. Dr. Nazmi Turan OKUMUŞOĞLU’na ve Kimya Bölüm Başkanı Sayın Yrd. Doç. Dr. Ahmet TABAK’ a çalışmalarımı yürütebilmem için sağladıkları her türlü imkandan dolayı teşekkür ederim.

Son olarak da bana bugünlere kadar gelmemde her türlü maddi-manevi desteği esirgemeyen babam Feyyaz EKİNCİ ve annem Ülviye EKİNCİ’ ye teşekkürü bir borç bilirim.

Arife Pınar EKİNCİ

Trabzon, 2008

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	VI
SUMMARY.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Serbest Radikaller.....	3
1.2.1. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri.....	6
1.2.2. Lipit Peroksidasyon Göstergesi Olarak Malondialdehit (MDA).....	9
1.3. Antioksidan Sistemler.....	12
1.3.1 Antioksidan Enzimler.....	17
1.3.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD).....	17
1.3.1.2. Glutasyon Peroksidaz.....	18
1.3.1.3. Katalaz (CAT).....	19
1.3.1.4. Glutasyon Redüktaz (GR).....	19
1.3.2. Bitkisel Antioksidan Olan Fenolik Bileşikler.....	20
1.4. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri.....	28
1.4.1. MDA Oluşumunun İnhibisyonu Yöntemi.....	29
1.4.2. Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvvet (FRAP) Yöntemi.....	29
1.4.3. Toplam Fenolik Madde Tayini Yöntemi.....	30
1.4.4. DPPH Radikali Temizleme Aktivitesi Yöntemi.....	30
1.4.5. Bakır (II) İndirgenme Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi.....	31
1.5. Bitki Bileşenlerinin Analizinde Kullanılan Yöntemler.....	31
1.5.1. Modern Kromatografik Yöntemler.....	31
1.5.1.1. Yüksek-Performanslı Sıvı Kromatografisi.....	32
1.6. Erzincan Üzümü ( <i>Vitis vinifera</i> , Cimin) Bitkisinin Özellikleri.....	34
1.6.1. Genel Özellikleri.....	34

1.6.2.	Ürünün Bileşimi.....	34
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	36
2.1.	Kullanılan Cihazlar.....	36
2.2.	Kullanılan Çözeltiler ve Kimyasallar.....	36
2.3.	Meyvenin Toplanması ve Ekstraktların Hazırlanması.....	38
2.1.	Metanolla Soxhlet Ekstraksiyonu.....	38
2.3.2.	Sulu Ekstraktların Hazırlanması.....	39
2.4.	Erzincan Üzümünün Farklı Dokulardaki Toplam Fenolik Madde Miktarlarının Belirlenmesi.....	39
2.5.	Erzincan Üzümünün Farklı Dokularından Elde Edilen Ekstraktlardaki Polifenol Bileşiminin HPLC ile Analizi.....	40
2.6.	Antioksidan Tayin Yöntemleri.....	42
2.6.1.	DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi.....	42
2.6.1.2.	IC <sub>50</sub> Değerlerinin Bulunması.....	43
2.6.2.	Eritrositlerde MDA Miktar Tayini.....	43
2.6.2.1.	Eritrosit Paketinin Hazırlanması.....	43
2.6.2.2.	Hücre Süspansiyonlarının Hazırlanması.....	43
2.6.2.3.	Eritrosit MDA Miktar Tayini.....	44
2.6.3.	Plazma Konjugedien Oluşumu İçin Gerekli Süre (t-lag) Değerlerinin Bulunması.....	45
2.7.	İstatistik Analiz.....	45
3.	BULGULAR.....	46
3.1.	Erzincan Üzümünün Farklı Dokulardan Elde Edilen Toplam Fenolik Madde Miktarları.....	46
3.2.	Erzincan Üzümünün Farklı Dokularından Elde Edilen Ekstraktlardaki Polifenol Bileşiminin HPLC ile Analizi.....	47
3.3.	Erzincan Üzümünün Farklı Dokularından Elde edilen Ekstraktlarda Antioksidan Aktivite Tayinleri.....	51
3.3.1.	Çalışma Gruplarının DPPH Radikali Temizleme Aktivitesi.....	51
3.3.2.	Eritrosit MDA Düzeyleri.....	55
3.3.3.	Plazma Konjugedien Oluşumu İçin Gerekli Süre (t-lag) Değerleri.....	70
4.	TARTIŞMA.....	76
5.	SONUÇLAR.....	82

6.	ÖNERİLER.....	83
7.	KAYNAKLAR.....	84
	ÖZGEÇMİŞ	

## ÖZET

Organizmada, kimyasal süreçler, özellikle oksitlenme, serbest radikallerin oluşmasına neden olur. Serbest radikaller yaşam için gereklidir; fakat yüksek derecede reaktif olan serbest radikaller biyomoleküllerle kolayca reaksiyona girerek hücrelere zarar verebilecek toksik özellikte bileşikler oluşturabilir. Antioksidanlar serbest radikallerle etkileşerek serbest radikallerin hücrelere zarar vermelerini önlerler. Günümüzde antioksidan özelliği keşfedilen birçok farklı madde vardır. Bu maddelerin bir kısmını vücut kendisi, serbest radikallere karşı bir savunma sistemi olarak üretirken, bir kısmını diyetimizle özellikle bitkilerden alırız. Bu çalışmanın amacı Erzincan üzümünün (*Vitis vinifera* ssp. , Cimin) farklı dokularından elde edilen ekstraktların antioksidan özelliğini ve kimyasal bileşimini belirlemek ve bu dokuların antioksidan kapasitesini eritrositler üzerinde zaman ve ekstrakt konsantrasyonuna bağlı olarak karşılaştırmaktır. Ayrıca benzer kıyaslamayı plazma üzerinde de gerçekleştirmektedir. Çalışmada kullanılan meyveler Erzincan'dan getirilmiştir.

Meyvenin sulu ve metanollü ekstraktlarının toplam fenolik madde içerikleri Folin-Ciocalteu reaktifıyla kateşin standartına eşdeğer olarak; bu ekstraktlardaki bazı flavonodleri ise HPLC cihazı ile (ISO 14502-2, 2005) belirlendi. DPPH radikal temizleme aktivitesi Cuendet metodu ile kateşin standartıyla karşılaştırmalı olarak tayin edildi. Ekstraktların hücre (eritrosit) üzerine etkisi; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oksidan stres oluşturulan eritrositlerdeki lipid peroksidasyon son ürünü tayini ile belirlendi. Son ürün (MDA) Stocks metodu ile tespit edildi. Plazmada ise konjugedien oluşumunun göstergesi olan t-lag zamanı Spranger protokolüne göre belirlendi.

Meyvenin fenolik bileşimi en yüksek metanolik özütlerde ve çekirdeğin sulu ekstraktında gözlemlendi ve en yüksek flavonoid ise kateşin olduğu tespit edildi. Flavonid düzeylerine paralel şekilde en yüksek radikal temizleme aktivitesi, en düşük lipid peroksidasyon düzeyi ve en uzun t-lag süresi üzümün metanolik ekstraktlarında olduğu belirlendi.

Sonuç olarak üzümün farklı dokularında flavonoid bileşimine bağlı olarak farklı antioksidan özelliğe sahip olduğu görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Erzincan üzümü, Flavonoid, MDA, t-lag süresi.

## SUMMARY

### **The Investigation of Antioxidant Properties in Extracts of Different Parts of Erzincan Grape (*Vitis vinifera* ssp., Cimin) in vitro**

Chemical processes, especially oxidation, cause formation of free radicals in organisms. Free radicals are necessary for life, but highly reactive free radicals can form toxic compounds that can damage cells reacting easily with biomolecules. Antioxidants prevent cell damages from free radicals by interacting with them. Antioxidant properties of lots of different substances have been discovered recently. While the body produces a number of these substances against free radicals as a defense system, we take many others especially from plants. The aim of this study is to investigate the antioxidant activity of aqueous and methanolic extracts from Erzincan grape's (*Vitis vinifera* ssp., Cimin) different parts and to determine chemical composition of this extracts and to compare antioxidant capacity depends on the concentration of these extracts and time. Fruits used in this study was brought from Erzincan.

Total phenolic contents of all extracts of the plants were evaluated with Folin-Ciocalteu reagent as, equivalent to the standard antioxidant, catechin. In addition, phenolic substances of these extracts were evaluated by HPLC. DPPH radical scavenging antioxidant activities of the extracts were evaluated with the method modified from Cuendet by comparing with catechin. The effect of extracts on the erythrocytes were evaluated by the last product of lipid peroxidation in the erythrocytes exposed to oxidant stress with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The last product (MDA) was determined by the Stocks method. T-lag time that is an indicator of the form of conjugated-diene was determined according to Spranger protocol in plasma.

It was observed that the phenolic content was the most abundant in the all methanolic extracts and the aqueous extract of seed. Catechin was the most abundant flavonoid in the all extracts. The highest radical scavenging activity, the lowest level of the lipid peroxidation and the longest t-lag time were observed in the methanolic extracts of the grape as being parallel their flavonoid contents.

Consequently, different parts of the grape has different antioxidant properties depend on their flavonoid contents.

**Key Words:** Erzincan grape, Flavonoid, MDA, t-lag time



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Serbest radikallerin hücresel hedefleri.....	7
Şekil 2. Serbest radikallerin hücreye etkisi.....	10
Şekil 3. Lipit peroksidasyonu mekanizması.....	11
Şekil 4. Antioksidanların sınıflandırılması.....	14
Şekil 5. E vitamini (5,7,8-trimetiltokol [ $\alpha$ -tokoferol])' nin formülü.....	16
Şekil 6. BHT (2,6 di-tert - butil- 4 metil fenol [butillenmiş hidroksitoluen])'nin peroksil radikali ile reaksiyonu.....	16
Şekil 7. Flavonoidlerin temel yapısı (a) ve bazı substituentleri (b).....	21
Şekil 8. Flavonoidlerin kimyasal yapısı.....	22
Şekil 9. Diyetlerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerin yapıları.....	23
Şekil 10. Demir (III)'ün indirgenme reaksiyonu.....	30
Şekil 11. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalinin formülü.....	31
Şekil 12. Erzincan üzümü'nün fotoğrafları.....	35
Şekil 13. Toplam fenolik madde tayini yönteminde standart olarak kullanılan kateşinin farklı konsantrasyonlarına karşı 700 nm'de verdiği absorpsiyon değerlerinin gra.....	42
Şekil 14. Gallik asit, kafein ve kateşin standartlarına ait kromatogram.....	42
Şekil 15. Lipit peroksidasyonu sonucu pembe rengin oluştuğu MDA ile TBA'nın tepkimeye girdiği reaksiyon.....	44
Şekil 16. Erzincan üzümünün farklı dokularına ait toplam fenolik madde miktarları ( mM eşdeğer miktarda kateşin).....	46
Şekil 17. Erzincan üzümünün meyve suyuna (EÜ) ait kromatogram.....	48
Şekil 18. Erzincan üzümünün kabuğunun sulu ekstraktına (EÜK) ait kromatogram.....	48
Şekil 19. Erzincan üzümünün kabuğunun metanollü ekstraktına ait kromatogram.....	49
Şekil 20. Erzincan üzümünün çekirdeğinin sulu ekstraktına (EÜÇS) ait kromatogram...49	49
Şekil 21. Erzincan üzümünün çekirdeğinin metanollü ekstraktına ait kromatogram.....	50
Şekil 22. Standart olarak kullanılan kateşinin DPPH radikali temizleme aktivitesi ( $IC_{50} = 43\mu M$ ).....	51
Şekil 23. Erzincan üzümünün meyve suyunun DPPH radikali temizleme aktivitesi ( $IC_{50} = 230\mu M$ ).....	52

Şekil 24. Erzincan üzümünün kabuğunun sulu ekstraktı DPPH radikali temizleme aktivitesi ( $IC_{50} = 225 \mu M$ ).....	52
Şekil 25. Erzincan üzümünün kabuğunun metanollü ekstraktı DPPH radikali temizleme aktivitesi( $IC_{50} = 127 \mu M$ ).....	53
Şekil 26. Erzincan üzümünün çekirdeğinin sulu ekstraktının DPPH radikali temizleme aktivitesi ( $IC_{50} = 359 \mu M$ ).....	53
Şekil 27. Erzincan üzümünün çekirdeğinin metanollü ekstraktı DPPH radikali temizleme aktivitesi ( $IC_{50} = 130 \mu M$ ).....	54
Şekil 28. Kateşin standartı ile Erzincan üzümü meyve suyu, kabuk ve çekirdeğinin sulu ve metanollü ekstraktlarının 517 nm'deki DPPH radikali temizleme aktivitesi tayinleri sonucu elde edilen $IC_{50}$ değerleri ( $\mu M$ ).....	54
Şekil 29. 15. dakikada, Erzincan üzümünün farklı dokulardan elde edilen ekstraktlarının ve standart kateşinin eritrositlerde lipit peroksidasyonun bir göstergesi olan MDA oluşumuna etkisinin karşılaştırılmasını gösteren grafik.....	57
Şekil 30. 15. dakikada, Erzincan üzümünün farklı dokularından elde edilen ekstraktlarının ve kateşinin farklı konsantrasyonlarının eritrositlerde lipit peroksidasyonun sonucunda MDA oluşturma düzeylerinin karşılaştırılmasını gösteren grafik.....	58
Şekil 31. 30. dakikada, Erzincan üzümünün farklı dokulardan elde edilen ekstraktlarının ve standart kateşinin eritrositlerde lipit peroksidasyonun bir göstergesi olan MDA oluşumuna etkisinin karşılaştırılmasını gösteren grafik.....	59
Şekil 32. 30. dakikada, Erzincan üzümünün farklı dokularından elde edilen ekstraktlarının ve kateşinin farklı konsantrasyonlarının eritrositlerde lipit peroksidasyonun sonucunda MDA oluşturma düzeylerinin karşılaştırılmasını gösteren grafik.....	60
Şekil 33. 45. dakikada, Erzincan üzümünün farklı dokulardan elde edilen ekstraktlarının ve standart kateşinin eritrositlerde lipit peroksidasyonun bir göstergesi olan MDA oluşumuna etkisinin karşılaştırılmasını gösteren grafik.....	61
Şekil 34. 45. dakikada, Erzincan üzümünün farklı dokularından elde edilen ekstraktlarının ve kateşinin farklı konsantrasyonlarının eritrositlerde lipit peroksidasyonun sonucunda MDA oluşturma düzeylerinin karşılaştırılmasını gösteren grafik.....	62
Şekil 35. 60. dakikada, Erzincan üzümünün farklı dokulardan elde edilen ekstraktlarının ve standart kateşinin eritrositlerde lipit peroksidasyonun bir göstergesi olan MDA oluşumuna etkisinin karşılaştırılmasını	

gösteren grafik.....	63
Şekil 36. 60. dakikada, Erzincan üzümünün farklı dokularından elde edilen ekstraktlarının ve kateşinin farklı konsantrasyonlarının eritrositlerde lipit peroksidasyonun sonucunda MDA oluşturma düzeylerinin karşılaştırılmasını gösteren grafik.....	64
Şekil 37. Paket peroksit ve 100 µM standart ve ekstrakt içeren bütün çalışma gruplarında MDA düzeylerinin zamanla değişimini gösteren grafik.....	65
Şekil 38. Paket peroksit ve 200 µM standart ve ekstrakt içeren bütün çalışma gruplarında MDA düzeylerinin zamanla değişimini gösteren grafik.....	65
Şekil 39. Peroksitli paket ve 100µM'lik konsantrasyonlu özütlü paketlerin lipit peroksidasyon düzeylerinin zamana bağlı olarak % değişimleri.....	67
Şekil 40. Peroksitli paket ve 100µM'lik konsantrasyonlu özütlü çalışma gruplarına ait lipit peroksidasyon sonucu oluşan MDA düzeylerinin zamana bağlı olarak % değişimlerinin birbirleriyle karşılaştırılması.....	68
Şekil 41. Peroksitli paket ve 200µM'lik konsantrasyonlu özütlü paketlerin lipit peroksidasyon sonucu oluşan MDA düzeylerinin zamana bağlı olarak % değişimleri.....	69
Şekil 42. Peroksitli paket ve 100µM'lik konsantrasyonlu özütlü paketlerin lipit peroksidasyon düzeylerinin zamana bağlı olarak % değişimlerinin birbirleriyle karşılaştırılması.....	70
Şekil 43. Plazma ve Erzincan üzümünün farklı dokularının ekstraktlarının bulunduğu plazmalara ait ortalama t-lag zamanları.....	72
Şekil 44. Plazma ve Erzincan üzümüne ait farklı dokulardan elde edilen ekstraktların bulunduğu plazmalara ait konjugedien oluşumunun göstergesi olan t-lag zamanını gösteren absorban(234 nm)- zaman (dakika) grafiği.....	72
Şekil 45. t- lag EÜÇS ile 45. dakika 200µM EÜÇS içeren çalışma grubu arasındaki regresyon grafiği.....	73
Şekil 46. t- lag EÜK ile 45. dakika 200 µM EÜK içeren çalışma grubu arasındaki regresyon grafiği.....	74
Şekil 47. t- lag EÜÇS ile 60. dakika 200µM EÜÇS içeren çalışma grubu arasındaki regresyon grafiği.....	75

## TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Hücrelerdeki serbest radikal hedefleri .....	8
Tablo 2. Temel antioksidanlar ve özellikleri.....	12
Tablo 3. Denemelerde kullanılan cihazlar.....	36
Tablo 4. Çözeltiler ve hazırlanışları.....	36
Tablo 5. Kimyasallar ve satın alındıkları firmalar.....	37
Tablo 6. Numune kodları.....	38
Tablo 7. Polifenol tayini için pipetleme miktarları.....	39
Tablo 8. Gradient şartları .....	41
Tablo 9. Erzincan üzümünün farklı dokularına ait toplam fenolik madde miktarları (mM eşdeğer miktarda kateşin.....)	47
Tablo 10. Erzincan üzümünün farklı dokularının farklı çözücülerdeki fenolik madde miktarları mg/mL.....	50
Tablo 11. Kateşin standartı ile Erzincan üzümü meyve suyu, kabuk ve çekirdeğinin sulu ve metanollü ekstraktlarının 517 nm'deki DPPH radikali temizlem aktivitesi tayinleri sonucu elde edilen IC <sub>50</sub> değerleri (µM).....	55
Tablo 12. Eritrosit ve özütlü eritrosit süspansiyonlarının H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> aracılı lipit peroksidasyon düzeylerinin zaman ve özüt konsantrasyonuna bağlı değişimleri(nmol MDA/g Hb).....	56
Tablo 13. Bütün çalışma gruplarının lipit peroksidasyon sonucu oluşan MDA düzeylerinin zamanla % değişimi.....	66
Tablo 14. Erzincan üzümüne ait farklı dokulardan elde edilen bitki ekstraktlarının plazmada konjugedien oluşumu ile ilgili ortalama t-lag zamanları.....	71

## SEMBOLLER DİZİNİ

BHA	: Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	: Bütillenmiş hidroksitoluen
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
CAT	: Katalaz
ÇMYD	: Çoklu doymamamış yağ asidi
CoA	: Koenzim A
Cu	: Bakır
CUPRAC	: Bakır (II) İndirgenme Antioksidan Kapasitesi
CuSO <sub>4</sub>	: Bakır sülfat
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DPPH	: 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
e <sup>-</sup>	: Elektron
EC	: Epikateşin
ECG	: Epikateşin gallat
EGC	: Epigallo kateşin
EGCG	: Epigallo kateşin gallat
Fe	: Demir
Fe <sup>+2</sup>	: Ferro demir
Fe <sup>+3</sup>	: Ferri demir
FID	: Alev İyonlaşma Dedektörü
FRAP	: Demir (III) İndirgeme Kuvveti
GSH	: İndirgenmiş glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
GR	: Glutatyon redüktaz
GSSG	: Yükseltgenmiş glutatyon
GST	: Glutatyon-S-transferazlar
Hb	: Hemoglobin
H <sub>2</sub> O	: Su
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen peroksit
HCl	: Hidroklorik Asit

HPLC	: Yüksek-Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPT	: Haptoglobin
IC <sub>50</sub>	: %50 İnhibisyon konsantrasyonu
KC	: Karaciğer
L•	: Lipit radikali
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
LH	: Lipit
LOO•	: Lipit peroksil radikali
LOOH	: Lipit hidroperoksit
MDA	: Malondialdehit
MLT	: Melatonin
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	: Sodyum bi karbonat
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
NaN <sub>3</sub>	: Sodyum azid
NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	: Nitronyum iyonu
NO <sub>2</sub>	: Azot dioksit
Nm	: Nanometre
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	: Süperoksit
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	: Süperoksit radikali
OH <sup>-</sup>	: Hidroksil
OH <sup>•-</sup>	: Hidroksil radikali
PAB	: Prealbumin
PBS	: Tuzlu Fosfat tamponu ( Phosphate buffer in salt)
Ppm	: Milyonda bir kısım
R•	: Serbest radikal
RES	: Retikulo endotelyal sistem
RH	: Çoklu doymamış yağ asidi
RNA	: Ribo nükleik asit
RO•	: Alkoksil radikali
ROO•	: Peroksil radikali
ROOH	: Hidroperoksit
RS•	: Tiyol radikalleri

SER	: Seruloplazmin
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBA	: 2-Tiyobarbütirik asit
TCA	: Trikloroasetik asit
TRF	: Transferrin
TPTZ	: 2,4,6-tripiridil-s-triazin
UV	: Ultraviyole
UV-VIS	: Ultraviyole- Görünür Bölge
V	: Volt
VIS	: Görünür
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Vücudumuz normal fonksiyonları için enerji üretirken, her saniye milyonlarca serbest radikal oluşmasına neden olur. Çevre kirliliği, kimyasal maddeler, petrokimya ürünleri, sanayi atıkları, ilaçlar, güneşin UV ışınları, ozon kozmik ışınlar, X-ışınları, virüsler, enfeksiyon, stres, sigara dumanı ve otomobil egzoz gazları gibi pek çok etken vücudumuzdaki serbest radikallerin sayısını sürekli olarak ve tahmin edemeyeceğimiz kadar artırır. Oksijen radikalleri endojen (mitokondriyal elektron transport zinciri, ksantin oksidaz, siklooksijenaz, vs.) olarak üretileceği gibi, dışardan ekzojen alınan ilaçlar ve ksenobiyotikler gibi maddeler tarafından da meydana getirilebilirler (Yavuzer, 1993). Modern gıdalar, yüksek şeker, yağ miktarı yüksek gıdalar, alkol ve hatta yoğun egzersizler de oksijen kullanımındaki artışla beraber vücudumuzdaki serbest radikallerin miktarının artmasına neden olmaktadır. Serbest radikaller; membran yapılarında bulunan fosfolipitlerin doymamış yağ asitlerini peroksidasyona uğratarak membran bütünlüğünün bozulmasına, proteinlerin denatürasyonuna, çapraz bağlarla agregasyonlarına veya parçalanmaları suretiyle aktivite kaybına, karbohidrat polimerlerinin yıkılmasına, in vivo olarak glikozaminoglikanlar ve hiyaluronik asidin depolimerizasyonuna sebep olurlar. Ayrıca DNA ile reaksiyona girerek istenmeyen mutasyonlar oluşturabilirler (Cheeseman ve Slater, 1993). Serbest radikaller; birçok hastalıkla ilişkili olması ve bu hastalıklar eşlik eden çeşitli komplikasyonların ortaya çıkışında merkezi rol oynaması dolayısıyla son yıllarda araştırmacıların ilgi alanı haline gelmiştir. Özellikle vücutta oluşan oksijen radikallerinin kalp hastalıkları, Alzheimer, Parkinson, serebrovasküler rahatsızlıklar, nörosensoryel bozukluklar, katarakt ve romatoid artrit gibi birçok hastalıkta rol oynadığı bilinmektedir. Yaşlanma sürecinde gözlenen cilt kırışıkları, böbrek fonksiyonlarında azalma ve otoimmün hastalıklara yatkınlığın artması gibi belirtilerde serbest radikaller esas faktör olarak düşünülmektedir (Cross vd., 1987).

Lipit peroksidasyonu hücre membranlarında olduğu gibi lipoprotein yapısındaki poliansatüre yağ asitleri ve kolesteroller üzerinde de oluşmaktadır. Hiperlipidemide serbest radikallerin etkisiyle ortaya çıkan lipit peroksidasyonunun ve okside LDL'nin son ürünü olan malondialdehit (MDA)' in konsantrasyonu artmaktadır (Reaven,1994). Okside LDL



karaciğer ve ekstrahepatik dokularda bulunan reseptörler tarafından tanınmaz, bunun yerine makrofajlar üzerinde bulunan Scavenger (çöpçü) reseptörler tarafından alınırlar. Ayrıca lipit peroksidasyon son ürünü olan MDA, apo B üzerindeki lizin, histidin ve serin gibi aminoasitlere bağlanarak modifiye MDA-LDL'nin oluşmasına sebep olur (Esterbauer vd., 1992).

Gerek fizyolojik olarak, gerekse patolojik durumlarda ortaya çıkan serbest radikalleri etkisiz hale getirmede etkili olan savunma sistemi süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz gibi enzimler ve glutatyon, vitaminler (vit C, E ve A) gibi hücrelere zarar veren serbest radikallerle reaksiyona girip onları etkisiz hale getirerek, kanser ve kalp hastalıkları dahil pek çok hastalığa ve erken yaşlanmaya neden olabilecek zincir reaksiyonları engelleyen veya etkilerini azaltan moleküller olan antioksidan maddelerden oluşmaktadır. Normalde vücutta oksidan-antioksidan dengesi mevcuttur. Antioksidan savunmanın yetersiz olduğu durumlarda serbest radikallerin zararlı etkileri ortaya çıkmaktadır (Akkuş, 1995). Serbest radikallerin bu zararlı etkilerini azaltmak için dışardan alınan sentetik yapıda olan antioksidanların yan etkilerinin görülmeye başlamasıyla; besin kimyası ve koruyucu tıbbın, bitkisel kaynaklı ve insan organizması için genellikle zararsız olup, yan etkileri bulunmayan doğal antioksidanlara ilgisi artmıştır. Artan bu ilgi, tüm dünyada bitkisel tedavinin desteklenmesine de zemin oluşturmuştur (Rice-Evans vd., 1997). Doğal antioksidanlar; flavonoidler başta olmak üzere sinamik asit türevleri, kumarinler, tokoferoller, organik asitler gibi bitkilerde ikincil metabolit olarak oluşan fenolik maddelerdir (Bilaloğlu ve Harmandar, 1999; Harborne, 1994).

Fenolik bileşikler antioksidan olarak, insan vücudundaki çeşitli nedenlerle oluşmuş serbest radikalleri temizleme yeteneğine sahiptirler. Ayrıca, ağır ve radyoaktif metalleri şelatlama ve otooksidasyonu önleme konusunda da fenolik bileşikler oldukça etkilidirler. Başka bir deyişle bunlar, çeşitli reaktif oksijen türlerini hücrelerden uzaklaştırarak metabolizmayı zinde tutarlar (URL-1, 2006).

Fenolik bileşikler veya polifenoller bitkilerde çeşitli meyve, sebze, kuruyemiş, tohum, çiçek, kök ve gövde kısımlarında doğal olarak sentezlenen maddelerdir (Wollgast ve Anklam, 2000). Üzümün flavonoid muhtevası yaklaşık 50-450 mg/g tane üzüm aralığındadır ve bu değer elma şeftali, portakal greyfurt ve bunun gibi benzer meyvelerden daha yüksektir (Rho ve Kim, 2006). Üzümün radikal temizleme aktivitesi ile ilgili birçok çalışmalar vardır. Bunlardan Bozan ve arkadaşlarının 11 çeşit üzüm üzerinde gerçekleştirdiği

çalışmada en yüksek antioksidan aktivitenin sahip papaz karası üzümünde görmüşlerdir(Bozan vd., 2008). Bir başka çalışmada(Dani vd., 2007) beyaz ve kırmızı üzümün eritrositler üzerindeki antioksidan etkisi karşılaştırılmış ve kırmızı üzümün daha etkin olduğunu tespit etmişlerdir. Erzincan üzümü(*Vitis vinifera* ssp.); ince kabuklu, koyu renklidir. Raf ömrünün çok kısa olması ve mayalanmaması nedeniyle şarap yapımında kullanılmaması Erzincan üzümünü diğer üzümlerden farklı kılmaktadır.

Bu çalışma, Erzincan'da yetişen ve cimin üzümü olarak adlandırılan meyvenin çeşitli kısımlarının farklı çözücülerdeki ekstraktlarının farklı yöntemlerle antioksidan aktivitelerinin ölçülmesinin yanı sıra bu antioksidan özellik göstermesine neden olan fenolik bileşikler kantitatif olarak HPLC cihazında analiz etmek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

## 1.2. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, en azından bir ortaklanmamış elektron içeren atom ya da moleküllerdir. Serbest radikaller katyonik, anyonik ya da nötral karakteristikli olabilirler. Oldukça reaktiftirler, İn vivo serbest radikal üretiminin sebepleri şunlardır: Oksijen gerektiren biyokimyasal (redoks) reaksiyonları, radyasyona (gama radyasyon) maruz kalma, ultra-viyole ışık, çevresel kirlenmeler (sigara dumanı), hiperoksia ve aşırı egzersiz.

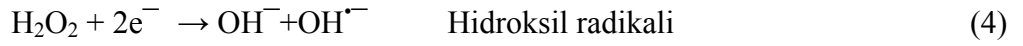
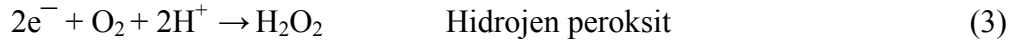
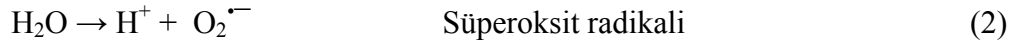
Kuantum kimyasına göre bir bağın yapısına ancak iki elektron girebilir. Ayrıca bu iki elektronun ters spinli olması gerekir. Yani elektronlardan biri saat yönünde dönerken diğeri tersi yönde döner. Bu şekilde bir araya gelmiş elektron çiftleri oldukça kararludur ve insan vücudunda neredeyse tüm elektronlar elektron çifti halinde bulunur.

Bir bağ koptuğunda elektronlar ya birlikte aynı atoma katılır ya da ayrılarak biri bir atoma, diğeri öbür atoma katılır. Eğer birlikte kalırlarsa oluşan atom bir iyon olur, eğer ayrılırlarsa serbest radikaller oluşur. Serbest radikalleri oluşturan bu eşleşmemiş elektronlar yüksek enerjilidir ve eşleşmiş elektronları ayırıp işlerine engel olurlar. Bu işlem serbest radikalleri hem tehlikeli hem de kullanışlı yapar. Bir serbest radikal, çift halde bulunan elektronların çoğunu birbirinden ayırarak reaksiyonu durdurur. Ama sonuçta serbest radikal kendine bir elektron alarak elektron çifti haline geçer, diğerelektronsa yeni bir serbest radikal oluşturur (URL-2, 2007).

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijen kaynaklı olanlarıdır. Bu radikaller, oksijenin suya indirgenmesi sırasında tek elektron aktarması sonucunda oluşan;

oksijenin kendisi (singlet oksijen), süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metallerinin iyonları ve hidroksil radikalidir (Akkuş, 1995).

Moleküler oksijenin bir elektron almasıyla süperoksit ( $O_2^{\bullet-}$ ), iki elektron almasıyla hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), üç elektron almasıyla hidroksil ( $OH^{\bullet}$ ) radikali, dört elektron almasıyla ise su ( $H_2O$ ) oluşmaktadır.



Singlet oksijen ( $O_2$ ), ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi, bu reaksiyonların başlamasına da sebep olur. Serbest oksijen radikallerinin etkisi sonucu karbon merkezli radikaller ( $R^{\bullet}$ ), peroksil radikalleri ( $ROO^{\bullet}$ ), alkoksil radikalleri ( $RO^{\bullet}$ ), tiyol radikalleri ( $RS^{\bullet}$ ) gibi önemli serbest radikaller meydana gelir.

Süperoksit radikali, oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu meydana gelir.

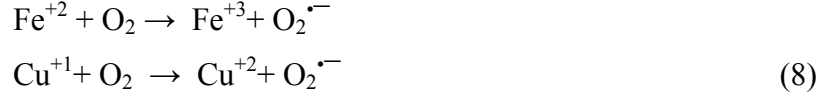


Süperoksit, bir serbest radikal olmakla birlikte, kendisi tek başına zarar vermez. Asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksitin nitrik oksit ile birleşmesi sonucu reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitrit meydana gelir.

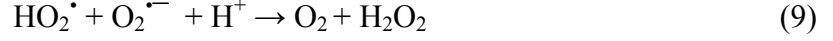


Peroksinitritin doğrudan proteinlere zararlı etkileri vardır ve azot dioksit ( $NO_2^{\bullet}$ ), hidroksil radikali ( $OH^{\bullet}$ ) ve nitronyum iyonu ( $NO_2^+$ ) gibi farklı toksik ürünlere dönüşürler.

Süperoksit radikali kuvvetli bir indirgeyici ajandır. Özellikle hem grupları, Fe-S grupları ile ve prostatik grup olarak geçiş metalleri (Fe, Cu gibi) içeren gruplarla etkileşim gösterir.



Süperoksit radikali süperoksit dismutaz (SOD) ile mutasyona uğrayarak hidrojen peroksiti oluşturur.



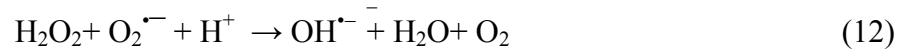
Hidrojen peroksit, moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü, iki hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksidi ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) meydana getirir.



Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi süperoksidin dismutasyonu ile olur.



Hidrojen peroksit, süperoksit ile reaksiyona girerek en aktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturur. Bu reaksiyona ‘‘Haber-Weiss’’ reaksiyonu adı verilir.



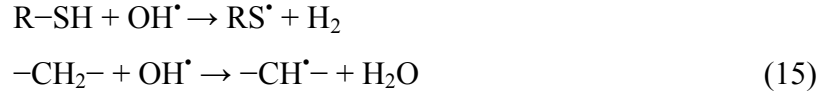
Metallerin varlığında ise aynı reaksiyon geçiş metalleriyle ‘‘Fenton reaksiyonu’’ sonucu oluşur.



Hidroksil radikali ( $\text{OH}^\bullet$ ), bütün oksijen radikalleri içinde en aktif ve toksik etkili olanıdır. Proteinler, karbohidrat, lipit ve nükleik asitleri okside etme yeteneği fazladır, oluştuğu yerde büyük hasara sebep olur. Hidroksil radikali ( $\text{OH}^\bullet$ ) hidrojen peroksidin geçiş metalleri varlığında indirgenmesiyle (Fenton reaksiyonu) ya da suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda oluşur.



Hidroksil radikali, tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak yeni radikallerin oluşumuna sebep olur.



### 1.2.1. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri

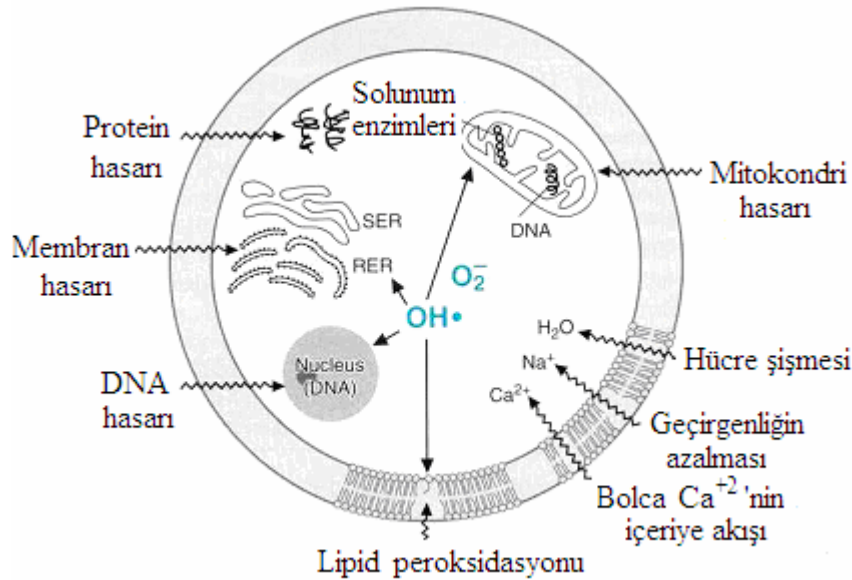
Serbest radikaller yaşam için gereklidir. Elektron transferi, enerji üretimi ve pek çok diğer metabolik işlevin temelini oluşturur. Ama, eğer zincir reaksiyonu kontrolsüz bir davranış gösterirse hücrede hasarlara neden olur. Nitekim, serbest radikallerin biyomoleküllerle reaksiyona girerek oluşturdukları bileşikler çoğu kez toksik özellik taşımaktadır. Serbest radikallerin yaşlanma ve dejeneratif hastalıklara neden olduğu 1954'lerden beri bilim adamları tarafından bilinmektedir (URL- 2, 2007).

Serbest radikaller oldukça reaktif moleküllerdir. Eğer serbest radikaller nötralize edilmezlerse vücutta ciddi hasarlara neden olabilirler. En temel etkileri, lipit peroksidasyonu, proteinler arasında disülfid bağı oluşumu ve DNA hasarıdır ( Tablo 1.).

Lipit peroksidasyonu, serbest radikaller tarafından başlatılan ve membranda bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal bir olaydır. Lipit peroksil radikalleri (süperoksit radikali, hidroksil radikali, peroksil radikali ve alkoksil radikali) lipit peroksidasyonu zincir reaksiyonlarının başlatıcılarıdır (URL-3, 2007)

Serbest radikaller, hücre zarındaki lipitlerden birine saldırdığında lipit molekülü değişime uğrar. Lipitler vücutta değişime uğradığında; hücre zarının yapısı ve fonksiyonları da zarara uğrar. Bunun sonucunda hücre zarı gıdaların, oksijenin ve suyun

uzun süreli olarak transferini yapamaz, harcanan ürünlerin atılmasını düzenleyemez (URL-4, 2007).



Şekil 1. Serbest radikallerin hücresel hedefleri

Serbest radikal saldırısının devamı, hücre zarının yapısında bulunan lipitlerin parçalanmasına, zarın yırtılmasına ve hücre bileşenlerinin dağılmasına sebep olur. Hücre içi bileşenlerin hücre dışına akması etraftaki dokulara da zarar verir. Serbest radikal saldırısı ve hücre zarının tahribatı "Oksidatif Zarar" olarak adlandırılır.

Serbest radikallerin dokularda meydana getirdiği zararın, damar sertliği (arteroskleroz) ve kalp hastalıklarının başlıca nedeni olduğu düşünülmektedir.

Serbest radikallerin proteinler üzerine olan etkileri; proteinlerin serbest radikal hasarına karşı duyarlılığına, aminoasit bileşimi ve yerleşimine, hasarlı proteinin onarılabiliğine bağlıdır. Hücredeki enerji üretim merkezi (mitokondri), serbest radikallerin saldırısı ile zedelenir. Bu merkezdeki oksidatif hasar, enerji üretimi ve protein sentezinin durmasına sebep olur. Protein yapısında bulunan özellikle prolin, histidin, arginin, sistein ve metiyonin aminoasitleri radikal hasarına açıktır. Bu aminoasitlerin oksidasyonu, proteinlerin parçalanmasına, çapraz bağ oluşumuna, agregasyona ve proteinlerin proteolitik parçalanmaya yatkın hale gelmesine neden olmaktadır.

Serbest radikaller aynı zamanda hücrelerin genetik kodunu içinde taşıyan, hücrenin üretimini ve büyümesini sağlayan nükleik asitlere (DNA) de etki eder. Hücreler genetik

kodları değiştiğinde ölebilirler. İyonize radyasyondan kaynaklanan hücre mutasyonları ve ölüm, serbest radikallerin DNA ile olan reaksiyonuyla oluşabilir. Serbest radikal reaksiyonları sonrasında nükleik asitlerde baz değişimleri, DNA'da zincir kırılmaları meydana gelir. Tamir sistemlerindeki yetersizlik sonucu mutasyonlar meydana gelir.

Serbest radikallerin karbohidratlara etkisiyle çeşitli ürünler meydana gelir ve bunlar, çeşitli patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksid, peroksidler ve okzoaldehidler meydana gelir. Bunlar diabet ve sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıklar gibi patolojik olaylarda önemli rol oynarlar (Kayalı ve Çakatay, 2004). Okzoaldehidler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturabilme özelliklerinden dolayı antimikotik etki gösterirler. Böylece, kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar (Yılmaz ve Ozan, 2003).

Serbest radikallerin hücredeki bu etkileri sonucu pek çok hastalığın oluşabildiği düşünülmektedir. Vücudumuz serbest radikalleri tanıyan ve etkisiz hale getiren bir sisteme sahiptir. Bu sistem, 'antioksidan savunma sistemi' olarak bilinir.

Tablo 1. Hücrelerdeki serbest radikal hedefleri

HEDEF	SONUÇ
<b>Küçük Moleküller</b>	
Doymamış ve tiyol içeren aminoasitler	Protein denatürasyonu ve çapraz bağların oluşumu, enzim inhibisyonu, organel ve hücre geçirgenliğindeki değişiklikleri
Nükleik asitler	Hücre siklus değişiklikleri, mutasyonlar
Kofaktörler	Nikotinamid ve flavin içeren kofaktörlerde ve aktivitelerinde azalma
Nörotransmitterler	Serotonin ve epinefrin gibi nörotransmitterlerde ve aktivitelerinde azalma
Antioksidanlar	E vitamini ve beta karoten miktarında azalma
<b>Büyük Moleküller</b>	
Proteinler	Peptid zincirinde kopma, denatürasyon
DNA	Zincir kopması, baz değişiklikleri
Hiyalüronik asit	Sinoviyal sıvı vizkozitesinde değişiklik

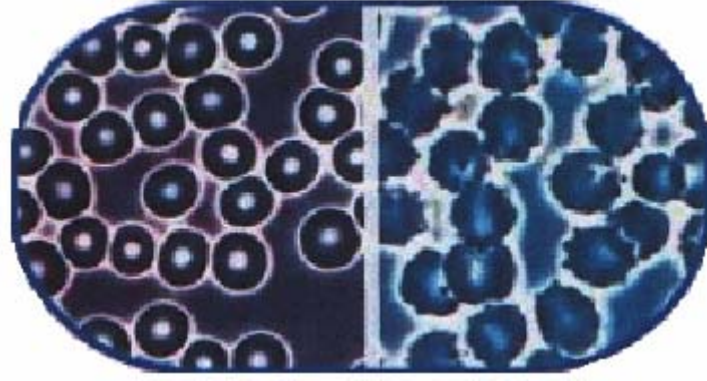
### 1.2.2. Lipit Peroksidasyon Göstergesi Olarak Malondialdehit (MDA)

Yağlar suda zayıf, kloroform, eter vb. organik çözücülerde iyi çözünen bir organik bileşiktir. Lipitler adipoz dokularda enerjinin depo şekli, diğer dokularda ise hücre zarının yapısal bileşenidir. Lipitlerin proteinlerle ve karbohidratlarla yaptıkları kompleks bileşikler, hücre zarının yapısını oluşturur ve çeşitli görevler üstlenirler. Çoğunluğu su olan kanda lipitler çözünebilir ve taşınabilir olması için proteinlerle kompleksler oluştururlar. Bu, lipit ve protein komplekslerine lipoprotein adı verilir. Lipoproteinlerin hidrofobik lipitleri (trigliserid ve ester kolesterol) kapsayan bir çekirdek ile protein, serbest kolesterol ve fosfolipitten oluşan tek katlı yüzey tabakasından (zar) meydana gelen küresel makromoleküllerdir. Lipitlerde bulunan doymamış çift bağlar serbest radikaller tarafından çekiciliğini arttıran en önemli sebeplerdendir. Biyomoleküllerin bütün büyük sınıfları serbest radikaller tarafından etkilenir ancak lipitler en hassas olanıdır. Lipitlerin ihtiva ettiği doymamış yağ asitleri ve bunların esterleri moleküler oksijen ile kolaylıkla oksitlenebilirler.

Dolayısıyla serbest radikallerin zararlı etkilerinden en fazla zarar gören yapılar zarlardır. Serbest radikaller, mekanizmasının kapasitesini aşıp hücre zarına saldırdığında zardaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları ile kolaylıkla reaksiyona girerek çeşitli peroksidasyon ürünleri oluştururlar ve böylece zarın yapısını geçirgenliğini (permeabilitesini) ve fonksiyonunu bozarlar.

Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipit peroksidasyonu olarak adlandırılır ve reaksiyon sonucunda MDA, L-hidroksinonenal, lipit hidroperoksitleri gibi oldukça toksik ve zararlı yan ürünler oluştururlar. Lipit peroksidasyonu oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve meydana gelen zar hasarı geri dönüşümsüzdür.





sağlıklı hücre

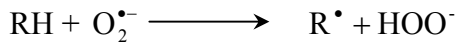
serbest radikal  
etkisine maruz  
kalmış hücre

Şekil 2. Serbest radikallerin hücreye etkisi

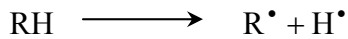
Zar yapılarında lipit peroksidasyonu üç aşamada gerçekleşir. Organizmada oluşan serbest radikaller (özellikle hidroksil radikali) zar yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar. Bunun sonucunda yağ asidi zinciri bir lipit radikali niteliği kazanır. Oluşan bu lipit radikali kararsız bir bileşiktir. Bu kararsız lipit radikali çift bağların pozisyonlarında değişiklik yaparak dien konjugatların oluşumuna sebep olur. Daha sonra lipit radikalinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipit peroksil radikali meydana gelir. Bu lipit peroksidasyonun başlama safhasını oluşturur.

Lipit peroksidasyonunun basamakları:

a) Başlama

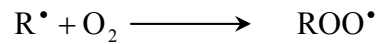


RH: Çoklu doymamış yağ asidi

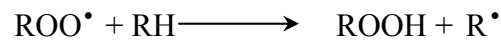


$R^{\bullet}$ : Serbest radikal

b) Yayılma



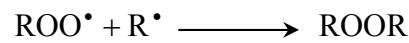
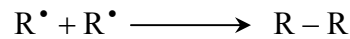
$ROO^{\bullet}$ : Peroksil radikali

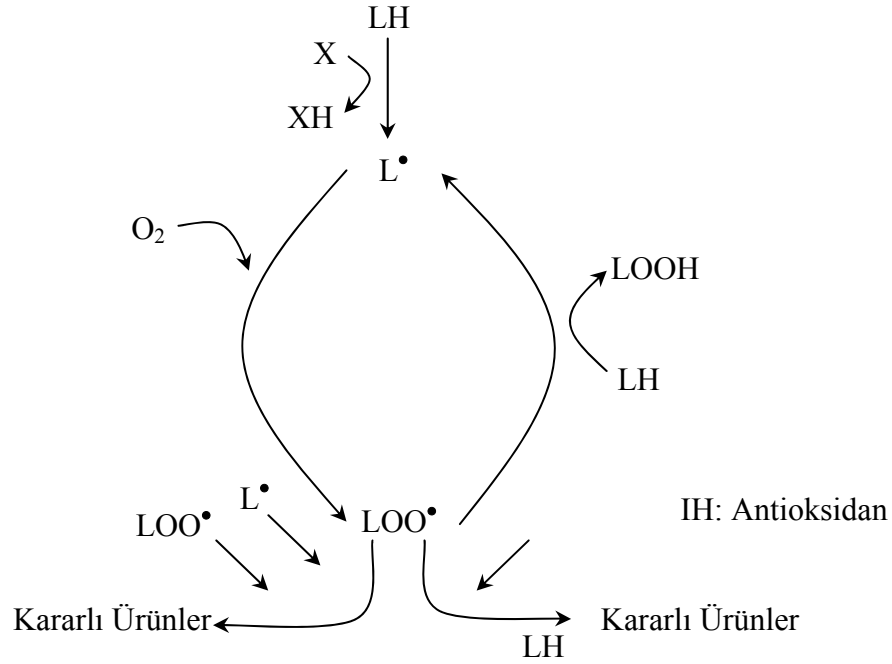


ROOH: Hidroperoksit

$HOO^{\bullet-}$ : Hidroperoksil radikali

c) Sonlanma





Şekil 3. Lipit peroksidasyonu mekanizması

İlerleme safhasında lipit peroksit radikalleri, zar yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitleriyle etkileşerek yeni lipit radikallerinin oluşmasına yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit hidroperoksitlerine dönüşürler ve bu olay kendi kendine katalizlenerek zincirleme reaksiyonlar şeklinde devam eder. Sonuçta kararsız hidroperoksit moleküllerinden sitotoksik ürünler meydana gelir. Bu ürünler MDA, L-hidroksinonenol, etan ve pentan gibi hidrokarbon gazlardır.

Lipit peroksidasyonu, antioksidan etkili moleküllerin toplayıcı reaksiyonuyla sonlandırılır ya da otokatalitik yayılma reaksiyonlarla devam eder. Radikal olmayan singlet oksijen, hidrojen peroksit, bakır, demir gibi geçiş metal iyonları lipit peroksidasyonunu hızlandırır. Başlama, hidroksil radikali ya da demir/oksijen kompleksi gibi oksidanın oluşumuna ihtiyaç duyar. Metaller redoks katalisti olarak görev yaparlar ve süperoksit ile hidrojen peroksidin daha güçlü oksidanlara dönüşümünü katalizler.

### 1.3. Antioksidan Sistemler

Hücrelerdeki serbest radikaller, oksijen varlığında mitokondriyal elektron transport zincirinden oksijen sızıntısından gelir. Sitokrom P<sub>450</sub> oksidasyon sistemi tarafından bazı ilaçların metabolizması, serbest radikal üretimini artırır. Memeli hücrelerinde radikal hasarın etkileriyle savaşmak üzere pek çok antioksidan savunma mekanizma vardır.

Yakalayıcı (scavenger) sistem serbest radikal üretimi; geçiş metal katalistleri ile şelat oluşturma (transferin), zincir kırma reaksiyonları ( $\alpha$ -tokoferol), reaktif radikallerin konsantrasyonlarının indirgenmesi (glutasyon) ve başlatıcı radikallerin temizlenmesi (süperoksit dismutaz) mekanizmalarıyla. inhibe edebilir.

Antioksidanlar; hücelere zarar veren serbest radikallerle reaksiyona girip onları etkisiz hale getirerek, kanser dahil pek çok hastalığa ve erken yaşlanmaya neden olabilecek zincir reaksiyonları önleyen, yok eden veya etkilerini azaltan moleküllerdir. Başlıca antioksidanlar ve etki tarzları Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Temel antioksidanlar ve özellikleri ( Efe, 1996).

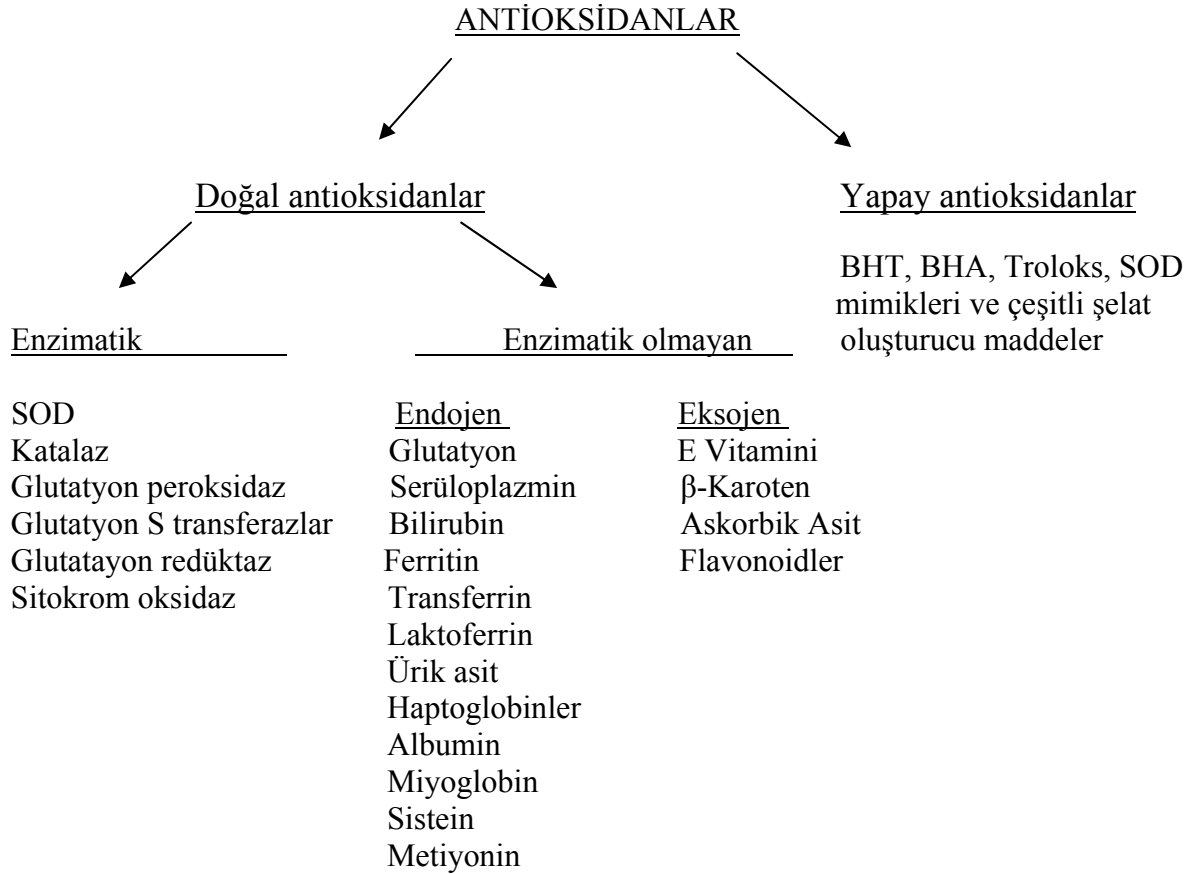
Antioksidan	Yapısı	Yeri	Etkisi
Süperoksit Dismutaz	CuZn-SOD Mn-SOD Cu-SOD	Sitozol-Nukleus Mitokondri Plazma	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ’nin H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ’ye dismutasyonunu kataliz eder.
Katalaz	Tetramerik Hemoprotein	Peroksizomlar	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ’nin dismutasyonunu katalizler.
GSH Peroksidaz	Selenoprotein	Sitozol- Mitokondri	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve lipit peroksidlerin redüksiyonunu katalizler.
GSH Redüktaz	Dimerik Protein	Sitozol- Mitokondri	GSSG’nin GSH’ye dönüşümü lipit peroksidleri inaktive eder.
Vitamin E	Yağda çözünen vitaminler	Zar lipitleri Ekstrasellüler sıvılar	Lipit peroksidasyon zincirini kırar.
Vitamin C	Suda çözünen vitaminler	Hücre İçi-Dışı Sıvılar	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ve OH’ın direkt scavengeri, Vit E’nin rejenerasyonu
Beta Karoten	Vit A Metaboliti Preküsörü	Membranlarda	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> scavenger, direkt peroksidlere etki
Bilirubin	Hemoprotein- Metabolizma Ürünü	Kan ve Doku	Reaksiyon zincirini kırar, LOO’yu aktive eder.

Tablo 2'nin devamı

Ürik asit	Ksantin Oksidasyonu	Yaygındır	$O_2^-$ , $\cdot OH$ ve peroksil scavengeri, vit C'nin oksidasyonunu engeller.
Glukoz	Karbohidrat	Yaygındır	$\cdot OH$ scavengeri organik maddeleri indirger
Sistein	Aminoasit	Yaygındır	$\cdot OH$ scavengeri organik maddeleri indirger
GSH	Tripeptid	Hücre İçi ve Alveoller	$O_2^-$ , $\cdot OH$ 'ye direkt etki enzimler için substrattır.
Taurin	Beta Aminoasit	Radikal Salgılaya Hücrelerde	$HOCl$ ile reaksiyon, Ksenobiotiklere bağlanma
Trakeobronşial	Protein	Üst Solunum Yolları	Solunan oksijen yakalayıcısı
Mukus	Glikoprotein	yaygın	Solunan oksijen yakalayıcısı
Albumin	Protein	Yaygın	Geçiş metalleri bağlar.

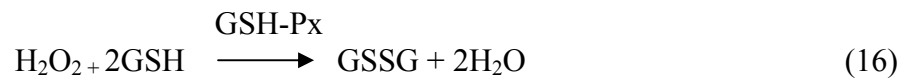
Antioksidanları öncelikle doğal antioksidanlar ve yapay antioksidanlar (ilaçlar) şeklinde sınıflandırmak daha doğru olacaktır. Doğal antioksidanlar, endojen ve eksojen antioksidanlar olarak iki gruba ayrılabilir. Endojen antioksidanlar, enzimler ve enzim olmayanlar şeklinde sınıflandırılabilir. Katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve hidroperoksidaz enzimlere; melatonin, seruloplazmin, transferin ve miyoglobin ise enzim olmayanlara örnek olarak verilebilir. Endojen antioksidanlar buldukları ve etkinliklerini yerine getirdikleri yerlere göre de hücre içi (intraselüler), membranal ve hücre dışı (ekstraselüler) antioksidanlar olarak üç sınıf altında toplanabilir.

Eksojen antioksidanlar, vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanlarıdır. Vitamin olan eksojen antioksidanlar;  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E),  $\beta$ -karoten, askorbik asit (vitamin C) ve folik asit (folat) tir. İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar; ksantin oksidaz inhibitörleri, NADPH oksidaz inhibitörleri ve Troloks örnek olarak verilebilir. Gıdalardaki yapay antioksidanlar ise; butillenmiş hidroksitoluen (BHT), butillenmiş hidroksianisol (BHA), sodyum benzoat, etoksikuin ve propilgallattır.



Şekil 4. Antioksidanların sınıflandırılması

Katalaz (CAT), yüksek konsantrasyonda oluşan hidrojen peroksitin dismutasyonunu katalizler. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), hücre içinde düşük konsantrasyonda oluşan hidrojen peroksit ve lipit peroksitlerini indirger.



Glutasyon redüktaz (GSH-R), yükseltgenmiş glutasyonun (GSSG), indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüşümünü sağlar. Glutasyon-S-transferazlar (GST), başta araşidonik asit ve lineloat hidroperoksitleri olmak üzere lipit peroksitlerine karşı, selenyum-bağımsız GSH-Px aktivitesi göstererek bir antioksidan savunma mekanizması oluştururlar.

GST

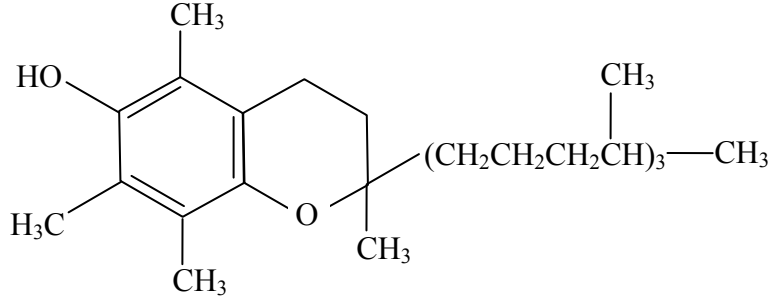


Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi ise solunum zincirinin son enzimidir ve süperoksidi ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) detoksifiye eder (Akkuş, 1995).

Enzimatik olmayan endojen antioksidanlardan glutatyon (GSH) bir peptit olup hücre içinde en önemli antioksidan moleküldür ve hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını indirgenmiş halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur. Melatonin (MLT) en zararlı serbest radikal olan hidroksil serbest radikalini ( $\text{OH}^{\bullet-}$ ) ortadan kaldıran güçlü bir antioksidandır ve günümüze kadar bilinen antioksidanların en güçlüsü olarak kabul edilmektedir. Ürat; hidroksil, süperoksit, peroksit radikalleri ve singlet oksijeni temizler ve C vitamininin oksidasyonunu engelleyici etkisi vardır. Bilirubin, süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır. Albümin LOOH ve HOCl toplayıcısıdır ve plazma osmotik basıncını düzenler. Aynı zamanda kan, bilirubin, hormon, aminoasit, steroid, yağ asitleri ve ilaçların taşınmasında rol oynar.

Glutatyon (GSH), bilirubin, radikal tutucu özelliği ile ürik asit, albumin, bakır iyonlarını bağlayarak metal katalizli reaksiyonları sınırlayan seruloplazmin, hemoglobin, ferritin aynı zamanda hücre içi antioksidanlardır (Meister ve Anderson, 1983; Dündar ve Aslan, 2000).

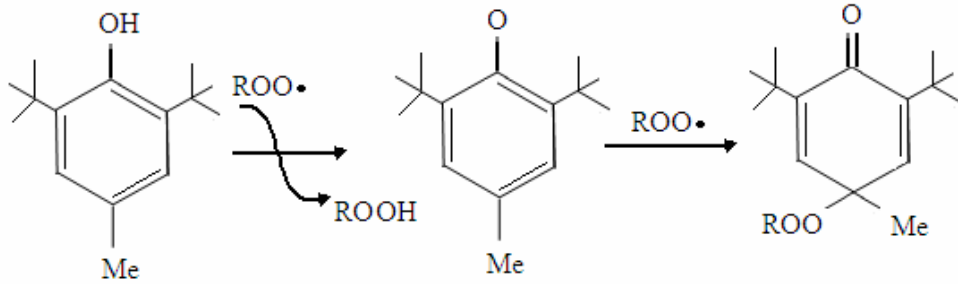
Süperoksit radikali dışında diğer bir indirgeyici hücre sel ajan olan askorbik asit (C vitamini), zincir kırıcı antioksidan etki gösteren ve okside olduktan sonra ve parçalanmadan önce askorbik asit ve glutatyon tarafından yeniden indirgenebilen  $\alpha$ - tokoferol, radikal toplayıcı etkisi bulunan  $\beta$ -karoten ve polifenoller gibi moleküller insan ve hayvan organizmasında sentezlenemeyen bitkiler tarafından sekonder metabolit olarak üretilen maddeler olup radikallerin temizlenmesinde ve zincir reaksiyonlarının durdurulmasında son derece etkili birer antioksidandırlar ve etkinliklerini enzimatik olmayan yolla sürdürürler (Chen vd., 1988; Edge vd., 1997). Bunlardan E ve A vitaminleri zarda bulunan antioksidanlardır.



Şekil 5. E vitamini (5,7,8-trimetiltokol [ $\alpha$ -tokoferol])' nin formülü

Süperoksit anyonunun temizlenmesinde en etkili antioksidan (SOD) enzimi olup glutatyon, flavonoidler ve çeşitli polifenoller de etkin rol oynamaktadır.

Sentetik olarak üretilen ve çoğunlukla antioksidan aktivite tayinlerinde standart olarak kullanılan Trolox, rutin, BHT, BHA gibi antioksidanlar da vardır. Peroksil radikaliyle iki aşamada etkileşerek onu çok daha az reaktif ürünlere dönüştüren BHT önemli sentetik antioksidandır.



Şekil 6. BHT (2,6 di-tert - butil- 4 metil fenol [butillenmiş hidroksitoluen])'nin peroksil radikali ile reaksiyonu

Süper antioksidan haplar, Japon eriği, kokusuz sarımsak, mavi-yeşil alg (yosun), havuç, portakal ve badem konsantreleri ilave edilmiş 'Activin' üzüm çekirdeği ekstresinden oluşan bir bitkisel karışım olup A, C, E vitaminleri, selenyum, çinko ve kalsiyum mineralleri de içermektedir. Ayrıca ürünü oluşturan doğal bitki özleri, vitaminler ve mineraller antioksidan etkileri bilinen ve bu amaç için kullanılan özel maddelerdir (Dündar ve Aslan, 2000). Bir başka karışım ise ABD'den ithal edilmekte olan ve nar kapsülü olarak adlandırılan, ticari adı 'PomGT' olan ürün şeker, gluten, yapay aromalar, renklendirici ve koruyucu katkı maddeleri içermeyip 1 kapsülünde 8 fincan yeşil çay ve 2 bardak nar suyu

bulunduran antioksidan haptır. Son yıllarda üretilen bu tür haplar yapay antioksidanlara birer örnektir.

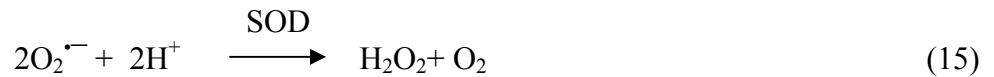
Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler:

- 1) Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme toplayıcı etkidir. Antioksidan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküller bu tip etki gösterirler.
- 2) Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme bastırıcı etkidir. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.
- 3) Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki zincir kırıcı etkidir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.
- 4) Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması onarıcı etkidir(URL- 3, 2007).

### 1.3.1. Antioksidan Enzimler

#### 1.3.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD, süperoksidan hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen enzimdir. Daha önce bulunduğu dokuya göre bakır içeren protein manasına gelen eritrocuprein, serebro cuprein gibi isimlerle anılan enzim ilk kez 1968 yılında Mc Cord ve Fridovich tarafından adlandırılmıştır. Bu enzim subsellüler kompartmanlarda süperoksit düzeylerini kontrol etmede önemli bir role sahiptir.



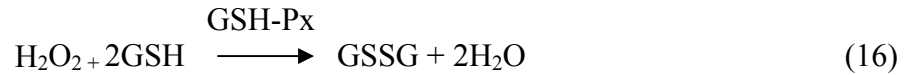
SOD sayesinde, spontan olarak gerçekleşen bu reaksiyon  $10^4$  hızlandırılır ve reaksiyon difüzyon hızında yürür. İnsanda SOD' un iki tipi bulunmaktadır. Sitolde bulunan dimerik Cu-Zn ihtiva eden CuZn-SOD ile mitokondride bulunan tetramerik Mn ihtiva eden Mn SOD'dür. Genel olarak hücrelerde en bol bulunan sitozolik form olan CuZn-SOD'dür.



CuZn-SOD enziminin başlıca fonksiyonu, oksijeni metabolize eden hücrelerde meydana gelen süperoksit radikallerinin zararlı etkilerine karşı hücreyi korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder. SOD izoenzimlerinin doku ve organellerdeki dağılışı buralarda oksijenin kısmi basıncındaki artışa bağlıdır. Mitokondrilerde bulunan Mn-SOD bakterilerde de bulunmaktadır ve aralarında yapısal benzerlik vardır. Bakterilerde ayrıca Fe ihtiva eden SOD da tespit edilmiştir (Marklund, 1984).

### 1.3.1.2. Glutatyon Peroksidaz

Glutatyon peroksidaz GSH-Px ( Glutatyon: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> okside redüktaz EC: 1.11.1.9 ) molekül ağırlığı 85000 dalton olan, tetramerik dört selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. GSH- Px aşağıdaki reaksiyonlarla hidrojen peroksidi suya indirgerken hidroperoksitlerin de daha etkisiz bileşiklere dönüşümünü katalizler.



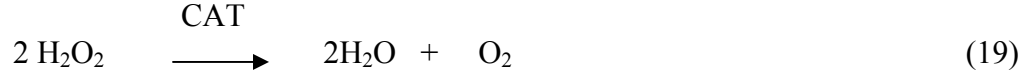
Hidrojen peroksit, kümenhidroperoksit, t-bütil hidroperoksit ve lipid peroksitler enzimin substratıdır. Selenyum GSH-Px enziminin esansiyel bir bileşenidir.

Suda çözünen lipid peroksitler bu Glutatyon peroksidaz tarafından suya parçalanırken membrana bağlı fosfolipit Hidroperoksit Glutatyon peroksidaz (PLGSH-Px) enzimi membran içinde oluşan hidroperoksitlerin yıkımında rol oynar. Membrana bağlı en önemli antioksidan olan Vit E yetersiz olduğu zaman PLGSH\_Px membranın peroksidasyona karşı korunmasını sağlar.

GSH-Px lökositlerde de önemli fonksiyona sahiptir. Özellikle fagositik hücrelerde oksidatif yıkım sonucu oluşan hidrojen peroksitin detoksifiye edilmesinde rol oynar. GSH-Px aktivitesi düşük fagositlerde ortama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> salınımını artırmaktadır. Eritrositlerde de GSH-Px hücreyi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin tesirinden koruyan en önemli antioksidan enzimdir. GSH-Px yaşlılarda ve Down sendromlu hastaların eritrositlerinde yüksek, yaşlılar ve hipertansiyonlu şahısların lökositlerinde ise düşük olduğu ileri sürülmektedir (Yavuzer,1993; Akkuş, 1995; Costello ve Webber, 1990; Gaetani vd., 1989).

### 1.3.1.3. Katalaz (CAT)

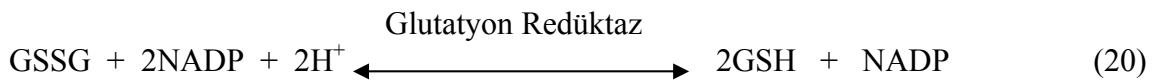
Katalaz ( $H_2O_2$ :  $H_2O_2$  oksidoredüktaz, EC: 1.11.1.6) dört hem grubu ihtiva eden bir enzimdir. Hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalar.



CAT GSH-Px 'den farklı olarak daha çok peroksizomlarda lokalize olmuştur. CAT başta karaciğer olmak üzere vücutta çeşitli doku ve organlarda bol miktarda bulunur. GSH-Px düşük  $H_2O_2$  konsantrasyonlarında aktif iken CAT daha çok yüksek  $H_2O_2$  konsantrasyonlarında aktif hale gelir. Ayrıca CAT daha çok  $H_2O_2$  etilhidroperoksit, metilhidroperoksit gibi küçük molekülleri substrat olarak kullanır. Lipit peroksitlerine ise etki etmez (Yavuzer, 1993). Dolayısıyla lipit peroksidasyonu başladığında lipit hidroperoksitler meydana geldikten sonra CAT antioksidan aktivitede etkisiz kalır. Katalaz insan eritrositlerinde yüksek konsantrasyonda sitozolde çözülmüş halde bulunur (Gaetani vd., 1989)

### 1.3.1.4. Glutatyon Redüktaz (GR)

Glutatyon Redüktaz ( NADPH: okside glutatyon oksidoredüktaz, E.C: 1.6.4.2) okside glutatyonun indirgenme reaksiyonunu katalizleyen bir enzimdir. Molekül ağırlığı 104.800 olan enzim dimerik yapıdadır. Koenzimi NADP ve prostatik grubu FAD'dır. Glutatyon redüktaz;



Reaksiyonuyla redükte glutatyon rejenerasyonunu sağlar. Fizyolojik şartlarda reaksiyon tek yönlüdür ve bu şekilde GSH/ GSSG oranı (1/500) yüksek tutulur. GSH ise tüm hücrelerde en bol bulunan protein dışı tiyoldür ve hücre metabolizmasında, bazı bileşiklerin transportunda hücre korunmasında rol alır. Enzimin NADPH'a olan afinitesi NADH' a karşı olandan 60 kat fazladır. Koenzim olarak kullanılan redükte NADPH'lar ise pentoz monofosfat metabolik yolunda üretilir. Bu yolun anahtar enzimi ise glukoz-6-fosfat

dehidrogenazdır. Dolayısıyla antioksidan savunma sisteminde GR ile birlikte bu enzimin de önemli rolü ardır. GR, sitozol ve mitokondrilerde bulunur. GR, glutatyon peroksidaz ile birlikte hücre içinde glutatyon redoks döngüsü yoluyla hidroperoksitlerin uzaklaştırılmasında rol alır. Dokularda GSH konsantrasyonu ve GR aktivitesinin yaşlanmayla azaldığı gösterilmiştir. Alyuvarlarda GR eksikliği daha çok riboflavin eksikliğine bağlı olarak görülmüştür. Bu durumda enzim FAD ile ön inkübasyona tabi tutulursa gerçek aktivitesi ortaya çıkar. Biskloronitrozoüre, glutatyon redüktazın spesifik inhibitörüdür( Efe,1996).

### 1.3.2. Bitkisel Antioksidan Olan Fenolik Bileşikler

Bitkiler, yüzyıllardan beri tüm dünyada gıdaların tat ve aromasının artırılmasında (Shelef, 1983), gıdalardaki istenmeyen kokuların giderilmesinde (Giese, 1994) ve hepsinden önemlisi de tedavi amaçlı olarak kullanılmıştır. Uzun yıllar geleneksel olarak devam eden bu kullanım şekilleri, 20. yüzyılın başından itibaren değişime uğramış, tedavi amaçlı kullanılan bitkilerin çeşitli özellikleri laboratuarlarda araştırılmaya başlanmıştır (Dığrak vd., 1998). Tıbbi bitkiler konusunda bilimsel araştırmalar arttıkça, bitki türlerine ve bileşenlerine ilgi de bir hayli artmıştır.

Bitkiler tarafından sentezlenen bazı moleküller; karbohidratlar, proteinler ve yağların sentezinden sonra ikincil metabolizma ürünleri olup, mikroorganizmalara karşı insektisit ve herbisit olarak serbest radikallere karşı koruyucu rol oynarlar. Bunlar "fitokimyasallar" diye de adlandırılırlar. Fitokimyasallar, özellikle sebze ve meyvelerdeki fenolikleri, flavonoidleri ve karotenoidleri kapsarlar.

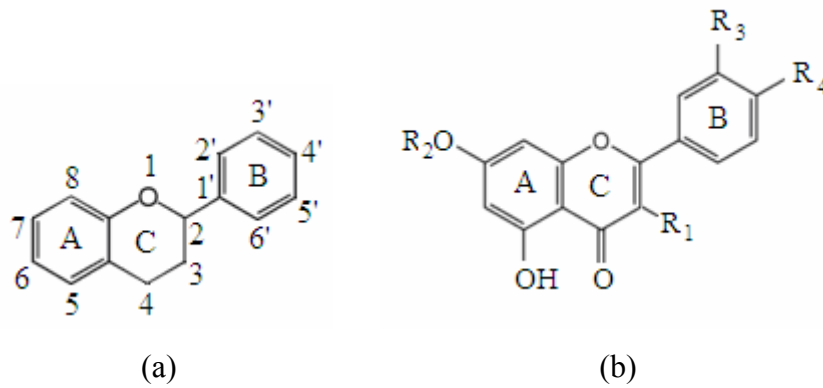
Fenolik bileşikler altı üyeli aromatik halkaya direkt bağlı bir hidroksil grubu (-OH) içeren ve bu hidroksil grubundan bir hidrojen kaybetmeye meyilli, zayıf asidik, aromatik bileşiklerdir. Fenolik bileşikler antioksidan olarak, insan vücudundaki çeşitli nedenlerle oluşmuş serbest radikalleri temizleme kabiliyetine sahiptirler. Ayrıca, ağır ve radyoaktif metalleri şelatlama ve otooksidasyonu önleme konusunda fenolik bileşikler oldukça etkilidirler. Diğer bir deyişle bunlar, çeşitli reaktif oksijen türlerini (serbest oksijen, peroksinitrit ve hidrojen peroksiti) hücrelerden uzaklaştırarak metabolizmayı zinde tutarlar (URL- 1, 2006).

Fenolik bileşikler veya polifenoller, en fazla bitkilerde bulunan yapılardan biri olup bitki aleminde 6000'den daha fazla fenolik yapının bilindiği belirtilmektedir (Bravo, 1998).

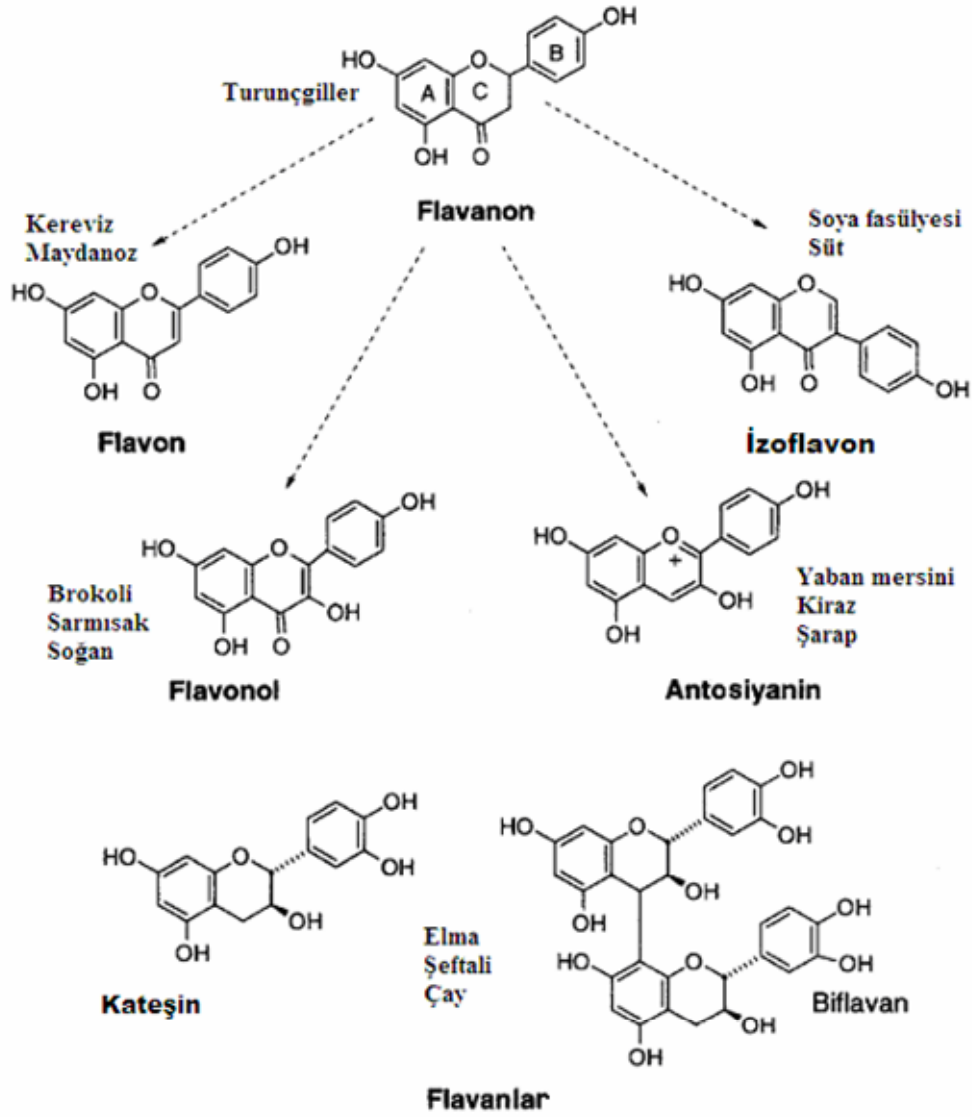
Fenolik maddeler, meyve, sebze, baharat, tahıl ve içecekler gibi bitkisel gıdalarda yaygın olarak bulunmaktadır (Tosun İ. ve Karadeniz B., 2005). Fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidler olarak iki gruba ayrılabilir. Bunlar çok önemli antioksidanlar olup, bitkisel gıdaların tüketilmesiyle sağlığa olan pozitif etkileri artırılabilir.

Fenolik asitler yaygın olarak bitki taç kısmında bulunur ve antioksidan karaktere sahiptir. Başlıca fenolik asitler gallik asit, protokatekuik asit, p-hidroksibenzoik asit ve vanilik asit gibi hidroksibenzoik asitler ve ferulik asit, kafeik asit ve kumarik asit gibi hidroksi sinnamik asitleri içerir.

Flavonoidler insanlar tarafından sentezlenemeyen bitki fitokimyasallarıdır. Flavanoidler, özellikle meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan fenolik maddelerin (renk maddelerinin) C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> çatısına sahip olanlarına verilen addır. Flavonoidlerin tümü C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> yapısındadır, ancak moleküldeki hidroksil (OH) grubu sayısı ve dağılımı açısından farklıdırlar. A halkası üç karbonlu bir bileşik olan malonil-CoA (sinamik asit) dan sentezlenirken, C ve B halkaları şikimat ve fenilpranoid metabolik yolu üzerinden yine glukozdan sentezlenir. Fenil halkalarının propan zincirine farklı pozisyonlarda bağlanmasıyla, bir başka deyişle, içerdikleri C halkasındaki değişimlere göre altı ana alt gruba ayrılabilir: flavanonlar, flavonlar, flavonoller, antosiyanidinler, flavanlar, izoflavonoidler.

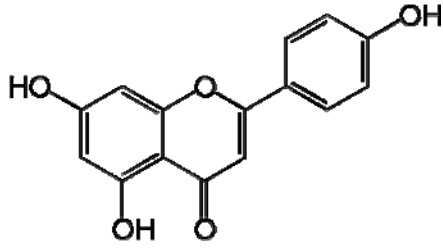


Şekil 7. Flavonoidlerin temel yapısı (a) ve bazı substituentleri (b)

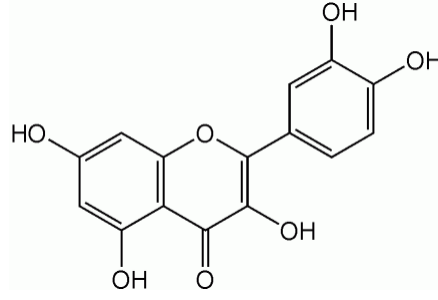


Şekil 8. Flavonoidlerin kimyasal yapısı

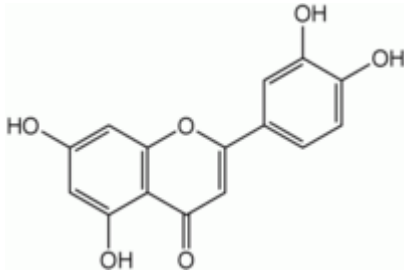
Genel olarak, flavanonlar turunçgil meyvelerde, flavonlar baharatlarda, izoflavonoidler baklagillerde, antosiyanin ve kateşinler meyvelerde, flavonoller tüm meyve ve sebzelerde bulunur.



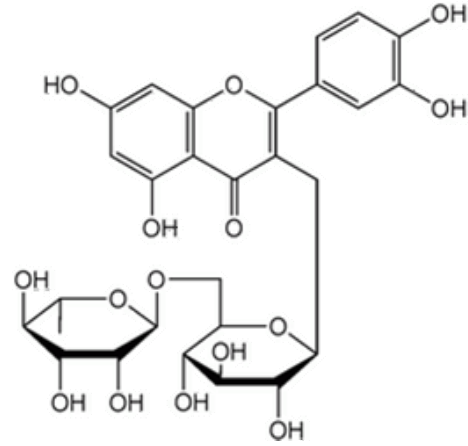
Apigenin  
(Flavon)



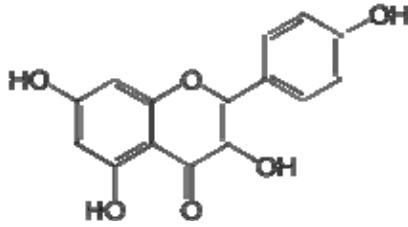
Kuersetin  
(Flavonol)



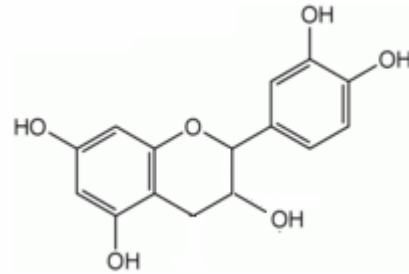
Luteolin  
(Flavon)



Rutin



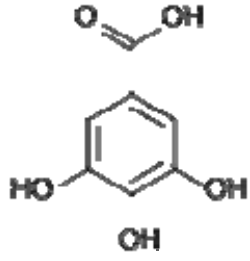
Kaempferol  
(Flavonol)



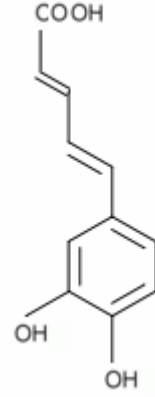
Kateşin  
(Flavanol)

Şekil 9. Diyetlerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerin yapıları

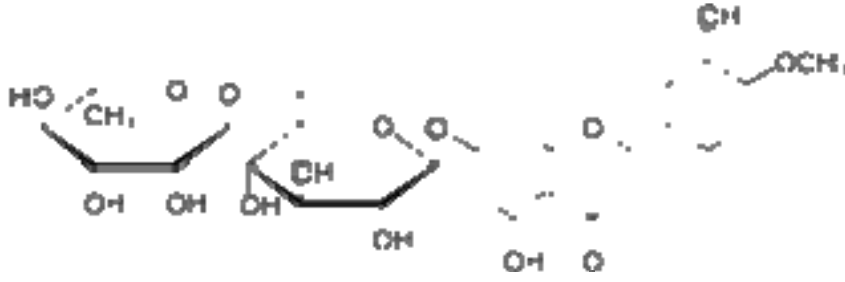
Şekil 9'un devamı



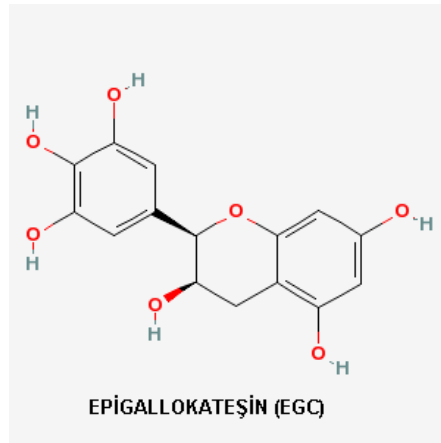
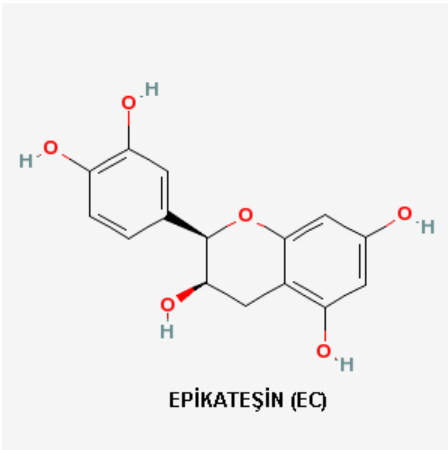
Gallik Asit  
(Hidroksibenzoik asit türevi)



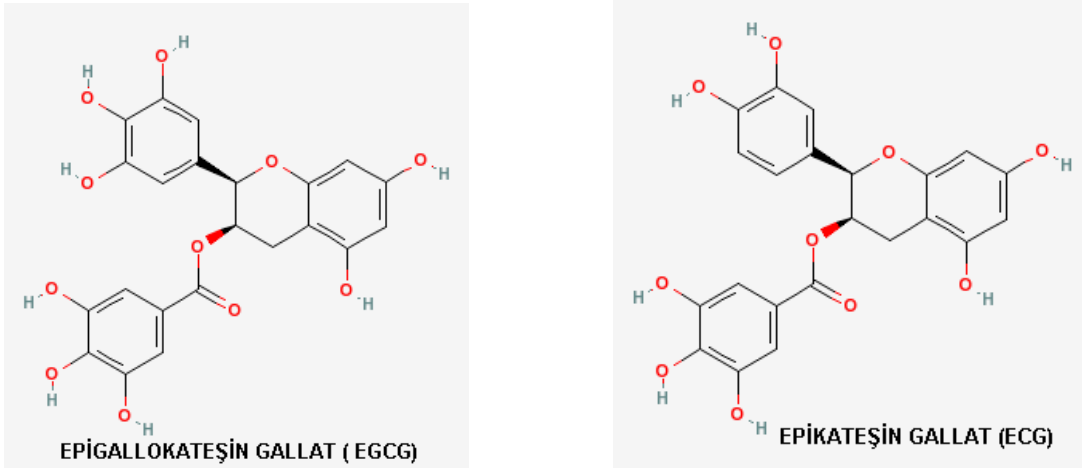
Kafeik Asit  
(Sinnamik asit türevi)



Hesperidin  
(Flavanon)



Şekil 9 'un devamı



Flavononlar renksizdirler ve özellikle; taksifolin, naringin, naringenin, eriodiktol ve hesperitinle temsil edilirler. Birçok gıda flavon ve flavanol içermesine rağmen; kimyon, yaban çileği, meyan kökü, nane ve turunçgil meyveler flavanon içerirler. Flavanonların asıl kaynağı turunçgil meyveler ve sularıdır. Yaban çileği ve kızılıçıkta narirutin ve naringenin glikozitleri; kimyon ve nanede hesperidin bulunur.

Flavonlar, meyvelerde pek bulunmayan fakat tahıl (arpa, buğday, mısır vb.) ve baharatlarda (nane vb.) bulunan flavonoid sınıfıdır. Flavonlar, soluk-sarı renklidir. Esas flavonlar; apigenin ve luteolinlerdir. Maydonoz apigenin ve chryseriol içerir. Biberiye ve kekik gibi baharatlar flavon içerir. Luteolin, en fazla tahıl ve baharatlarda bulunur. Sebzelere ve sebze yapraklarında, luteolin glikozitleri ve apigenin mevcuttur.

Glikozillenmiş flavonlar, acı maddelerin acılığını azaltır. Flavonlardan neodiosmin; limonin, naringin, kafein, kuinin ve sakkarinin acılığını azaltır.

Flavonoller ve glikozitleri çoğunlukla meyvelerin dış kısmında bulunur. En çok bilinen flavonoller kuersetin ve kaempferoldür. Kuersetin, birçok meyve, sebze ve içecekte bulunur. Diyetimizdeki en önemli flavonoiddir ve özellikle soğan ve çayda bolca bulunur. Kuersetin, luteolin ve galangin yapılarındaki farklılığa rağmen kuvvetli antioksidan olarak bilinirler. Kuersetin ve rutin lipoprotein oksidasyonunu inhibe ederek, hücreyi okside LDL'den gelen zarara karşı korur. Rutin, kan damarlarının hücre aralarını yapıştırır ve kanın damarın dışına sızmasını önler. Rutinde, bir aktif madde olan P vitamini vardır ki, kan damarları iltihaplanınca ve kan akmasının durdurulmasında yardımcı olur; kan pıhtılaşmasını artırır; radyoaktif maddelerin etkisiyle damarların esnekliği zayıflamışsa, onun düzelmesini sağlar. Bunun yanı sıra rutin, gistamine karşı da etkilidir. Rutin



damarların daralmasına giderir ve kalp kaslarının arttırır. O yüzden flavonlar, zehirlenen kalbin atması zayıflayınca sık uygulanır. Kaempferol, genellikle meyve ve lifli sebzelerde bulunur. Ayrıca bazı taneli-kabuksuz- yumuşak meyvelerde (çilek, kiraz vb.), baharatlarda, baklagillerde ve köklü sebzelerde bulunur. İzohamnetin ve miresitin de flavonoller arasında yer alır. İzohamnetin, soğan ve şeftalide bulunur. Miresitin ise özellikle taneli-kabuksuz- yumuşak meyvelerde, mısır ve çayda bulunur.

İzoflavonoidler, östrojenik aktivitesi iyi bilinen farklı bir flavonoid sınıfıdır ve çoğunlukla baklagillerde bulunur. 'B' halkası oryantasyonuyla yapısal olarak genel flavonoidlerden ayrılır. Bunlar: İzoflavanonlar, İzoflavonlar ve İzoflavonollerdir. En iyi bilinen izoflavonoidler daidzein ve genisteindir. Soya fasülyesi; fasülye, yeşil bezelye ve yonca filizlerinde bulunan daidzein ve genisteinin ana kaynağıdır. Soya ürünleri insanlarda LDL oksidasyonunu azaltmada etkin bulunmuştur. Bilinen diğer izoflavonoidler biokanin A ve formononetindir. Fasülyelerde, bezelyelerde, ayçiçeği tohumlarında, alfalfa filizlerinde ve yonca filizlerinde bulunur.

Antosiyaninler, taneli-kabuksuz- yumuşak meyvelerde, kiraz ve erikte, patlıcan, kırmızı lahana ve turpta kırmızı ve mavi rengi üretir. Antosiyanin rengi pH'a bağlıdır. Antosiyanin genellikle, pH 3,5' te kırmızıdır, pH artışıyla önce renksizleşir ve sonra maviye döner. Antosiyaninler, yenilebilir tahıllarda, köklerde ve yeşil sebzelerde bulunmasına rağmen özellikle meyvelerle ilişkilidir. Elma, armut, ayva, kayısı, erik ve şeftali gibi çekirdekli meyvelerin kabuğunda; taneli-kabuksuz- yumuşak meyvelerin hem kabuğunda, hem de etli kısmında bulunur. İçecekler ve diğer besin maddeleri için renklendirici ajan olarak kullanılırlar. Bir de farmasötik ürünlerin boyanmasında kullanılırlar. Test edilen antosiyaninlerin çok yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Örneğin, antosiyaninlerin üzüm kabuğundan izole edilen ekstraktı çok iyi antioksidatif aktivite göstermiştir.

Flavanlar, yapısal ve adlandırma olarak karmaşık flavonoidlerdir. Bunlar: kateşinler, leukoantosiyeninler, proantosiyeninler ve tanninlerdir. Flavanlar renksizdirler. Flavan ve onun özel şekli olan kateşinler (flavan-3-ol), çayda bolca bulunur. Diğer kateşin kaynakları kırmızı şarap ve çikolatadır. Monoflavanlar, olgun meyvelerde ve taze yapraklarda bulunur. Turunçgil kabuklarında bulunan flavonoidlere, 'bioflavonoidler' denir. Biflavanlar ve triflavanlar meyve ve tahıllarda bulunur. Elma, böğürtlen, kuşüzümü, yabanmersini, üzüm, şeftali ve çilekte bulunur.

Geleneksel tıpta, son yirmi beş yılda flavonoidlere karşı ilgi artmış ve gerçekleştirilen çalışmalar sonucu flavonoidlerin yapıları ile antioksidan aktiviteleri arasında yakın bir ilişki olduğu bulunmuştur. Örneğin; flavonoid yapısında C-4' pozisyonunda hidroksil grubunun bulunması antioksidan aktiviteyi artırırken, serbest 4'-OH grubunun metoksil grubu ile substitue olması aktiviteyi önemli derecede azaltır. Bu durum göz önüne alındığında kuersetin, luteolin, kateşin ve rutin antioksidan olarak etkili flavonoidlerdendir. Yapılan araştırmalarda, flavonoidlerin sadece antioksidan aktiviteye değil, aynı zamanda birçok biyokimyasal ve farmakolojik aktivitelere sahip oldukları belirlenmiştir (Guliyev ve Harmandar, 2000; Hausteen, 2002).

Flavonoidlerden kumarinler, molekülünde kokulu laktonlar mevcut olan maddelerdir. Kumarinler, kan pıhtılaşmasını önler, düz kasların kasılmasını azaltır ve ağrı kesici, yatıştırıcı ve idrar söktürücü özelliklere sahiptir. Kumarinli maddelerin en önemlisi, dihidroksikumarindir (dikumarol). Geperin gibi o da karaciğerdeki protrombin biyosentezini azaltır. Rutin, kuersetin, kaempferol, miresitin ve hiperin de idrar sökücü özelliğine de sahiptir. Flavonoidli maddeler, çeşitli nedenlerden kaynaklanan kan akmasını durdurur. Bu nedenle onlar, hipertoni, miyokart enfarktüsü, bronş astımı, şeker diyabeti ve alerji tedavisinde önemli bir yer tutar. Flavonoidlerin antibakteriyal özelliğe sahip olduğu bulunmuştur. Örneğin, kuersetinin gram pozitif ve gram negatif mikroorganizmalara karşı güçlü bir etkisi vardır.

Flavonoidler üzerine birçok mutajenik çalışma da yapılmıştır. Flavonoid aglikonların önemli mutajenik aktivite gösterdikleri, özellikle kuersetin, miresitin, kaempferol ve tamariksetinin aktif mutajenler olduğu bulunmuştur. Kuersetin, insan metabolizmasında anti-karsinojenik ve anti-arterit özellik de gösterdiğinden üzerinde en çok çalışılan bileşiktir. Bazı araştırmalar, kateşinlerin de antimutajenik ve antikarsinojenik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar flavonoidlerin oksidatif DNA zedelenmesini serbest radikal tutulması dışında mekanizmalarla önlediğini göstermektedir. Flavonoidlerin çoğu glutatyon-S transferazı (GST) aktive etme yeteneğine sahiptir.

Yapılan bazı araştırmalar ise kuersetin ve türevlerinin doğal antioksidan olan  $\alpha$ -tokoferole göre daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca Flavonollerin yapısında bulunan hidroksil ve metoksil gruplarının antioksidatif aktiviteye katkıda bulunduğu da deneysel çalışmalarla kanıtlanmıştır. Araştırmacılar çeşitli yöntemler ve test mikroorganizmaları kullanarak, bitkilerden elde edilen bileşiklerin mantarlara karşı özelliklerini ortaya çıkarmışlardır. bazı mantarlara karşı kuercetin, miresitin ve

kaempferolün antifungal aktivitelerini karşılaştırmışlardır. Flavonoidler serbest radikalleri temizleme, güçlü antioksidan olma özelliklerinin yanı sıra hidrolitik ve oksidatif enzimler olan fosfolipaz-A2, siklooksijenaz, lipooksijenazın inhibisyonu ile antiinflamatuvar özellik gösterirler. Ayrıca, ksantin oksidaz, glutasyon redüktaz, NADH-oksidad ve protein kinaz enzimlerini inhibe ettiklerine dair veriler mevcuttur (Çimen Y. ve Burak M., 1999).

Genel olarak ‘Flavonoidler’ ve diğer bitki fenoliklerinin süperoksit, alkoksil, peroksil ve nitrik oksit gibi radikalleri temizleme, enzim aktivitelerini düzenleme, hücre çoğalmasını inhibe etme, demir ve bakır şelasyonu,  $\alpha$ -tokoferol rejenerasyonu foksiyonlarına ek olarak; vazodilatatör, antibiyotik, immünstimülan, antiallerjik, antidiyareik, antiülser, östrojenik, antiviral ve daha birçok etkilerinin olduğu söylenebilir (Dillard CJ ve German JB., 2000; Rice-Evans C.A., vd., 1996).

Dünyada tedavi amaçlı olarak kullanılan bitki sayısının 20.000 civarında olduğu Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından rapor edilmiştir (Kalaycıoğlu ve Öner, 1994). Son zamanlarda bitkilerin maya, mantar ve bakterileri inhibe ettiği doğrulanmıştır (Shelef, 1983).

#### **1.4. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri**

‘Oksidatif stres’ koşullarında serbest radikaller biyolojik makromoleküllerle etkileşerek çeşitli hastalıklara yol açtığından özellikle risk grubundaki bireylerin aldığı gıdalarda, bu serbest radikalleri gideren, organizma tarafından sentezlenen ya da dışarıdan besinlerle alınan, antioksidanların toplamsal tayini önemlidir. Maddelerin bu amaçla kullanılabilirliğini belirlemek için birçok antioksidan tayin yöntemi geliştirilmiştir. Bunları Şu şekilde sıralayabiliriz:

- 1- MDA Oluşumunun İnhibisyonu Yöntemi
- 2- Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvvet (FRAP) Yöntemi
- 3- Tiyosiyanat Yöntemi
- 4- Floresans Sönme Zamanı Yöntemi
- 5- Toplam Fenolik Madde Tayini Yöntemi
- 6- Toplam Antioksidan Cevap (TAR) Tayin Yöntemi
- 7- Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite (TEAC) Yöntemi
- 8- DPPH• Radikali Temizleme Aktivitesi Yöntemi
- 9- Oksijen Radikali Absorbans Kapasitesi (ORAC) Yöntemi

## 10- Bakır (II) İndirgenme Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi

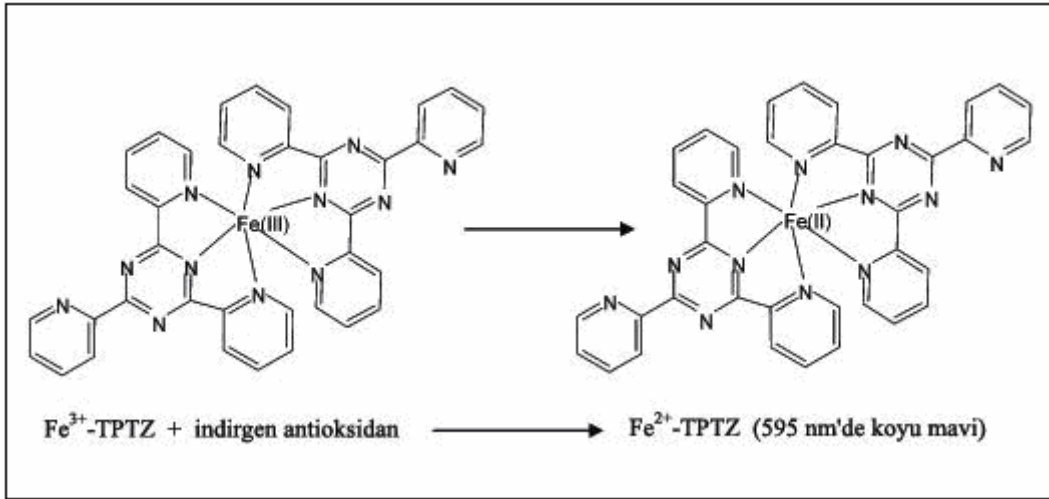
Bunlar arasında en yaygın kullanılanları burada özetlenecektir.

### 1.4.1. MDA Oluşumunun İnhibisyonu Yöntemi

MDA, lipid peroksidasyonunun ikincil ürünlerinden en iyi bilinenidir ve hücre duvarı hasarının belirlenmesinde indikatör olarak kullanılabilir. Lipid peroksidasyonunun derecesinin belirlenmesi için kullanılan pek çok yöntem mevcuttur. Son yıllarda, Ohkawa vd., (1979)'nin ortaya koyduğu yöntemlerden biri bir miktar değiştirilerek uygulanmaktadır. Yöntem, karaciğer doku homojenatı,  $Fe^{+2}$  ve C vitamini muamele edilerek oluşturulan Fenton reaksiyon karışımında ortaya çıkan ve bir lipid peroksit ürünü olan MDA'nın sıcak ve asidik ortamda tiyobarbiturik asit ile renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan bu renkli kompleks 532 nm'de maksimum absorbanı oluşturur. Tayinde antioksidan aktivite köre göre MDA oluşumunu %50 inhibe eden madde miktarları ( $IC_{50}$ ) cinsinden verilir. %50 inhibisyonu en az konsantrasyonda sağlayabilen madde miktarını veren madde antioksidan aktivite yönünden en etkili olanıdır. MDA oluşumunun engellenmesi antioksidan aktivitenin varlığını gösterir.

### 1.4.2. Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvvet (FRAP) Yöntemi

Oyaizu (1986) tarafından ortaya konan yönteme göre indirgeme kuvveti özütün dolaylı olarak toplam indirgeme potansiyelini göstermekte olup  $Fe^{+3} \rightarrow Fe^{+2}$  indirgenmesi ile meydana gelen renk değişimi 595 nm'de takip edilerek belirlenir. Sonuçlar, indirgeme potansiyeli yüksek ve aynı zamanda standart bir antioksidan madde olan askorbik asit ile karşılaştırılmak suretiyle yorumlanır. Güncel olarak kullanılan FRAP yönteminde 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ)'in Fe(III) tuzu kullanılmaktadır. Bu yöntemle redoks potansiyeli 0,7 V' tan daha düşük olan bileşikler antioksidan olarak test edilebilmektedir. Polifenolik antioksidanlarda hidroksilasyon ve konjugasyonun miktarı bu yöntemde aktiviteyi etkilemektedir. FRAP yöntemi hidrojen transferi ile radikal temizleyen özellikle tiyol ve proteinlerin antioksidan kapasitesini ölçmemektedir.



Şekil 10. Demir (III)'ün indirgenme reaksiyonu

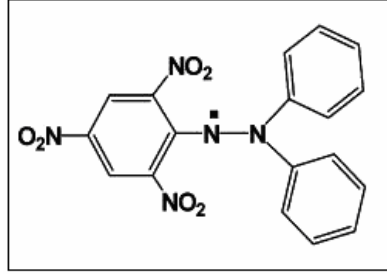
### 1.4.3. Toplam Fenolik Madde Tayini Yöntemi

Bu yöntem, suda ve diğer organik çözücülerde çözülmüş olan fenolik bileşiklerin Folin reaktifi ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan mormenekşe renkli kompleks 700 nm'de maksimum absorban oluşturur (Slinkard ve Singleton, 1977). Adı bunu yansıtmamasına rağmen, bu yöntem aslında numunenin indirgeme kapasitesini ölçer. Yani, bir antioksidan tayin yöntemidir.

### 1.4.4. DPPH Radikali Temizleme Aktivitesi Yöntemi

DPPH radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak satın alınabilen bir serbest radikal olup bu radikal 517 nm'de maksimum absorban oluşturmaktadır (Cuendet vd., 1997). Antioksidanlarla muamele, DPPH'tan kaynaklanan mor rengin şiddeti azalarak absorbanın düşüşüne sebep olacaktır. Farklı numune konsantrasyonlarıyla muamele edilen DPPH'ın absorbanındaki değişim ölçülerek, absorbanlara karşılık gelen konsantrasyonlarla grafik çizilmekte; grafikteki  $y=ax+b$  denkleminde DPPH konsantrasyonunu yarıya düşüren numune miktarı  $\mu\text{g/mL}$  veya  $\mu\text{M}$  cinsinden belirlenmekte ve  $\text{IC}_{50}$  değeri olarak ifade edilmektedir. Bu yöntemin önemli bir dezavantajı, büyük antioksidan moleküllerin sterik engellenmeye maruz kalmaları nedeniyle inaktif olarak test edilmeleridir. Bu yöntemde, antioksidan molekülün yapısı ve

boyutu test sonucunu etkilemektedir. Bu yöntem, radikal temizleme aktivite tayinlerinde kolaylığı ve kısa sürmesi nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır.



Şekil 11. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalinin formülü

#### 1.4.5. Bakır (II) İndirgenme Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi

CUPRAC yöntemi, diğer antioksidan aktivite tayin yöntemlerine göre daha hızlı, basit ve kullanışlıdır; radikal kromojen reaktiflerin pahalılık, güç temin edilebilirlik ve kararsızlık sorunlarından arınmıştır. Cu(II)-neokuproin reaktifi ılımlı bir yükseltgen olduğundan gıda maddelerinde bolca bulunan sitrat ve glukoz gibi bileşenlerle tepkime vermeksizin sadece antioksidanları yükseltger ve reaksiyon ürünü Cu(I)-neokuprin kelatının 450 nm'deki absorpsiyonu okunarak sonuç verilir. Yöntem, tiyol (-SH) tipi antioksidanlarla çabuk ve net sonuçlara ulaşır. CUPRAC, fizyolojik pH'lara yakın olan pH=7 ortamında yürütülür; dolayısıyla fizyolojik koşulları yansıtmaya şansı daha fazladır. Uygun çözücü seçimiyle hem hidrofilik, hem de lipofilik antioksidanlar tayin edilebilir (Apak vd., 2005).

### 1.5. Bitki Bileşenlerinin Analizinde Kullanılan Yöntemler

#### 1.5.1. Modern Kromatografik Yöntemler

Kromatografi diğer yöntemler tarafından ayrılmaları çoğunlukla mümkün olmayan pek çok karmaşık karışımlardaki benzer bileşenlerinin ayrılmalarına izin veren çeşitli ve önemli metotlar grubudur. Tüm kromatografik ayırmalarda numune bir gaz, sıvı ya da süperkritik akışkan olabilen hareketli bir fazda çözülür. Ardından bu hareketli faz uygun

bir sabit faz boyunca geçirilir. Bu iki faz öyle seçilir ki numunenin bileşenleri hareketli faz ve sabit faz arasında kendiliklerinden farklı derecelerde dağılırlar. Sabit faz tarafından güçlü bir şekilde tutulan bileşikler hareketli fazın akışıyla sadece yavaşça hareket ederler. Öte yandan sabit faz tarafından zayıfça tutulan bileşikler ise hızlıca hareket ederler. Hareketlilikteki bu farklılıkların bir sonucu olarak numunenin bileşenleri kalitatif ve/veya kantitatif olarak analiz edilebilen ayrı bantlar içinde ayrılırlar (Skoog vd., 1998).

Kromatografi hareketli fazın özelliklerine bağlı olarak başlıca üç forma ayrılabilir:

- Gaz kromatografisi
- Sıvı kromatografisi
- Süperkritik akışkan kromatografisi

Kromatografik işlemler aşağıdakilere göre sınıflandırılabilirler:

- Adsorpsiyon kromatografisi
- Dağılma (paylaşım) kromatografisi
- İyon-değişim kromatografisi
- Boyut eleme kromatografisi

Sıvı kromatografide tüm bu dört form uygulanabilir. Bileşenlerin uçuculuğunun gerekli oluşunun bir sonucu olarak gaz kromatografisinde yalnızca adsorpsiyon kromatografisi ve paylaşım kromatografisi uygulanabilir (Sandra, 2004).

#### **1.5.1.1. Yüksek-Performanslı Sıvı Kromatografisi ( HPLC)**

Yüksek-performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) özellikle biyolojik, farmakolojik, besinsel, çevresel ve endüstriyel v.b. numunelerde organik ve anorganik bileşiklerin ayrılma ve belirlenmesi için uygulanan analitiksel bir tekniktir. Numunelerdeki bileşikler sıvı hareketli faz ve sabit faz arasında dağılım davranışlarındaki farklılıklardan dolayı kolon boyunca farklı hızlarda geçerler.

HPLC enstrümanları bir hareketli faz deposu, bir pompa, bir enjektör, bir ayırma kolonu (seçimli ön-kolon), bir kolon ısıtıcısı, bir dedektör ve bir integratör veya bilgisayarlı dijital sinyal alıcısı içerirler.

Tipik bir HPLC çalışması bir lineer değişim kullanarak karıştırılan iki çözücü ve kolon boyunca belli bir akış hızını içerir. Çözücülerin değişikliği ve ilaveler ayırmanın

seçiciliğini optimize etmek için kullanılır. Çözücülerin bulunduğu hareketli faz depoları kolonda ve dedektör sisteminde gaz oluşturarak bozucu etkilere sebep olan çözülmüş gazların (genellikle oksijen ve azot) giderilmesi için bir cihazla donatılmıştır (Skoog vd., 1998). Pompa yüksek basınçta sabit serbest-vuruş akışı sağlar ve ayırma esnasında çözücülerin çeşitli kompozisyonlarına programlanabilir. Akış hızı kolonun iç çapına bağlıdır; kolonda küçük iç çapı küçük akış hızı gerektirir. Analitik HPLC için tipik olarak 0,5–5 ml/dk akış hızı 400 bar'a kadar çalışan pompalar tarafından üretilebilir.

Genellikle modern LC için en faydalı ve yaygın kullanılan örnek verme düzeneği bir enjeksiyon valfinin kullanımına bağlıdır. Bu valfler akışın önemli derecede bozulmaksızın basınçlı kolonun içinde numunenin tekrarlanabilir girişi için kullanılır. Valfli enjeksiyon hızlı, tekrarlanabilir ve özellikle 400 bar'a kadar %0.2'den daha az hata ile numune hacminin (60 nl'den birkaç mililitrelere kadar) geniş bir aralıkta operatör bağımsız olarak dağıtımına müsaade eder (URL-5, 2006).

HPLC ile ayırmalar farklı operasyon tipleri kullanılarak başarılar. Özel bir uygulama için seçilen tip, ayrılacak analit(ler)in özelliklerine bağlı olacaktır (Lindsay, 1987). Çoğu HPLC ayırmalar dağılma tipinde çalışılır. Dağılma kromatografisi hareketli ve sabit fazlarının bağlı polarlığına bağlı olarak iki temel forma ayrılabilir (Skoog, 1998). Normal faz durumunda, sabit faz hareketli fazdan daha polardır ve en az polar analitler ilk elue edilirler. Analit tutunması hareketli fazın polaritesi arttıkça azalır. Ters faz kromatografide (RP), sabit faz hareketli fazdan daha az polardır. En polar analitler ilk elue edilirler ve analitin tutunması hareketli fazın hidrofobikliği arttıkça azalır. Yaklaşık olarak tüm HPLC analizlerinin %80'i RP tipinde çalışılır.

Ters faz kolonlar silikondan modifiye edilirler. Silika jelde modifiye olan Oktıl (C8) ve oktadesil (C18) en yaygın kullanılan fazlardır.

HPLC kolonlar (genelde 3-5  $\mu\text{m}$ ) dar bir boyut dağılımına sahip küçük partiküllerden oluşur ki bunlar apolar fonksiyonel grupların kullanımıyla modifiye edilirler. Mikro partiküllü materyaller yüksek basınçta kolon boyunca pompalanan hareketli fazı gerekli kılarlar. Kolonlar laboratuarda hazırlanabilir fakat çoğu analistler ticari olarak hazır kolonlar satın alırlar. Analitik kolonun bozulmalardan korunması için bir koruyucu kolon, kolon ile enjeksiyon aletinin arasına kurulur.

Farklı boyutlardan kolonlar kullanılabilmesine rağmen, günümüzde 100–250 mm boyunda, 3–5 mm iç çaplı 5  $\mu\text{m}$  sabit faz materyaliyle paketlenmiş kolonlar çoğu uygulamalar için mantıklı bir zamanda yeterli ayırımı sağlamaktadır.



Son otuz yılı aşkındır pek çok LC detektörler çeşitli ilkelere dayandırılarak geliştirilmiştir. Fakat yine de yalnızca onlardan yaklaşık on iki tanesi LC analizleri için etkin bir şekilde kullanılır ve bunların da yalnızca dördü yaygın kullanımdadır.

## **1.6. Erzincan Üzümü (*Vitis vinifera* ssp. , Cimin) Bitkisinin Özellikleri**

### **1.6.1. Genel Özellikleri**

*Vitis vinifera* (kara üzüm)'nin bir alt türü olan ve Erzincan'ın Üzümlü (cimin) yöresinde yetişen siyah renkli, şekli basık-oval, ortalama 3-4 gram tane ağırlığında, çekirdek sayısı ortalama 1-4 orta kabuk kalınlığında, aroması tatlı-mayhoş, konik şeklinde, dolgun sıklıkta, 300-1500 gram salkım iriliğinde sofralık bir üzüm cinsidir. Yöreye özgü coğrafi durum, iklim özellikleri, nem, sıcaklık ve rüzgar gibi faktörlerden gelmektedir.

En faydalı yağışlar; kış, erken bahar ve hasadı müteakip olan sonbahar yağışlarıdır. Oncaların suya ve sulamaya ihtiyacı, Haziran ayının başından başlayarak Eylül ayının ortalarına kadar devam etmektedir. En fazla su ihtiyacı, Temmuz ayının başı Ağustos ayının birinci haftasıdır. Ortalama nisbinem % 58'dir. Nisbi rutubetin düşük ve sıcaklık yüksek olduğunda evaporasyon çok fazla olursa yoncaların yapraklarına ve tanelerine zarar vermektedir. Yıllık sıcaklık ortalaması en az 9 °C (9-12) olan yerlerde yetişebilmektedir. Erzincan'ın senelik sıcaklık ortalaması 10.7 °C, yaz ayları ortalaması 22.6 °C olmaktadır. Sıcaklık devamlı olarak 15-20 °C' nin altına düşmemelidir. Ürünün denetimi, başkalarının aynı ürünü üretimlerini, teknik ve coğrafi özelliklerine uygunluğunun kontrolleri Erzincan Üzümlü Belediyesi koordinasyonu ile gerçekleştirilir.

### **1.6.2. Ürünün Bileşimi**

Tanede; azot %0.36, fosfor %0.01, potasyum % 0.20, magnezyum % 0.008, kalsiyum % 0.04, Yaprakta; azot % 1.75 fosfor % 0.30, potasyum % 0.49, magnezyum % 0.11, kalsiyum % 1.47, demir % 66.0, Çinko % 29.95, bakır % 36.25.



Şekil 12. Erzincan üzümünün fotoğrafları

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Kullanılan Cihazlar

Denemelerde kullanılan madde ve malzemeler Rize Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü ve KTÜ Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü laboratuvarlarından temin edildi. Kullanılan cihazlar ve satın alındıkları firmaları gösteren bilgiler Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. Denemelerde kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Markası
Öğütücü ( Blender)	Arçelik
UV spektrofotometre	SHIMADZU uv-1601 spectrophometer
Rotary evaporatör (Döner vakum buharlaştırıcısı)	Bibby R100
Çalkalayıcı Su banyosu	Nüve st 402
Isıtıcı magnetik karıştırıcı	Are Velp Scientifica
HPLC	Thermo Finnigan
Santrifüj	ALC Centrifuge 4218
Etüv	BINDER
pH metre	HANNA HI 2121

### 2.2. Kullanılan Çözeltiler ve Kimyasallar

Denemelerde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4. Çözeltiler ve hazırlanışları

Çözelti	Hazırlanışı
0.2 N Folin-Ciocalteu Reaktifi	2N’lik hazır satın alınan çözeltiden saf su ile 1:10 oranında seyreltilerek hazırlanır.
%7,5’lik (% a/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> çözeltisi	7,5g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> alınır ve bir miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim saf suda 100 mL ‘ ye tamamlanır.
Stok Kateşin	2,9 mg kateşin az miktarda suda çözüldükten sonra son hacim 10 mL’ ye tamamlanır. (1000 µM).

Tablo 4'ün devamı

0,1 M NaOH	0,100 g NaOH bir miktar suda çözüldükten sonra son hacim 25 mL' ye tamamlanır (0,1 M).
0,16 M NaCl ( Serum Fizyoloji)	9,36 g NaCl alınır ve bir miktar saf suda çözüldükten sonra son hacmi 1 litreye tamamlanır.
10 mM PBS	1,36 g $K_2H_2PO_4$ alınır 0,16 M NaCl çözeltisi ile çözüldükten sonra pH' sı 7,4 oluncaya kadar derişik NaOH ilave edilerek pH metre yardımıyla ayarlanır ve sonra son hacmi 0,16 M NaCl çözeltisi ile 1 litreye tamamlanır.
% 28 Trikloroasetik Asit (TCA)	28 g trikloro asetik asit alınır bir miktar saf suyla çözümlenerek hacmi 100 mL' ye tamamlanır.
2-Tiyobarbütirik Asit (TBA)	0,1 g NaOH ve 0,1 g 2- tiyobarbütirik asit (TBA) alınır ve son hacim 10 mL' ye tamamlanır.
0,02 M $NaN_3$	0,065 g $NaN_3$ alınır ve çözümlenerek hacmi PBS ile 50 mL' ye tamamlanır.
0,002 M $CuSO_4$	4,99 mg $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ alınır ve saf suyla çözümlenerek hacmi 10 mL' ye tamamlanır.
100 $\mu$ M DPPH çözeltisi	11,60 mg DPPH bir miktar metanolde çözüldükten sonra son hacim 250 mL metanolle tamamlanır.

Denemelerde kullanılan kimyasallar ve satın alındıkları firmaların ticari adları Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 5. Kimyasallar ve satın alındıkları firmalar

<b>Madde Adı</b>	<b>Firması</b>
Asetik asit	Merck
DPPH	Sigma
Etanol	Merck
Folin-Ciocalteu Reaktifi	Sigma
HCl	Merck
Kateşin	Sigma
Metanol	Merck
$Na_2CO_3$	Merck
NaOH	Merck
Trikloroasetik Asit (TCA)	Merck
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	Merck
$H_2O_2$	Merck

### 2.3. Meyvenin Toplanması ve Ekstraktların Hazırlanması

2006 Ekim ayında Erzincan'nın Tercan ilçesinden alınıp getirilen *Vitis vinifera* ssp. (Erzincan Üzümü) ilk önce ezildi ve süzülerek meyve suları elde edildi. Daha sonra bu meyve suyu santrifüjlendikten sonra 45 µm'lik filtrelerden geçirilir ve küçük Eppendorf tüplerine konularak -20 °C 'de derin dondurucuya konuldu. Diğer taraftan çekirdek ve meyvenin kabuğu ayrılarak açık havada kurutuldu.

Kurutulan bu kısımlar her biri öğütücüde ayrı ayrı parçalanarak toz haline getirildi ve uygulanacak tayin yöntemlerine göre kodlandı (Tablo 6).

Tablo 6. Numune kodları

Kod	Numune
EÜ = ÜzümS	Erzincan üzümünün meyve suyu
EÜK = KabukS	Erzincan üzümünün meyvesinin kabuğunun sulu ekstraktı
EÜKM = KabukM	Erzincan üzümünün meyvesinin kabuğunun metanollü ekstraktı
EÜÇS = ÇekirdekS	Erzincan üzümünün çekirdeğin sulu ekstraktı
EÜÇM = ÇekirdekM	Erzincan üzümünün çekirdeğin metanollü ekstraktı

#### 2.3.1. Metanolle Soxhlet Ekstraksiyonu

Metanol polar bir molekül olduğu için bitki bünyesindeki polar molekülleri ekstrakte eder. Kurutulmuş ve öğütülmüş olan çekirdek ve kabuktan yaklaşık 2'şer ve 5' er g alınıp, her biri ayrı ayrı süzgeç kağıdına sarıldı. Bu şekilde oluşturulan kartuşlar soxhlet düzeneğine yerleştirildi ve yaklaşık 150 mL ilave edilip, gömleklili ısıtıcıda 60 °C'de yavaşça kaynatılarak ekstraksiyona tabi tutuldu. Ekstraksiyon, soxhlet düzeneğindeki çözelti renksiz oluncaya kadar, yaklaşık 6 saat sürdürüldü. Daha sonra çözücüler döner vakumlu evaporatörde uçuruldu.

### 2.3.2. Sulu Ekstraktların Hazırlanması

Kurutulmuş ve öğütülmüş olan çekirdek ve kabuktan belirli miktarda tartıldı ve 50 mL su ile karıştırılarak 25 °C'de 18 saat çalkalayıcıya bırakıldı. Daha sonra buradan alınarak süzülüp 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi en son aşamada 0,45 µm'lik filtreden geçirilerek eppendorf tüplerine konularak -20 °C'de buzdolabında saklandı.

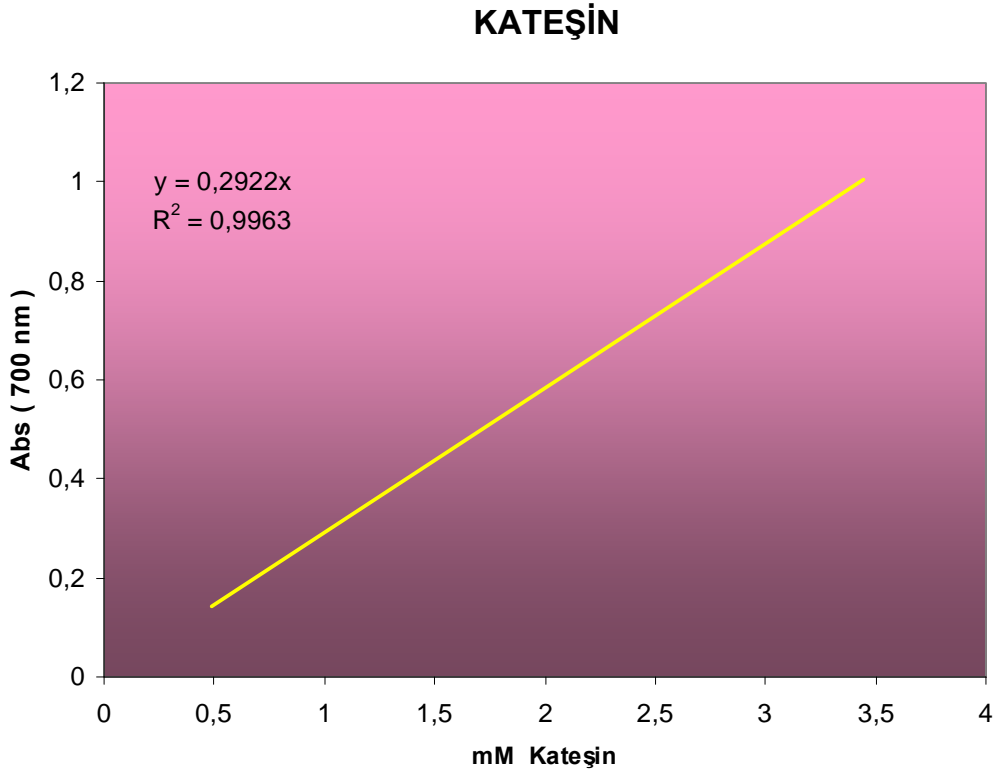
### 2.4. Erzincan Üzümünün Farklı Dokulardaki Toplam Fenolik Madde Miktarlarının Belirlenmesi

Yöntem, suda ve organik çözücülerde çözülmüş olan fenolik bileşiklerin folin reaktifleri ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan mor-menekşe renkli kompleks 700 nm'de maksimum absorban oluşturur (Slinkart ve Singleton, 1977).

Metanollü ve sulu ekstraktlar içindeki toplam fenol miktarları, bu yöntem kullanılarak kolorimetrik olarak tayin edildi. Bunun için; öncelikle ekstraktlar ve standarttan (kateşin) 1 mg/mL konsantrasyonunda çözeltiler hazırlandı. Numuneler ve standartlar 5 farklı konsantrasyonla (1 - 0,8 - 0,6 - 0,4 - 0,2 mg/mL kateşin) çalışıldı. Tablo 7' deki gibi pipetleme yapıldıktan sonra oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı ve bu zaman sonunda 700 nm'de köre karşı okuma yapıldı ve şekil 15'de verilen kalibrasyon grafiği elde edildi. Oluşturulan bu grafikten numunelerin toplam fenolik içerikleri hesaplandı.

Tablo 7. Polifenol tayini için pipetleme miktarları

	Kör (mL)	Numune (mL)	Standart (mL)
Deiyonize su	0.1	-	-
Numune	-	0.1	-
Standart	-	-	0.1
Deiyonize su	5	5	5
0.2 N Folin	0.5	0.5	0.5
Tüpler çalkalandı ve 3 dakika sonra			
% 2 Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1.5	1.5	1.5
2 saat inkübasyona bırakılır.			



Şekil 13. Toplam fenolik madde tayininde standart olarak kullanılan kateşinin farklı konsantrasyonlarına karşı 700 nm’de verdiği absorbans değerlerinin grafiği

## 2.5. Erzincan Üzümünün Farklı Dokularından Elde Edilen Ekstraktlardaki Polifenol Bileşiminin HPLC ile Analizi

Çalışmanın bu kısmı ÇAYKUR Atatürk Çay ve Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü’nde yapılmıştır.

Yöntem bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerin cinsi ve miktarı, sistemde önceden yürütülen saf standart fenolik bileşikler (gallik asit, kafein, kateşin (C), epigallo kateşin (EGC), epigallo kateşin galat (EGCG), epik ateşin (EC), epik ateşin galat (ECG) ve teoflavinler) referans alınarak belirlenir.( ISO 14502-2, 2005)

Sistemde kullanılan mobil fazların içeriği şu şekildedir:

- Mobil faz A : % 9 asetonitril, % 2 asetik asit ve 20 ppm EDTA
- Mobil faz B: % 80 asetonitril, %2 asetik asit ve 20 ppm EDTA

Gradient şartları Tablo 8’deki gibi ayarlandı.

Tablo 8. Gradient şartları

	% A	% B
0-10 dakika	100	0
10-25 dakika	68	32
25-35 dakika	68	32
35-45 dakika	100	0

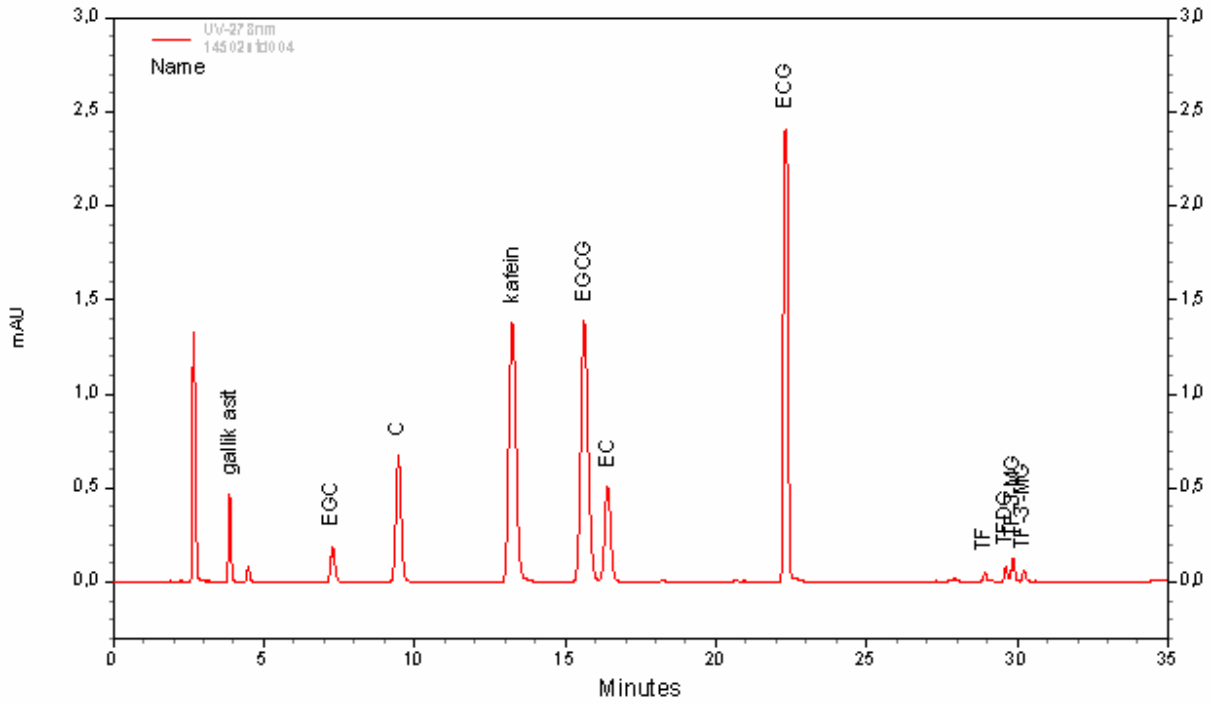
Cihazın diğ er ayarları ise ř u ř ekildedir:

- Pompa ç alış ma sũresi: 45 dakika
- Akış hızı: 1mL/dakika
- Kolon: Phenomex Yuna 5u-C18 ( 250 x 4,60 mm )
- Enjeksiyon miktarı: 10µL
- Kolon fırın sıcaklığı: 35 °C ( ± 0,5 °C)
- Dedektũr tipi: DAD
- Dalga boyu: 278 nm
- Ç alış ma sũresi: 45 dakika

Mobil fazlar degaze edildikten sonra sisteme yerleş tirildi ve sistem ç alış tirıldı. Önce sistemden mobil faz geçirilerek sistemin dengeye gelmesi sağlandı. – 0,005 ile 0,005 mAU arasında iyi bir baseline elde edildikten sonra analize başlandı.

Analize başlamadan birkaç tane standart karışını enjekte edilerek bu karışımların kromatogramalarından kalibrasyon eğrisi ç izildi. Daha sonra numuneler enjekte edildi ve standartlara ait kromatogramdaki aynı RT 'ye sahip piklerin alanlarına bakılarak sonuç hesaplaması yapıldı. Standart karışıma ait kromatogram ř ekil 14' de verilmiş tir.





Şekil 14. Gallik asit, kafein ve kateşin standartlarına ait kromatogram

## 2.6. Antioksidan Tayin Yöntemleri

### 2.6.1. DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi

DPPH radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak satın alınabilen bir radikal olup denemelerimizde satın alınan bu radikalın 100  $\mu\text{M}$ 'lık metanolik çözeltisi, metanollü ve sulu ekstraktlarda kullanıldı. Denemelerde Cuendet vd. (1997) yöntemi kullanıldı. Elde edilen ekstraktlar (numuneler) ve standart (kateşin) değişik konsantrasyonlarda hazırlandı. Standartlar 107,5- 215 - 430 - 860 - 1720  $\mu\text{M}$ 'lık; numuneler ise  $\mu\text{M}$  kateşin eşdeğer cinsinden 5 farklı konsantrasyonlarda hazırlandı. Eşit hacimde (750  $\mu\text{L}$ ) DPPH' çözeltisi, numune çözeltileri üzerine eklenerek vortekslendi ve oda sıcaklığında 50 dakika inkübasyona bırakıldı. Her bir numune ve standart konsantrasyonu için iki paralel çalışıldı. Ayrıca numune/standartın her bir konsantrasyonu için birer kör (numune/standart + DPPH çözücüsü [metanol] ) ve her bir çözücüsü (metanol/su) için de (kontrol tüpleri [ DPPH + numune/standart çözücüsü] ) üç paralel çalışıldı. Süre sonunda DPPH'nin maksimum absorbands verdiği 517 nm'de absorbands okundu. Hesaplamalarda iki paralelin ortalaması

alınarak kör değerleri bu ortalamadan çıkarıldı. Bulunan absorbanslara karşılık gelen konsantrasyonlar grafiğe geçirilerek IC<sub>50</sub> değerleri  $\mu$ M cinsinden hesaplandı.

#### **2.6.1.2. IC<sub>50</sub> Değerlerinin Bulunması**

IC<sub>50</sub> radikal miktarını yarıya indiren numune konsantrasyonudur. IC<sub>50</sub> değerinin bulunması için farklı konsantrasyonlarda çalışmak gerekir. Bu nedenle çalışmalarda 5 farklı konsantrasyonda ölçüm yapıldı. Numunelerin yeterli miktarda farklı konsantrasyonu hazırlanıp absorbans ölçümleri yapıldı ve absorbanslar konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi. Maksimum absorbansın yarısına karşılık gelen yani absorbansı yarıya düşüren konsantrasyon miktarı IC<sub>50</sub> değerini vermektedir. IC<sub>50</sub> değeri mg/mL veya  $\mu$ M gibi birimlerle ifade edilmektedir.

#### **2.6.2. Eritrositlerde MDA Miktar Tayini**

##### **2.6.2.1. Eritrosit Paketinin Hazırlanması**

Numune olarak eritrosit paketleri kullanıldı. Eritrosit paketlerinin hazırlanması şu şekilde gerçekleştirildi. Rize Devlet Hastanesi Kan Laboratuvarından temin edilen kanlar heparinli tüplere alındı. Bu kanlar büyük deney tüplerinde toplanarak 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra plazma kısmı konjugedien ölçümünde kullanılmak için ayrıldı. Lökosit ve trombosit fazlarının uzaklaştırmak için % 0.9'luk NaCl ile hacimlerinin 4 katına tamamlanıp 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek kan yıkandı. Bu işlem en az 3 kez tekrarlandı. Eritrosit hücreleri bir araya toplanarak havuz oluşturuldu ve ependorf tüplerine aktarıldı. Daha sonra bu kanların Rize 82. Yıl Devlet Hastanesi Kan Laboratuvarında hemoglobin miktarları okundu

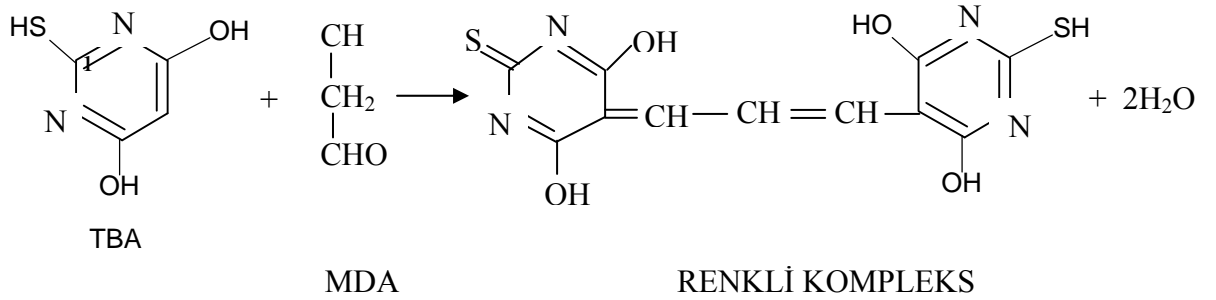
##### **2.6.2.2. Hücre Süspansiyonlarının Hazırlanması**

Reaksiyon ortamının hazırlanmasında Stocks metodu kullanıldı (Stocks ve Dormandy, 1971). Hazırlanan eritrosit paketi hastanede okunmuş hemoglobin değerine göre son konsantrasyonu 3g/dL olacak şekilde PBS'li 0,02 M NaN<sub>3</sub> ile seyreltilip, 37 °C 'de 10 dk.

inkübasyona bırakılarak stok çözelti hazırlanmış oldu. Hazırlanan çalışma tüplerine 10 mL stok, üzerine son konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konuldu ve çalışma ortamındaki konsantrasyonları 100 µM ve 200 µM olacak şekilde üzüm özütleri ilave edilip PBS tamponu ile çalışma ortamının son hacmi 15 mL 'ye tamamlanır. Çalışma tüpleri 37 °C'de çalkalayıcı su banyosunda inkübasyona bırakılır. 15 dakika aralıklarla aşağıda şekilde MDA tayini yapıldı (Stocks ve Dormandy, 1971).

### 2.6.2.3. Eritrosit MDA Miktar Tayini

Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan MDA, TBA çözeltisi ile ısıtılması sonucu oluşan pembe renkli kompleksin konsantrasyonunun spektrofotometrik olarak belirlenmesi ile tayin edilir.



Şekil 15. Lipit peroksidasyonu sonucu pembe rengin oluştuğu MDA ile TBA'nın tepkimeye girdiği reaksiyon

İnkübasyona bırakılan çalışma tüplerinden 15 dakika sonra 900 µL alınarak üzerine 600 µL TCA çözeltisi ilave edildi ve 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjün ardından 900 µL süpernatant alınarak üzerine 300 µL günlük taze olarak hazırlanan TBA çözeltisi ilave edildi ve 15 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Oluşan renkli çözeltinin absorbansı 532 ve 600 nm'de spektrofotometrede (Shimadzu UV 1601) okundu ve MDA konsantrasyonları aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Stocks ve Dormandy, 1971).

$$[\text{MDA}] = (A_{532} - A_{600}) \times 900 = \text{nmol MDA} / \text{g Hb}$$

### 2.6.3. Plazma Konjugedien Oluşumu İçin Gerekli Süre (t-lag) Değerlerinin Bulunması

Bu yöntemde daha önce kanın santrifüjünden elde edilen plazma kullanıldı. Reaksiyon ortamına son konsantrasyonu  $50 \mu\text{M}$   $\text{Cu}^{+2}$  olacak şekilde  $\text{CuSO}_4$  çözeltisi,  $50 \mu\text{M}$  katabazine eşdeğer miktarda ekstrakt ve son konsantrasyonu 150 kat seyreltilmiş olacak şekilde plazma ilave edildi ve son hacimler PBS ile 1 mL' ye tamamlandı. Ayrıca bir de hiçbir antioksidan bileşiğin içine ilave edilmediği sadece plazma ve  $\text{Cu}^{+2}$  bulunan kontrol reaksiyon ortamı hazırlandı. Daha sonra 234 nm 'de bütün çalışma gruplarının içerisinde sadece  $\text{Cu}^{+2}$  ve PBS'nin bulunduğu köre karşı her 6 dakikada bir yaklaşık 17 saat boyunca absorbansı okundu. Absorbansa karşı zaman grafiği çizilerek her bir ekstraktın konulduğu reaksiyonun, standartın konulduğu reaksiyonun ve sadece plazmanın bulunduğu reaksiyon ortamımında konjugedien oluşumunun bir göstergesi olan t-lag zamanları hesaplandı ( Spranger vd., 1998)

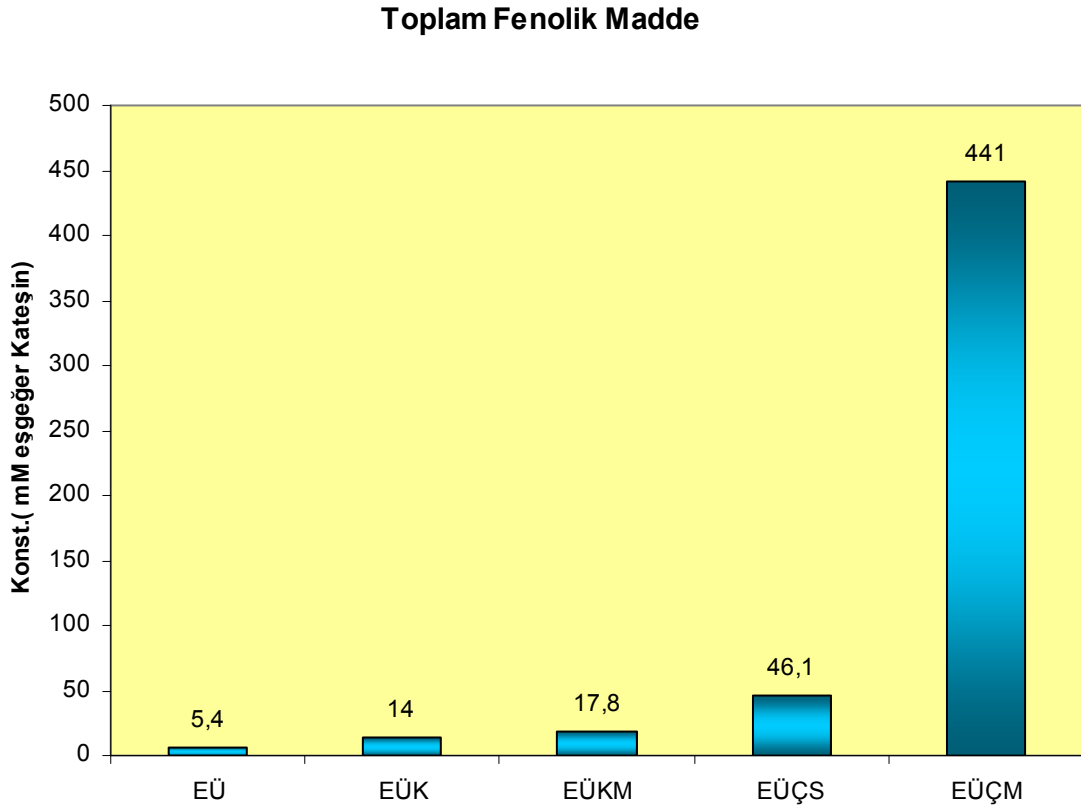
### 2.7. İstatistik Analiz

Elde edilen sonuçlar aritmetik ortalama ( $\bar{X}$ ) ve standart sapma (SD) olarak ifade edildi. Bütün çalışma gruplarındaki parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorow-Simirnow testi ile değerlendirilmiştir. Çalışma gruplarına ait ilgili parametrelerin zamana ve özüt konsantrasyonuna bağlı değişimlerinin anlamlılığı One- Way ANOVA testiyle, çalışma gruplarına ait parametrelerinin birbirleriyle karşılaştırılması Student-t testi, her bir çalışma grubunda ölçülen parametrelerin birbirine göre değişimlerinin değerlendirilmesi ise Spearman's Korelasyon testi ile gerçekleştirilmiştir. Üzüm, plazma ve eritrositlerde bakılan değerlerin birbirleriyle ilişkilerinin anlamlılığı Regresyon Testi ile gerçekleştirildi.  $p < 0,05$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Erzincan Üzümünün Farklı Dokulardan Elde Edilen Toplam Fenolik Madde Miktarları

Sulu ve metanollü ekstraktlarda ve meyve suyunda toplam polifenol madde miktarı Folin- Ciocalteu yöntemiyle kateşine eşdeğer olarak belirlenen fenolik madde miktarları Şekil 16' da verilmiştir. 700 nm' de, mM eşdeğer miktarda kateşin artan konsantrasyonlarına karşılık gelen numunelerin fenolik madde içerikleri grafiğe geçirilerek belirlenmiştir.



Şekil 16. Erzincan üzümünün farklı dokularına ait toplam fenolik madde miktarları (mM eşdeğer miktarda kateşin)

Tablo 9. Erzincan üzümünün farklı dokularına ait toplam fenolik madde miktarları ( mM eşdeğer miktarda kateşin)

Numune	Toplam fenolik madde miktarı ( mM eşdeğer kateşin)
EÜ	5,4
EÜK	14
EÜKM	17,8
EÜÇS	46,1
EÜÇM	441

Sulu ve metanollü ekstraktlarının karşılaştırıldığında metanollü ekstraktların sululara göre daha fazla fenolik madde içerdiği söylenebilir. Kısım açısından değerlendirilirse de en çok fenolik madde içeriği çekirdekte bulunduğu söylenebilir.

### 3.2. Erzincan Üzümünün Farklı Dokularından Elde Edilen Ekstraktlardaki Polifenol Bileşiminin HPLC ile Analizi

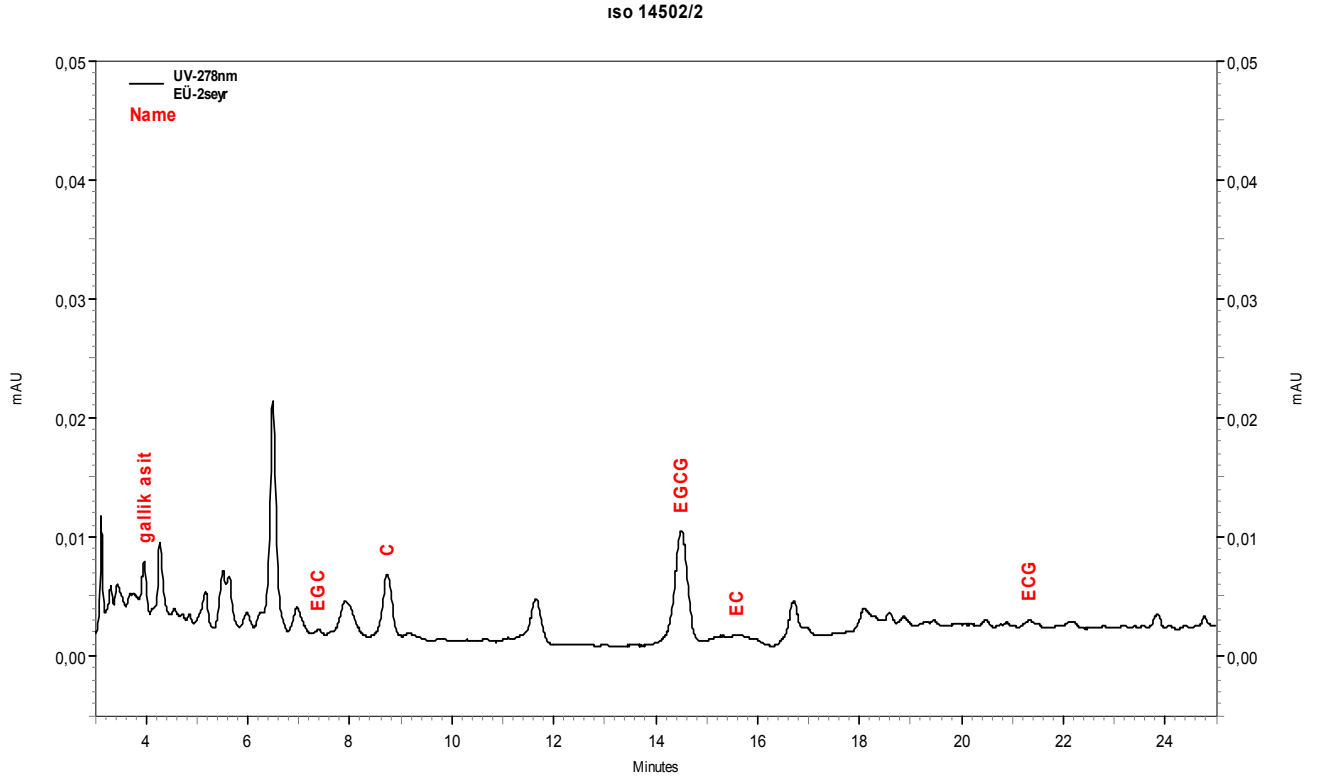
Yapılan analiz sonucu numunelere ait kromatogramlar Şekil 17-21 'de verilmiştir. Ayrıca numunelerde bulunan fenolik bileşiklerin miktarları Şekil 14 'de yer alan standart kromatogram referans alınarak hesaplanmış ve Tablo 10 'da verilmiştir. Buna göre fenolik madde içerik bakımından en fazla madde miktarı çekirdeğin metanollü ekstraktında bulunmaktadır. En fazla bulunan fenolik madde de kateşindir. Ayrıca ekstraktların içeriklerinin kateşin, epigallo kateşin 3-gallat, gallik asit ve toplam miktar bakımından birbirleriyle karşılaştırılması şu şekildedir:

Kateşin( C): EÜÇM > EÜÇS > EÜK > EÜ > EÜKM

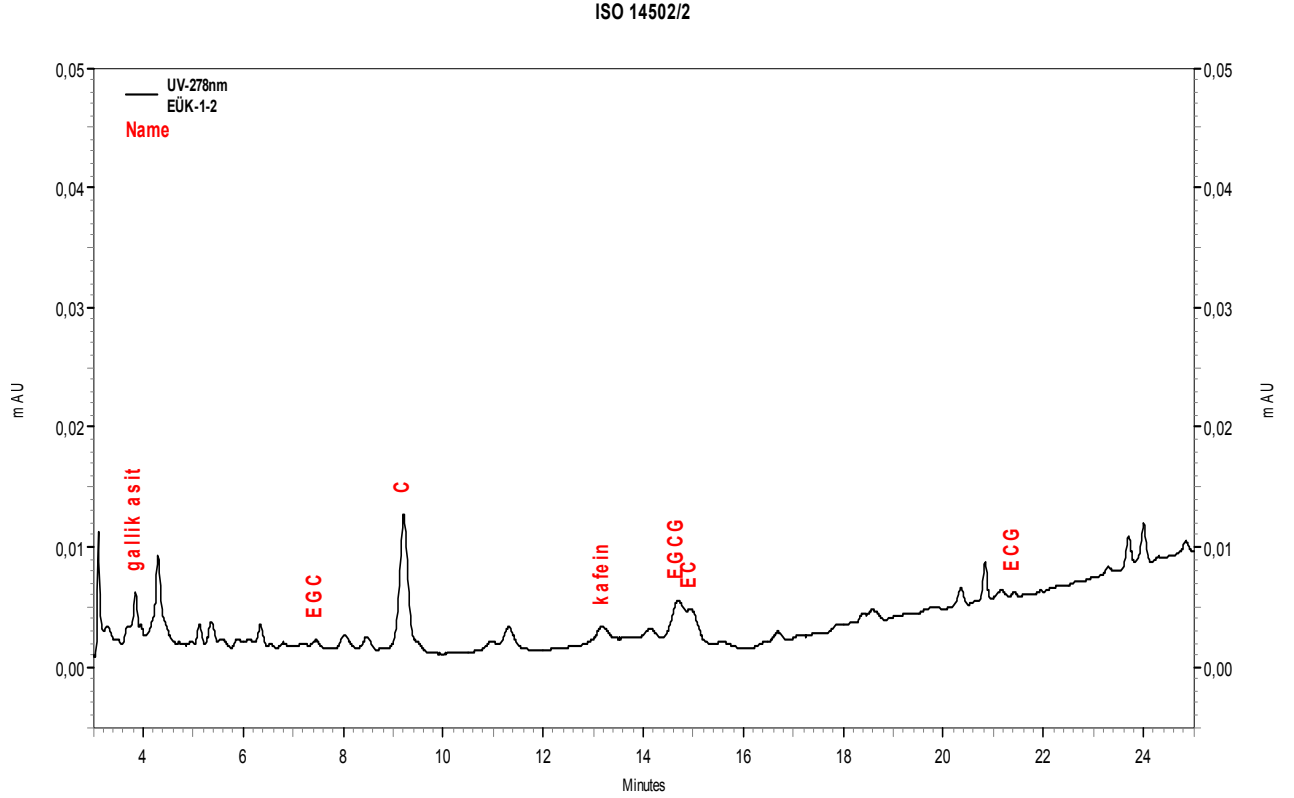
Epigallo kateşin gallat(EGCG): EÜÇM > EÜ > EÜKM > EÜÇS > EÜK

Gallik asit: EÜÇM > EÜÇS > EÜKM > EÜK > EÜ

Toplam fenolik madde: EÜÇM > EÜÇS > EÜKM > EÜ > EÜK

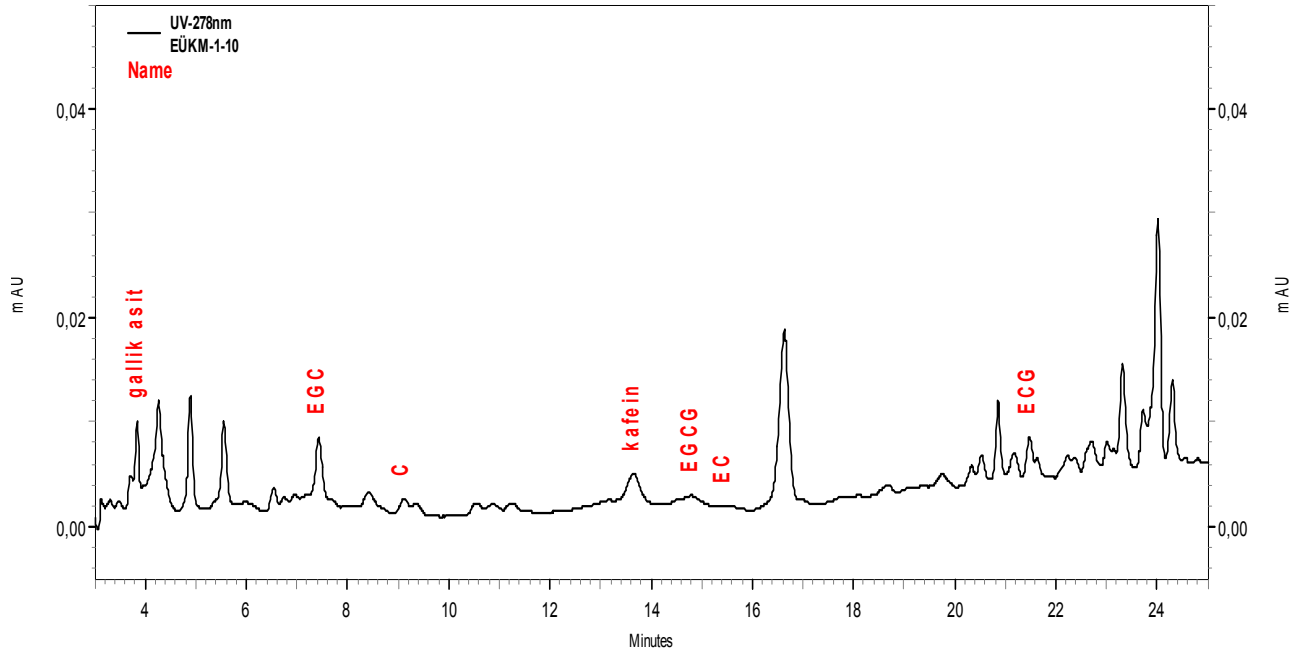


Şekil 17. Erzincan üzümünün meyve suyuna (EÜ) ait kromatogram



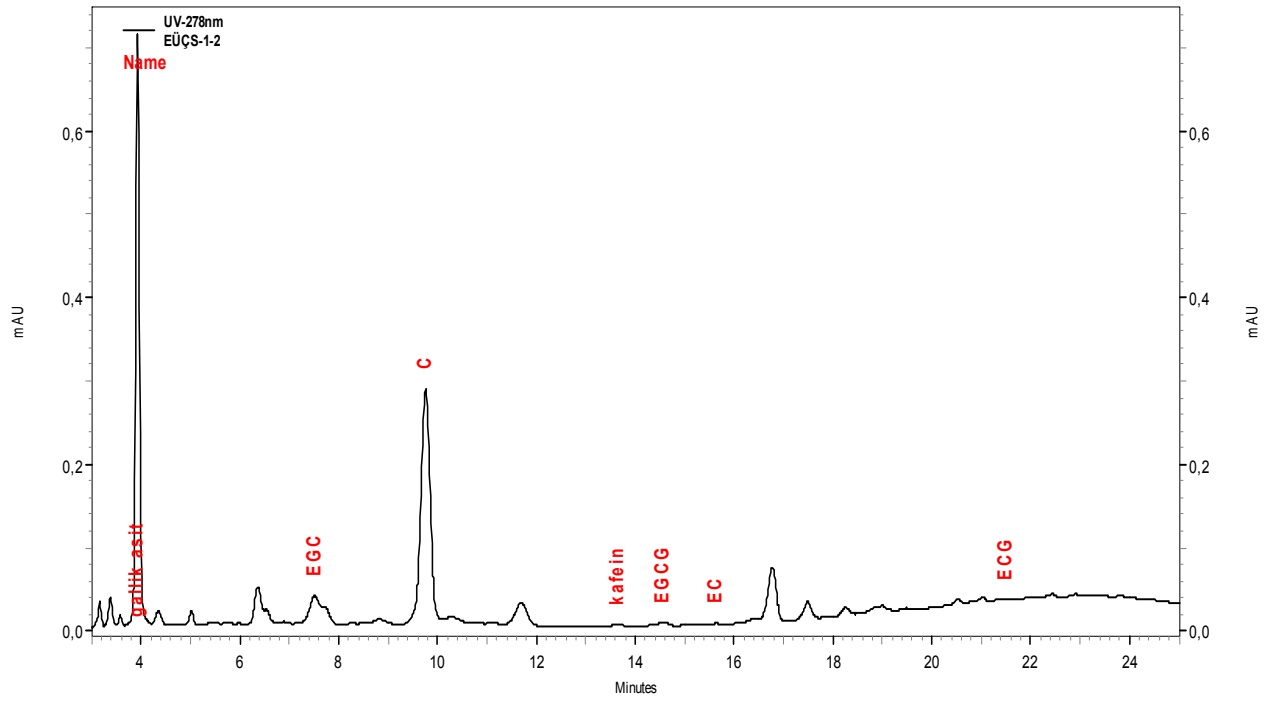
Şekil 18. Erzincan üzümünün kabuğunun sulu ekstraktına (EÜK) ait kromatogram

ISO 14502/2



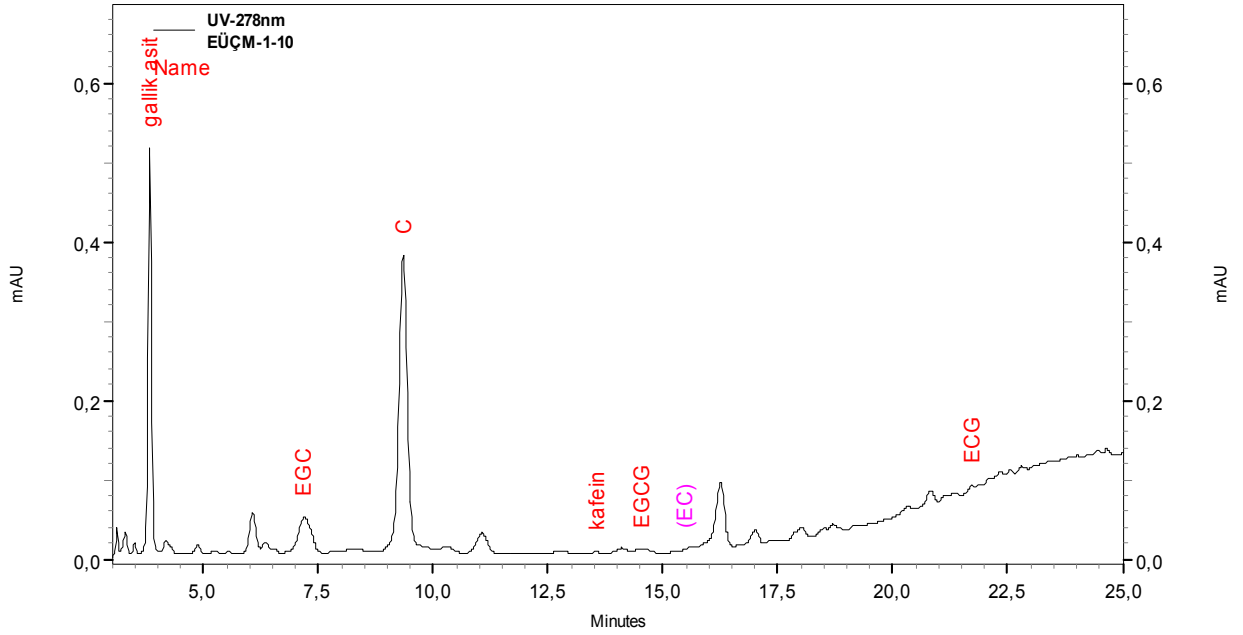
Şekil 19. Erzurum üzümünün kabuğunun metanollü ekstraktına (EÜKM) ait kromatogram

ISO 14502/2



Şekil 20. Erzurum üzümünün çekirdeğinin sulu ekstraktına (EÜÇS) ait kromatogram





Şekil 21. Erzincan üzümünün çekirdeğinin metanollü ekstraktına (EÜÇM) ait kromatogram

Tablo 10. Erzincan üzümünün farklı dokularının farklı çözücülerdeki fenolik madde miktarları ( mg/mL)

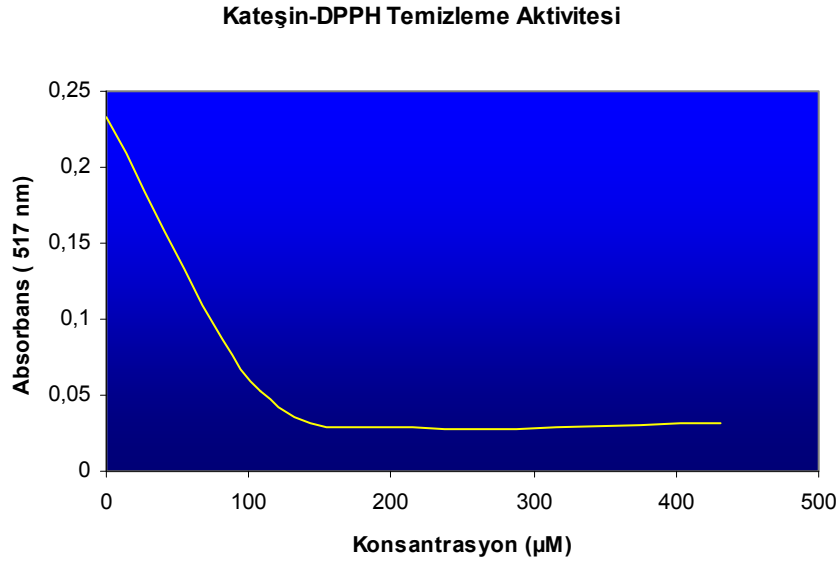
Fenolik Bileşiğin Adı	EÜ	EÜK	EÜKM	EÜÇS	EÜÇM	Numunelerdeki fenolik çeşidinin Toplam Miktarı
Gallik asit	0,00012	0,0002	0,002	0,0545	0,191	<b>0,2477</b>
Epigallo kateşin (EGC)	0,0056	0,001	0,057	0,0523	0,3075	<b>0,4232</b>
Kateşin (C)	0,00325	0,006	0,002	0,173	1,170	<b>1,3544</b>
Kafein	-	0,0004	0,004	0,0008	0,0021	<b>0,00743</b>
Epigallo kateşin gallat (EGCG)	0,0058	0,0008	0,005	0,003	0,0128	<b>0,0271</b>
Epikateşin (EC)	0,0019	0,0006	0,001	0,002	-	<b>0,00523</b>
Epikateşin galat (ECG)	0,00005	0,00003	0,0014	0,00006	0,0021	<b>0,00365</b>
<b>Her Bir Kısımdaki Toplam Fenolik Madde Miktarı</b>	<b>0,0167</b>	<b>0,0089</b>	<b>0,07235</b>	<b>0,285</b>	<b>1,6856</b>	

### 3.3. Erzincan Üzümünün Farklı Dokularından Elde edilen Ekstraktlarda Antioksidan Aktivite Tayinleri

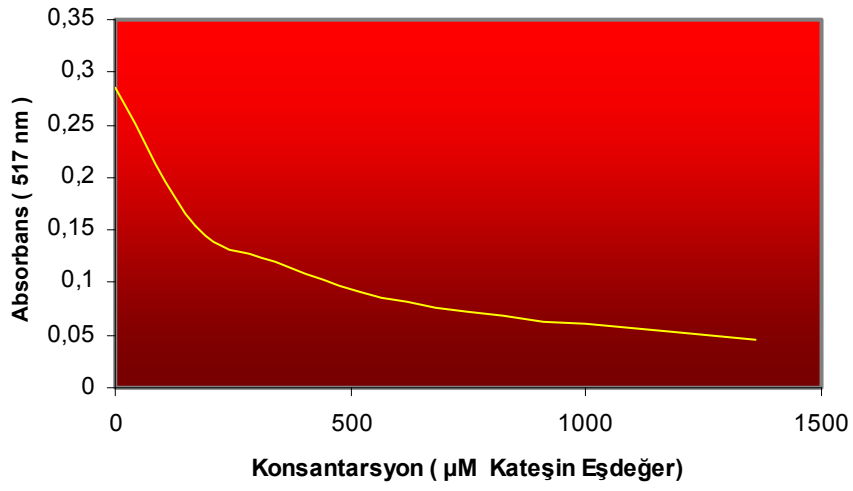
#### 3.3.1. Çalışma Gruplarının DPPH Radikali Temizleme Aktivitesi

Meyve suyunda, sulu ve metanollü ekstraktlarda DPPH radikali temizleme yöntemiyle belirlenen numune antioksidan kapasiteleri Şekil 22-27’da gösterilmiştir. Antioksidan aktivite, numunelerin  $IC_{50}$  değerleri belirlenerek karşılaştırılmıştır (Tablo 11). Ayrıca kateşine ve numunelere ait  $IC_{50}$  değerleri Şekil 28 ‘da gösterilmiştir. Buna göre kateşinle karşılaştırdığında en düşük  $IC_{50}$  değerleri metanollü ekstraktlarda olduğu, meyve suyunun ve kabuğunun sulu ekstraktlarının birbirine yakın olduğu gözlemlenmiştir. Genel olarak ise DPPH radikali temizleme aktivitesinin bir göstergesi olan  $IC_{50}$  değerlerinin standart ve numunelerin birbirleriyle karşılaştırılması küçükten büyüğe doğru şu şekildedir:

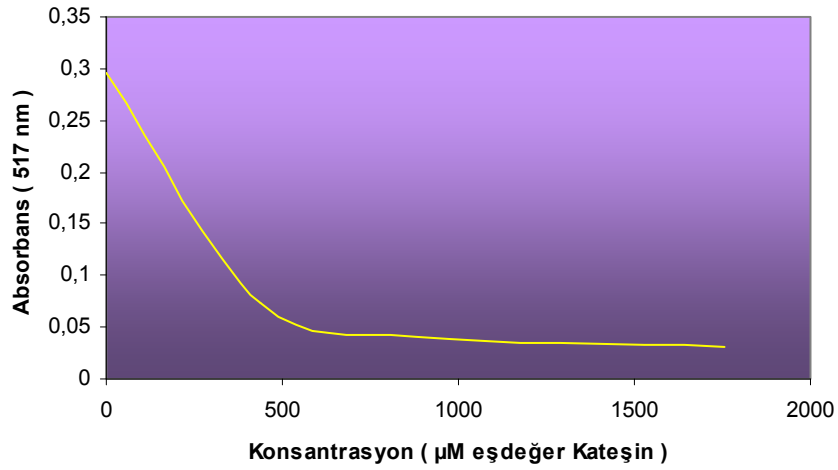
$IC_{50}$  değerleri: Standart( Kateşin) < EÜKM < EÜÇM < EÜK < EÜ < EÜÇS



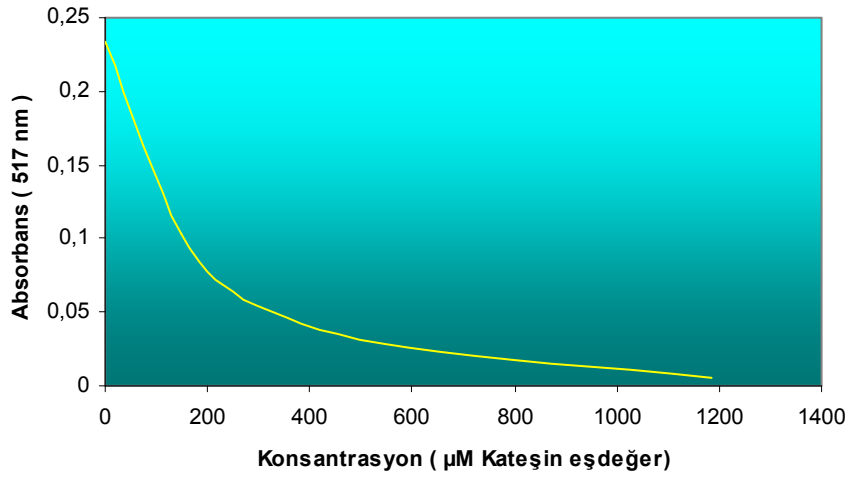
Şekil 22. Standart olarak kullanılan kateşinin DPPH radikali temizleme aktivitesi ( $IC_{50} = 43 \mu M$ )

**EÜ- DPPH Temizleme Aktivitesi**

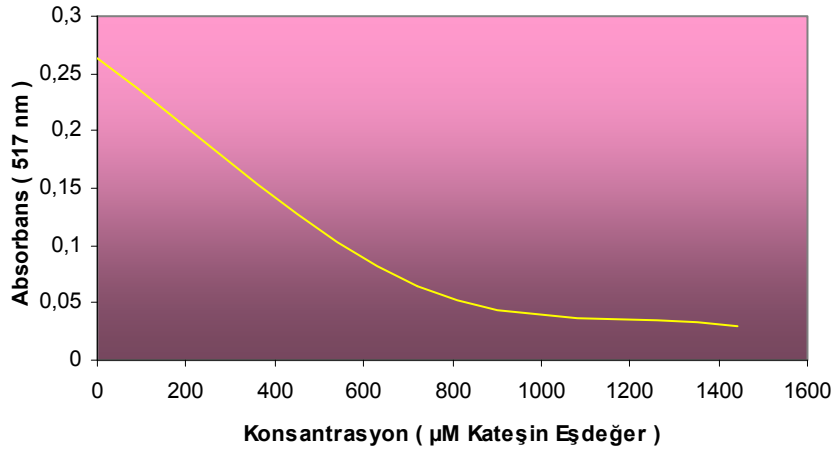
Şekil 23. Erzincan üzümünün meyve suyunun DPPH radikali temizleme aktivitesi ( $IC_{50} = 230 \mu M$ )

**EÜK-DPPH Temizleme Aktivitesi**

Şekil 24. Erzincan üzümünün kabuğunun sulu ekstraktının DPPH radikali temizleme aktivitesi ( $IC_{50} = 225 \mu M$ )

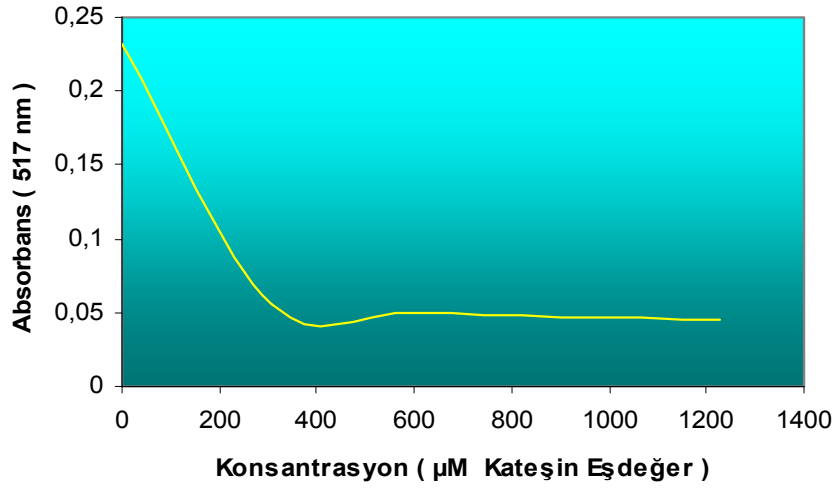
**EÜKM-DPPH Temizleme Aktivitesi**

Şekil 25. Erzincan üzümünün kabuğunun metanollü ekstraktının DPPH radikali temizleme aktivitesi (IC<sub>50</sub> = 127 µM )

**EÜÇŞ-DPPH Temizleme Aktivitesi**

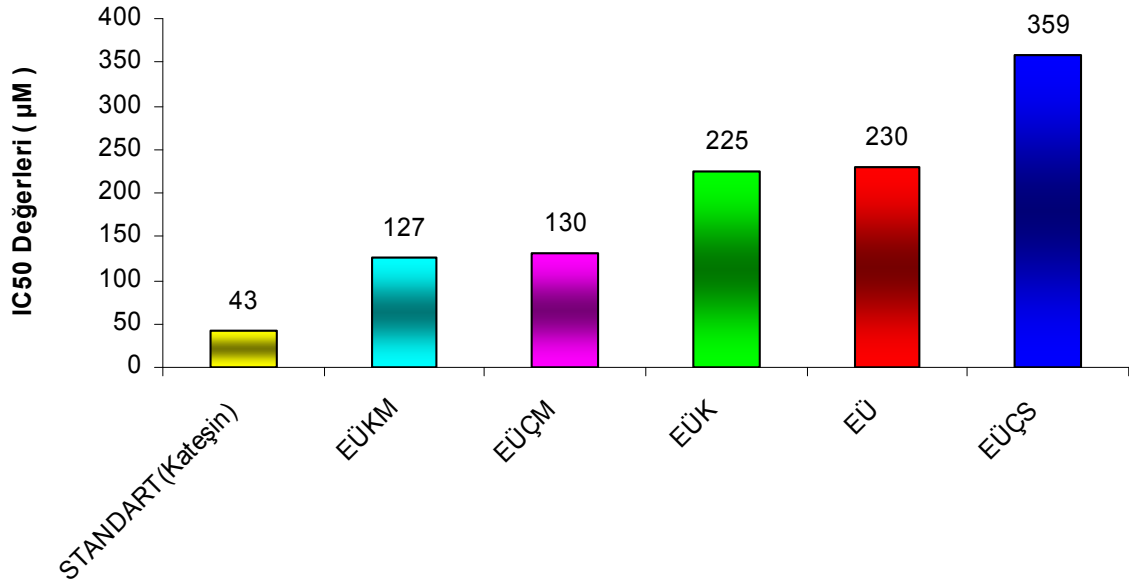
Şekil 26. Erzincan üzümünün çekirdeğinin sulu ekstraktının DPPH radikali temizleme aktivitesi (IC<sub>50</sub> = 359 µM )

### EÜÇM- DPPH Temizleme Aktivitesi



Şekil 27. Erzincan üzümünün çekirdeğinin metanollü ekstraktı DPPH radikali temizleme aktivitesi ( $IC_{50} = 130 \mu M$ )

### Kateşin ve Erzincan Üzümü Ekstraktlarının DPPH Temizleme Aktivitesi



Şekil 28. Kateşin standartı ile Erzincan üzümü meyve suyu, kabuk ve çekirdeğinin sulu ve metanollü ekstraktlarının 517 nm'deki DPPH radikali temizleme aktivitesi tayinleri sonucu elde edilen  $IC_{50}$  değerleri ( $\mu M$ )

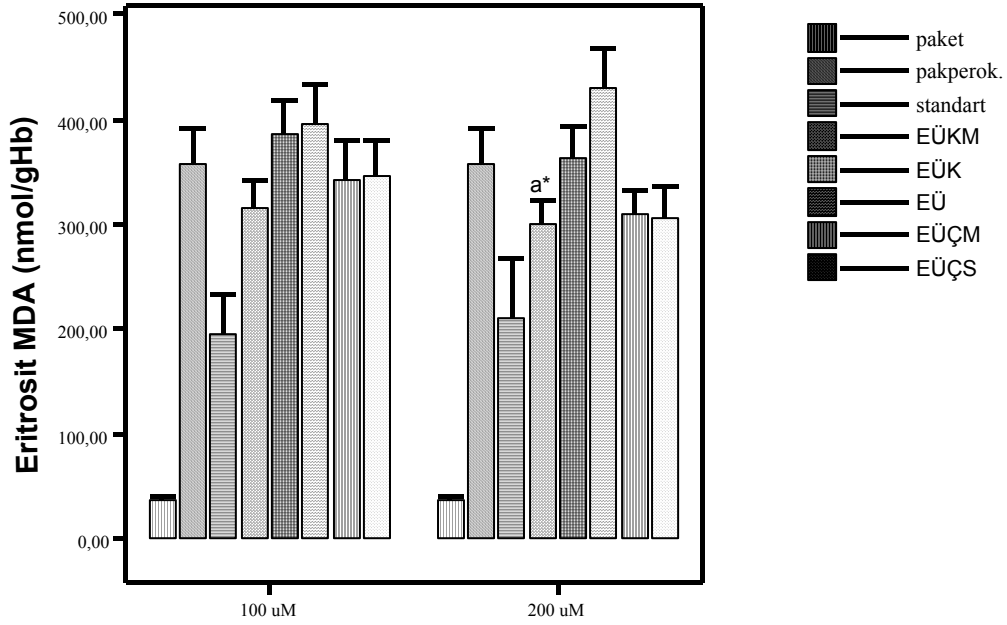
Tablo 11. Kateşin standartı ile Erzincan üzümü meyve suyu, kabuk ve çekirdeğinin sulu ve metanollü ekstraktlarının 517 nm'deki DPPH radikali temizleme aktivitesi tayinleri sonucu elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri (µM)

Numune	IC <sub>50</sub> değerleri (µM eşdeğer kateşin)
<b>Kateşin</b>	43
<b>EÜ</b>	230
<b>EÜK</b>	225
<b>EÜKM</b>	127
<b>EÜÇS</b>	359
<b>EÜÇM</b>	130

### 3.3.2. Eritrosit MDA Düzeyleri

Eritrosit süspansiyonunun ve Erzincan üzümünün farklı dokularından elde edilen ekstraktların bulunduğu eritrosit süspansiyonlarının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aracılı lipit peroksidasyon düzeylerinin zamana ve özüt konsantrasyonuna bağlı değişimleri eritrosit nmol MDA/ g Hb cinsinden Tablo 12' de gösterilmiştir. Gruplar arasındaki MDA düzeyleri arasındaki farklılık derecesi şu şekilde ifade edildi ; \*: p<0,05, \*\*: p<0,01, \*\*\*: p<0,001.

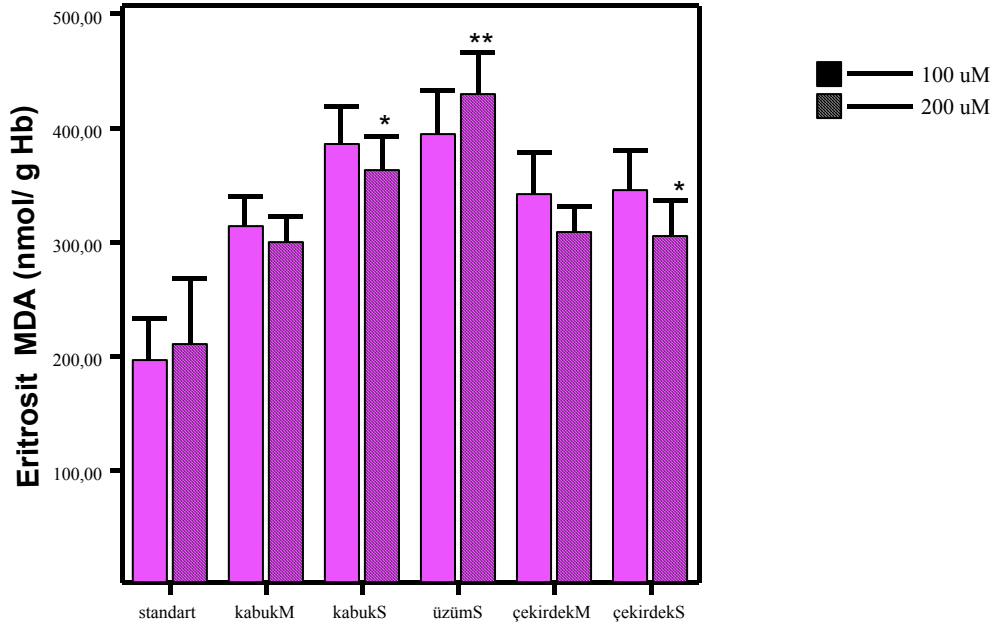




Şekil 29. 15. dakikada, Erzincan üzümünün farklı dokulardan elde edilen ekstraktlarının ve standart kateşinin eritrositlerde lipit peroksidasyonun bir göstergesi olan MDA oluşumuna etkisinin karşılaştırılmasını gösteren grafik (a: Aynı zaman diliminde paket peroksit grubuna göre anlamlı değişim gösterir, b: Aynı zaman diliminde kabuğun sulu ekstraktı grubuna göre anlamlı değişim gösterir, \*:p<0,05, \*\*: p<0,01, \*\*\*: p<0,001)

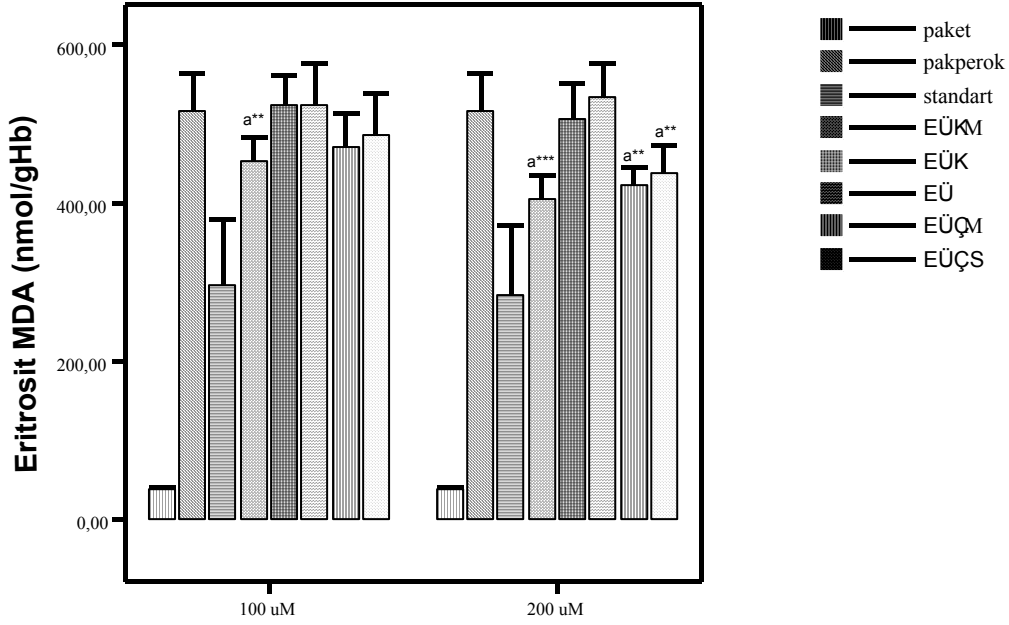
15. dakikada, Erzincan üzümünün farklı dokulardan elde edilen ekstraktlarının ve standartın eritrositlerde lipit peroksidasyonun bir göstergesi olan MDA oluşumuna etkisinin karşılaştırılması Şekil 29’de verilmiştir. Yapılan istatistik analize göre standart kateşinin her iki konsantrasyonunun diğer bütün çalışma gruplarıyla arasında anlamlı bir fark vardır (p<0,001). Ayrıca düşük EÜKM ile düşük EÜÇS (p<0,001) , düşük EÜ ile düşük EÜÇM (p<0,05) ve düşük EÜKM (p<0,001) arasında istatistik açıdan anlamlı bir fark vardır. Yüksek konsantrasyonlularda ise peroksitli paket ile EÜKM (p<0,05), EÜK ile EÜKM (p<0,001), EÜ ile EÜK (p<0,001), EÜ ile EÜÇM (p< 0,001) ve EÜ ile EÜÇS (p< 0,01) arasında anlamlı bir fark olduğu görülmektedir.





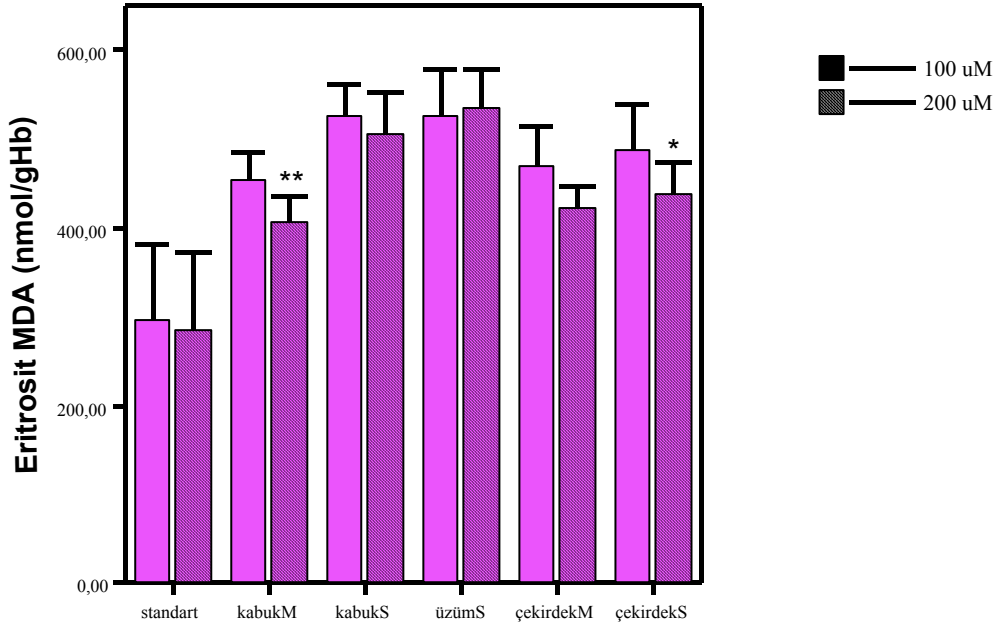
Şekil 30. 15. dakikada, Erzincan üzümünün farklı dokularından elde edilen ekstraktlarının ve kateşinin farklı konsantrasyonlarının eritrositlerde lipit peroksidasyonun sonucunda MDA oluşturma düzeylerinin karşılaştırılmasını gösteren grafik (\*:p<0,05, \*\*: p<0,01,\*\*\*: p<0,001)

15. dakikada, Erzincan üzümünün farklı dokularından elde edilen ekstraktların ve kateşinin farklı konsantrasyonlarının eritrositlerde lipit peroksidasyonu sonucu oluşan MDA düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 30 'de verilmiştir. Yapılan istatistik analize göre Erzincan üzümünün kabuğunun sulu ekstraktının (p<0,05), meyve suyunun (p<0,01) ve çekirdeğinin sulu ekstraktının (p<0,05) farklı konsantrasyonlarının arasında anlamlı derecede fark vardır.



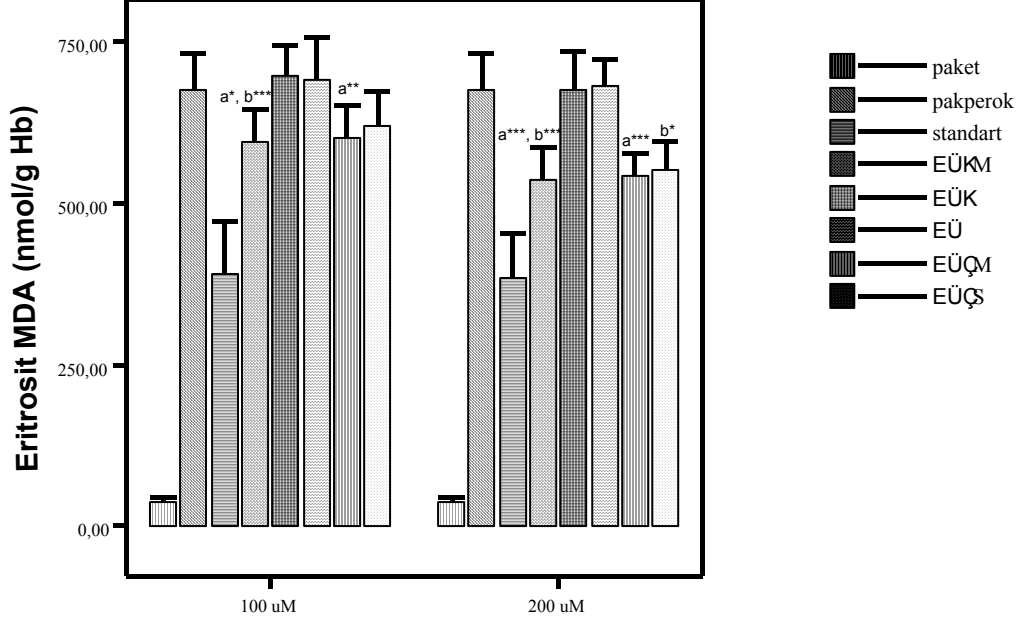
Şekil 31. 30. dakikada, Erzincan üzümünün farklı dokulardan elde edilen ekstraktlarının ve standart kateşinin eritrositlerde lipit peroksidasyonun bir göstergesi olan MDA oluşumuna etkisinin karşılaştırılmasını gösteren grafik (a: Aynı zaman diliminde paket peroksit grubuna göre anlamlı değişimi gösterir, b: Aynı zaman diliminde kabuğun sulu ekstraktı grubuna göre anlamlı değişim gösterir, \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ )

30. dakikada, Erzincan üzümünün farklı dokulardan elde edilen ekstraktlarının ve standartın lipit peroksidasyonu sonucunda oluşan MDA düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 31’de gösterilmiştir. Yapılan istatistik analize göre standart kateşinin hem düşük hem de yüksek konsantrasyonunun diğer bütün çalışma gruplarıyla arasında anlamlı bir fark vardır ( $p < 0,001$ ). Düşük konsantrasyonlu özütlerde; peroksitli paket ile EÜKM ( $p < 0,01$ ), peroksitli paket ile EÜÇM ( $p < 0,01$ ), EÜ ile EÜKM ( $p < 0,01$ ), EÜK ile EÜKM ( $p < 0,001$ ), EÜÇM ile EÜK ( $p < 0,05$ ) arasında anlamlı bir fark vardır. Yüksek konsantrasyonlu özütlerde ise peroksitli paket ile EÜKM ( $p < 0,001$ ), peroksitli paket ile EÜÇS ( $p < 0,01$ ), peroksitli paket ile EÜÇM ( $p < 0,01$ ), EÜK ile EÜKM ( $p < 0,001$ ), EÜ ile EÜK ( $p < 0,001$ ) ve EÜ ile EÜÇM ( $p < 0,001$ ) arasında anlamlı bir fark vardır.



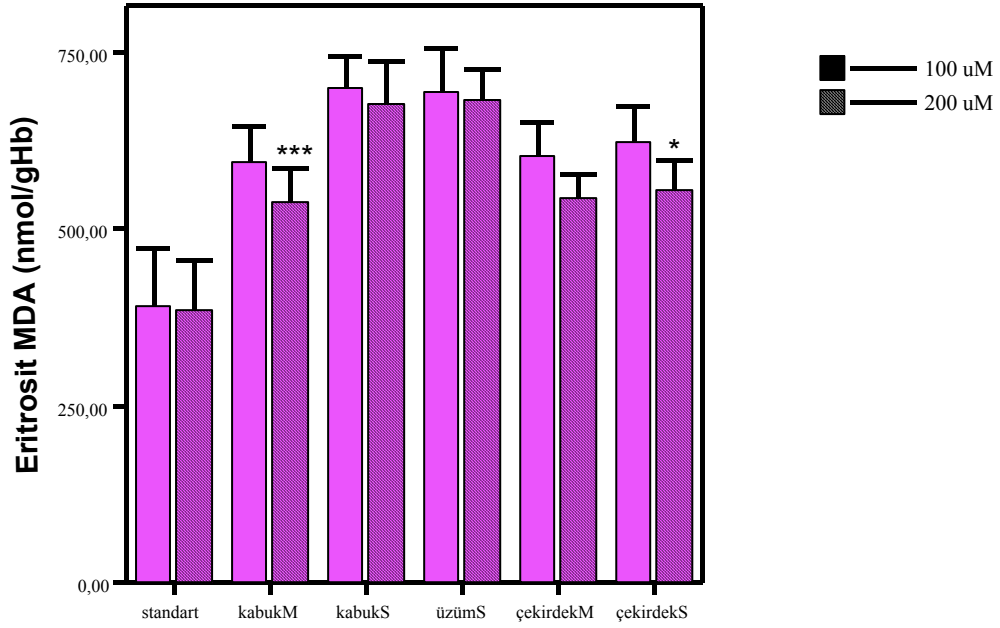
Şekil 32. 30. dakikada, Erzincan üzümünün farklı dokularından elde edilen ekstraktlarının ve kateşinin farklı konsantrasyonlarının eritrositlerde lipid peroksidasyonun sonucunda MDA oluşturma düzeylerinin karşılaştırılmasını gösteren grafik (\*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ )

30. dakikada, Erzincan üzümünün farklı dokularından elde edilen ekstraktlarının ve kateşinin farklı konsantrasyonlarının lipid peroksidasyonu sonucu oluşan MDA oluşturma düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 32' de verilmiştir. Yapılan istatistik analize göre EÜKM' nin ( $p < 0,01$ ) ve EÜÇS 'nin ( $p < 0,05$ ) farklı konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark vardır.



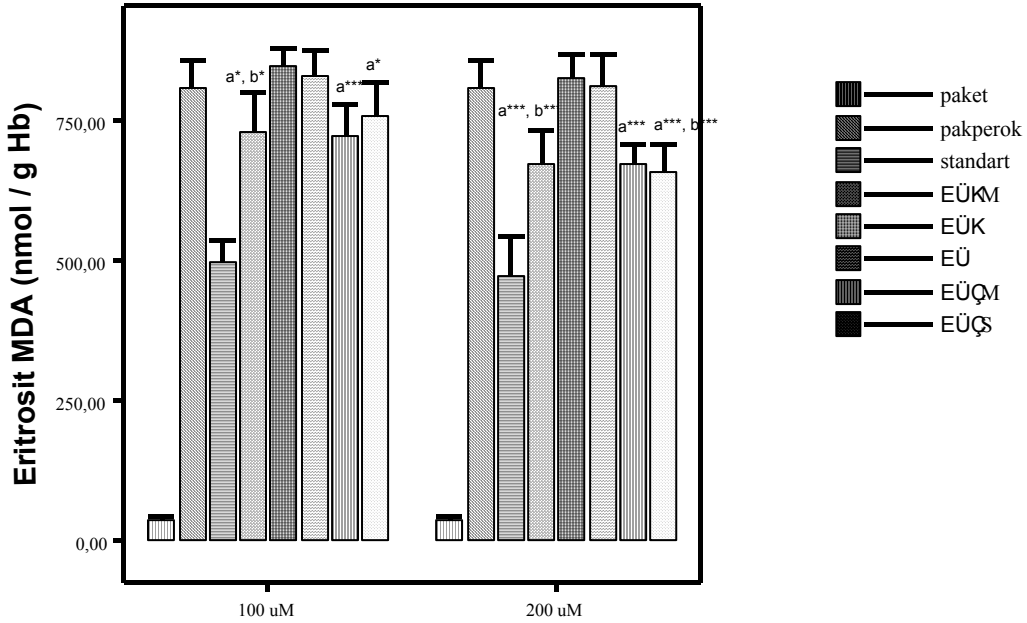
Şekil 33. 45. dakikada, Erzincan üzümünün farklı dokulardan elde edilen ekstraktlarının ve standart kateşinin eritrositlerde lipit peroksidasyonun bir göstergesi olan MDA oluşumuna etkisinin karşılaştırılmasını gösteren grafik (a: Aynı zaman diliminde paket peroksit grubuna göre anlamlı değişim gösterir, b: Aynı zaman diliminde kabuğun sulu ekstraktı grubuna göre anlamlı değişim gösterir, \*:p<0,05, \*\*:p<0,01, \*\*\*: p<0,001)

45. dakikada, Erzincan üzümünün farklı dokulardan elde edilen ekstraktlarının ve standartın eritrositlerde lipit peroksidasyonun bir göstergesi olan MDA oluşumuna olan etkisinin karşılaştırılması Şekil 33’de verilmiştir. Yapılan istatistik analize göre standart kateşinin hem düşük hem de 200 yüksek konsantrasyonunun diğer bütün çalışma gruplarıyla arasında anlamlı bir fark vardır (p<0,001). Düşük konsantrasyonlu özütlerde; peroksitli paket ile EÜKM (p<0,05), peroksitli paket ile EÜÇM (p<0,01), EÜK ile EÜKM (p<0,001) ve EÜ ile EÜKM (p<0,01) arasında anlamlı bir fark vardır. Yüksek konsantrasyonlu özütlerde ise peroksitli paket ile EÜKM(p<0,001), peroksitli paket ile EÜÇM (p<0,001), peroksitli paket ile EÜÇS (p<0,001), EÜK ile EÜKM (p<0,001), EÜK ile EÜÇS (p<0,05), EÜ ile EÜKM (p<0,001) ve EÜ ile EÜÇM (p<0,001) arasında anlamlı bir fark vardır.



Şekil 34. 45. dakikada, Erzincan üzümünün farklı dokularından elde edilen ekstraktlarının ve kateşinin farklı konsantrasyonlarının eritrositlerde lipid peroksidasyonun sonucunda MDA oluşturma düzeylerinin karşılaştırılmasını gösteren grafik (\*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\* :  $p < 0,001$ )

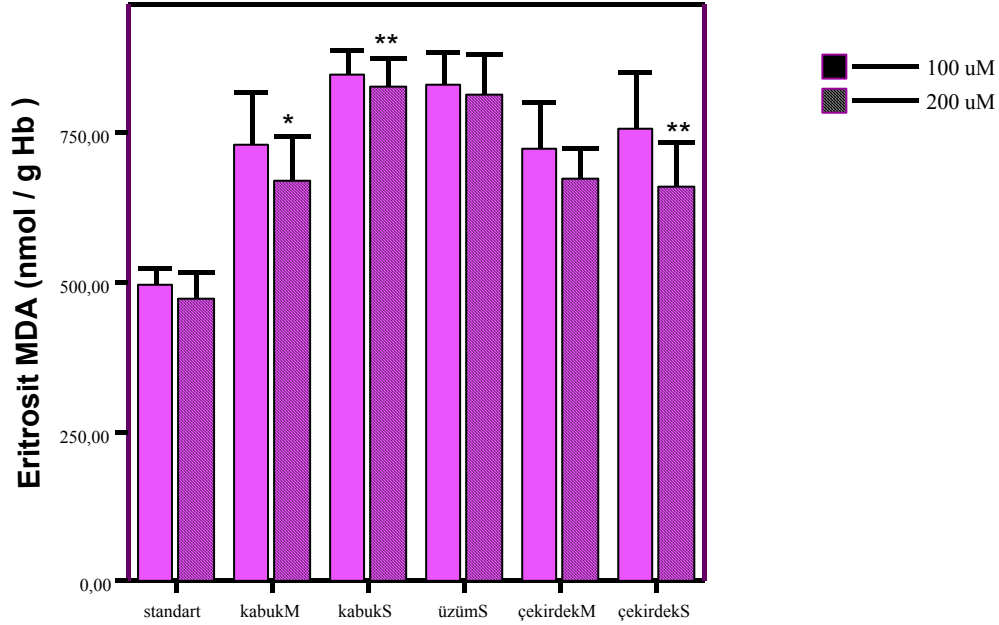
45. dakikada, Erzincan üzümünün farklı dokularından elde edilen ekstraktlarının ve kateşinin farklı konsantrasyonlarının eritrositlerde lipid peroksidasyonun bir sonucu olan MDA düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 34' de verilmiştir. Yapılan istatistik analize göre EÜKM' nin ( $p < 0,001$ ) ve EÜÇS 'nin ( $p < 0,05$ ) farklı konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark vardır.



Şekil 35. 60. dakikada, Erzincan üzümünün farklı dokulardan elde edilen ekstraktlarının ve standart kateşinin eritrositlerde lipit peroksidasyonun bir göstergesi olan MDA oluşumuna etkisinin karşılaştırılmasını gösteren grafik (a: Aynı zaman diliminde paket peroksit grubuna göre anlamlı değişim gösterir, b: Aynı zaman diliminde kabuğun sulu ekstraktı grubuna göre anlamlı değişim gösterir, \*:p<0,05, \*\*:p<0,01, \*\*\*:p<0,001)

60. dakikada, Erzincan üzümünün farklı dokulardan elde edilen ekstraktlarının ve standartın eritrositlerde lipit peroksidasyonun göstergesi olan MDA oluşturma düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 35’de verilmiştir. Yapılan istatistik analize göre standart kateşinin hem düşük hem de yüksek konsantrasyonunun diğer bütün çalışma gruplarıyla arasında anlamlı bir fark vardır (p<0,001). Düşük konsantrasyonlu özütlerde; peroksitli paket ile EÜKM (p<0,05), peroksitli paket ile EÜÇM (p<0,001), peroksitli paket ile EÜÇS (p<0,05), EÜK ile EÜKM (p<0,001) ve EÜ ile EÜKM (p<0,001), EÜK ile EÜÇS (p<0,001) ve EÜK ve EÜÇM (p<0,001) arasında anlamlı bir fark vardır. Yüksek konsantrasyonlu özütlerde ise peroksitli paket ile EÜKM (p<0,001), peroksitli paket ile EÜÇM (p<0,001), peroksitli paket ile EÜÇS (p<0,001), EÜK ile EÜKM (p<0,001), EÜK

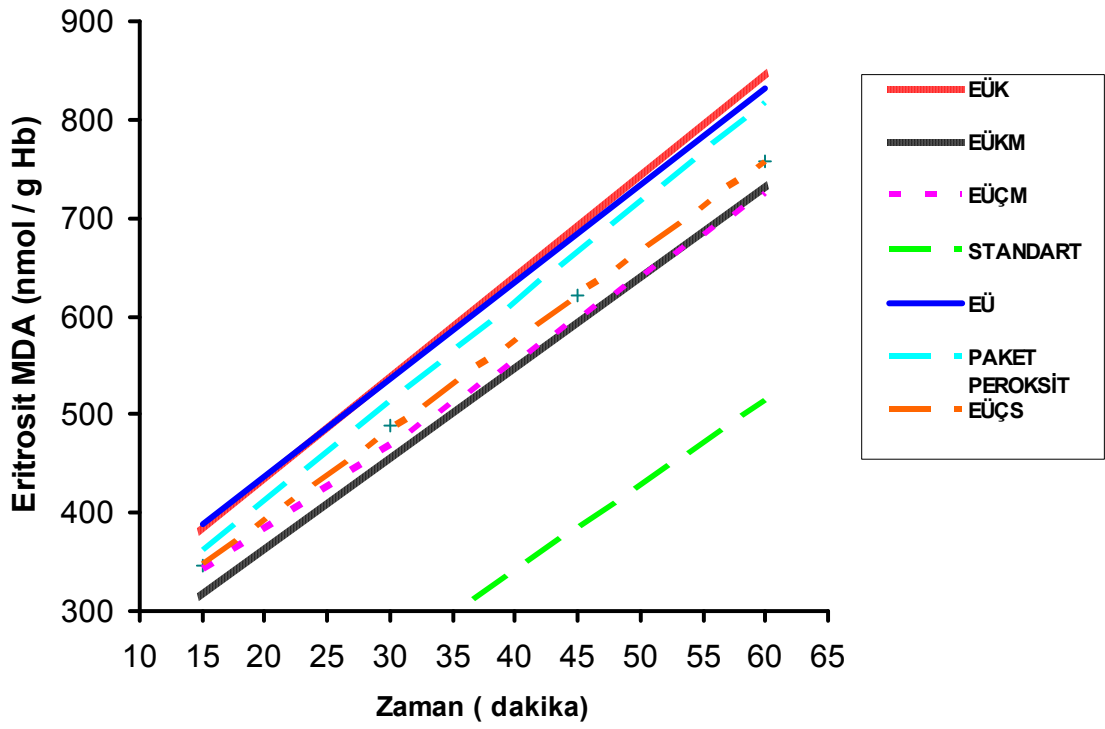
ile EÜÇS ( $p<0,001$ ), EÜ ile EÜÇS ( $p<0,001$ ), EÜ ile EÜÇM ( $p<0,001$ ) ve EÜ ile EÜKM ( $p<0,001$ ) arasında anlamlı bir fark vardır



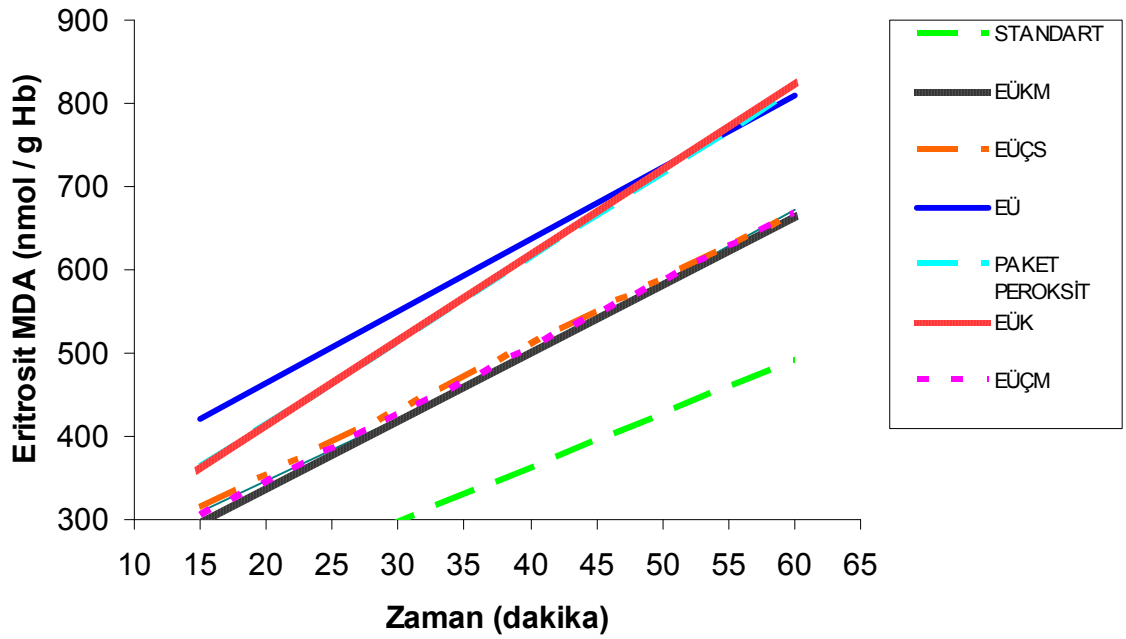
Şekil 36. 60. dakikada, Erzincan üzümünün farklı dokularından elde edilen ekstraktlarının ve kateşinin farklı konsantrasyonlarının eritrositlerde lipid peroksidasyonun sonucunda MDA oluşturma düzeylerinin karşılaştırılmasını gösteren grafik (\*:  $p<0,05$ , \*\*:  $p<0,01$ , \*\*\* :  $p<0,001$ )

60. dakikada, Erzincan üzümünün farklı dokularından elde edilen ekstraktlarının ve kateşinin farklı konsantrasyonlarının eritrositlerde lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan MDA düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 36' de verilmiştir. Yapılan istatistik analize göre EÜKM' nin ( $p<0,05$ ) EÜÇS 'nin ( $p<0,01$ ) ve EÜK' nin ( $p<0,01$ ) farklı konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark vardır.

Ayrıca özet olarak bütün çalışma gruplarına ait eritrosit MDA düzeylerinin hem düşük hem de yüksek ekstrakt varlığında zaman göre değişimi Şekil 37-38' de gösterilmiştir. Bu grafiklere göre en düşük eğim metanollü ekstraktlarda olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 37. Paket peroksit ve 100  $\mu$ M standart ve ekstrakt içeren bütün çalışma gruplarında MDA düzeylerinin zamanla değişimini gösteren grafik



Şekil 38. Paket peroksit ve 200  $\mu$ M standart ve ekstrakt içeren bütün çalışma gruplarında MDA düzeylerinin zamanla değişimini gösteren grafik



Tablo 13. Bütün çalışma gruplarının lipit peroksidasyon sonucu oluşan MDA düzeylerinin zamanla % değişimi

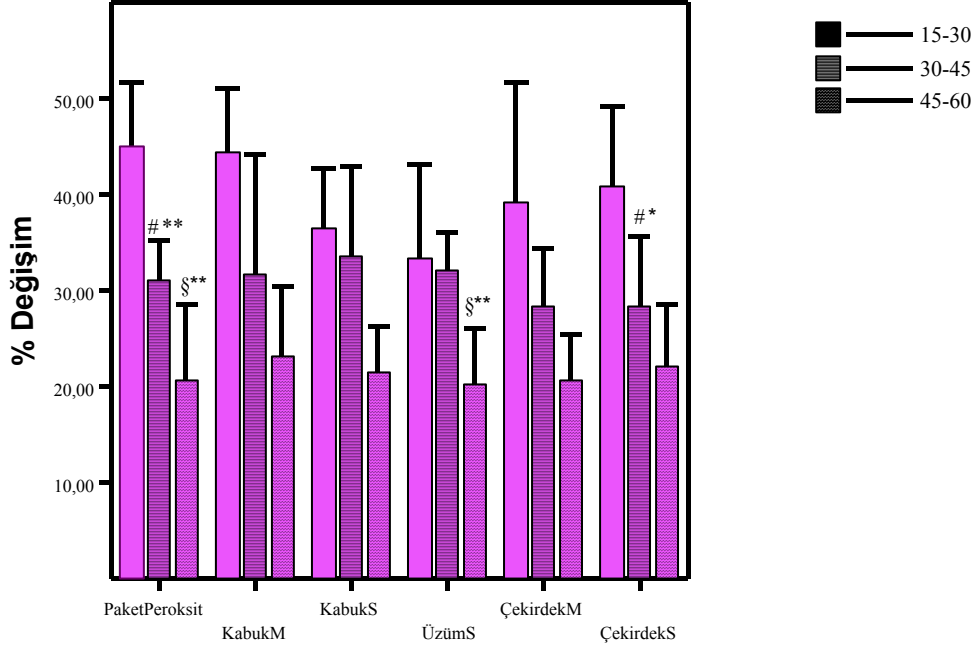
Konsantrasyon	Çalışma Grupları	1. çeyrek(15-30 dak.)	2. çeyrek (30-45 dak.)	3. çeyrek (45-60 dak.)
		Paket peroksit	45 ± 9,8 <sup>b*</sup>	31 ± 6,2 <sup>#*</sup>
100 µM Ekstrakt	EÜKM	44,4 ± 7,8	31,6 ± 15,1 <sup>#*</sup>	23,2 ± 8,5
	EÜK	36,6 ± 7,4 <sup>a*, b*</sup>	33,5 ± 11,2	21,4 ± 5,8
	EÜ	33,4 ± 4 <sup>a*, b***, c*</sup>	32,2 ± 4,7	20,3 ± 6,9 <sup>§***</sup>
	EÜÇM	39,1 ± 17,6	28,3 ± 8,3	20,7 ± 6,1
200 µM Ekstrakt	EÜÇS	40,9 ± 12,3	28,4 ± 10,8 <sup>#*</sup>	22,1 ± 9,5
	EÜKM	35 ± 7,5 <sup>d*</sup>	32,6 ± 10,2	25,1 ± 5,9
	EÜK	39,2 ± 6,1 <sup>d**</sup>	34,5 ± 15,4	22,9 ± 7,4
	EÜ	24,8 ± 6,8 <sup>a**</sup>	27,7 ± 6,2	14,4 ± 5 <sup>§**</sup>
200 µM Ekstrakt	EÜÇM	36,8 ± 4,9 <sup>a**, d**</sup>	28,5 ± 6,5 <sup>#**</sup>	24,3 ± 7,2
	EÜÇS	41,9 ± 13,8	28,1 ± 6,2 <sup>#**</sup>	19,3 ± 10,1

a: paket peroksit ile karşılaştırma, b: EÜKM ile karşılaştırma, c: EÜÇS ile karşılaştırma, d: EÜ ile karşılaştırma

\* : p<0,05, \*\* : p<0,01, \*\*\* : p<0,001

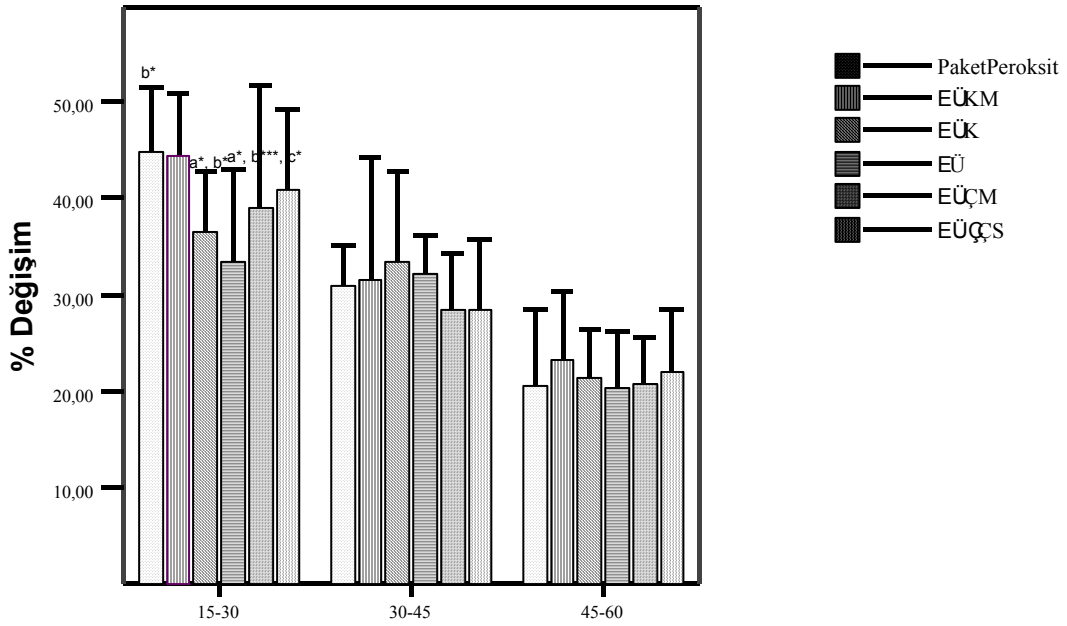
#: 1. çeyrekte gözlenen % değişim arasındaki anlamlı farklılık, §: 2. çeyrekte gözlenen % değişim arasındaki anlamlı farklılık

Çalışma gruplarında zamana bağlı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uyarılı lipit peroksit hızının değerlendirilmesi amacı ile % değişimler hesaplandı. Elde edilen değerler Tablo 13’de verilmiştir



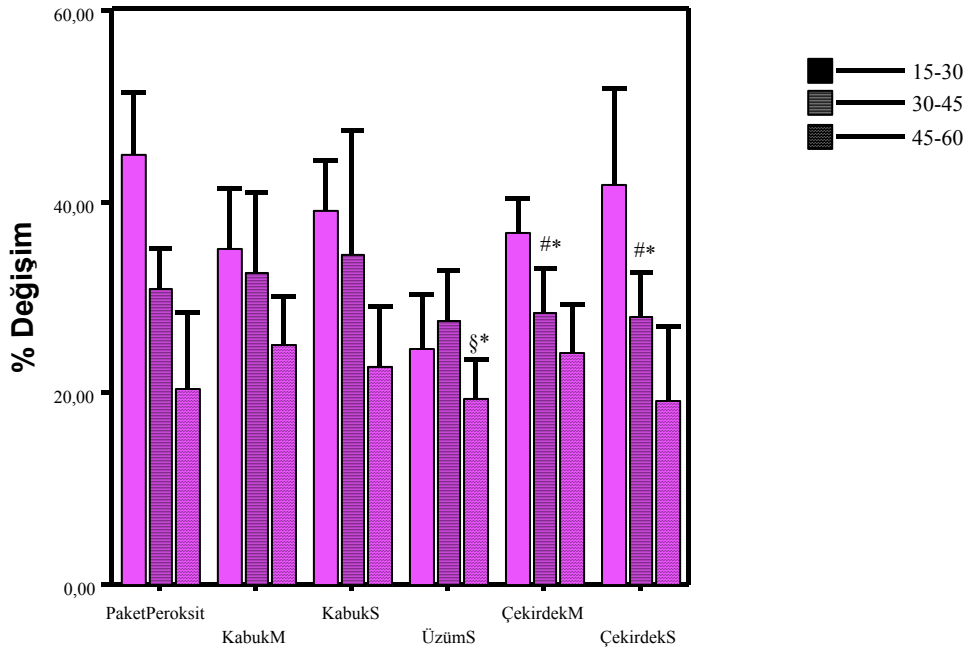
Şekil 39. Peroksitli paket ve 100µM’lik konsantrasyonlu özütli paketlerin lipit peroksidasyon düzeylerinin zamana bağlı olarak % değişimleri (\*: p<0,05, \*\*: p<0,01, \*\*\*: p<0,001, #: 1. çeyrekte gözlenen % değişim arasındaki anlamlı farklılık, §: 2. çeyrekte gözlenen % değişim arasındaki anlamlı farklılık)

Peroksitli paket ve düşük konsantrasyonlu özütli çalışma gruplarına ait lipit peroksidasyon düzeylerinin zamana bağlı olarak % değişimleri Şekil 39’de verilmiştir. Buna göre peroksitli paketin 30-45 ve 45-60 dakikalıkları (p<0,01), EÜKM’nin 15-30 dakikalıkları (p<0,05), EÜ’nün 45-60 dakikalıkları (p<0,01) ve EÜÇS’nin 30-45 dakikalıkları (p<0,05) arasında anlamlı bir farklı vardır.



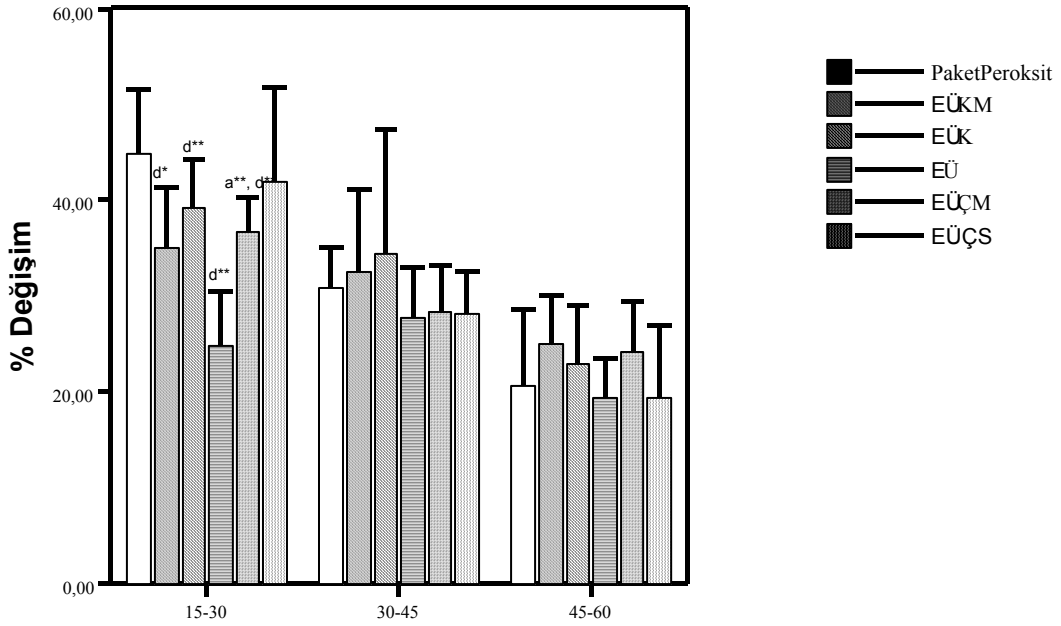
Şekil 40. Peroksitli paket ve 100 $\mu$ M'lik konsantrasyonlu özütlü çalışma gruplarına ait lipit peroksidasyon sonucu oluşan MDA düzeylerinin zamana bağlı olarak % değişimlerinin birbirleriyle karşılaştırılması(a: paket peroksit ile karşılaştırma, b: EÜKM ile karşılaştırma, c: EÜÇS ile karşılaştırma, d: EÜ ile karşılaştırma, \*: p< 0,05, \*\*: p<0,01, \*\*\*: p<0,001)

Peroksitli paket ve düşük konsantrasyonlu özütlü çalışma gruplarına ait lipit peroksidasyon sonucu oluşan MDA düzeylerinin zamana bağlı olarak % değişimlerinin birbirleriyle karşılaştırılması Şekil 40'da verilmiştir. Buna göre 15-30 dakikaları arasında EÜK ile EÜKM (p<0,05), EÜKM ile EÜ (p<0,001) ve EÜ ile EÜÇS (p<0,01) arasında anlamlı bir fark vardır. Ayrıca peroksitli paketin 15-30 dakikalarında EÜ ve EÜK (p<0,05) ile arasında anlamlı bir fark vardır.



Şekil 41. Peroksitli paket ve 200 $\mu$ M'lik konsantrasyonlu özütlü paketlerin lipit peroksidasyon sonucu oluşan MDA düzeylerinin zamana bağlı olarak % değişimleri (\*:  $p<0,05$ , \*\*:  $p<0,01$ , \*\*\*:  $p<0,001$ , #: 1. çeyrekte gözlenen % değişim arasındaki anlamlı farklılık, §: 2. çeyrekte gözlenen % değişim arasındaki anlamlı farklılık)

Peroksitli paket ve yüksek konsantrasyonlu özütlü çalışma gruplarına ait lipit peroksidasyon düzeylerinin zamana bağlı olarak % değişimleri Şekil 41'de verilmiştir. Yapılan istatistik analize göre peroksitli paketin 30-45 ve 45-60 dakikaları ( $p<0,01$ ), EÜ'nün 15-30 ve 45-60 dakikaları ( $p<0,01$ ) ve EÜÇM'nin 30-45 dakikaları ( $p<0,01$ ) arasında anlamlı bir farklı vardır.



Şekil 42. Peroksitli paket ve 100 $\mu$ M'lik konsantasyonlu özütü paketlerin lipid peroksidasyon düzeylerinin zamana bağlı olarak % değişimlerinin birbirleriyle karşılaştırılması (a: paket peroksit ile karşılaştırma, b: EÜKM ile karşılaştırma, c: EÜÇS ile karşılaştırma, d: EÜ ile karşılaştırma, \*:  $p<0,05$ , \*\*:  $p<0,01$ , \*\*\*:  $p<0,001$ )

Peroksitli paket ve yüksek konsantrasyonlu özütü çalışma gruplarına ait lipid peroksidasyon düzeylerinin zamana bağlı olarak % değişimlerinin birbirleriyle karşılaştırılmasını gösteren grafik Şekil 42'de verilmiştir. Yapılan istatistik analize göre 15-30 dakikaları arasında EÜK ile EÜKM ( $p<0,05$ ), EÜKM ile EÜ ( $p<0,001$ ) ve EÜ ile EÜÇS ( $p<0,01$ ) arasında anlamlı bir fark vardır. Ayrıca peroksitli paketin 15-30 dakikalarında EÜ ( $p<0,001$ ), EÜK ( $p<0,05$ ), EÜKM ( $p<0,01$ ) ve EÜÇM ( $p<0,01$ ) ile arasında anlamlı bir fark vardır

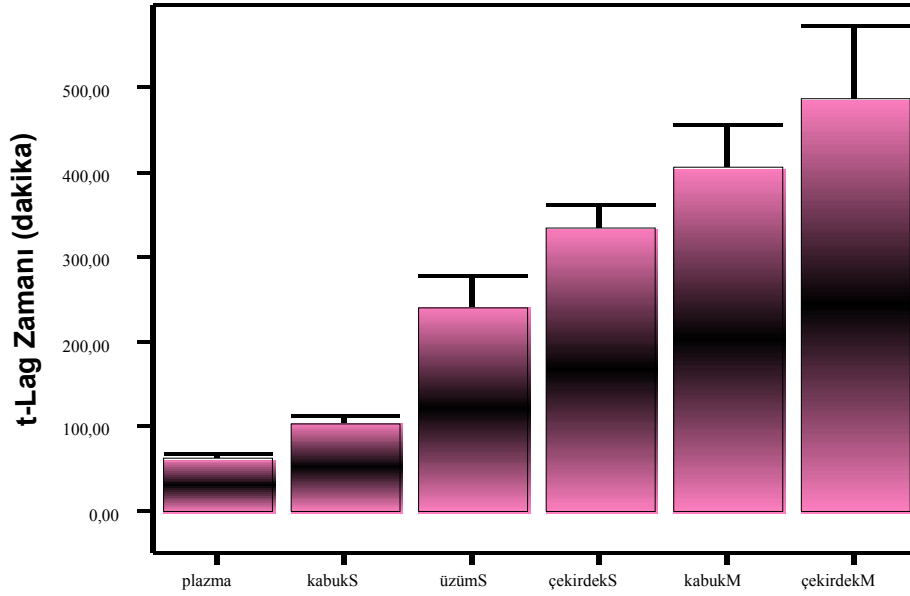
### 3.3.3. Plazma Konjugedien Oluşumu İçin Gerekli Süre (t-lag) Değerleri

Erzincan üzümüne ait farklı dokulardan elde edilen bitki ekstraktlarının plazmada konjugedien oluşumunun bir göstergesi olan t-lag zamanının ortalamaları Tablo 14'de, plazma ve bu ekstraktların bulunduğu plazmaya ait ortalama t-lag zamanlarının

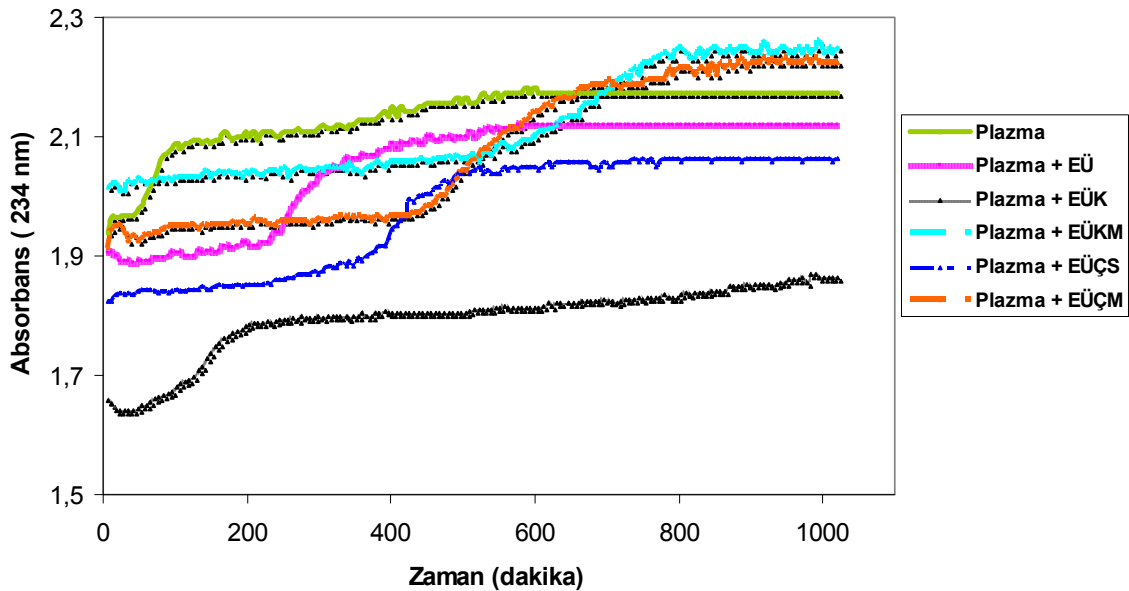
değerlendirilmesi Şekil 43’ de gösterilmiştir. Yapılan istatistik analize göre üzüm çekirdeğinin ve kabuğunun metanollü ekstraktlarının arasındaki farklılık hariç, plazma ve bütün çalışma gruplarının t-lag zamanlarının birbirlerine göre değişimleri anlamlı derecede farklıdır ( $p < 0,001$ ). Ayrıca bu konjugedien oluşumunun göstergesi olan t-lag zamanını gösteren Absorbans-zaman grafiği Şekil 44 ‘de gösterilmiştir.

Tablo 14. Erzincan üzümüne ait farklı dokulardan elde edilen bitki ekstraktlarının plazmada konjugedien oluşumu ile ilgili ortalama t-lag zamanları

<b>Numune Çeşidi</b>	<b>Ortalama t-lag (dakika) (<math>\bar{X} \pm SD</math>)</b>
Plazma + Cu <sup>2+</sup>	63 ± 9
Plazma + Cu <sup>2+</sup> + EÜ	241 ± 57
Plazma + Cu <sup>2+</sup> + EÜK	104 ± 15
Plazma + Cu <sup>2+</sup> + EÜKM	405 ± 69
Plazma + Cu <sup>2+</sup> + EÜÇS	333 ± 41
Plazma + Cu <sup>2+</sup> + EÜÇM	486 ± 122

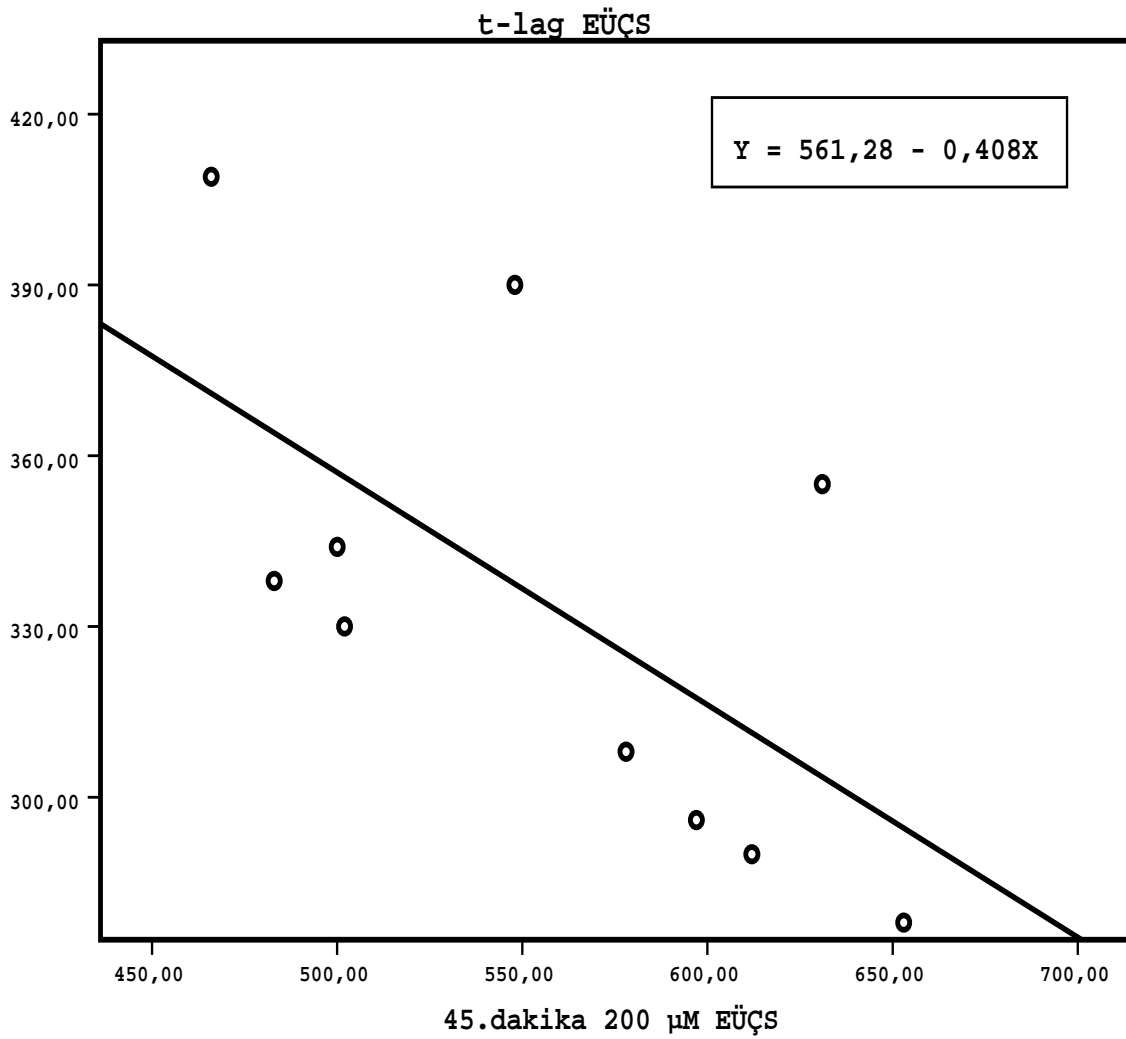


Şekil 43. Plazma ve Erzincan üzümünün farklı dokularının ekstraktlarının bulunduğu plazmalara ait ortalama t-lag zamanları



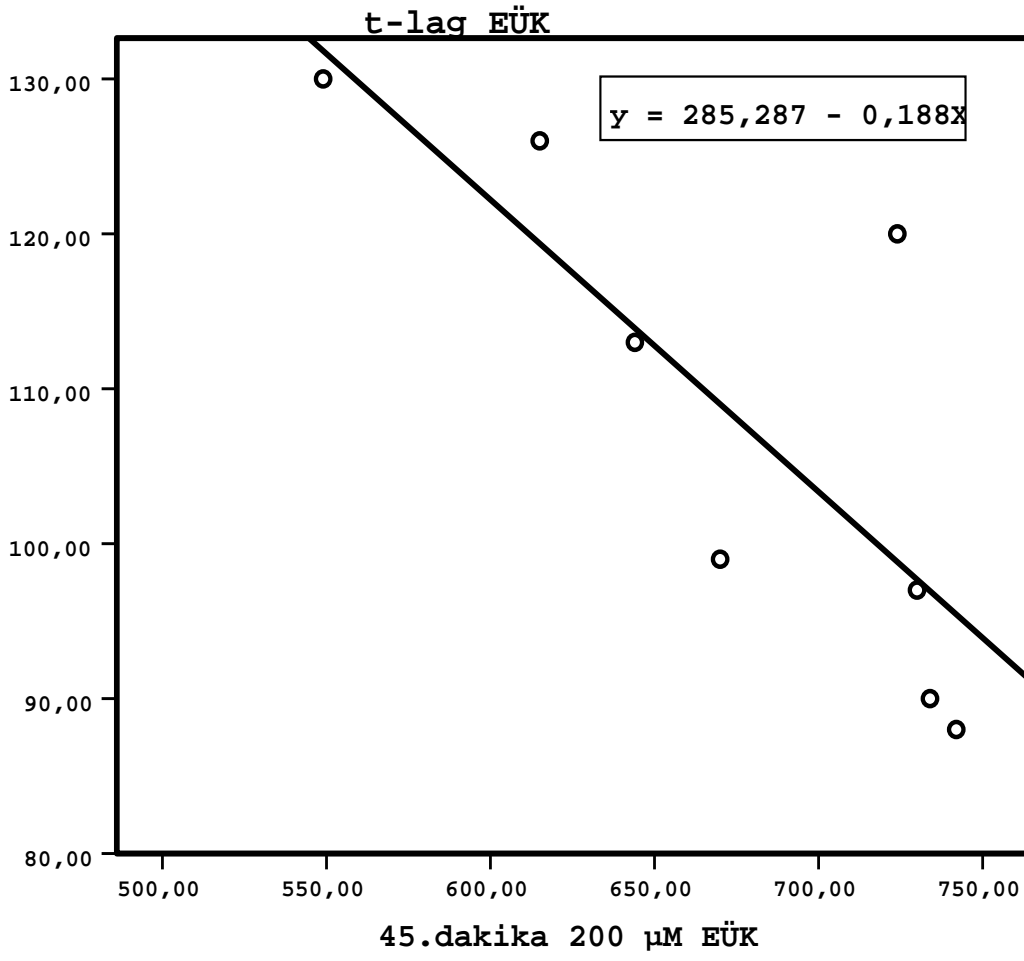
Şekil 44. Plazma ve Erzincan üzümüne ait farklı dokulardan elde edilen ekstraktların bulunduğu plazmalara ait konjugedien oluşumunun göstergesi olan t-lag zamanını gösteren absorbans(234 nm)- zaman (dakika) grafiği

Erzincan üzümünün farklı kısımlarıyla ilgili antioksidan kapasitenin değerlendirilmesi plazma ve eritrositlerde analitler (t-lag ve MDA) arasında gerçekleştirildi ve ilgili korelasyon incelendi. Yüksek özüt konsantrasyonlu eritrosit MDA değeri ile plazma t-lag zamanı arasındaki korelasyon analizi sonucunda t-lag süresinin 45. dakika EÜK ve EÜÇS MDA değerleri arasında negatif bir ilişki olduğu tespit edildi ( $r = -0,929$ ,  $p < 0,001$  ve  $r = -0,634$ ,  $p < 0,05$ ). Yine 60. dakika yüksek özüt konsantrasyonunda EÜÇS MDA değeri ile t-lag süresi arasında ters yönde bir ilişki olduğu görüldü ( $r = -0,727$ ,  $p < 0,05$ ). İlgili grafikler Şekil 45-47' da gösterilmiştir.

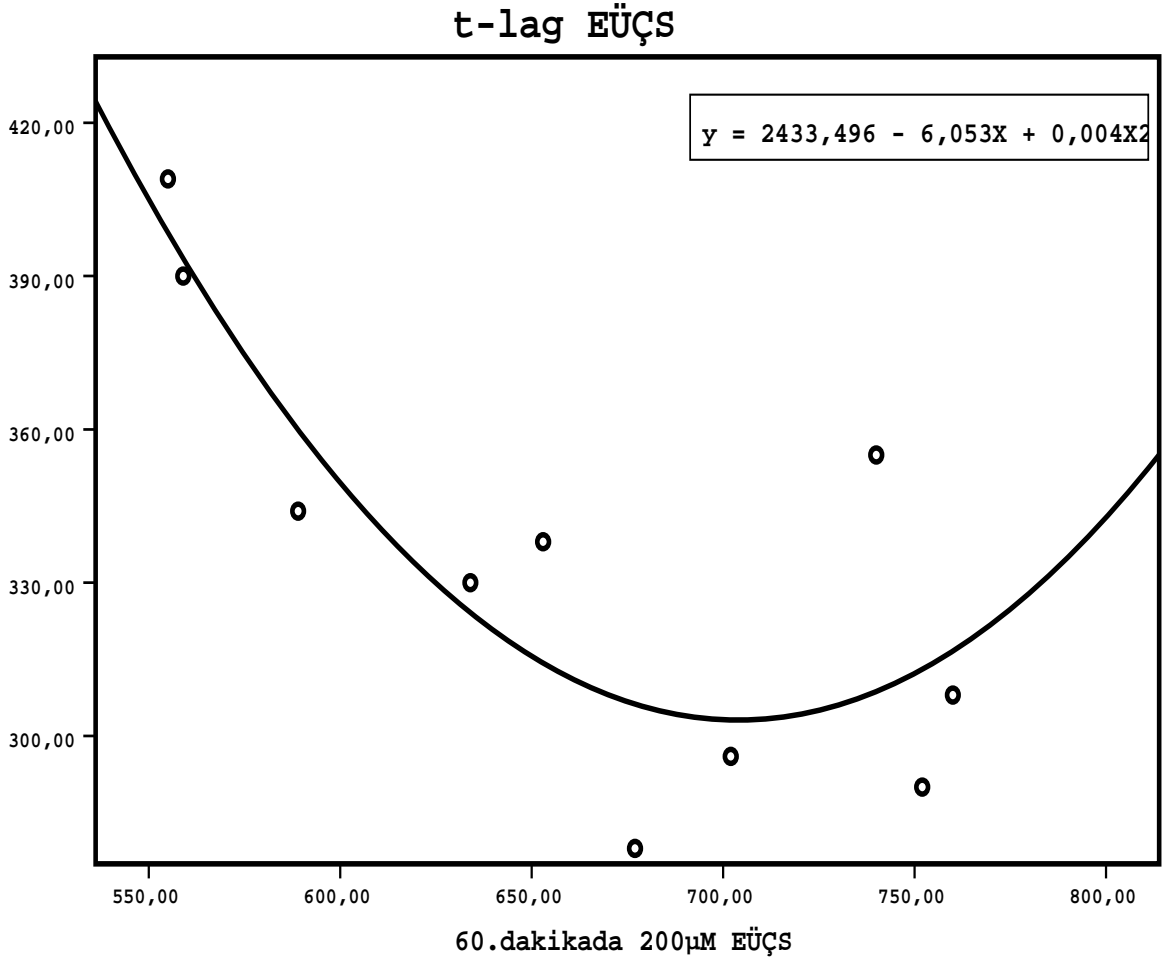


Şekil 45. t- lag EÜÇS ile 45. dakika 200µM EÜÇS içeren çalışma grubu arasındaki regresyon grafiği





Şekil 46. t- lag EÜK ile 45. dakika 200 µM EÜK içeren çalışma grubu arasındaki regresyon grafiği



Şekil 47. t- lag EÜÇS ile 60. dakika 200µM EÜÇS içeren çalışma grubu arasındaki regresyon grafiği

#### 4. TARTIŞMA

Çok eskilerden günümüze kadar doğal bitkilerin birçok hastalıkların tedavisinde kullanıldığına dair çok sayıda yayın ve doküman bulunmaktadır. Özellikle batıda folk medikal preparatlar halinde uygulama alanı bulan bitki özütlerinin kullanımı ABD 'de kimyasal sentez kaynaklı ilaç tüketimini geçmiştir. Bitkilerin tedavi yönündeki cazibesi onların önemli miktarda polifenolik yapıda flavonoidler bulundurmasından dolayıdır. Diyetle aldığımız besinlerde çok çeşitli ve oldukça bol miktarda flavonoidler vardır. Özellikle içecek olarak; ay, Şarap, bira ve kahve, yiyecek olarak tüketilen meyvelerden üzüm, kiraz, Şeftali, elma, sebzelerden ise domates, brokoli, brüksel lahanası bu besinlere örnek olarak verilebilir. Üzümün flavonoid muhtevası yaklaşık 50-450 mg/ g tane üzüm aralığındadır ve bu değer elma Şeftali, portakal greyfurt ve bunun gibi benzer meyvelerden daha yüksektir (URL-6, 2008, Rho ve Kim, 2006) . Erzincan zm; ince kabuklu, koyu renklidir. Raf ömrünün çok kısa olması ve mayalanmaması nedeniyle Şarap yapımında kullanılmaması dikkat çekici farklılıklarıdır.

Bu çalışmada öncelikle Erzincan zmnn farklı dokularına ait polifenolik bileşimi ortaya çıkartıldı. HPLC ile elde edilen sonuçlarda en yüksek değer çekirdeğin metanollü ekstraktında bulundu. Genel olarak metnolik ekstraktlarda (kabuk ve çekirdek) toplam polifenol miktarı üzümün kabuk sulu ekstraktına ve üzüm suyuna göre önemli derecede daha fazla olduğu bulunmuştur. İkinci yüksek flavonoid bileşim ise çekirdeğin sulu ekstraktında bulundu. Kateşin zm suyu ve kabuğun metanollü ekstraktı hariç diğer üzüm kısımlarında en çok bulunan flavonoid iken epigallo kateşin ve gallik asit onu takip eden diğer bileşenlerdir. En az bulunan flavonoid ise epikateşin galat olarak tespit edildi. Toplam olarak üzümün çekirdek ekstraktlarındaki fenolik bileşim kabuk ekstraktlarına göre 16 kat, üzüm suyuna göre 100 kat daha fazla olduğu (Şekil 16) , fenolik bileşiminde ise benzer kıyaslama da bu oranın yaklaşık 23 ve 98 olduğu (Tablo 10) görülmektedir. Sadece ekirdek fazlarındaki kateşin oranı üzümün kabuk fazlarına göre yaklaşık 23 kat, üzüm suyuna göre ise 100 kat daha fazla idi. Bozan ve arkadaşlarının Türkiye'de üreticiliği yapılan 11 çeşit üzümün çekirdeğinde gerçekleştirdiği araştırmada bütün üzüm çeşitlerinde en fazla flavonoid miktarı kateşin olduğu tespit etmişlerdir (Bozan vd., 2008). İtalya'da 10 çeşit üzüm çekirdeğinde gerçekleştirilen benzer bir çalışmada da birbirine aynı sonuç bulunmuştur.

Erzincan üzümünün çekirdeğiyle ilgili sonuçlarımız yukarıda bahsedilen çalışma değerleriyle uyumludur.

Organizmada özellikle mitokondriyal oksidasyon ile gerçekleşen elektron transferi süresince serbest oksijen radikalleri üretilir ve canlılar için çok değerli olan biyomoleküller (lipit, protein, DNA) bu radikallerin hedefidir (Rho ve Kim, 2006, Rodriguez vd., 2006, Lucchi vd.,2000). Organizma, radikallerin bu olumsuz etkisine karşılık endojen ve ekzojen kaynaklı savunma sistemlerine sahiptirler. Prooksidan ve antioksidan arasındaki denge sağlıklı yaşam için önemli bir stratejiyi oluşturmaktadır. Sebze ve meyvelerde bulunan polifenolik bileşiklerin sağlık üzerinde meydana getirdiği koruyucu etki onların yapısında bulunan ve serbest radikalleri yakalayıcı özelliğe sahip gruplardan ileri gelmektedir. Bu çalışmada Erzincan üzümünün farklı dokularına ait radikal temizleme etkisini belirlemek için DPPH radikali temizleme testi gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar bize, belirlenen aktivitenin en fazla metanolik ekstraktlarda bulunduğunu göstermiştir. Kabuk ve çekirdeğin metanolik özütlerindeki kateşin miktarının sulu ekstraktlara göre 6 kat daha fazla bulunması bu sonucun ortaya çıkmasına neden olduğu düşünülmektedir. Bu sonuçlarımız Iacopini ve arkadaşlarının kateşin ve epikateşin miktarı yüksek olan Kanyola üzümünün en düşük  $IC_{50}$  değerine, dolayısıyla en yüksek DPPH temizleme aktivitesine sahip olduğu bulgusuyla uyumludur ( Iacopini vd., 2008). Fakat Bozan ve arkadaşlarının en düşük kateşin bileşimine sahip papaz karası üzümünün en yüksek DPPH temizleme aktivitesine sahip olması sonucuyla çelişmektedir (Bozan vd, 2008). Yaptığımız literatür taramasında mevcut uyumsuzluklara rastlanmaktadır ve DPPH temizleme aktivitesinin oluşumunda ölçümü yapılan polifenolik bileşimlerin dışında oligomerik yapıda ve yapısında şeker bulduran flavonoidlerin de yer aldığını düşündürmektedir. Yine Yen ve arkadaşlarının Cuscuta çekirdeğinin etil asetat ekstraktında yaptığı çalışmada, Fiorani ve arkadaşlarının 3 farklı balın eter ekstraktında ve Dani' nin 8 çeşit üzüm suyunda yaptığı çalışmada da benzer sonuçlara ulaşmışlardır (Yen vd., 2007, Fiorani vd., 2006, Dani vd., 2007).

Gerek sentetik maddelerin antioksidan etkilerinin araştırılmasında gerekse bitki özütlerinin oluşturduğu serbest radikal toplayıcı potansiyellerinin değerlendirilmesinde hücre modeli olarak eritrositler seçilmektedir. Basit hücre yapısına sahip olması, yüksek yoğunlukta oksijen taşıması, zar yapısında bol miktarda ÇDYA bulundurması, özellikle hemoglobin yapısındaki demir gibi geçiş metallerine sahip olması ve hasara uğrayan bileşenlerini telafi edememesi gibi özellikler eritrositlerin sıklıkla hücre modeli

seçimindeki tercihlerin başlıca nedenleridir (Suwalsky vd., 2007, ,Kruthiga vd., 2007, Zhu vd., 2002). Çalışmamızda üzümün farklı kısımlarına ait koruyucu etkiyi değerlendirmek üzere bizde eritrositleri seçtik.

Birçok çalışma sonuçları: Bitkilerin sahip olduğu yararlı etkilerin yapısındaki polifenolik bileşimlerden kaynaklandığını göstermektedir. Biyoflavonoid bu etkilerini; şelatör olarak iş görerek, sahip olduğu hidroksil gruplarının sayısı ve yerleşimine bağlı olarak vitamin ve diğer antioksidan maddeleri yenileyerek ve zar yapısına bağlanıp radikalik saldırıları engelleyerek ortaya koymaktadır (Rodriguez vd., 2006, Fieroni vd.,2006, Kruthiga vd., 2007, Zhu vd., 2002, Konyalioglu ve Karamenderes, 2005).

Mevcut çalışmada eritrositlere oksidatif stres (OS) uyguladık. Bunun için katalaz enzimi inaktive edilmiş eritrositleri stresör ajan olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile etkileşmeye bıraktık. Literatür taramalarında OS oluşturmak için ilave edilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonun 0.2 mM ile 735 mM'lık gibi geniş bir aralığın kullanıldığını belirledik. 10 mM'lık H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonun oluşturduğu etkinin, konsantrasyonu artırmakla peroksidasyon büyüklüğünü değiştirmediğini ifade eden çalışma (Stocks ve Dormandy, 1971) bizi bu konsantrasyonu seçmemize neden oldu. Bu uygulamayla gerçekleştirilen OS'in mekanizması ise şu şekilde belirtilmektedir (Kruthiga vd., 2007, Chaudhuri vd., 2007); hemolizat halindeki eritrositlerde bulunan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sadece okside hemoglobin (methemoglobin) oluşumuna yol ağmaz aynı zamanda en zararlı radikal (OH<sup>•</sup>) üreten Haber-Weiss reaksiyonunu doğrudan, Fenton reaksiyonunu ise hemoglobindeki demirin salınmasını sağlayarak ve kendisi de reaksiyona katılarak etki etmektedir. Sonuçta oluşan bu radikaller ÇDYA'in peroksidasyon zincirleme reaksiyonlarını başlatır. Biz de bu yağ asitlerin peroksidasyonunu gösteren kararlı ve son ürün olan MDA değerlerini tayin ederek üzüme ait antioksidan kapasitesinin değerlendirmesini gerçekleştirdik.

Makale taramalarında deney ortamına uygulanan ekstrakt değerinin (kateşin, gallik asit veya kuersitin'e eşdeğer) 0.05 µM ile 400 µM arasında değiştiğini belirledik ve yapılan ön çalışma sonucunda 100 ve 200 µM'lık konsantrasyonları seçtik. Reaksiyon süresini ise ekstraktların koruyucu etkinliklerini değerlendirmek amacıyla 4 farklı zaman olarak belirledik. Normal bir inkübasyon ortamında (ekstraksız) 2 saatlik peroksidasyon süresi boyunca MDA düzeyinin önemli bir kısmının ilk çeyrekte oluştuğu belirtilmektedir (Stocks ve Dormandy, 1971). Bizim çalışmamızda benzer sonuçlar gözlendi. Üzüm kısımlarının en etkin koruyucu potansiyeli her iki konsantrasyonda da metanolik ekstrakta özellikle kabuk dokusunda gözlendi. Sadece 60. dakika sonunda yine her iki

konsantrasyonda çekirdek ekstraktlarında en yüksek koruyucu etki bulundu. Üzüm suyu ve kabuğun sulu ekstraktlarına ait MDA değeri ise reaksiyon süresince ekstraksız çalışma grubuyla (paket+peroksit) paralel seyretti. Bahsedilen bu iki grubun fenolik bileşiminin de en az olması, çalışma gruplarının fenolik bileşim ve antioksidan etkinlikleri sıralamasıyla uyumludur. Reaksiyon ortamına ilave edilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonunun daha düşük dozlarda olması üzümün bu kısımlarına ait koruyucu etkiyi ortaya çıkartabileceğini düşünmekteyiz. Metanolik ekstraktlarda özellikle kateşin miktarının diğer ekstrakt gruplarına göre daha fazla olması bu antioksidan kapasite farkını açıklamaktadır. Ayrıca organik ekstraktlardaki fenolik bileşenlerin eritrositlerce daha kolay alınarak özellikle hemoglobine bağlanması sonucunda hücrede biriktiğini belirten araştırma (Fieroni vd., 2006) sonuçlarımızı desteklemektedir. Çekirdek ve kabuğun metanolik ekstraktlarındaki antioksidan etki farkı ise bu fazlarda bulunan flavonik bileşimlerin ve eser elementlerin farklı miktarlarıyla açıklanabilir. Biyoflavonoidlerin yapısında bulunan, özellikle B (3. ve 5. karbona bağlı) ve C (3' ve 4' karbonlara bağlı) halkasındaki fenolik hidroksil grubunun yerleşimi ve sayısı ile yapıda taşıdığı çift bağ (C halkasındaki 2 ile 3. karbon arasında) ve ona bağlı okso grubunun flavonoidlerin biyoyararlılık derecesini belirleyen en önemli unsurlar olduğu bildirilmektedir (Fieroni vd., 2006, Zhu vd.,2002). Ratlarda yapılan ve UV ışınlarıyla OS oluşturulan çalışmada eritrosit MDA oluşumu üzerine üzüm çekirdeği prosiyanidinlerinin saf EGCG ve kateşin preparatlarına göre daha etkili engelleyici olduğu bildirilmiştir (Carini vd. 2000). Kırmızı şarabın antosiyanidince zengin fraksiyonlarında en az eritrosit MDA'sı olduğu rapor edilmiştir (Tedesco vd., 2001). Yine Yen ve arkadaşlarının Kuskuda bitkisinde yaptığı çalışmada en az MDA oluşumuna yol açan ekstrakt miktarının (IC<sub>50</sub>) sırasıyla etil asetat, etanol, n-bütanol ve sulu ekstratlarda rastlanmıştır (Yen vd., 2008). Bizim elde ettiğimiz bulgular bahsedilen çalışma sonuçlarıyla uyumludur.

Ekstrakt konsantrasyon farkının antioksidan korumadaki değişim derecesini belirlemek amacıyla çalışma ortamına ilave edilen ekstrakt miktarını iki katına çıkardık ve bütün zaman dilimleri boyunca bulgularımızın öncekilerle aynı derecede ve aynı yönde tekrarladığını belirledik. Sadece inkübasyon süresinin son çeyreğinde çekirdek sulu ekstraktının kabuk metanolik ekstrakta göre MDA düzeylerini daha etkili azalttığını bulduk. 15. ve 30. dakikalarda ölçülen 3 ekstrakt çeşidinin oluşturduğu antioksidan etkinin konsantrasyon farkına bağlı olarak anlamlılık derecesinin değiştiği görülmektedir. Diğer ölçüm zamanlarındaki aynı gözlem sadece 2 ekstrakt çeşidi için geçerlidir. Yani konsantrasyon farkı sadece belli üzüm kısımlarında gözlenmiştir. Çalışma sonuçlarımız,

Suwalsky ve arkadaşlarının (Suwalsky vd., 2007) Frenk üzümü ekstrakt konsantrasyonunu 2 kat artırdığı çalışma sonuçlarıyla uyumluydu ancak konsantrasyonun 5 kat artırıldığı çay özütü (Grinberg vd., 1997), 10 kat artırıldığı yaban mersini (çay üzümü) özütü (Youdin vd., 2000) ve 100 kat artırıldığı mangifera bitki özütü (Rodriguez vd., 2006) çalışmalarında eritrosit MDA düzeylerinde anlamlı bir azalma olduğu bildirilmiştir. Ekstrakt konsantrasyonunun katları halinde artırıldığı çalışmada; oluşan MDA düzeylerinin benzer oranda azaldığını gösteren araştırmaya (Kaviarasan vd., 2004) da rastlanılmıştır.

Çalışmamızda üzüm kısımlarına ait antioksidan etkinlikleri zamanın bir fonksiyonu olarak değerlendirmek amacıyla 4 farklı zamanda eritrosit MDA ölçümü yapıldı ve bu periyotlarda gözlenen değişiklikler % değişim olarak ifade edildi. İlk çeyrekte en yüksek düzeyde peroksidasyon olduğu hem çalışmamızda görülmekte hem de kullandığımız protokolde (Stocks ve Dormandy, 1971) ifade edilmektedir. Her iki ekstrakt konsantrasyonda azalan bir % değişim gözlemlendi. Metanolik ekstraktlarda ve çekirdeğin sulu ekstraktındaki değişim yüzdelerinin ekstraksız (paket + peroksit) grupla paralellik göstermesi dikkat çekicidir. Üzüm dokularına ait radikal temizleme kapasite sırası bu yönde olması hesaplanan bu değerlerle uyumludur. Bu değerlendirme; inkübasyon süresine bağlı olarak üzüm dokularının flavonoid muhteva düzeylerine göre giderek azalan etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Etkinlikteki bu azalmanın ortamdaki biyoyararlılığı tükenen flavonoidlerden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Youdim'in ratlar üzerinde gerçekleştirdiği çalışmada; çay üzümü kabuğu ve etli kısımlarının ekstraksiyonuyla antosiyanidinler elde etmiş ve bunların 3 farklı zamanda (1. 6. ve 24. saatlerde) etkinlerini ölçmüşlerdir (Youdin vd., 2000). Bizim sonuçlarımız bu çalışma sonuçlarıyla uygunluk göstermiştir.

Üzümün farklı dokularına ait antioksidatif kapasite hücresel düzeyde irdelendikten sonra aynı değerlendirmenin ekstraselüler ortamda da yapılması için ikinci bir deney ortamını hazırladık. Bunun için sağlıklı kişilerden alınan ve tek bir havuz haline getirilen plazma (işlenmemiş, fraksiyonlaştırılmamış) stresör olarak kullanılan  $Cu^{+2}$  ile muamele edildi. Plazma peroksidasyonunu izleme belirteci olarak da, anlık izlenebilen fakat kararsız olan konjuge dien ürününün oluşması için gerekli olan süreyi (t-lag zamanı) seçtik. Plazmanın oksidasyona hassasiyeti, özellikle bileşiminde bulunan lipoproteinlerden kaynaklanmaktadır. Albümin plazma proteinleri arasında gerek radikal toplayıcı özelliğinden gerekse geçiş metalleri için şelatör olarak iş görmesinden dolayı en etkin antioksidan bileşenlerden biri olarak kabul edilir (Spranger vd., 1998). Antioksidanların

oksidasyona hassasiyeti engellemesini değerlendirmek üzere gerçekleştirilen çalışmalarda; işlenmemiş plazmanın izole edilmiş lipoproteinlere göre bazı avantajlara sahip olduğu bildirilmektedir. Özellikle LDL izolasyonu işlemi; plazmada yer alan ve suda oznen antioksidatif bileşenlerin (albümin, serüloplazmin, transferin, askorbat, rat ve bilirubin gibi) uzaklaştırılmasına neden olduğu belirtilmektedir. Yine lipoprotein izolasyonunun bitki ekstraktlarda bulunan bazı glikokonjuge halindeki hidrofilik flavonoidlerin etkilerinin gösterilmesini engelleyeceği ileri sürülmektedir (Spranger vd., 1998, Mayer vd., 2001).

Mevcut araştırmada; eritrosit lipid oksidasyonunu değerlendirme sonuçlarına benzer şekilde en uzun konjuge dien gecikme zamanının metanolik fazda olduğu tespit edilmiştir. Eritrositlerdeki sonuçlara benzer şekilde en kısa t-lag zamanı da sulu ekstrakt gruplarda görülmüştür. Hücre alışma sonuçlarından farklı olarak sıralama çekirdeğin metanolik ekstraktı lehine değişmiş fakat her iki metanolik grup arasındaki değişimin istatikselsel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir. Yine eritrositlerden farklı olarak bütün zml alışma gruplarının t-lag zamanı, zmsz (sadece peroksitli bulunan grup) gruba göre anlamlı derecede daha uzun olduğu bulunmuştur. Elde ettiğimiz bu sonuçlar glikoflavonoid (Mayer vd., 2001), E ve C vitamini (Kontush vd., 1996, Atkin vd., 2005) preparatlarıyla yapılan benzer çalışma sonuçlarıyla uyumluluk gösterdi. Yine Isla ve arkadaşlarının propolis ekstraktlarının işlenmemiş plazma üzerine oluşturduğu etkiyi gösteren çalışma sonuçları da diğer çalışma sonuçlarıyla paralellik göstermiştir (Isla vd., 2001).

Sonuç olarak Erzincan zmnn farklı dokularına ait antioksidan etkinin onun farklı ekstrakt ortamlarındaki flavonoid miktarı ve bileşimiyle ilgilidir. Üzümün koruyucu etkisi hem intraselüler (hücre içi) ortamda hem de ekstraselüler sıvı ortamında (hücre dışı sıvı) incelenmiş, indirgeme kapasite gücüne paralel şekilde kabuk ve çekirdeğin metanolik ekstraktlarında antioksidan etkinin daha güçlü olduğu bulunmuştur.



## 5. SONUÇLAR

1. Erzincan üzümünün flavonoid miktarı en fazla çekirdek ve kabuk dokusunun metanolik ekstraktında en az ise üzüm suyunda ve kabuğun sulu ekstraktında bulunmuştur.
2. Üzümde en fazla bulunan flavonoid ise kateşindir. Onu epigallokateşin ve gallik asit takip etmektedir.
3. Kabuk ve çekirdeğin metanolik fazı en yüksek radikal toplayıcı aktiviteye sahipken, sulu faz düşük radikal toplayıcı potansiyele sahiptir.
4. Eritrositlerdeki lipid peroksidasyon seviyesinin göstergesi olan MDA düzeyleri yine metanolik ekstrakta daha düşüktür.
5. Çalışma ortamına ilave edilen ekstrakt konsantrasyonunun iki kat artırılması bütün çalışma periyodu süresince eritrosit MDA düzeylerinde belirgin bir fark oluşumun neden olmadı.
6. Zamana bağlı olarak MDA miktarı ilk çeyrekte en yüksek idi. Diğer üççeyrekte giderek azalan oranlarda MDA oluşumu meydana geldi.
7. Metanolik ekstraktların bulunduğu çalışma gruplarına ait MDA değerlerindeki % değişim değerleri üzümsüz-peroksitli grupla benzer seyretti.
8. Üzümün plazmadaki oksidasyonu engelleyici potansiyelini değerlendirmek için konjugedien oluşumunu geciktiren zaman (t-lag süresi) belirlendi ve en uzun t-lag değeri eritrositlerdeki gibi metanolik fazda görüldü.

## 6. ÖNERİLER

1. Farklı ekstraksiyon çözeltileri ve metotlarının uygulanması üzüm bileşenlerinin daha iyi ve bozunmadan elde edilmesine yol açabilir ve böylece sonuçların daha sağlıklı olmasına katkıda bulunabilir.
2. Daha çok zaman aralığı ve farklı ekstrakt konsantrasyonu seçimi daha etkin sonuçlar bulunmasına yol açabilir.
3. Eritrosit antioksidan enzimlerinin çalışılması ve hücre içi indirgeyici potansiyelinin (glutasyon, total -SH grubu tayini) belirlenmesi üzüm kısımlarının değerlendirmesine katkı sağlayacaktır.
4. Her bir ekstrakt grubunun hücre ve plazma üzerinde oluşturacağı etkiye ait IC<sub>50</sub> değerinin bulunması, grupların birbirleriyle daha sağlıklı mukayese edilmesine imkan verecektir.
5. Aynı çalışma ratlar üzerinde gerçekleştirilebilir ve böylece in vivo şartlarda elde edilecek bulgular sayesinde mevcut sonuçların geçerliliği daha sağlıklı sorgulanabilir.

## 7. KAYNAKLAR

- Akkuş, İ., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yay., Konya.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E. ve Altun, M., 2005. Total Antioxidant Capacity Assay of Human Serum Using Copper (II)-neocuproine as Chromogenic Oxidant: The CUPRAC Method, Taylor & Francis, 39, 9, 949-961.
- Atkin, M.A., Gasper, A., Ullegaddi, R. ve Powers, H.J., 2005. Oxidative Susceptibility of Unfractionated Serum or Plasma: Response to Antioxidants in vitro and to Antioxidant Supplementation, Clinical Chemistry, 51,11, 2138-2144.
- Bilaloğlu, G.V. ve Harmandar, M., 1999. Flavonoidler, Bakanlar Matbaacılık Ltd.Şti., İstanbul, 336.
- Bozan, B., Tosun, G. ve Özcan, D., 2008. Study of polyphenol content in the seeds of red grape ( *Vitis vinifera L.* ) varieties cultivated in Turkey and their antiradical activity, Food Chemistry, 109, 426-430.
- Bravo, L., 1998. Polyphenol Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significance, Nutr. Rev., 56, 317-333.
- Carini, M., Adlini, G., Bombardelli, E., Morazzoni, P. ve Facino, R. M., 2000. UVB-induced hemolysis of rat erythrocytes: Protective effect of procyanidins from grape seeds, Life Sciences, 67,1799-1814
- Chaudhuri, S., Banerjee, A., Basu, K., Sengupta, B. ve Sengupta P. K., 2007, Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: Antioxidant and antihemolytic effects, International Journal of Biological Macromolecules, 41, 42-48.
- Chen, L. H., Boissonneault, G. A. ve Glauert, H. P., 1988. Vitamin C, Vitamin E and Cancer (Review), Anticancer Res., 8, 739-748.
- Cheeseman K.H., Slater, T. F.,1993, An introduction to free radical biochemistry, British Medical Bulletin, 49, 481-493.
- Costello, F.G. and Webber, A., 1990. White cell function in Down's syndrome: Increased enzymatic antioxidative defense is accompanied by decreased superoxide anion generation in blood, Hereditas, 113, 73-75.
- Cross, C E, Borish E T, Pryor W A , Ames B N, Saul R L, Mc Cord JM and Harmon D, 1987, Oxygen radicals and human disease, Ann. Intern Med, 107, 526-545.

- Cuendet, M., Hostettmann, P. ve Potterat, O., 1997. Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties from *Fagraea blumei*, Helv. Chim. Akta, 80, 1144-1152.
- Çimen, Y., ve Burak, M., 1999. Flavonoids and Their Antioxidant Properties, T. Klin. J. Med. Sci., 19, 5, 296-304.
- Dani, C., Oliboni, L.S., Vanderlinde, R., Bonatto, D., Salvador, M. ve Henriques, 2007. Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juice manufactured with organically- or conventionally-produced grapes, Food and Chemical Toxicology, 45, 2574-2580.
- Dığrak, M., Alma, M.H., İçlim, A. ve Şen, S., 1998. Antibacterial and Antifungal Effects of Various Commercial Plant Extracts, Pharmaceutical Biology, 36, 5, 1-5.
- Dillard, C.J. ve German, J.B., 2000. Pytochemicals: Nutraceuticals and Human Health, J. Sci Food Agric., 80, 1744-1756.
- Dünder, Y. ve Aslan, R., 2000. Hekimlikte Oksidatif Stres ve Antioksidanlar, I. Basım, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyon.
- Edge, R., Mc Garvey, D. J. ve Truscott, T. G., 1997. The Carotenoids as Antioxidants, a review, J. Photoch. Photobio., 41, 189-200.
- Efe, H, Hiperlipoproteinemilerde Plazma, Eritrosit, Lenfosit ve Nötrofil Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Lipid Peroksidasyonu ve Çeşitli Lipid Parametreleriyle ilişkilerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, K.T.Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 1996.
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., Jürgens, G., 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL, Free Radical Biology and Medicine, 13, 341-390.
- Fieroni, M., Accorsi, A., Blasa, M., Diamantini, G. ve Piatti, E., 2006. Flavonoids from Italian Multifloral Honeys Reduce the Extracellular Ferricyanide in Human Red Blood Cells, J. Agric. Food Chem., 54, 8328-8334
- Gaetani, F.G., Galino, S., Canepa, L., Ferraris, M.A., Kirkman, N.H., 1989. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes, Blood, 73, 334-339.
- Giese, J., 1994. Spices and Seasoning Blends: A taste for all seasons, Food Technol., 48, 4, 87-98
- Grinberg, L.N., Newmark, H., Kitrossky, N., Rahamim, E., Chevion, M. ve Rachmilewitz, E.A., 1997. Protective Effect of Tea Polyphenol against Oxidative Damage to Red Blood Cells, Biochemical Pharmacology, 54, 973-978.

- Guliyev, V. ve Harmandar, M., 2000. Flavonoidler, Aktif Yayınevi, İstanbul.
- Harborne, J.B., 1994. The Flavonoids Advances in Research Since 1986, Chapman & Hall/CRC, USA, 638.
- Hausteen, B. H., 2002. The Biochemistry and Medicalsignificance of the Flavonoids, Pharmacol. Exp. Ther., 96, 67-202.
- Iacopini, P., Baldi, M., Storchi, P. ve Sebastiani, L., 2008. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, *In vitro* antioxidant activity and interactions, Journal of Food Composition and Analysis, accepted manuscript.
- Isla, M. I., Moreno, M.I.N., Sampietro, A.R.ve Vattuone, M.A., 2001. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts, Journal of Ethopharmacology, 76, 165-170.
- ISO 14502-2, Determination of substances characteristic of green and black tea, Switzerland, 2005.
- Jaffé, H.H. ve Orchin M., 1964, Theory and Applications of Ultraviolet Spectroscopy, John Wiley and Sons, New York.
- Kalaycıoğlu, A. ve Öner, C., 1994. Bazı Bitki Ekstraksiyonlarının Antimutajenik Etkilerinin Amest-Salmonella Test Sistemi ile Araştırılması, Tr. J. Botany, 18, 117- 122.
- Kaviarasan, S., Vijayalakshmi, K.,ve Anuradha, C.V., 2004. Polyphenol-Rich Extract of Fenugreek Seed Protect Erythrocytes from Oxidative Damage, Plant Foods for Human Nutrition, 59, 143-147.
- Kayalı, R. ve Çakatay, U., 2004. Basic Mechanisms of Protein Oxidation, Cerrahpaşa Med, 35, 83-89.
- Kiruthiga, P. V., Shafreen, R. B., Pandian, S. K. ve Devi, K. P., 2007. Silymarin Protection aganist Major Reactive Oxygen Species Released by Environmental Toxins: Exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Exposure in Erythrocytes, Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 100, 414-419.
- Kontush, A., Finckh, B., Karten, B., Kohlschütter, A. ve Beiseigel, U., 1996. Antioxidant and prooxidant activity of  $\alpha$ -tocopherol in human plasma and low density lipoprotein, Journal of Lipid Research, 37, 1436-1448.
- Konyalioglu, S. ve Karamenderes C., 2005. The protective effects of *Achillea L.* species native in Turkey against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage in human erythrocytes and leucocytes, Journal of Ethnopharmacology, 102, 221-227.

- Lindsay S., 1987. High Performance Liquid Chromatography (Analytical Chemistry by Open Learning), Wiley, New York.
- Lucchi, L., Bergamini, S., Botti, B., Rapana, R., Ciuffreda, A., Ruggiero, P., Ballestri, M., Tomasi, A. ve Albertazzi, A., 2000. Influence of Different Hemodialysis Membranes on Red Blood Cell Susceptibility to Oxidative Stres, Artificial Organs, 24, 1, 1-6.
- Marklund, L.S., 1984. Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines, J. Clin. Invest., 74, 1384-1398.
- Mayer, B., Schumasher, M., Brandsätter, H. ve Wagner, F.S., 2001. High-Throughput Fluorescence Screening of Antioxidative Capacity in Human Serum, Analytical Biochemistry, 297, 144-153.
- Meister, A. ve Anderson, M. E., 1983. Glutathion, Annu. Rev. Biochem., 52, 711-60.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. ve Yagi, K., 1979. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbuturic Acid Reaction, Anal. Biochem., 95, 351-358.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on Product of Browning Reaction Prepared from Glucose Amine, Jap. J. Nutr., 44, 307-315.
- Reaven, P. D., 1994, Mechanicms of atherosclerosis role of LDL oxidation, Free radicals in diagnostic medicine, Plenum Pres, New York..
- Rho, K.A. ve KiM, M.K., 2006. Effects of Different Grape Formulations on Antioxidative Capacity, Lipid Peroxidation and Oxidative DNA Damage in Aged Rats, J. Nutr. Sci. Vitaminol, 52, 33-46.
- Rice-Evans, C. A., Miller N. J. ve Paganga, G., 1996. Structure Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids Free Radic., Biol. Med, 20, 7, 933- 56.
- Rice-Evans, C. A., Miller N. J. ve Paganga G., 1997. Antioxidant Properties of Phenolic Compounds, Trends Plant Sci., 2 , 152-159.
- Rodriguez, J., Pierro, D.D., Gioia, M., Monaco, S., Delgado, R., Coleta, M. ve Marini S., 2006. Effects of a natural extract from *Mangifera indica L*, and its active compound, mangiferin, on energy state and lipid peroxidation of red blood cells, Biochimica et Biophysica, 1760, 1333-1342.
- Sandra P., 2004. Advanced Separation Science, Ghent University, Belgium.
- Shelef, L. A., 1983. Antimicrobial Effects of Spices, J. Food Safety, 6, 29-44
- Skoog D.A., James Holler F. ve Nieman T.A., 1998. Principles of Instrumental Analysis, Fifth Edition, Kılıç E., Köseoğlu F. ve Yılmaz H., Saunders College Publishing, US, Bilim Yayıncılık, Ankara

- Slinkard, K. ve Singleton, V. L., 1977. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manuel Methods, Am. J. Enol. Viticult., 28, 49-55.
- Spranger, T., Finckh, B., Fingerhut, R., Kohlschütter, Beisiegel, U. ve Kontush, A., 1998. How differnt constituents of human plasma and low density lipoprotein determine plasma oxidizability by copper, Chemistry and Physics of Lipids, 91, 39-52.
- Stocks, J., Dormandy T. L., 1971. The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide, British J. Hamatol, 20, 95-111
- Suwalsky, M., Orellana, P., Avello, M. ve Villena, F., 2007. Protective effect of *Ugni molinae* Turcz against oxidative damage of human erythrocytes, Food and Chemical Toxicology, 45, 130-135
- Tedesco, I., Russo, G.L., Nazzaro, F., Russo, M. ve Palumbo, R., 2001. Antioxidant effect of red wine anthocyanins in normal and catalase-inactive human erythrocytes, J. Nutr. Biochem.,12, 505-511.
- Tosun, İ. ve Karadeniz, B., 2005. Çay ve Çay Fenoliklerinin Antioksidan Aktivitesi, OMÜ Zir. Fak. Dergisi, 20, 1, 78-83.
- URL-1, <http://tr.wikipedia.org/wiki/Polifenol>, 14.04.2007.
- URL-2, [http://www.genetikbilimi.com/gen/serbest\\_radikaller.htm](http://www.genetikbilimi.com/gen/serbest_radikaller.htm), 21.05.2007.
- URL-3, <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01.doc>, 22.05.2007.
- URL-4, <http://www.bitkisel-tedavi.com/superantioksidan.html>, 01.06.2007.
- URL-5, <http://hplc.chem.shu.edu>, 08.07.2006.
- URL-6, <http://www.derki.com/dergi/index.php/tibbi-bitkiler-ve-sagligimiz.html>, 2008
- Wollgast, J. ve Anklam, E., 2000. Rewiew on Polyphenols in Theobroma cacao: Changes in Composition During the Manufacture of Chocolate and Methodology for Identification and Quantification, Food Res. Int., 33, 423-347.
- Yavuzer, S., 1993. Serbest oksijen radikallerinde karşı savunma sistemleri, Hücre-II. Oksijen Stres ve Hücre Hasarı, Tıpta Temel Bilimler Okulu, Kızılcahamam.
- Yen, F., Wu, T., Lin, L., Cham, T. ve Lin, C., 2008. Concordance between antioxidant activities and flavonol contents in different extracts and fractions of *Cuscuta chinensis*, Food Chemistry , 108, 455-462.
- Yılmaz, S. ve Ozan, S. T., 2003. Meme Kanserli Hastalarda Lipid Peroksidasyonu ve Bazı Enzim Aktiviteleri Arasındaki İlişki, Türk Biyokimya Dergisi, 28, 4, 252-256.

- Youdin, K.A., Shukitt-Hale, B., McKinnon, S., Kalt, W. ve Joseph, J.A., 2000. Polyphenolics enhance red blood cell resistance to oxidative stress: in vitro and in vivo, Biochimica et Biophysica Acta, 1523, 117-122
- Young, J. F., Dragsted, L.O., Daneshvar, B., Lauridsen, S.T., Hansen, M. ve Sandström, B., 2000. The effect of grape-skin extract on oxidative status, British Journal of Nutrition, 84, 505-513.
- Zhu, Q. Y., Holt, R. R., Lazarus, S. A., Orozco T. J. ve Keen, C. L., 2002. Inhibitory Effects of Cocoa Flavanols and Procyanidin Oligomers on Free Radical-Induced Erythrocyte Hemolysis, Exp. Biol. Med., 227,5, 321-329.



## ÖZGEÇMİŞ

31.07.1981 yılında Ardahan'ın Posof ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Kars'da tamamladı. Lise öğrenimini ise Yalova'da tamamladı. 2000 yılında kazandığı KTÜ Rize Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü 2004 yılında birincilikle bitirdi. Aynı yıl KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda tezli yüksek lisansa başladı ve bir yıl KTÜ Yabancı Diller Bölümünde hazırlık okudu. 2005 Kasım' da KTÜ Fen bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalına araştırma görevlisi olarak atandı ve 2006 Aralık'da bu görevinden ayrıldı. 2007 Aralık'da Rize Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak göreve başladı. Halen bu görevine devam etmekte olup yabancı dili İngilizce'dir.