

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

DAMLATMA İLE YENİ DPPH VE FRAP ANTİOKSİDAN
TAYİN YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE UYGULANMASI

DOKTORA TEZİ

Zeynep İSKEFİYELİ

ARALIK 2014
TRABZON

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

DAMLATMA İLE YENİ DPPH VE FRAP ANTIOKSİDAN
TAYİN YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE UYGULANMASI

Zeynep İSKEFİYELİ

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“DOKTOR (KİMYA)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 02.12.2014
Tezin Savunma Tarihi : 19.12.2014

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Murat KÜÇÜK

Trabzon 2014

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Ana Bilim Dalında

Zeynep İSKEFİYELİ Tarafından Hazırlanan

**DAMLATMA İLE YENİ DPPH VE FRAP ANTIÖKSİDAN TAYİN
YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE UYGULANMASI**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 02 / 12 / 2014 gün ve 1579 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
DOKTORA TEZİ
olarak kabul edilmiştir.**

Jüri Üyeleri

Başkan: Prof. Dr. Nurettin YAYLI


.....

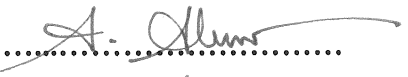
Üye : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN


.....

Üye: Prof. Dr. Murat KÜÇÜK


.....

Üye : Prof. Dr. Ahmet ALVER


.....

Üye : Doç. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU


.....

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Damlatma ile Yeni DPPH ve FRAP Antioksidan Tayin Yöntemlerinin Geliştirilmesi ve Uygulanması” adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda Doktora Tezi olarak hazırlanmıştır.

Öncelikle çalışma konusunun seçiminde bana yol gösteren, araştırmalarımın başlangıcından bitimine kadar yardım ve desteğini esirgemeyen ve bana araştırma zevki ve bilimsel düşünce disiplini aşlamak için çaba gösteren, tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Murat KÜÇÜK’e teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimin takibi süresince emeklerini esirgemeyen tez jüri üyeleri, Sayın Prof. Dr. Nurettin YAYLI’ya ve Sayın Prof. Dr. Ahmet ALVER’e teşekkür ederim. Ayrıca tez çalışmasında madde ve malzeme yardımında bulunan Sayın Prof. Dr. İlhan DENİZ’e ve Sayın Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI’ ya gönülden teşekkür ederim.

Laboratuar çalışmalarımda benden yardımlarını esirgemeyen, ne zaman yardım istesem hep tamam diyen Hacer DOĞAN ve Derya CANSIZ’a ve diğer BAL grubu arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu uzun ve meşakkatli süreçte hep yanımda olan, bana maddi ve özellikle manevi destek veren değerli dostlarım Yrd. Doç. Dr. Zehra CAN ve Yrd. Doç. Dr. Hüseyin ŞAHİN’e çok teşekkür ederim.

Tüm çalışmam boyunca bana anlayış gösteren, destek veren ve araştırmam süresince desteklerini hiç esirgemeyen aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Zeynep İSKEFİYELİ
Trabzon, 2014

TEZ BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “Damlatma ile Yeni DPPH ve FRAP Antioksidan Tayin Yöntemlerinin Geliştirilmesi ve Uygulanması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Murat KÜÇÜK’ün sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deney ve analizleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.
02/12/2014

Zeynep İSKEFİYELİ

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa No</u> |
|--|-----------------|
| ÖNSÖZ..... | III |
| TEZ BEYANNAMESİ..... | IV |
| İÇİNDEKİLER..... | V |
| ÖZET | IX |
| SUMMARY | X |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | XI |
| TABLolar DİZİNİ..... | XIX |
| SEMBOLLER DİZİNİ | XX |
| 1. GENEL BİLGİLER..... | 1 |
| 1.1. Giriş | 1 |
| 1.2. Serbest Radikaller..... | 2 |
| 1.3. Antioksidan Bileşikler | 4 |
| 1.3.1. Antioksidan Bileşiklerin Sınıflandırılması | 4 |
| 1.4. Fenolik Bileşikler | 6 |
| 1.4.1. Fenolik Bileşiklerin Biyoaktiviteleri | 7 |
| 1.4.2. Fenolik Bileşiklerin Kimyasal Yapıları ve Sınıflandırılması | 8 |
| 1.5. Antioksidan Aktivite Belirleme Yöntemleri..... | 10 |
| 1.5.1. Hidrojen Atomu Transfer (HAT) Reaksiyonlarına Dayalı Yöntemler..... | 11 |
| 1.5.2. Tek Elektron Transfer (SET) Reaksiyonlarına Dayalı Yöntemler | 12 |
| 1.5.2.1. DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini | 13 |
| 1.5.2.2. Demir (III) İndirgeme/ Antioksidan Güç (FRAP) Tayini | 14 |
| 1.6. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)..... | 15 |
| 1.7. Biyoaktif Çalışmalarda Kullanılan Yazıcılar | 16 |
| 1.8. Renk Analizi ile Biyoaktivite Çalışması | 16 |
| 1.8.1. “Image J” Renk Ölçüm Programı | 17 |
| 1.9. Çalışılan Bitkiler ve Özellikleri..... | 18 |
| 1.9.1. Isırgan Otu Bitkisinin Özellikleri | 18 |
| 1.9.2. Nane Bitkisinin Özellikleri..... | 18 |
| 1.9.3. Sarısabır Bitkisinin Özellikleri | 19 |
| 1.9.4. Biberiye Bitkisinin Özellikleri..... | 20 |
| 1.9.5. İhlamur Bitkisinin Özellikleri..... | 21 |

| | | |
|--------------|---|----|
| 1.9.6. | Kantaron Bitkisinin Özellikleri | 21 |
| 1.9.7. | Ebegümece Bitkisinin Özellikleri | 22 |
| 1.9.8. | Ekinezya (Kirpi Otu) Bitkisinin Özellikleri | 23 |
| 1.9.9. | Yeşil Çay Bitkisinin Özellikleri | 23 |
| 1.9.10. | Zerdeçal Bitkisinin Özellikleri | 24 |
| 1.9.11. | Rezene Bitkisinin Özellikleri..... | 25 |
| 1.9.12. | Havaciva Bitkisinin Özellikleri | 25 |
| 2. | YAPILAN ÇALIŞMALAR..... | 27 |
| 2.1. | Kullanılan Cihazlar..... | 27 |
| 2.2. | Kullanılan Kimyasallar..... | 27 |
| 2.3. | Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları | 28 |
| 2.4. | Bitkilerin Temini ve Ekstraktların Hazırlanması..... | 31 |
| 2.5. | Antioksidan Standartların ve Bitki Ekstraktlarının Antioksidan Aktiviteleri..... | 32 |
| 2.5.1. | DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi..... | 32 |
| 2.5.1.1. | Antioksidan Standartlar ve Bitki Ekstraktlarında Spektrofotometrik Yöntemle DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini..... | 32 |
| 2.5.1.1.1. | SC ₅₀ Değerlerinin Bulunması | 33 |
| 2.5.1.2. | Antioksidan Standartlar ve Bitki Ekstraktlarında Damlatma Yöntemi ile DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini | 34 |
| 2.5.1.2.1. | CSC ₅₀ Değerinin Hesaplanması..... | 35 |
| 2.5.1.2.1.1. | Doğrudan CSC ₅₀ Değerinin Hesaplanması Yöntemi..... | 35 |
| 2.5.1.2.1.2. | Türev Alınarak CSC ₅₀ Değerinin Hesaplanması Yöntemi | 36 |
| 2.5.1.3. | Standartların ve Bazı Bitki Ekstraktlarının DPPH Testindeki Reaksiyon Kinetikleri | 36 |
| 2.5.1.3.1. | Standartların DPPH Testindeki Reaksiyon Kinetiği | 36 |
| 2.5.1.3.2. | Bazı Bitki Ekstraktlarının DPPH Testindeki Reaksiyon Kinetiği | 37 |
| 2.5.1.4. | Yeni Geliştirilen Damlatma Yöntemi ile DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini İçin Yapılan Optimizasyonlar..... | 38 |
| 2.5.1.4.1. | Tarayıcı ve Renk Ölçüm Programının (Image J) Özelliklerinin Optimizasyonu..... | 38 |
| 2.5.1.4.2. | DPPH• Radikalinin Çalışma Konsantrasyonunun Belirlenmesi..... | 38 |
| 2.5.1.4.3. | Damlatma Hacminin (Damla Hacminin) Belirlenmesi | 39 |
| 2.5.1.4.4. | Reaksiyonun Gerçekleşme Ortamının Belirlenmesi..... | 40 |
| 2.5.1.5. | Farklı Özellikteki İTK'ların Reaksiyona Etkisi..... | 40 |
| 2.5.2. | Demir (III) İndirgeme/ Antioksidan Güç (FRAP) Tayini | 41 |

| | | |
|------------|--|----|
| 2.5.2.1. | Standartlar ve Bitki Ekstraktlarında Spektrofotometrik Yöntem ile Demir (III) İndirgeme/ Antioksidan Güç (FRAP) Tayini | 41 |
| 2.5.2.2. | Standartların ve Bazı Bitki Ekstraktlarının FRAP Testindeki Reaksiyon Kinetikleri | 42 |
| 2.5.2.2.1. | Standartların FRAP Testindeki Reaksiyon Kinetiği..... | 42 |
| 2.5.2.2.2. | Bazı Bitki Ekstraktlarının FRAP Testindeki Reaksiyon Kinetiği | 42 |
| 2.5.2.2. | Standartlar ve Bitki Ekstraktlarında Damlatma Yöntemi ile Demir (III) İndirgeme/Antioksidan Güç (FRAP) Tayini | 43 |
| 2.6. | Yazıcı ile Püskürtme Çalışması | 44 |
| 2.6.1. | Püskürtme Çalışması Öncesinde Yapılan Optimizasyonlar | 44 |
| 2.6.2. | Bazı Antioksidan Standartlar ile Yapılan Spektrofotometrik, Damlatma ve Püskürtme Çalışmaları | 45 |
| 3. | BULGULAR | 48 |
| 3.1. | Antioksidan Standartların Spektrofotometrik Yöntemle Belirlenen DPPH Radikal Temizleme Aktiviteleri | 48 |
| 3.2. | Antioksidan Standartların Damlatma Yöntemi ile Belirlenen DPPH Radikal Temizleme Aktiviteleri | 52 |
| 3.3. | Bitki Ekstraktlarında Spektrofotometrik Yöntemle Belirlenen DPPH Radikal Temizleme Aktiviteleri | 63 |
| 3.4. | Bitki Ekstraktlarında Damlatma Yöntemi ile Belirlenen DPPH Radikal Temizleme Aktiviteleri..... | 66 |
| 3.5. | DPPH Testinde Çalışılan Standart ve Bitki Ekstraktlarının Spektrofotometrik ve Damlatma Yöntemleri Arasındaki Korelasyon | 80 |
| 3.6. | Standartların ve Bazı Bitki Ekstraktlarının DPPH Testindeki Reaksiyon Kinetiği Sonuçları..... | 82 |
| 3.6.1. | Standartların DPPH Testindeki Reaksiyon Kinetiği | 82 |
| 3.6.2. | Bazı Bitki Ekstraktlarının DPPH Testindeki Reaksiyon Kinetiği | 84 |
| 3.7. | Yeni Geliştirilen Damlatma Yöntemi ile DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini İçin Yapılan Optimizasyon Sonuçları | 86 |
| 3.7.1. | DPPH [•] Radikalinin Çalışma Konsantrasyonunun Belirlenmesi..... | 86 |
| 3.7.2. | Damlatma Hacminin (Damla Hacmi) Belirlenmesi | 87 |
| 3.7.3. | Reaksiyonun Gerçekleşme Ortamının Belirlenmesi..... | 90 |
| 3.8. | Farklı Özellikteki İTK'ların Reaksiyona Etkisi..... | 91 |
| 3.9. | Standartlar ve Bitki Ekstraktlarında Spektrofotometrik Yöntem ile Demir (III) İndirgeme/ Antioksidan Güç (FRAP) Tayini Sonuçları | 94 |
| 3.10. | Standartların ve Bazı Bitki Ekstraktlarının FRAP Testindeki Reaksiyon Kinetiği Sonuçları..... | 96 |
| 3.10.1. | Standartların FRAP Testindeki Reaksiyon Kinetiği..... | 96 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 3.10.2. | Bazı Bitki Ekstraktlarının FRAP Testindeki Reaksiyon Kinetiği | 98 |
| 3.11. | Standartlar ve Bitki Ekstraktlarında Damlatma Yöntemi ile Demir (III) İndirgeme/Antioksidan Güç (FRAP) Tayini Sonuçları | 101 |
| 3.12. | FRAP Testinde Çalışılan Standartların Spektrofotometrik ve Damlatma Yöntemleri Arasındaki Korelasyonu | 106 |
| 3.13. | FRAP Testinde Çalışılan Bitki Ekstraktlarının Spektrofotometrik ve Damlatma Yöntemleri Arasındaki Korelasyonu | 107 |
| 3.14. | Bazı Antioksidan Standartlar ile Yapılan Spektrofotometrik, Damlatma ve Püskürtme Çalışmalarının Karşılaştırılması | 109 |
| 4. | TARTIŞMA..... | 113 |
| 5. | SONUÇLAR VE ÖNERİLER..... | 122 |
| 6. | KAYNAKLAR..... | 124 |
| ÖZGEÇMİŞ | | |

Doktora Tezi

ÖZET

DAMLATMA İLE YENİ DPPH VE FRAP ANTIÖKSİDAN TAYİN YÖNTEMLERİNİN
GELİŞTİRİLMESİ VE UYGULANMASI

Zeynep İSKEFİYELİ

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Murat KÜÇÜK
2014, 132 Sayfa

Antioksidan özelliğe sahip standartların aktivite derecelerinin belirlenmesinde ve bitki ekstraktlarının antioksidan içeriklerinin tespitinde kullanılan antioksidan aktivite ölçüm yöntemleri arasında ortamda radikal içerenlerden DPPH radikal temizleme aktivitesi tayini ve radikal içermeyenlerden demir (III) indirgeme/ antioksidan güç (FRAP) tayini en yaygın kullanılan yöntemlerdir. Literatürde ve laboratuvarımızda yapılan münferit çalışmalarda bu iki yöntemin kullanıldığı spektrofotometrik çalışmalar mevcuttur. Bu iki yöntemin yaygın olarak kullanılmasına karşın her ikisinin olumsuz yönü bir spektrofotometre cihazına ihtiyaç duyulmasıdır. Yapılan çalışmanın amacı bu iki antioksidan teste de spektrofotometre kullanmadan maliyeti daha düşük ve uygulanabilirliği daha kolay olan yeni bir metod geliştirmektir. Çalışmada bazı antioksidan standartlar ve bitki ekstraktları ile hem spektrofotometrik hem de damlatma yöntemi uygulanarak DPPH ve FRAP testleri yapılmıştır. Çalışmada yeni geliştirilen damlatma yöntemi için bir çok optimizasyon çalışması (DPPH radikalinin çalışma konsantrasyonu, damlatma hacmi, reaksiyonun gerçekleşme ortamı, farklı özellikteki İTK'ların reaksiyona etkisi gibi) yapılmış, ayrıca her iki teste standartların ve bazı bitki ekstraktlarının reaksiyon kinetikleri belirlenmiştir. İki yöntem kullanılarak çalışılan standart ve bitki ekstraktlarının DPPH ve FRAP testindeki antioksidan aktiviteleri uyum göstermiştir. Dolayısıyla bu durum spektrofotometre olmadan bu antioksidan testlerin yapılabileceğini göstermiştir. Spektrofotometre kullanmadan bir İTK tabaka ve ücretsiz olarak elde edilebilen renk ölçüm programı Image J kullanılarak antioksidan test yapılabilmektedir. Bunların yanında bir başka yeni geliştirilen yöntem olarak yazıcı yardımıyla püskürtme çalışması yapılmıştır. Püskürtme çalışması iki standart ile yapılmış ve diğer spektrofotometrik ve damlatma yöntemleriyle karşılaştırılmıştır. Geliştirilen damlatarak uygulanan spektrofotometresiz DPPH ve FRAP antioksidan tayin yöntemleri hem saf maddelerin hem de gıda ve tıbbi bitki özütleri gibi karışımların aktivitelerinin belirlenmesinde güvenle kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, DPPH, FRAP, Damlatma, İTK, Image J programı, Püskürtme.

PhD. Thesis

SUMMARY

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF NEW DPPH AND FRAP DROPPING
ANTIOXIDANT ASSAYS

Zeynep İSKEFİYELİ

Karadeniz Technical University
The Graduate of Natural and Applied Sciences
Chemistry Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Murat KÜÇÜK
2014, 132 Pages

Among the antioxidant activity measurement assays used to determine the antioxidant capacities of standard antioxidants as well as the antioxidant compositions of plant extracts, DPPH radical scavenging activity test as radical involving assay and ferric (III) reducing / antioxidant power (FRAP) test as non-radical involving assay are the most widely used methods. A lot of studies in our laboratory and many investigations in the literature contain spectrophotometric analyses with these two test methods. Although these methods are widely used in antioxidant research, both have the drawback of the need for a spectrophotometer. The purpose of this work is to develop a method of application for both antioxidant assays without using a spectrophotometer and with ease of use. DPPH and FRAP tests were performed for the standard antioxidants and plant extracts using both spectrophotometric and dropping assays in the study. A number of optimizations including working DPPH radical concentration, drop volume, reaction medium, and the effect of İTK plate types were made for the newly developed dropping assay, and the reaction kinetics of the standards and the extracts were investigated in both DPPH and FRAP methods. The antioxidant activities measured with DPPH and FRAP methods showed good correlations between spectrophotometric and dropping assays. The results indicate that these antioxidant methods can be applied without needing a spectrophotometer. Thus, antioxidant tests can be performed by using a İTK plate and freely available image processing software Image J. In addition, another new method studied for the first time was investigated by using an ink-jet printer. Ink-jet method was performed for only DPPH assay with two standard antioxidants and compared with spectrophotometric and dropping methods. In conclusion, the newly developed DPPH and FRAP antioxidant determination methods without the use of a spectrophotometer can reliably be used for the determination of the activities of both pure compounds and mixtures as extracts of medicinal plants.

Key Words: Antioxidant, DPPH, FRAP, Dropping, İTK, Image J Software, Ink-jet.

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | <u>Sayfa No</u> |
|---|-----------------|
| Şekil 1. Antioksidanların sınıflandırılması..... | 6 |
| Şekil 2. Flavonoidlerin genel yapısı | 10 |
| Şekil 3. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalinin formülü | 13 |
| Şekil 4. Demir (III)'ün indirgenme reaksiyonu | 14 |
| Şekil 5. Image J programının göstergesi | 17 |
| Şekil 6. Isırgan Otu (<i>Urtica dioica</i>)..... | 18 |
| Şekil 7. Nane (<i>Mentha spicata</i>) | 19 |
| Şekil 8. Sarımsabır (<i>Aloe vera</i>)..... | 20 |
| Şekil 9. Biberiye (<i>Rosmarinus officinalis</i>) | 20 |
| Şekil 10. İhlamur (<i>Tilia argentea</i>)..... | 21 |
| Şekil 11. Kantaron (<i>Hypericum perforatum</i>)..... | 22 |
| Şekil 12. Ebegümece (<i>Malva sylvestris</i>) | 22 |
| Şekil 13. Ekinezya (<i>Echinacea angustifolia</i>) | 23 |
| Şekil 14. Yeşil Çay (<i>Camelliasinensis</i>) | 24 |
| Şekil 15. Zerdaçal (<i>Curcuma longa</i>) | 24 |
| Şekil 16. Rezene (<i>Foeniculum vulgare</i>) | 25 |
| Şekil 17. Havaciva (<i>Alkannatinctoria</i>) | 26 |
| Şekil 18. Farklı konsantrasyondaki A standardının 517 nm'de verdiği absorbans değerlerinin grafiğinden SC ₅₀ değerinin hesaplanması (SC ₅₀ = 0,0146 mg/mL)..... | 34 |
| Şekil 19. Farklı konsantrasyondaki B standardının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiğinden CSC ₅₀ değerinin hesaplanması (CSC ₅₀ = 0,013 mg/mL) | 35 |
| Şekil 20. Farklı konsantrasyondaki C standardının türev formülü kullanılarak CSC ₅₀ değerinin hesaplanması (CSC ₅₀ = 0,35 mg/mL) | 36 |
| Şekil 21. Standartlar için %1 oranında artan saydamlık değerlerine göre hazırlanan ve yazdırılan diagram | 45 |
| Şekil 22. DPPH radikali için %1 oranında artan saydamlık değerlerine göre hazırlanan ve yazdırılan diagram | 45 |
| Şekil 23. Farklı konsantrasyondaki BHT standardının 517 nm'de verdiği absorbans değerlerinin grafiği (SC ₅₀ = 0,07243 mg/mL)..... | 48 |
| Şekil 24. Farklı konsantrasyondaki klorojenik asit standardının 517 nm'de verdiği absorbans değerlerinin grafiği (SC ₅₀ = 0,0753 mg/mL) | 49 |

| | | |
|-----------|---|----|
| Şekil 25. | Farklı konsantrasyondaki ferulik asit standardının 517 nm’de verdiği absorbans değerlerinin grafiği (SC ₅₀ = 0,0690 mg/mL)..... | 49 |
| Şekil 26. | Farklı konsantrasyondaki gallik asit standardının 517 nm’de verdiği absorbans değerlerinin grafiği (SC ₅₀ = 0,0141 mg/mL)..... | 49 |
| Şekil 27. | Farklı konsantrasyondaki kafeik asit standardının 517 nm’de verdiği absorbans değerlerinin grafiği (SC ₅₀ = 0,0372 mg/mL)..... | 50 |
| Şekil 28. | Farklı konsantrasyondaki kateşin standardının 517 nm’de verdiği absorbans değerlerinin grafiği (SC ₅₀ = 0,0329 mg/mL)..... | 50 |
| Şekil 29. | Farklı konsantrasyondaki kuersetin standardının 517 nm’de verdiği absorbans değerlerinin grafiği (SC ₅₀ = 0,0453 mg/mL)..... | 50 |
| Şekil 30. | Farklı konsantrasyondaki protokatekuik asit standardının 517 nm’de verdiği absorbans değerlerinin grafiği (SC ₅₀ = 0,0476 mg/mL) | 51 |
| Şekil 31. | Farklı konsantrasyondaki rutin standardının 517 nm’de verdiği absorbans değerlerinin grafiği (SC ₅₀ = 0,0885 mg/mL)..... | 51 |
| Şekil 32. | Farklı konsantrasyondaki şiringik asit standardının 517 nm’de verdiği absorbans değerlerinin grafiği (SC ₅₀ = 0,0334 mg/mL)..... | 51 |
| Şekil 33. | Farklı konsantrasyondaki BHT standardının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği (CSC ₅₀ = 0,13 mg/mL) | 52 |
| Şekil 34. | Türev yöntemi kullanılarak BHT standardının CSC ₅₀ değerinin hesaplandığı grafik (CSC ₅₀ = 0,165 mg/mL) | 53 |
| Şekil 35. | 3000 µM konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan BHT standardının görüntüsü | 53 |
| Şekil 36. | Farklı konsantrasyondaki klorojenik asit standardının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği (CSC ₅₀ = 0,089 mg/mL)..... | 53 |
| Şekil 37. | Türev yöntemi kullanılarak klorojenik asit standardının CSC ₅₀ değerinin hesaplandığı grafik (CSC ₅₀ = 0,090 mg/mL) | 54 |
| Şekil 38. | 1000 µM konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan klorojenik asit standardının görüntüsü | 54 |
| Şekil 39. | Farklı konsantrasyondaki ferulik asit standardının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği (CSC ₅₀ = 0,112 mg/mL) | 54 |
| Şekil 40. | Türev yöntemi kullanılarak ferulik asit standardının CSC ₅₀ değerinin hesaplandığı grafik (CSC ₅₀ = 0,155 mg/mL) | 55 |
| Şekil 41. | 2000 µM konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan ferulik asit standardının görüntüsü | 55 |
| Şekil 42. | Farklı konsantrasyondaki gallik asit standardının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği (CSC ₅₀ = 0,028 mg/mL) | 55 |
| Şekil 43. | Türev yöntemi kullanılarak gallik asit standardının CSC ₅₀ değerinin hesaplandığı grafik (CSC ₅₀ = 0,042 mg/mL) | 56 |
| Şekil 44. | 500 µM konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan gallik asit standardının görüntüsü..... | 56 |

| | | |
|-----------|--|----|
| Şekil 45. | Farklı konsantrasyondaki kafeik asit standardının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği (CSC ₅₀ = 0,048 mg/mL)..... | 56 |
| Şekil 46. | Türev yöntemi kullanılarak kafeik asit standardının CSC ₅₀ değerinin hesaplandığı (CSC ₅₀ = 0,065 mg/mL)..... | 57 |
| Şekil 47. | 750 µM konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan kafeik asit standardının görüntüsü..... | 57 |
| Şekil 48. | Farklı konsantrasyondaki kateşin standardının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği (CSC ₅₀ = 0,070 mg/mL)..... | 57 |
| Şekil 49. | Türev yöntemi kullanılarak kateşin standardının CSC ₅₀ değerinin hesaplandığı grafik (CSC ₅₀ = 0,075 mg/mL)..... | 58 |
| Şekil 50. | 1000 µM konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan kateşin standardının görüntüsü..... | 58 |
| Şekil 51. | Farklı konsantrasyondaki kuersetin standardının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği (CSC ₅₀ = 0,092 mg/mL)..... | 58 |
| Şekil 52. | Türev yöntemi kullanılarak kuersetin standardının CSC ₅₀ değerinin hesaplandığı grafik (CSC ₅₀ = 0,110 mg/mL)..... | 59 |
| Şekil 53. | 1000 µM konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan kuersetin standardının görüntüsü..... | 59 |
| Şekil 54. | Farklı konsantrasyondaki protokatekuik asit standardının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği (CSC ₅₀ = 0,051 mg/mL)..... | 59 |
| Şekil 55. | Türev yöntemi kullanılarak protokatekuik asit standardının CSC ₅₀ değerinin hesaplandığı grafik (CSC ₅₀ = 0,072 mg/mL)..... | 60 |
| Şekil 56. | 1000 µM konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan protokatekuik asit standardının görüntüsü..... | 60 |
| Şekil 57. | Farklı konsantrasyondaki rutin standardının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği (CSC ₅₀ = 0,135 mg/mL)..... | 60 |
| Şekil 58. | Türev yöntemi kullanılarak rutin standardının CSC ₅₀ değerinin hesaplandığı grafik (CSC ₅₀ = 0,160 mg/mL)..... | 61 |
| Şekil 59. | 1000 µM konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan rutin standardının görüntüsü..... | 61 |
| Şekil 60. | Farklı konsantrasyondaki şiringik asit standardının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği (CSC ₅₀ = 0,054 mg/mL)..... | 61 |
| Şekil 61. | Türev yöntemi kullanılarak şiringik asit standardının CSC ₅₀ değerinin hesaplandığı grafik (CSC ₅₀ = 0,060 mg/mL)..... | 62 |
| Şekil 62. | 500 µM konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan şiringik asit standardının görüntüsü..... | 62 |
| Şekil 63. | Farklı konsantrasyondaki kantaron ekstraktının 517 nm'de verdiği absorbans değerlerinin grafiği (SC ₅₀ = 1,1960 mg/mL)..... | 63 |

| | | |
|-----------|--|----|
| Şekil 64. | Farklı konsantrasyondaki nane ekstraktının 517 nm'de verdiği absorbans değerlerinin grafiği ($SC_{50} = 0,2399$ mg/mL)..... | 63 |
| Şekil 65. | Farklı konsantrasyondaki sarısabır (<i>Aloe vera</i>) ekstraktının 517 nm'de verdiği absorbans değerlerinin grafiği ($SC_{50} = 1,9901$ mg/mL)..... | 64 |
| Şekil 66. | Farklı konsantrasyondaki yeşil çay ekstraktının 517 nm'de verdiği absorbans değerlerinin grafiği ($SC_{50} = 0,052$ mg/mL)..... | 64 |
| Şekil 67. | Farklı konsantrasyondaki biberiye ekstraktının 517 nm'de verdiği absorbans değerlerinin grafiği ($SC_{50} = 0,221$ mg/mL)..... | 64 |
| Şekil 68. | Farklı konsantrasyondaki zerdeçal ekstraktının 517 nm'de verdiği absorbans değerlerinin grafiği ($SC_{50} = 0,130$ mg/mL)..... | 65 |
| Şekil 69. | Farklı konsantrasyondaki yeşil çay (EtAc) ekstraktının 517 nm'de verdiği absorbans değerlerinin grafiği ($SC_{50} = 0,480$ mg/mL) | 65 |
| Şekil 70. | Farklı konsantrasyondaki havaciva ekstraktının 517 nm'de verdiği absorbans değerlerinin grafiği ($SC_{50} = 0,087$ mg/mL)..... | 65 |
| Şekil 71. | Farklı konsantrasyondaki ıhlamur ekstraktının 517 nm'de verdiği absorbans değerlerinin grafiği ($SC_{50} = 0,08$ mg/mL)..... | 66 |
| Şekil 72. | Farklı konsantrasyondaki kantaron ekstraktının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği ($CSC_{50} = 1$ mg/mL)..... | 67 |
| Şekil 73. | Türev yöntemi kullanılarak kantaron ekstraktının CSC_{50} değerinin hesaplandığı grafik ($CSC_{50} = 1,20$ mg/mL) | 67 |
| Şekil 74. | 23,2 mg/mL konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan üst kısımda da kör damlatması yapılan kantaron ekstraktının görüntüsü..... | 68 |
| Şekil 75. | Farklı konsantrasyondaki nane ekstraktının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği ($CSC_{50} = 0,15$ mg/mL) | 68 |
| Şekil 76. | Türev yöntemi kullanılarak nane ekstraktının CSC_{50} değerinin hesaplandığı grafik ($CSC_{50} = 0,225$ mg/mL) | 69 |
| Şekil 77. | 8 mg/mL konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan üst kısımda da kör damlatması yapılan nane ekstraktının görüntüsü | 69 |
| Şekil 78. | Farklı konsantrasyondaki sarı sabır (aloe vera) ekstraktının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği ($CSC_{50} = 1,5$ mg/mL) | 70 |
| Şekil 79. | Türev yöntemi kullanılarak sarısabır (aloe vera) ekstraktının CSC_{50} değerinin hesaplandığı grafik ($CSC_{50} = 2,00$ mg/mL) | 70 |
| Şekil 80. | 32,16 mg/mL konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan üst kısımda da kör damlatması yapılan sarısabır (aloe vera) ekstraktının görüntüsü..... | 71 |
| Şekil 81. | Farklı konsantrasyondaki yeşil çay ekstraktının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği ($CSC_{50} = 0,033$ mg/mL) | 71 |
| Şekil 82. | Türev yöntemi kullanılarak yeşil çay ekstraktının CSC_{50} değerinin hesaplandığı grafik ($CSC_{50} = 0,035$ mg/mL) | 72 |

| | | |
|-----------|--|----|
| Şekil 83. | 2,25 mg/mL konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan üst kısımda da kör damlatması yapılan yeşil çay ekstraktının görüntüsü..... | 72 |
| Şekil 84. | Farklı konsantrasyondaki biberiye ekstraktının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği (CSC ₅₀ = 0,13mg/mL) | 73 |
| Şekil 85. | Türev yöntemi kullanılarak biberiye ekstraktının CSC ₅₀ değerinin hesaplandığı grafik (CSC ₅₀ = 0,210 mg/mL) | 73 |
| Şekil 86. | 7,6 mg/mL konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan üst kısımda da kör damlatması yapılan biberiye ekstraktının görüntüsü..... | 74 |
| Şekil 87. | Farklı konsantrasyondaki zerdeçal ekstraktının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği (CSC ₅₀ = 0,08mg/mL) | 74 |
| Şekil 88. | Türev yöntemi kullanılarak zerdeçal ekstraktının CSC ₅₀ değerinin hesaplandığı grafik (CSC ₅₀ = 0,130 mg/mL) | 75 |
| Şekil 89. | 4,75 mg/mL konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan üst kısımda da kör damlatması yapılan zerdeçal ekstraktının görüntüsü | 75 |
| Şekil 90. | Farklı konsantrasyondaki ıhlamur ekstraktının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği (CSC ₅₀ = 0,06 mg/mL) | 76 |
| Şekil 91. | Türev yöntemi kullanılarak ıhlamur ekstraktının CSC ₅₀ değerinin hesaplandığı grafik (CSC ₅₀ = 0,070 mg/mL)..... | 76 |
| Şekil 92. | 2,813 mg/mL konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan üst kısımda da kör damlatması yapılan ıhlamur ekstraktının görüntüsü | 77 |
| Şekil 93. | Farklı konsantrasyondaki havaciva ekstraktının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği (CSC ₅₀ = 0,1 mg/mL) | 77 |
| Şekil 94. | Türev yöntemi kullanılarak havaciva ekstraktının CSC ₅₀ değerinin hesaplandığı grafik (CSC ₅₀ = 0,120 mg/mL) | 78 |
| Şekil 95. | 5 mg/mL konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan üst kısımda da kör damlatması yapılan havaciva ekstraktının görüntüsü..... | 78 |
| Şekil 96. | Farklı konsantrasyondaki yeşil çay (EtAc) ekstraktının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği (CSC ₅₀ = 0,45 mg/mL) | 79 |
| Şekil 97. | Türev yöntemi kullanılarak yeşil çay (EtAc) ekstraktının CSC ₅₀ değerinin hesaplandığı (CSC ₅₀ = 0,40 mg/mL)..... | 79 |
| Şekil 98. | 9 mg/mL konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan üst kısımda da kör damlatması yapılan yeşil çay (EtAc) ekstraktının görüntüsü | 80 |
| Şekil 99. | DPPH testinde çalışılan standartların ve bitki ekstraktlarının her iki yöntemle göre (spektrofotometrik ve damlatma) antioksidan aktivitelerinin karşılaştırıldığı grafik..... | 81 |

| | | |
|------------|--|----|
| Şekil 100. | DPPH testinde çalışılan standartların ve bitki ekstraktlarının spektrofotometrik ve damlatma yöntemleri arasındaki korelasyon grafiği | 81 |
| Şekil 101. | Standartların DPPH radikal temizleme testindeki zamana bağlı absorban değişimi grafikleri | 82 |
| Şekil 102. | Standartların hepsinin bir arada olduğu DPPH radikal temizleme testindeki zamana bağlı reaksiyon kinetiği grafiği..... | 84 |
| Şekil 103. | Yeşil çay ekstraktının DPPH testinde ki zamana bağlı reaksiyon kinetiği grafiği..... | 85 |
| Şekil 104. | Zerdeçal ekstraktının DPPH testinde ki zamana bağlı reaksiyon kinetiği grafiği..... | 85 |
| Şekil 105. | Sarısabır ekstraktının DPPH testinde ki zamana bağlı reaksiyon kinetiği grafiği..... | 85 |
| Şekil 106. | DPPH radikalinin çalışma konsantrasyonunun belirlenmesi için Troloks standardı için elde edilen renk değeri/konsantrasyon grafiği | 86 |
| Şekil 107. | DPPH radikalinin çalışma konsantrasyonunun belirlenmesi için gallik asit standardı için elde edilen renk değeri/konsantrasyon grafiği | 87 |
| Şekil 108. | Damla hacminin belirlenmesi için farklı konsantrasyonlardaki Troloks standardı ile yapılan çalışmanın grafiği | 88 |
| Şekil 109. | Damlatma hacminin (damla hacminin) belirlenmesinde oluşan görüntü | 88 |
| Şekil 110. | İTK üzerinde ki spotların orta kısımlarının renk değerlerinin belirlenmesi sonucu elde edilen grafik..... | 89 |
| Şekil 111. | İTK üzerinde ki spotların rastgele kısımlarının renk değerlerinin belirlenmesi sonucu elde edilen grafik..... | 89 |
| Şekil 112. | Şiringaldehit standardı ile reaksiyonun gerçekleşme ortamının belirlenmesi için tüplerde bekletilerek yapılan çalışma sonucunda elde edilen grafik..... | 90 |
| Şekil 113. | Şiringaldehit standardı ile reaksiyonun gerçekleşme ortamının belirlenmesi için İTK tabaka üzerinde bekletilerek yapılan çalışma sonucunda elde edilen grafik..... | 91 |
| Şekil 114. | İTK silika gel 60 ile reaksiyonun tüpte gerçekleştiği zaman elde edilen renk değeri/konsantrasyon grafiği | 92 |
| Şekil 115. | İTK silika gel 60 F ₂₅₄ ile reaksiyonun tüpte gerçekleştiği zaman elde edilen renk değeri/konsantrasyon grafiği | 92 |
| Şekil 116. | İTK silika gel 60 ile reaksiyonun İTK tabaka üzerinde gerçekleştiği zaman elde edilen renk değeri/konsantrasyon grafiği | 93 |
| Şekil 117. | İTK silika gel 60 F ₂₅₄ ile reaksiyonun İTK tabaka üzerinde gerçekleştiği zaman elde edilen renk değeri/konsantrasyon grafiği..... | 93 |
| Şekil 118. | Troloks'un farklı konsantrasyonlarına karşı FRAP analizi için 595 nm'de verdiği absorban değerlerinin grafiği | 94 |

| | | |
|------------|--|-----|
| Şekil 119. | 400 µM konsantrasyonda ki standartların spektrofotometrik yöntemle 595 nm’de demir (III) indirgeme/antioksidan güçlerinin µM TEAC cinsinden karşılaştırılması | 95 |
| Şekil 120. | 1 mg/mL konsantrasyonundaki bitki ekstraktlarının spektrofotometrik yöntemle 595 nm’de demir (III) indirgeme/antioksidan güçlerinin µM TEAC cinsinden karşılaştırılması..... | 95 |
| Şekil 121. | Standartların FRAP radikal temizleme testindeki zamana bağlı absorbans değişimi grafikleri | 96 |
| Şekil 122. | Yavaş bozunan FRAP reaktifinin zamana göre absorbans değişimi grafiği | 99 |
| Şekil 123. | Yavaş bozunan FRAP reaktifi ile çalışılan yeşil çay ekstraktının FRAP testindeki reaksiyon kinetiği..... | 99 |
| Şekil 124. | Yavaş bozunan FRAP reaktifi ile çalışılan zerdeçal ekstraktının FRAP testindeki reaksiyon kinetiği..... | 99 |
| Şekil 125. | Yavaş bozunan FRAP reaktifi ile çalışılan sarısabır ekstraktının FRAP testindeki reaksiyon kinetiği..... | 100 |
| Şekil 126. | Çabuk bozunan FRAP reaktifinin zamana göre absorbans değişimi grafiği | 100 |
| Şekil 127. | Çabuk bozunan FRAP reaktifi ile çalışılan yeşil çay ekstraktının FRAP testinde ki reaksiyon kinetiği..... | 101 |
| Şekil 128. | Çabuk bozunan FRAP reaktifi ile çalışılan sarısabır ekstraktının FRAP testinde ki reaksiyon kinetiği..... | 101 |
| Şekil 129. | 1000-500-250-125-62,5 µM konsantrasyonlarında standart Troloks grafiğinin elde edildi görüntü..... | 102 |
| Şekil 130. | Troloks’un farklı konsantrasyon değerlerine karşı ölçülen renk değerleri grafiği..... | 102 |
| Şekil 131. | 400 µM konsantrasyonunda ki standartların damlatma yöntemi ile demir (III) indirgeme/antioksidan güçlerinin µM CTEAC cinsinden karşılaştırılması | 103 |
| Şekil 132. | Her biri 400 µM konsantrasyonda çalışılan standartlar gallik asit..... | 104 |
| Şekil 133. | 1 mg/mL konsantrasyonunda ki bitki ekstraktlarının damlatma yöntemi ile demir (III) indirgeme/antioksidan güçlerinin µM CTEAC cinsinden karşılaştırılması | 105 |
| Şekil 134. | Her biri 1 mg/mL konsantrasyonunda çalışılan bitki ekstraktları | 105 |
| Şekil 135. | FRAP testinde standartlara uygulanan spektrofotometrik ve damlatma yöntemi arasındaki korelasyon grafiği | 106 |
| Şekil 136. | FRAP testinde standartlara uygulanan spektrofotometrik ve damlatma yöntemi sonuçlarının çizgi grafiği ile gösterimi..... | 107 |
| Şekil 137. | FRAP testinde bitki ekstraktlarına uygulanan spektrofotometrik ve damlatma yöntemi arasındaki korelasyon grafiği | 108 |

| | | |
|------------|---|-----|
| Şekil 138. | FRAP testinde bitki ekstraktlarına uygulanan spektrofotometrik ve damlatma yöntemi sonuçlarının çizgi grafiği ile gösterimi..... | 108 |
| Şekil 139. | Farklı konsantrasyondaki protokatekuik asit ve Troloks standartlarının 517 nm’de verdiği absorbans değerlerinin grafiği | 109 |
| Şekil 140. | Farklı konsantrasyondaki protokatekuik asit ve Troloks standartlarının damlatma yöntemine göre renk değeri/konsantrasyon grafiği | 110 |
| Şekil 141. | Farklı konsantrasyondaki protokatekuik asit ve Troloks standartlarının % saydamlık ayarlarına göre püskürtülerek ölçülen renk değerlerinin grafiği..... | 110 |
| Şekil 142. | Troloks standardının % saydamlık ayarlarına göre püskürtme sonucu oluşan görüntü | 111 |
| Şekil 143. | Troloks standardının % saydamlık ayarlarına göre püskürtme sonucu oluşan görüntü | 111 |

TABLÖLAR DİZİNİ

| | <u>Sayfa No</u> |
|---|------------------------|
| Tablo 1. Bazı Fenolik Asitlerin Yapısal Sınıflandırılması | 8 |
| Tablo 2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Markaları | 27 |
| Tablo 3. Kimyasallar ve Satın Alındıkları Firmalar | 28 |
| Tablo 4. Kullanılan Bazı Çözeltiler ve Bu Çözeltilerin Hazırlanışı | 28 |
| Tablo 5. Çalışmada Kullanılan Standartların Molekül Şekilleri ve Ağırlıkları..... | 29 |

SEMBOLLER DİZİNİ

| | |
|-------------------------|--|
| DPPH' | : 1, 1-difenil-2-pikrilhidrazil radikali |
| FRAP | : Demir (III) indirgeme / antioksidan kapasite |
| TPTZ | : 2,4,6-Tris (2-pyridyl)-s-triazine |
| TEAC | : Troloks eşdeğer Antioksidan Kapasite (Spektrofotometrik) |
| CTEAC | : Troloks eşdeğer Antioksidan Kapasite (Damlatma) |
| İTK | : İnce Tabaka Kromatografisi |
| CSC₅₀ | : Radikali % 50 temizleyen numune konsantrasyonu (Damlatma) |
| SC₅₀ | : Radikali % 50 temizleyen numune konsantrasyonu (Spektrofotometrik) |
| UV | : Ultraviyole |
| UV-Vis | : Ultraviyole-görünür bölge spektroskopisi |
| R² | : Korelasyon katsayısı |
| μ | : Mikro |
| L | : Litre |
| mL | : Mililitre |
| μL | : Mikrolitre |
| g | : Gram |
| M | : Molar |
| mM | : Milimolar |
| μM | : Mikromolar |
| °C | : Santigrat derece |
| dk | : Dakika |
| % | : Yüzde |
| • | : Radikal |

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Aerobik solunumun temel gereği olan oksijen, oksidasyon sırasında hücreye büyük zararlar verebilir. Vücuda giren oksijen, oksidatif fosforilasyon ile bir yandan enerji üretirken diğer yandan da serbest radikal kaynağı olan reaktif oksijen türlerini (ROS) oluşturabilmekte ve bu türler toksik etki gösterebilmektedir (Mandal, 2009). Serbest radikaller, dış yörüngesinde ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektron taşıyan organik ve inorganik moleküllerle reaksiyona girebilme yeteneğine sahip, yüksek oranda reaktif özellik gösteren ve kısa ömürlü bileşiklerdir (Lushchak, 2014; Ulusoy, 2010). Serbest radikallerin artmasına sebep olan birçok etken vardır. Bu etkenlerden bazılarına örnek olarak; kimyasal maddeler, çevre kirliliği, UV ve X-ışınları, ilaçlar, virüsler, stres ve sigara dumanı vs. verilebilir. Ayrıca hazır gıdalar, şeker ve yağ miktarı fazla olan gıdalar, alkol ve yoğun egzersizler de oksijen kullanımındaki artışa sebep olurken aynı zamanda serbest radikallerin miktarının da artmasına sebep olabilirler. Oluşan serbest radikaller kanser, damar tıkanıklığı, şeker hastalığı, sıtma gibi birçok hastalığın patolojisiyle ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Tsao ve Deng, 2004; Halliwell, 2002).

Organizmada oluşan ROS hücre yapısında bulunan ve önemi çok büyük olan lipid, protein ve DNA gibi hücre bileşenlerine zarar verir. Canlı organizmalarda serbest radikallerin oluşumunun sebep olacağı olumsuz etkileri ortadan kaldırmak ya da yavaşlatmak için antioksidan savunma sistemleri mevcuttur. Ancak bazı durumlarda oluşan antioksidan savunma sistemleri serbest radikallerin sebep oldukları etkileri tamamen ortadan kaldıramaz ve böylece oksidatif stres olarak adlandırılan durum ortaya çıkar. Diğer bir deyişle oksijen kaynaklı olan reaktif radikallerin ve ara ürünlerin hücrede aşırı miktarda oluşmaları “oksidatif stres” olarak tanımlanır.

Antioksidanlar ise hücre içerisinde çeşitli nedenlerle oluşan ve hücreye zarar veren serbest radikallerle reaksiyona girerek onların başlatmış oldukları zincir reaksiyonunu durduran ya da ilerlemesini yavaşlatan, böylece vücudumuzdaki hayati öneme sahip olan bileşenlerin zarar görmesini engelleyen moleküller olarak tanımlanmaktadır. Son yıllarda serbest radikallerin sebep olduğu hasarların artması antioksidan özellik gösteren maddelere ilgiyi arttırmıştır. Aynı zamanda günümüzde kullanılan sentetik antioksidanların

yan etkilerinin görülmeye başlanması nedeniyle bitkisel kaynaklı antioksidanlara ilgi artmıştır (Koleva vd., 2002; Wettasinghe ve Shahidi, 1999). Artan bu ilgi de, bütün dünyada bitkisel tedavinin desteklenmesini ve önemsenmesini sağlamıştır.

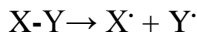
1.2. Serbest Radikaller

Serbest radikaller iyonların veya uyarılmış moleküllerinin ayrılmaları sonucunda oluşan, dış yörüngelerinde bir ya da daha fazla ortaklanmamış elektronu bulunan ve genellikle elektriksel açıdan yüksüz atom ya da moleküllerdir (Akkuş, 1995). Ancak Fe^{+3} , Cu^{+2} , Mn^{+2} ve Mo^{+5} gibi geçiş metalleri de ortaklanmamış elektrona sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler, fakat serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar. Serbest radikaller pozitif yüklü (kasyon), negatif yüklü (anyon) veya elektriksel olarak nötr olabilirler. Organizmada geçiş metallerini (Fe^{+2} ve Cu^{+} gibi metaller) içeren enzimler vasıtasıyla moleküler oksijene tek elektronun aktarılması sonucu “oksidasyon” reaksiyonları meydana gelmektedir.

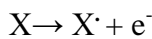
Bu stabil olmayan durumun oluşturduğu enerji, organik veya inorganik kimyasallar, lipitler, karbohidratlar, proteinler ve DNA gibi komşu moleküllerle reaksiyona girerek serbest hale gelir. Serbest radikaller dış yörüngelerindeki elektron açığını reaksiyona girdiği komşu molekülden sağlarken, elektronunu kaybeden komşu molekül kararsız hale geçer ve böylece yeni bir serbest radikal oluşmuş olur. Etkileşim böyle devam ederek sürekli serbest radikale dönüşüme neden olan bir radikalik zincir reaksiyon (otokatalitik reaksiyon) başlar.

Serbest radikaller aşağıda belirtildiği gibi üç farklı yolla oluşmaktadır. Bunlar:

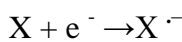
1. Kovalent bağlı bir molekülün homolitik parçalanması: Bağ oluşturan elektron çiftinden her biri birer atom tarafından alınır ve yüksüz atom ya da atom grupları oluşur.



2. Bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya heterolitik bölünme:



3. Bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi:



Serbest radikaller sınıflandırıldığında ise oksijen içeren ve oksijen içermeyen olmak üzere ayrılabilir. Oksijen molekülü iki eşleşmemiş elektrona sahip olduğu için serbest radikallerle daha kolay reaksiyona girebilir. Bu nedenle biyolojik sistemlerdeki en önemli

ve en etkili serbest radikaller oksijen radikalleridir. Bunların büyük kısmı aerobik solunum sırasında mitokondrilerde indirgenmiş karbon birimlerinden alınan elektronların çeşitli elektron taşıyıcılardan geçerek en son elektron alıcısı olan moleküler oksijene transferi esnasında meydana gelir. Oksijenin tam olarak indirgendiği reaksiyonlarda son ürün daima su'dur. Oksijenin kısmi indirgenmesi sonucu ise serbest oksijen radikalleri oluşur. Oksijen merkezli serbest radikallerin başlıcaları; süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($OH\cdot$), perhidroksil radikali (HO_2^{\cdot}) (Winston, 1991; Matés vd., 1999) ve lipid peroksil (LOO^{\cdot}) radikalidir (Günaydın ve Çelebi, 2003; Lee vd., 2004; Schoneich, 1999).

Ayrıca hidrojen peroksit (H_2O_2), tekli (singlet) oksijen (1O_2), hipokloröz asit ($HOCl$), peroksinitrit ($OONO^{\cdot}$) gibi radikal olmayan fakat etkileri ve sonuçları sebebiyle kimyasal aktiviteleri yüksek reaktif azot/oksijen bileşikleri de vardır. Oksijen merkezli olmayan radikaller ise; karbon merkezli lipid ve alkoksi radikalleri (L^{\cdot} , RO^{\cdot}), kükürt merkezli tiyol (RS^{\cdot}), hidrojen merkezli hidrojen atomu (H^{\cdot}) ve demir merkezli perferri ($Fe^{+3}-O_2-Fe^{+2}$) radikalidir (Yapar, 2006).

Serbest radikaller vucutta birçok olumsuz etkiye sebep olmaktadır. Özellikle hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler (Onat, 2002). Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) bir eşleşmemiş elektron içerdiğinden ne çok fazla reaktif, ne de güçlü bir oksidandır. Süperoksit radikali aerobik hücrelerde oldukça sık oluşur, fakat daha çok elektron transfer sistemlerinde meydana gelir. Bunun yanı sıra pek çok enzimatik ve enzimatik olmayan yollarla da meydana gelebilir (Halliwell vd., 1992).

Serbest radikaller içerisinde önemli bir yere sahip olan hidroksil radikali ($\cdot OH$) ise, en reaktif molekül olup, diğer kimyasal türlerle sıklıkla reaksiyona girmektedir. Ayrıca bu radikal, hücrelerde mevcut olan tüm organik yapılara saldırabilme yeteneğine sahiptir. Hidroksil radikali iyonlaştırıcı radyasyonun etkisiyle de oluşturulabilir ve muhtemelen x-ışını ve γ -ışınlarıyla hücre ölümlerine sebep olan en etkili türlerden biridir. Bu radikal kimyasal olarak süperoksit ve peroksit radikalleri arasındaki reaksiyonla da üretilebilir. Dolayısıyla süperoksit ve peroksitin aynı anda üretildiği canlı sistemlerde hidroksil radikalinin biyokimyasal oluşumu da mümkündür.

1.3. Antioksidan Bileşikler

Canlıların yaşam kaynağı olan oksijen molekülü, tüm besinlerin yakılmasında kullanılır. Canlı organizmalar sürekli olarak gerek oksijenli solunum ve gerekse başka yollarla alınan oksijenin oksitleyici etkisi altında kalırlar ve bu yaşlanmanın temel nedenidir. Oksijenli solunum sırasında oksijenin tam olarak indirgenmesi ile su molekülü oluşurken eksik indirgenme ürünleri olan serbest oksijen radikalleri (süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri) oluşmaktadır. Serbest radikaller potansiyel olarak toksik oldukları için organizmalar bunları etkisiz hale getirmek amacıyla savunma sistemleri geliştirmişlerdir. Hücre ve dokular, radikal ürünleri ve reaksiyonları inhibe eden bir sisteme sahiptir. Organizmada oksidasyonu başlatan ve ilerlemesine sebep olan serbest radikallerin oluşumunu önleyen; yani hücrelerdeki oksidatif stresi azaltan bileşikler antioksidan olarak tanımlanmaktadır (Karovicova, 2000; Réka Szöllösi,2002; Küçük vd., 2007).

Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek veya reaktif oksijen türlerini gidererek lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Ayrıca antioksidanlar, hem direkt hem de dolaylı olarak ilaçların, karsinojenlerin ve toksik radikal reaksiyonların istenmeyen etkilerine karşı hücreyi koruyan bileşenlerdir. Antioksidanlar ile oluşturulan kontrol mekanizmasının temel amacı serbest radikallerin aşırı yapılmasını önlemek, aynı zamanda da sağlam olan komşu hücreleri korumaktır.

Antioksidanlar başlıca dört yolla oksidanları etkisiz hale getirirler;

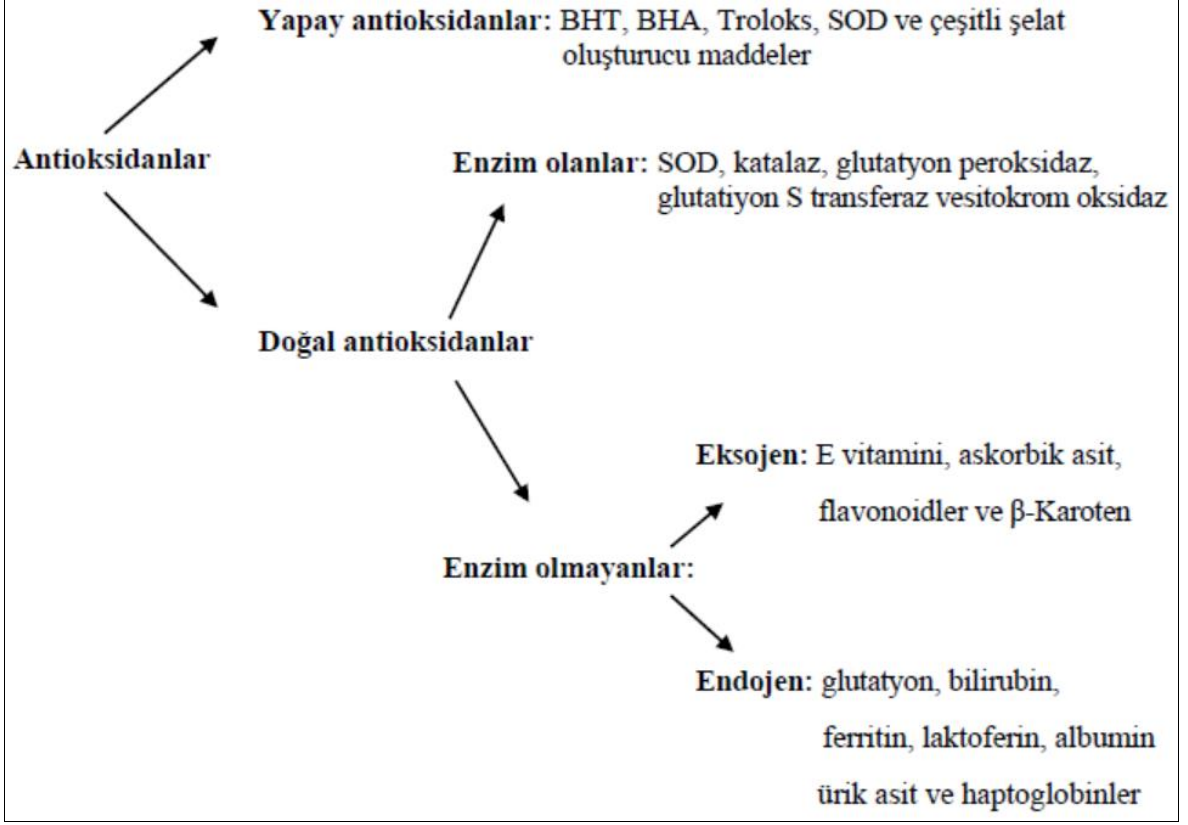
1. Süpürme etkisi: Oksidanları daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirirler. Antioksidan enzimler ve mikromoleküller bu yolla etki eder.
2. Onarma etkisi: Oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onarırlar.
3. Söndürme etkisi: Oksidanlara bir hidrojen aktararak inaktive olmasını sağlar. Vitaminler ve flavanoidler bu şekilde etki eder.
4. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi: Hemoglobin, seruloplazmin, ağır mineraller kendilerine bağlar ve inaktive eder.

1.3.1. Antioksidan Bileşiklerin Sınıflandırılması

Antioksidanları doğal ve yapay antioksidanlar olarak iki sınıfa ayrılabilir. Doğal antioksidanlar, endojen ve eksojen antioksidanlar olarak iki gruba ayrılabilir. Endojen

antioksidanlar, enzimler ve enzim olmayanlardır. Katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutasyon 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; α -tokoferol (E vitamini), β -karoten, askorbik asit (C vitamini) ve folik asit (folat)'tir.

Gıda sanayisinde oldukça yaygın olarak kullanılan yapay antioksidanlar, tükettiğimiz birçok ürüne katılmaktadır. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanları, Bütillendirilmiş hidroksitoluen (BHT) ve Bütillendirilmiş hidroksianisol (BHA)'dır. Bu yapay antioksidanlar gıda bileşenlerinin oksidasyonunu ve gıdaların bozunmasını engelleyerek raf ömrünü uzatabilmektedir. Bu bakımdan yapay antioksidanlar katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Krishnaiah vd., 2011; Elmastaş ve Gerçekçioğlu, 2006). Ancak son yıllarda tüketiciler tarafından yapay antioksidanların toksik etki oluşturabileceği düşüncesi yaygınlaştığı için doğal ürünlere ilgi artmıştır (Cuvelier, 1996; Durling vd., 2007; Şensoy, 2007). Yapılan araştırmalar sonucunda bitki çeşitlerinin çoğunun yapay antioksidanlarla benzer ve yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu, gıda işleme endüstrisinde sentetik antioksidanlara karşı alternatif olarak bu bitkilerin kullanılabilceğini göstermektedir (Krishnaiah vd., 2011).



Şekil 1. Antioksidanların sınıflandırılması

1.4. Fenolik Bileşikler

Bitkiler normal metabolizma sırasında yaralanma, enfeksiyon, UV radyasyonuna maruz kalma gibi durumlarda bitkiler tarafından ikincil metabolizma ürünleri olarak fenolik bileşikler sentezlerler. Bu bileşikler, haberci (sinyal) olarak ve mikroorganizma, insektisit, herbisit ve serbest radikallere karşı koruyucu olarak rol oynarlar. Bu nedenle (karbohidratlar, proteinler ve yağların sentezinden sonra) bunlar “ikincil bitki ürünleri” diye adlandırılırlar. Bitkiler aleminde en fazla üretilen yapıların başında yer alan temel bileşenler fenolik bileşikler veya polifenoller olup ayrıca besinlerin organoleptik özelliklerinden de sorumludurlar (Fabre vd., 2001; Borbálan vd., 2003; Fang vd., 2007; Can, 2014).

Bitkinin normal gelişimi sırasında sentezlenen ve ikincil metabolitler olarak adlandırılan fenolik bileşikler çok çeşitli yapı ve fonksiyonlara sahiptirler. Fenolik bileşikler yapısal olarak aromatik halkada bir hidroksil grubu (-OH) olanlar fenol, daha fazla hidroksil grubu bağlı olanlar ise, polifenol olarak adlandırılmaktadır. Aromatik

halkaya bağlı olan fenolik hidroksillerin hidrojeninin kararsız olması bu yüzden hidroksil grubundan bir hidrojen kaybetmeye meyilli olmalarından dolayı zayıf asidiktirler (Naczk ve Shahidi, 2004; Robards vd., 1999).

Bitkilerde bulunan fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Flavonoidler çeşitli besin ve tıbbi bitkilerde bulunan ikincil metabolitlerin en yaygın grupları arasında olan insanlar tarafından sentezlenemeyen fenolik bileşiklerdir. Özellikle meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunurlar. Bu bileşiklerin bazıları terpenoidler gibi bitkiye koku ve tat verirken (Naczk ve Shahidi, 2004) bazıları kinonlar ve tanenler gibi bitki pigmentlerini oluştururlar (Bravo, 1998). Pek çok bileşik, bitkinin tadından sorumlu olup bunlardan bazıları gıda ve bazıları ise tıbbi amaçlar için kullanılmaktadır (Akyüz, 2011).

Çevresel ve iklimsel koşullar, bitki hastalıkları, toprak çeşidi, coğrafik bölge gibi genetik ve çevresel faktörler bitkinin fenolik içeriğini ve kompozisyonunu etkilemektedir (Sellapan vd., 2002; Öztan, 2006; Küçük, 2007).

1.4.1. Fenolik Bileşiklerin Biyoaktiviteleri

Bütün bitkiler metabolizmalarında, farklı nitelikte ve miktarlarda fenolik bileşik bulundurmaktadırlar. Bu ikincil metabolitler, bitki yapısında yaygın olarak buldukları için insanların beslenmelerinde önemli bir yere sahiptirler (Bravo, 1998). Aynı zamanda besinsel fonksiyonları olmamalarına rağmen sağlık üzerine olumlu etkileri vardır (Öztan, 2006).

Son yıllarda çeşitli hastalıkların ortaya çıkması ve bu hastalıklardan özellikle kanserin çok etkin ve hızlı bir şekilde yayılması bitkisel gıdalarda bulunan fenolik bileşikler üzerine yapılan çalışmaları arttırmıştır. Birçok çalışmadan elde edilen bulgular, flavonoidlerin antimitojen ve antikarsinojen olduğunu desteklemektedir (Nizamlioęlu ve Nas, 2010). Ayrıca; insan diyetinin önemli bir kısmını oluşturan bu bitkisel bileşiklerin antioksidan, antimitojenik, antiviral, antibakteriyel, antikarsinojik, ve antialerjik özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Gaulejac vd., 1999; Murakami vd., 2003; Alan ve Miller, 1996; Balasundram vd., 2006). Bazı fenolik bileşiklerden, özellikle flavonoidler; hipertansiyon, alerjiler, hiperkolesterolemi gibi hastalıkların tedavisinde antidiyareik, antiülser ve antiinflamatuvar ajan gibi uygulamalara sahiptirler (Bravo, 1998). Flavonoidler,

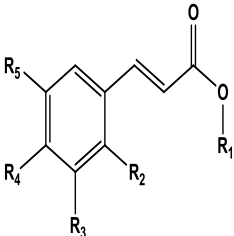
lipoprotein oksidasyonunu inhibe ederek kardiyovasküler vb. hastalıklara yakalanma riskinin azalmasında rol oynarlar (Lazarus ve Schmitz, 2000).

1.4.2. Fenolik Bileşiklerin Kimyasal Yapıları ve Sınıflandırılması

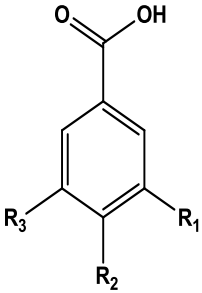
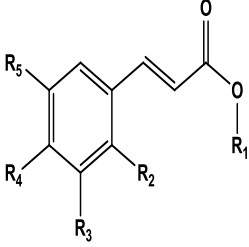
Fenolik bileşikler ya da polifenoller bitkilerde en fazla bulunan yapılardan biri olup, bitki aleminde 10000'den fazla fenolik bileşiğin olduğu bilinmektedir (Pyrzynska, 2009). Polifenoller, bitkilerde, sebze, meyve, tohum, çiçek, kök ve gövde kısımlarında doğal olarak sentezlenen maddelerdir (Wollgast ve Anklam, 2000). Fenolik bileşikler başlıca, fenolik asitler ve flavonoidler olarak iki gruba ayrılır.

Fenolik bileşiklerin alt grubu olan fenolik asitler bitkinin taç kısmında bulunup, antioksidan karaktere sahiptir. Bitkilerde, fenolik asitler serbest halde bulunmazlar, organik asitler ve şekerlerle esterleşmiş halde bulunurlar. Fenolik asitler, hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asit şeklindedirler. Hidroksi benzoik asitler C₆-C₁ iskeletine sahip fenil metan yapısında bileşiklerdir. Bunlardan bir kaç; m-hidroksibenzoik, gallik, vanilik, salisilik, şiringik asitdir. Hidroksisinnamik asitler ise, C₆-C₃ fenilpropan yapısında olup bitkilerde çok yaygın bir şekilde bulunurlar. Fenilpropan halkasına bağlanan -OH grubunun konumu ve sayısına göre farklılık gösterirler. Hidroksisinnamik asitler çok az miktarda serbest halde bulunmaktadırlar. Genellikle asit türevleri şeklinde bulunmaktadırlar.

Tablo 1. Bazı Fenolik Asitlerin Yapısal Sınıflandırılması

| Hidroksisinnamik Asitler (C₆-C₃) | -R ₁ | -R ₂ | -R ₃ | -R ₄ | -R ₅ | |
|---|------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|  | Kafeik Asit | -H | -H | -H | -OH | -OH |
| | Ferulik Asit | -H | -H | -H | -OH | -OCH ₃ |
| | İzoferulik Asit | -H | -H | -H | -OCH ₃ | -OH |
| | <i>p</i> -Kumarik Asit | -H | -H | -H | -OH | -H |
| | <i>o</i> -Kumarik Asit | -H | -OH | -H | -H | -H |
| | Sinapik Asit | -H | -H | -OCH ₃ | -OH | -OCH ₃ |

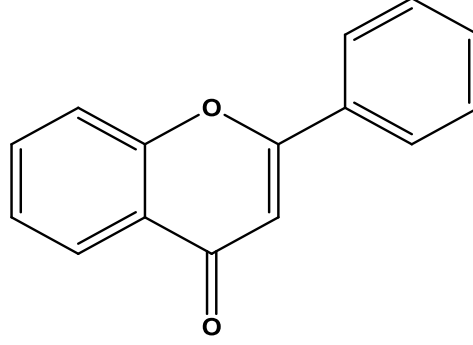
Tablo 1'in devamı

| Hidroksibenzoik Asitler (C₆-C₁) | | -R ₁ | -R ₂ | -R ₃ | | |
|--|---------------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
|  | Gallik Asit | -OH | -OH | -OH | | |
| | Protokatekuik Asit | -OH | -OH | -H | | |
| | <i>p</i> -OH Benzoik Asit | -H | -OH | -H | | |
| | <i>m</i> -OH Benzoik Asit | -OH | -H | -H | | |
| | Vanilik Asit | -OCH ₃ | -OH | -H | | |
| Şiringik Asit | -OCH ₃ | -OH | -OCH ₃ | | | |
| Hidroksisinnamik Asit Türevleri | | -R ₁ | -R ₂ | -R ₃ | -R ₄ | -R ₅ |
|  | Klorojenik Asit | Kuiniik Asit | -H | -H | -OH | -OH |
| | İzoklorojenik Asit | Kuiniik Asit | -H | -OH | -OH | -H |
| | Kaftarik Asit | Tartarik Asit | -H | -H | -OH | -OH |
| | Kutarik Asit | Tartarik Asit | -H | -H | -OH | -H |
| | Fertarik Asit | Tartarik Asit | -H | -H | -OH | -OCH ₃ |

Kafeik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit ve sinapik asit, meyvelerde dağılım gösteren en yaygın hidroksisinnamik asitlerdir (Macheix vd., 1990). Genellikle çeşitli konjuge formlarında bulunan hidroksisinnamik asitlerin serbest formları, kimyasal ya da enzimatik hidroliz ürünleridir.

Flavonoidler, bitkisel gıdalarda yaygın olarak bulunan ikincil metabolitlerin en yaygın grupları arasında olan fenolik bileşiklerdir (Casagrande ve Darbon, 2001). Bu bileşikler renk, tat ve koku gibi organoleptik özelliklerden sorumlu oldukları için, analizleri önemli derecede bu tür ürünlerin kalitesiyle yakından ilgilidirler (Fabre vd., 2001; Borbálan vd., 2003; Akyüz, 2011). Aynı zamanda bu bileşikler bitkinin büyüme ve gelişmesini etkiledikleri gibi, hastalık etmenlerine karşı savunma sisteminin de bir parçasını oluştururlar. Ayrıca farmakolojik, antimikrobiyal, antioksidan, antikanserojen özellikleri olduğunda bilinmektedir (Havsteen, 2002). Flavonoidlerin antioksidan olarak davranma kapasiteleri genellikle molekül yapılarına bağlıdır. Flavonoidlerin genel yapısında, bir aromatik A halkası, bir oksijen içeren heterosiklik orta halka ve birde aromatik B halkasından oluşan flavan iskeleti olarak tanımlanır ve (C₆-C₃-C₆) bunlar karbon iskeletine sahip bileşiklerdir. Yapısındaki heterosiklik halkanın oksidasyon derecesine bağlı olarak

farklı gruplar içermektedirler (Halaç Türk, 2009; Şahin, 2014). Yapıda bulunan OH grupları, reaktif özelliklerinden dolayı kolaylıkla glikozitlenir (Bilaloğlu ve Harmandar, 1999; Tsiogiannis ve Oreopoulou, 2006; Plochmann vd., 1997). Flavonoidlerin genel yapısı aşağıdaki Şekil 2’de gösterildiği gibi difenilpropan ($C_6-C_3-C_6$) yapısındadır.



Şekil 2. Flavonoidlerin genel yapısı

1.5. Antioksidan Aktivite Belirleme Yöntemleri

Antioksidanlar oksidatif stresle ve pro-oksidanların gıdalarda, çevrede ve organizmada meydana getireceği hasarla mücadelede kullanılmaktadırlar. Maddelerin bu amaçla kullanılabilirliğini belirlemek amacıyla birçok antioksidan tayin yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin esasları çeşitli yollarla oluşturulmuş oksidasyonu önlemek, durdurmak, oluşumunu engellemek, oluşabilecek radikalik zincir reaksiyonlarını durdurmak veya bir dereceye kadar azaltabilmektir.

Günümüzde antioksidan kapasiteyi belirlemek için birçok yöntem geliştirilmiştir. Antioksidan kapasiteyi belirlemede kullanılan yöntemler; hidrojen atomu transferi (HAT: Hydrogen Electron Transfer) reaksiyonlarına dayalı yöntemler, tek elektron transferi (SET: Single Electron Transfer) reaksiyonlarına dayalı yöntemler ve diğer mekanizmalar üzerine kurulu yöntemler olarak sınıflandırılmaktadır (Prior vd., 2005; Oğuz, 2008; Burnaz, 2011).

HAT ve SET esaslı yöntemler bir örneğin koruyucu antioksidan kapasitesi yerine radikal (veya oksidan) süpürücü kapasitesini ölçmeye dönüktür. SET yöntemleri substratın (antioksidan) indirgeyici yeteneğini ölçerken, HAT yöntemleri substratın hidrojen verebilme yeteneğini ölçer. HAT yöntemlerine örnek olarak; oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC), toplam radikal yakalama antioksidan parametresi (TRAP), oksijen kullanım inhibisyonu (IOU), linoleik asit oksidasyonu inhibisyonu, LDL oksidasyonu

inhibisyonu ve krosin beyazlatma yöntemleri verilebilir. SET yöntemlerine ise örnek olarak; Folin-Ciocalteu ayırıcı ile toplam fenolik madde miktarı (FCR/TPC), Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC/ABTS), demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP), bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) ve DPPH (1,1'difenil-2-pikrilhidrazil) radikali temizleme yöntemlerini içermektedir (Albayrak vd., 2010; Ardağ, 2008).

Toplam antioksidan kapasite tayininde kullanılan diğer yöntemlere yaygın olarak kullanılan kemilüminesans, HPLC ve elektrokimyasal yöntemler verilebilir.

HAT ve SET yöntemlerinden en yaygın olarak kullanılanlar DPPH, FRAP, ORAC, CUPRAC ve TEAC yöntemleridir (Ou vd, 2002; Pellegrini vd, 2003; Tsao ve Deng, 2004; Huang vd., 2005; Özgen vd., 2006; Sáura-Calixto ve Goni, 2006; Oğuz, 2008).

1.5.1. Hidrojen Atomu Transfer (HAT) Reaksiyonlarına Dayalı Yöntemler

HAT (Hydrogen Atom Transfer) esaslı yöntemler genellikle sentetik serbest radikal üretici, oksitlenebilir moleküler antioksidanların karışımını içermektedir. Antioksidan kapasite belirlemede Hat esaslı literatür de en sık kullanılan yöntem ORAC yöntemidir (Zulueta, 2009; Sáenz, 2009). Bitkisel maddelerin, gıdaların ve fitokimyasalların antioksidanlarını belirlemede kullanılmaktadır (Albayrak vd., 2010; MacDonald-Wicks, 2006; Scherer vd., 2007). Klasik radikal zincir kırma reaksiyonlarından oluşur (Öztan, 2006).

Antioksidan kapasiteyi belirlemede kullanılan ikinci yaygın yöntem TRAP yöntemi olup, bilinen tüm zincir kırıcı antioksidanlara karşı hassastır (Ghiselli vd., 2000; Prior vd., 2005). Bu yöntemin esası bir azo bileşiğin sıcaklıkla bozulması ile oluşturulan kontrollü lipid peroksidasyonu boyunca oksijen tüketiminin ölçülmesini temel almaktadır (Albayrak vd, 2010).

Diğer bir HAT yöntemi olan krosin beyazlatma yöntemide sıklıkla kullanılmaktadır. Krosin suda çözünebilen renklendirici bir karotenoiddir (Chen vd., 2003). Bu yöntemde sıcaklıkla bozulan AAPH tarafından oluşturulan peroksil radikallerinin krosini yükseltgeyerek rengini gidermesi esasına dayanmaktadır (Tubaro vd., 1998; Yıldız, 2007). Burada krosinin beyazlama derecesi ölçülmektedir (Prior vd., 1999). Karışıma eklenen maddedeki antioksidanlar bu beyazlamayı önlemektedir. Deneysel olarak reaksiyon krosin

içeren fosfat tamponu ve bilinen miktarda antioksidan ile gerçekleştirilir (Huang, 2005; Albayrak vd., 2010).

1.5.2. Tek Elektron Transfer (SET) Reaksiyonlarına Dayalı Yöntemler

SET (Single Electron Transfer) yöntemleri ise substratın (antioksidan) indirgeyici yeteneğinin, yani antioksidan maddenin indirgendiğinde renk değiştiren bir oksidan maddeyi indirgeme kapasitesinin ölçümüne dayanır. Renk değişiminin derecesine göre örnekteki antioksidan derişimi ile kıyaslama yapılır (Albayrak vd, 2010; Ardağ, 2008). SET yöntemleri; DPPH, TPC, TEAC, FRAP ve CUPRAC yöntemlerini içermektedir.

Folin-Ciocalteu reaktifinin kullanıldığı FCR yöntemi ile antioksidanların toplam fenolik madde içeriği belirlenebilmektedir. Bu yöntemin esası, suda ve diğer organik çözücülerde çözülmüş olan fenolik bileşiklerin Folin reaktifi ile alkali ortamda mor-menekşe renkli kompleks oluşturup 750- 760 nm'de maksimum absorbands vermesine dayanmaktadır (Slinkard ve Singleton, 1977). Toplam fenolik madde içeriği ve antioksidan aktivitesi arasında oldukça iyi korelasyon görülür (Prior vd., 2005; Öztan, 2006).

TEAC/ABTS yöntemi en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntem ilk kez Miller ve arkadaşları (Miller vd., 1993) tarafından geliştirilmiş ama daha sonra Re ve arkadaşları (Re vd., 1999) tarafından modifiye edilmiştir. TEAC, gıdalarda bulunan antioksidan bileşenlerin serbest radikal bağlama güçlerinin belirlenmesi prensibi üzerine kurulu bir antioksidan kapasite tayin yöntemidir (Oğuz, 2008; Pellegrini vd., 1999; Huang vd., 2005). Bu yöntem, en yaygın radikalik reaktif olan $ABTS^{++}$ [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)]'nin kullanılarak çeşitli maddelerin antioksidan kapasitelerinin Troloks eşdeğeri kapasitesi cinsinden belirlenmesi esasına dayanır (Wang vd., 2004; Rice-Evans ve Miller, 1994). Yöntemde, ABTS molekülünün H_2O_2 ve metmiyoglobinle mavi-yeşil renkli $ABTS^{++}$ radikal katyonuna dönüşmesi ve bu dönüşümün 734 nm'de spektrofotometrik olarak gözlenmesi esastır. Antioksidan varlığında bu dönüşüm engellenmektedir (Erel, 2004). Bu yöntemin olumsuz yönü hızlı reaksiyona giren antioksidanların ferrilmiyoglobin radikalini de indirgeyebilmeleridir (Albayrak vd., 2010).

Diğer bir yöntem olan CUPRAC yönteminde kullanılan bis (neokuprein) bakır (II) klorür reaktifi öncesinde, sistein (Tütem ve Apak, 1991), E vitamini (Tütem vd., 1997) ve askorbik asit (Güçlü vd., 2005)'in tayininde başarı ile kullanılmıştır. Bu yöntem, örnekte

bulunan antioksidanlar (redükta) tarafından Cu (II)'nin Cu (I)'e indirgenmesini temel almaktadır.

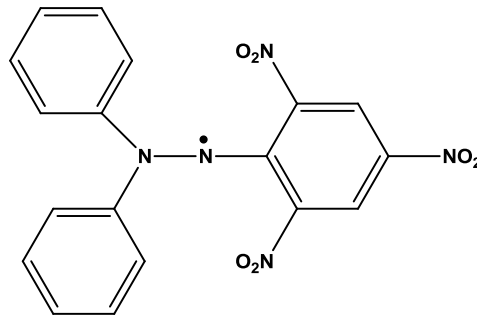
Mevcut çalışmada SET yöntemi olan ve yaygın kullanılan DPPH ve FRAP yöntemleri kullanılmıştır.

1.5.2.1. DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini

SET yöntemleri arasında en yaygın kullanılan yöntemlerden biri de DPPH yöntemidir. DPPH[•] (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikali ticari olarak satın alınabilen bir serbest radikal olup bu radikal 517 nm'de maksimum absorban göstermektedir (Cuendet vd. 1997). Antioksidanlarla muamele, DPPH[•]'tan kaynaklanan mor rengin şiddeti azalarak absorbanın düşüşüne sebep olacaktır. Farklı numune konsantrasyonu ile muamele edilen DPPH[•] radikalinin absorbanındaki değişim ölçülerek absorbanlara karşılık gelen konsantrasyonlarla grafik çizilerek $y=ax+b$ denkleminde DPPH[•] konsantrasyonunu yarıya düşüren numune miktarı mg/mL ya da µg/mL cinsinden belirlenmekte ve sonuçlar SC₅₀ ya da IC₅₀ değeri olarak ifade edilmektedir.

Bu metot radikal temizleme aktivite tayinlerinde kolaylığı ve kısa sürmesi nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır. DPPH radikali kolaylıkla temin edilebilen ve toz halinde satın alındığı için çalışma konsantrasyonuna göre hemen çözücüde çözünüp kullanılıyor olması açısından önemlidir.

Bu metodun önemli bir dezavantajı büyük antioksidan moleküllerin sterik engellenmeye maruz kalmaları nedeniyle inaktif olarak test edilmeleridir. Bu metotta antioksidan molekülün yapısı ve boyutu test sonucunu etkilemektedir.

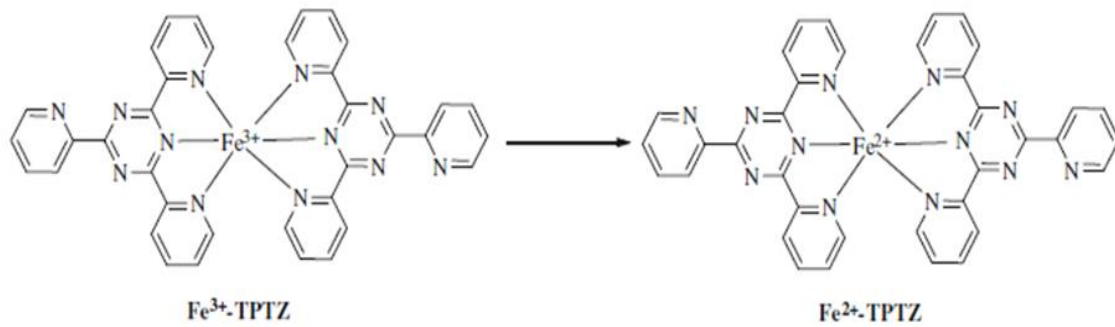


Şekil 3. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikalinin formülü

1.5.2.2. Demir (III) İndirgeme/ Antioksidan Güç (FRAP) Tayini

Bir diğer yaygın kullanılan antioksidan tayin yöntemlerinden biride FRAP yöntemidir. FRAP yöntemi, gıdalarda bulunan antioksidan bileşenlerin indirgen güçlerinin veya kapasitelerinin ölçümü prensibine dayalı bir antioksidan kapasite belirleme yöntemidir (Oğuz, 2008; Benzie ve Strain, 1999; Huang vd., 2005). Oyaizu (1986) tarafından geliştirilen bu yönteme göre indirgeme gücü, dolaylı olarak toplam indirgeme potansiyelini göstermekte olup, Fe^{+3} 'ün Fe^{+2} 'ye indirgenmesi sonucu oluşan renk değişiminin 595 nm'de izlenmesi ile belirlenir (Akyüz, 2007). Asidik pH'da Fe^{+3} 'ün, TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin) ile reaksiyonu sonucu oluşan $[Fe(III)-TPTZ]_2Cl_3$ kompleksi antioksidanların varlığında Fe(II)-tripiridil-triazin $[Fe(II)-TPTZ]$ kompleksine indirgenmektedir (Albayrak vd., 2010). Oluşan yoğun mavi renkli demir tuzu $[Fe(II)-TPTZ]$ oksidan olarak kullanılır ve 595 nm'de absorbans artışına neden olur (Albayrak vd., 2010; Benzie ve Strain 1996).

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 (Akyüz, 2007; Burnaz, 2007). FRAP yöntemi, diğer yöntemlere göre kısa zamanda sonuç veren, oldukça basit ve ucuz bir yöntemdir. Dolayısıyla bu özelliklerinden dolayı antioksidan aktivitenin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemin tek dezavantajı ise -SH grubu içeren antioksidanları ölçememesidir (Ardağ, 2008).



Şekil 4. Demir (III)'ün indirgenme reaksiyonu

1.6. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

Kromatografi birçok yöntem kullanılarak ayrımı mümkün olmayan kompleks karışımlardaki benzer bileşenlerin aydınlatılmasına olanak sağlayan yöntemler grubudur. Uygulama biçimine göre kromatografi çeşitlilik göstermektedir.

İnce tabaka kromatografisi basit, ucuz, hassas, hızlı ve miligram düzeyinde madde gerektirmesi açısından çok kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem genel olarak; karışımdaki bileşenlerin sayısını belirlemek, belli bir maddenin karışımda olup olmadığını anlamak, reaksiyonun yürüyüşünün ve ürün saflığının kontrol edilmesi gibi amaçlar için kullanılmaktadır. İnce tabaka kromatografisi, kağıt kromatografisine oldukça benzerdir. Bu kromatografi türünde sabit faz olarak genelde kuvvetli bir polarite özelliğine sahip silika jel olarak silisyum dioksit (SiO_2), alüminyum oksit (Al_2O_3), magnezyum silikat ve magnezyum oksit gibi maddeler kullanılmaktadır. Dolgu metaryali ile kaplanmak üzere özel olarak hazırlanmış cam, alüminyum veya plastik levhalar kullanılır. Bu levhaların üzeri silika jel, alümina gibi bir adsorbanla kaplanır. Adsorblayıcı tabakanın kalınlığı yapılacak analizin cinsine göre değişir, bu kalınlık 0.25-2 mm arasındadır. İnce tabaka kromatografisinin etkin mekanizması adsorbsiyondur. Bağlanma kapasitesi, adsorban ve ayrılacak maddenin polaritelerine bağlıdır. Polar bir dolgu maddesinde ayrılacak maddenin polaritesi ne kadar fazlaysa bağlanma da o kadar güçlü olacak, dolayısıyla ince tabaka boyunca ilerlemesi zor olacaktır. Polaritesi aynı olan maddelerden ise molekül ağırlığı fazla olan daha yavaş ilerlemektedir. Tez çalışmasında kullanılan silika ve alümina dolgu maddesine sahip İTK tabakalar en yüksek polariteye ve aynı zamanda bağlama kapasitesine sahip olanlardır.

Literatürde fenolik bileşiklerin İTK tabaka kullanılarak aydınlatılması için yapılan çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmaların çoğunda spektrofotometrik olarak DPPH ve FRAP testi yapılmış. Ayrıca bitki ekstraktları İTK tabaka üzerine spotlanmış ve farklı oranlarda hazırlanan çözücü tankının içine daldırılmıştır. Bileşenlerin İTK üzerinde aldıkları yola göre ve oluşan bantlara göre antioksidan aktivite yorumu yapılmıştır (Ghafoori vd., 2013; Maksimovi, 2008; Cies'la vd., 2012; Olech vd., 2012).

1.7. Biyoaktif Çalışmalarda Kullanılan Yazıcılar

Günümüzde yaygın olarak kullanılan yazıcıların çalışma mantığı örnek alınarak ve bunlar geliştirilerek tıp ve sanayi alanında kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle üç boyutlu (3D) yazıcılar 1980'lerden beri geliştirilerek kullanılmaktadır. Ama son 10 yılda hayli hızlı bir gelişme göstererek yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Kullanılmaya başlandığı ilk günden itibaren akla gelebilecek her türlü ürünün yanı sıra çok özel ve ilginç ürünler de ortaya çıkararak bu yeni nesil teknoloji, geleceğimizi inanılmaz biçimlerde şekillendireceği düşünülmektedir. Günümüzde 3D yazıcılar ile uçak ve otomobil yedek parçaları, ayakkabı, bisiklet, oyuncak, robot, heykel, takı, aksesuar, el aletleri, müzik aletleri, sandalye, koltuk, bardak, çatal-kaşık, tıbbi malzeme, kimyasal madde, ilaç, takma diş, tıbbi protez hatta silah gibi aklınıza gelebilecek her türden ürünler yapılabilmektedir. Ayrıca 3D yazıcıların tıp sektöründe, biyolojik dokuların ve yapay organ üretiminde hücrelerin tutunabileceği kalıpların hazırlanmasında, kimyasal bileşik veya ilaç üretiminde, biyokimyada çok farklı fonksiyonlara sahip protein moleküllerinin tasarlanmasında, nano teknolojide ve biyomedikal sektöründe ise parça üretiminde kullanılması için çalışmalar yapılmaktadır.

Literatür incelendiğinde bu konuda yapılan çalışmalara rastlanmıştır. Çalışmalarda tam olarak püskürtme yöntemi kullanılarak 3 boyutlu olacak şekilde organ yapılamamış ancak hücreler özel bir zemin üzerine püskürtülerek doku ve kalıp halinde hücre baskılama çalışmaları yapılmıştır (Mironov vd., 2003; Mironov vd., 2011; Melchelsa vd., 2012; Xu vd., 2005; Mironov vd., 2009).

1.8. Renk Analizi ile Biyoaktivite Çalışması

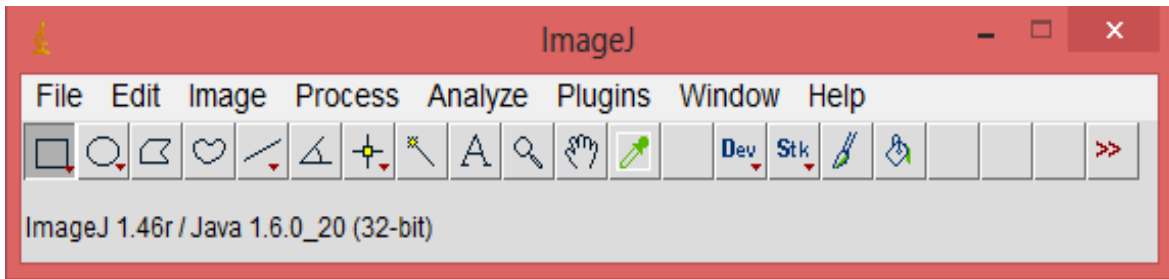
Son yıllarda çalışma sonucunda oluşan görüntülerin bir bilgisayar yada mikroskop ortamına aktararak, çalışma hangi amaçla değerlendirilmek isteniyorsa o amaca uygun bir görüntü analiz programı kullanılarak yapılması yaygınlaşmaktadır (Koga vd., 1997; Lei vd., 1997; Telewski vd., 1999; Yasue vd., 2000; Spiecker vd., 2000; Wang ve Aitken, 2001; Yanez vd., 2001; Fujiwara, 2003; Mayr ve Cochard, 2003). Bu programlar ile görüntülerin analizleri gerek yapısal olarak gerekse renk değeri olarak belirlenmektedir. Genelde ücretli olarak temin edilen programlar yardımıyla maddenin yapısal olarak özellikle partikül boyutunun belirlenmesi ile ilgili çalışmalar mevcuttur (Wernsdörfer vd.,

2004). Ancak renk analizi yaparak maddenin biyoaktivite özelliğinin ortaya konulduğu doğrudan çalışmalar pek olmamakla birlikte yeni gelişim göstermektedir.

Ayrıca fenolik bileşiklerin analizinde kolorimetrik yöntem kullanılarak çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalara örnek olarak Molecularly Imprinted Polymer (MIP) membran üzerinde suyun yapısında bulunan fenolikler bileşikler analiz edilmiştir. Membran üzerinde fenolik bileşenler farklı absorbans değeri göstermiştir. Bu şekilde fenolik bileşikler analiz edilmiştir (Sergeyeva vd., 2010). Diğer bir kolorimetrik çalışma da ise fenol, bisfenol A, katekol ve krisol gibi fenolikleri içeren bileşikler kağıt üzerine entegre edilen bir enzim üzerine numune uygulanmış ve çalışmanın sonunda konsantrasyonun artışıyla renk değerinin orantılı bir şekilde olduğu belirtilmiştir (Ramis vd., 2012).

1.8.1. “Image J” Renk Ölçüm Programı

Son yıllarda görüntülerin bilgisayara aktarılmasını ve bu görüntüler üzerinde ölçüm yapılmasını sağlayan değişik programlar geliştirilmiştir. Bu programlar oldukça pahalı programlardır. Ancak görüntü analizinde kullanılan ve mevcut çalışmada renk analizi için kullandığımız Image J programı ise ücretsizdir. Özellikle ücretsiz oluşu sebebiyle ve farklı alanlarda analiz çeşitliliği sağladığı için birçok bilim dalında kullanılmaktadır. Bu program özellikle cevherlerdeki morfolojik yapıların tanımlanmasında ve partikül boyutlarının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Literatürde Image J programı kullanılarak birçok çalışma yapılmıştır (Schneider vd, 2012; Vaher vd., 2014).



Şekil 5. Image J programının göstergesi

1.9. Çalışılan Bitkiler ve Özellikleri

Yapılan çalışmada Trabzon'daki bir aktardan temin edilen yeşilçay, ıhlamur, sarısabır, havaciva, zerdeçal, ısırgan otu, kantaron, nane, biberiye, ebegümece, rezene ve ekinezya bitkileri kullanılmıştır.

1.9.1. Isırgan Otu Bitkisinin Özellikleri

Isırgan (*Urtica dioica*), ısırgangiller (Urticaceae) familyasının *Urtica* cinsinden, mayıs-ağustos ayları arasında çiçek açan, bir yıllık veya çok yıllık otsu bitki türlerinin ortak adıdır. Isırgan bitkisinin tüm yüzeyini saran ve dokunulduğunda insan tenini yakan ısırıcı tüylerinden dolayı halk arasında ısırgan otu olarak bilinmektedir. Bu bitkinin tüylerinde formik asit ile tüm bitkide histamin, klorofil, asetilkolin, demir ve C vitamini bulunmaktadır. Isırgan otu hemen hemen her hastalık için kullanılan mucizevi bir bitkidir. Isırgan bitkisinin toprak üstü kısımlarının (herba), taşıdığı flavanoid bileşikler, mineral maddeler ve lutein gibi karotenoit bileşikler nedeniyle diüretik etkisi nedeniyle bitkiler arasında önemli bir yere sahiptir. Ayrıca kan temizleyici özelliği olduğundan olduğundan egzama ve bazı mantar hastalıklarına iyi gelmektedir.



Şekil 6. Isırgan Otu (*Urtica dioica*)

1.9.2. Nane Bitkisinin Özellikleri

Nane, ballıbabagiller (Lamiaceae) familyasının *Mentha* cinsini oluşturan bütün dünya'da görülebilen 25-30 türün ortak adıdır. Genellikle temmuz ve ağustos ayları

arasında açan tüylü ve çok kokulu otsu bir bitki cinsidir. Başak biçiminde beyaz, pembe veya morumsu çiçekleri vardır. Yaprak, sap ve çiçeklerinde mentol, menton, jasmon vb. maddeleri içeren uçucu yağ ile tanen, reçine, acı bitki esansı ve bazı organik maddeler bulunmaktadır. Dünyanın tüm ılıman ve az tropikal bölgelerine yayıldığı gibi ülkemizde de 7 türü yetişmektedir. Ayrıca ülkemizde yetiştirilen nanenin eterik yağ bakımından kalitesi oldukça yüksektir. Bitki özellikle C vitamini ve Omega 3 yağ asidi açısından oldukça zengindir. Nane birçok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Tedavisinde kullanıldığı hastalıkların başlıcaları şunlardır: astım rahatsızlığı, mide hastalıkları ve kas ağrıları tedavisi.



Şekil 7. Nane (*Mentha spicata*)

1.9.3. Sarısabır (*Aloe vera*) Bitkisinin Özellikleri

Sarısabır, Asphodelaceae familyasından *Aloe* cinsini oluşturan anavatanı Afrika olan bitki türlerinin ortak adıdır. Yaklaşık 300 türü vardır ve bu türlerden sadece 3-4 türünün şifalı özelliği bulunmaktadır. Bunların içinde en şifalı olarak gösterilen tür *Aloe vera*'dir. Bu bitkinin yapraklarından çıkan jelin şifa özelliği bulunmaktadır. Jel oksijenle temas ettikten sonra bir çeşit oksitlenme yapmakta ve yaklaşık 5 saat içinde şifa özellikleri ortadan kalkmaktadır. Sarısabır serbest ya da glikozit halde antrasen türevleri (aloin ve aloemodin adlı maddeler), uçucu yağ ve reçine içermektedir. Sarısabırdan çıkarılan bu özsu, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Sarısabır safra söktürücüdür. Ayrıca yaraları, düşük şiddetli yanıkları iyileştirir, deri iltihaplanmaları ve egzama durumlarında rahatlama sağlar.



Şekil 8. Sarısabır (*Aloe vera*)

1.9.4. Biberiye Bitkisinin Özellikleri

Biberiye (*Rosmarinus officinalis*), ballıbabagiller (Lamiaceae) familyasından iğneye benzeyen ince yapraklı, daima yeşil kalan bir bitki türüdür. Mor çiçekli ve çalı görünümlü bitkidir. Akdeniz çevresinde yaygın olarak yetişen bitkinin genç sürgünleri baharat olarak, kendisi ise süs bitkisi olarak kullanılmaktadır. Çiçeklerinden biberiye ispiertosu ve kolonya üretmek için esans yapılırken, yapraklarından yağ elde edilir. Ayrıca biberiye sağlık için halk arasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bitki beyin ve kalp gibi hayati organlara daha fazla oksijen taşınmasını sağlar, hafızayı güçlendirir, konsantrasyonu artırır, bağışıklık sistemini güçlendirir, kan dolaşımını artırır ve stresi azaltmaya yardımcı olur.



Şekil 9. Biberiye (*Rosmarinus officinalis*)

1.9.5. Ihlamur Bitkisinin Özellikleri

Ihlamur, ıhlamurgiller (Tiliaceae) familyasından *Tilia* cinsini oluşturan ağaç türlerine verilen addır. Ağaç boyu 20-30 m'ye kadar ulaşabilir. Büyüklüğü 5-10 cm arasında değişen yaprakları genellikle uzun saplıdır. Ihlamur çiçekleri güzel kokuya sahiptir ve içerdiği uçucu yağ, manganez, tanen, ossidaz, saponin, glusid, strol ve C vitamini zenginliğinden dolayı tıbbi alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ihlamur uykusuzluğu ve bağırsak sancılarını giderir. Ayrıca gribal enfeksiyonlara karşı etkilidir ve öksürüğü keser. Ama fazla tüketilmesi iç organlara ve beyne zarar verir.



Şekil 10. Ihlamur (*Tilia argentea*)

1.9.6. Kantaron Bitkisinin Özellikleri

Kantaron (*Hypericum perforatum*), Kılıç otu, Mayasıl otu ve Koyunkıran olarak da bilinir, sarı kantarongiller (Hypericaceae) familyasına dahil bir bitki türüdür. Dünyanın birçok yerinde bulunabilen bir bitkidir. Hiperisin ve psödohiperisin gibi bileşikler bitkinin % 0,05-0,3'ünü oluşturan karakteristik bileşenleridir. Bunun yanında bitkide % 0,9- 5,0 oranında hiperforin ve adhiperforin ile yaklaşık %4 kadar çeşitli flavonoid türevi bileşikler bulunmaktadır. Kantaron soğuk algınlığına iyi gelmekte ayrıca uykusuzluk, gerginlik ve depresyon durumlarının tedavisinde kullanılmaktadır.



Şekil 11. Kantaron (*Hypericum perforatum*)

1.9.7. Ebegümece Bitkisinin Özellikleri

Ebegümecegiller (*Malvaceae*), familyasına ait olan bir bitki türüdür. Yaklaşık olarak 1500 türüyle kutuplar hariç dünyanın her yerinde yayılış gösteren çiçekli bir bitkidir. Yaprakları uzun saplı, yuvarlak ve tüylüdür. Çiçekleri pembe veya leylak rengindedir. Daha çok boğaz ağrıları, diş ve ağız apselerinde gargara olarak kullanımı yaygındır. Protein ve C vitaminince zengindir. İçeriğindeki malvin ve malvidin dolayısı ile diş etleri için plak önleyici ve ağızdaki bakterilere karşı iyileştirici özelliğe sahiptir. Ağız gargaraları, faranjit ve kronikleşmiş bademcik iltihaplanmasına iyi gelir. Bileşiminde % 10 - 15 müshil yapıcı maddeler olduğundan yumuşaklık verir. Ayrıca anfizem, bronşit ve akciğer hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılır.



Şekil 12. Ebegümece (*Malva sylvestris*)

1.9.8. Ekinezya (Kirpi Otu) Bitkisinin Özellikleri

Ekinezya (*Echinacea*) ya da kirpi otu, papatyagiller (*Asteraceae*) familyasına ait bitki cinsidir. Çiçekleri eflatun renğinde ve çok sayıda boru şeklinde çiçeklerden oluşmuş konik bir disk seklindedir. Ekinezya en fazla üretimi Kuzey Amerika olup Kuzeybatı Pasifik, Orta ve Batı Kanada'da yetiştirilmektedir. Eski çağlardan günümüze kadar ilaç olarak kullanılan şifalı bitkidir. Özellikle bağışıklık sistemini desteklemeyle ün salmış bir bitki türüdür. Güçlü antibakteriyel ve anti viral özelliklere sahiptir. Ekinezya beyaz kan hücrelerinin üretimini teşvik ederek immün sistemi destekler. Bunun yanında soğuk algınlığı, bronşit ve egzama gibi hastalıkların tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır.



Şekil 13. Ekinezya (*Echinacea angustifolia*)

1.9.9. Yeşil Çay Bitkisinin Özellikleri

Yeşil çay, *Camellia sinensis* yapraklarından elde edilen çaydır. Yeşil çay yaprakların toplanır toplanmaz kavrulup hızla kurutulması ile elde edilir. Siyah çay kurutulurken oksijenle tepkimeye girer, yeşil çayın ise tepkimeye girmesine izin verilmez. Yeşil çayın kafein oranı siyah çaydan daha düşüktür. Yeşil çay fazla işlem görmediği için antioksidanca oldukça zengin bir içeriğe sahiptir. Bu sebeple başta kanser hastalığı olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Yeşil çay ayrıca bağışıklık sistemini güçlendirdiği, metabolizmayı hızlandırdığı, kolesterolü düşürdüğü ve kalp hastalıklarına iyi geldiği için halk arasında yaygın olarak tüketilmektedir.



Şekil 14. Yeşil Çay (*Camellia sinensis*)

1.9.10. Zerdeçal Bitkisinin Özellikleri

Zerdeçal (*Curcuma longa*), zencefilgiller (Zingiberaceae) familyasından sarı çiçekli, büyük yapraklı, çok yıllık otsu bir bitki cinsidir. *Hint safranı* olarak da bilinir. Anavatanı Güney Asya'dır. Başta Pakistan, Hindistan, Çin ve Bangladeş olmak üzere Asya'nın tropik bölgelerinde yetişir. Bitkinin toprak altındaki ana kökleri yumurta veya armut şeklindedir. Yan kökleri ise parmak şeklindedir. Acımsı bir tadı vardır. Zerdeçal, ipek kumaşlar ve ince derilerin boyanmasında ve kına yapımında da renklendirici olarak kullanılmaktadır. Baharat olarak kullanılması için, zerdeçal bitkisinin temizlendikten sonra suda kaynatılıp kurutulmuş, koyu sarı renkli kök saplarının öğütülmesi gerekir. Bu şekilde elde edilen baharat safran yerine de kullanılır. Etken maddesi kurkumindir. Antioksidan etkisi oldukça yüksektir. Bir çok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle kanser ve verem gibi hastalıkların tedavisinde, ayrıca soğuk algınlığı, safra kesesi ve karaciğer hastalıklarında da kullanılmaktadır.



Şekil 15. Zerdaçal (*Curcuma longa*)

1.9.11. Rezene Bitkisinin Özellikleri

Rezene (*Foeniculum vulgare*), maydanozgiller (*Apiaceae*) familyasından olup, iki yıllık kokulu otsu bir bitki türüdür. Akdeniz ve Yakın Doğuda yetişmektedir. Rezene bitkisinin baharatı yapraklarından, ya da kurutulmuş tohumlarından elde edilebilmektedir. Rezene bitkisinin birçok faydası bulunmaktadır. Özellikle halk arasında rezene, çay olarak tüketilmektedir. Rezene vitamin ve mineral açısından oldukça zengindir. Bağışıklık sisteminin kuvvetlenmesinde, kötü huylu kolesterolün düşürülmesinde ve mide hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.



Şekil 16. Rezene (*Foeniculum vulgare*)

1.9.12. Havaciva Bitkisinin Özellikleri

Havaciva (*Alkanna tinctoria*), köklerinden kırmızı renkli boya maddesi elde edilen bir hodangiller (*Boraginaceae*) familyası türüdür. 10-30 cm uzunluğunda mavi çiçekli ve çok yıllık otsu bir bitkidir. Akdeniz bölgesinde yetişmektedir. Türkiye’de havaciva bitkisinin üç çeşidi bulunmakta ve yaygın olarak Süphan dağında yetişmektedir. Özellikle tekstil alanında köklerinden kırmızı boya elde edilmektedir. Aynı zamanda havaciva egzama, yanık ve yaraların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.



Şekil 17. Havaciva (*Alkanna tinctoria*)

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Cihazlar

Deneysel çalışmalarda kullanılan madde ve malzemeler KTÜ Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarlarından temin edilmiştir. Kullanılan cihazlar ve satın alındıkları firmaları gösteren bilgiler Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Markaları

| Cihaz Adı | Markası |
|--|---|
| Mikropipet | Gilson (10-100 µL)/ (100-1000 µL) |
| Mikropipet | Genex Beta (10-100 µL) |
| Mikropipet | Transferpette, Brand (100-1000 µL) |
| Çoklu pipet | Socorex Acura 855 autoclavable 20-200 µl |
| İTK tabaka | İTK Silika gel 60 ve İTK Silika gel 60 F ₂₅₄ |
| UV-vis spektrofotometre | ATİ Unicam UV2 |
| pH metre | Hanna pH 211 |
| Rotary evaporatör (Döner vakum buharlaştırıcısı) | Bibby R100 |
| Su banyosu | Bibby R100B |
| Analitik terazi | Mettler Toledo MS204 |
| Isıtıcıli magnetik karıştırıcı | Heidolph/MR 3001 K Hei-standard |
| Buzdolabı (+4 °C) | Arçelik |
| Öğütücü (Blender) | Waring Commercial Blender |
| Vorteks karıştırıcı | IKA® Vortex Genius 3 |
| Santrifüj | Universal 320 R Hettich/Zentrifugen |
| Etüv | Binder ve Nüve FN 120 |
| Filtre | RC 0,45 µm |
| Bitki kurutma dolabı | Buzdolabı modifiye edilerek yapılmış |
| HP tarayıcı | HP Deskjet Ink Advantage 2060 |

2.2. Kullanılan Kimyasallar

Denemelerde kullanılan kimyasallar ve satın alındıkları firmaların ticari adları Tablo 3’te verilmiştir.

Tablo 3. Kimyasallar ve Satın Alındıkları Firmalar

| Madde Adı | Firması | Madde Adı | Firması |
|---------------------|----------------|-------------------|----------------|
| Gallik asit | Sigma- Aldrich | DPPH | Sigma-Aldrich |
| Kafeik asit | Sigma- Aldrich | TPTZ | Sigma- Aldrich |
| Klorojenik asit | Sigma- Aldrich | FeCl ₃ | Sigma- Aldrich |
| Gentisik asit | Sigma- Aldrich | Trolox® | Sigma- Aldrich |
| Siringik asit | Sigma- Aldrich | NaOH | Merck |
| Protokatekhuik asid | Sigma- Aldrich | Metanol | Merck |
| Kuersetin | Sigma- Aldrich | Asetik asit | Merck |
| Kateşin | Sigma- Aldrich | Etanol | Merck |
| Rutin | Sigma- Aldrich | Etil Asetat | Merck |
| Ferulik asit | Fluka | Metanol | Merck |
| BHT | Merck | HCl | Merck |

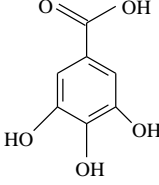
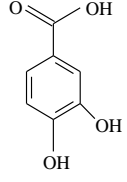
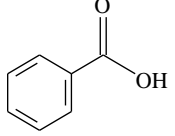
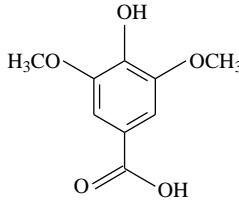
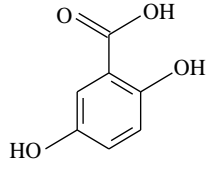
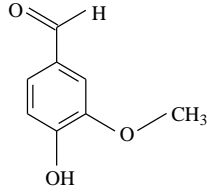
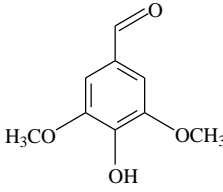
2.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

Deneysel çalışmalarda kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları Tablo 4’te verilmiştir.

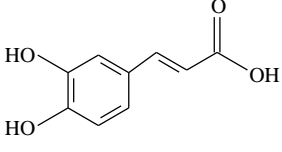
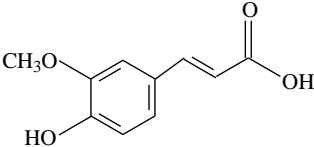
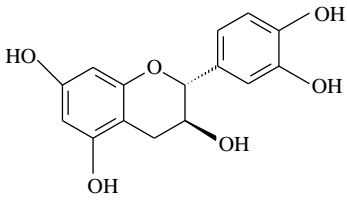
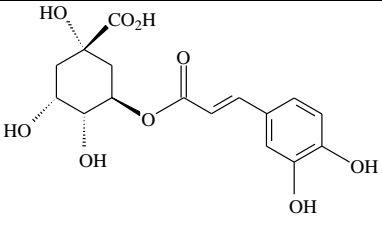
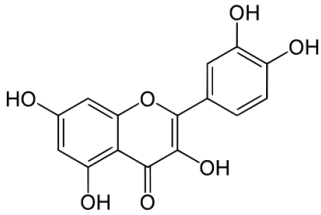
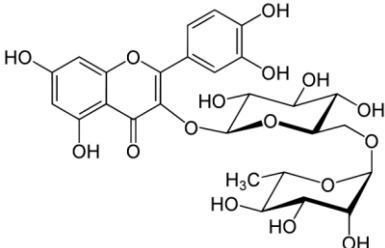
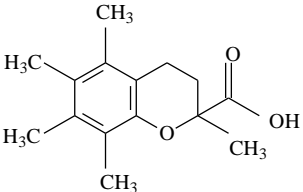
Tablo 4. Kullanılan Bazı Çözeltiler ve Bu Çözeltilerin Hazırlanışı

| Çözelti | Hazırlanışı |
|---|---|
| 2000 µM DPPH reaktifi | 39,44 mg DPPH 50 mL metanolde çözülür. |
| 300 mM Asetat tamponu (A) (%60 metanollü) | 0,690 µL der. (%99,5’lik) asetik asite 24 mL metanol ve 16 mL saf su eklenir. 0,1 M NaOH çözeltisi ile pH 3,6’ya ayarlanır. |
| 0,1 M NaOH | 0,100 g NaOH 25 mL saf suda çözülür. |
| 10 mM TPTZ (B) | 0,0125 g TPTZ önce 1600 µL 100 mM HCl’de çözülür, sonra hacim metanolla 4 mL’ye tamamlanır. |
| 100 mM HCl | 82 µL der. (%37’lik) HCl 10 mL’ ye saf su ile tamamlanmıştır. |
| 20 mM FeCl ₃ (susuz) (C) | 0,0130 g FeCl ₃ önce 1600 µL saf suda çözülür, sonra hacim metanolla 4 mL’ye tamamlanır. |
| Metanolik FRAP reaktifi | A, B ve C çözeltileri sırasıyla; 10:1:1 oranında karıştırılır. (FRAP reaktifi taze hazırlanmalıdır). |

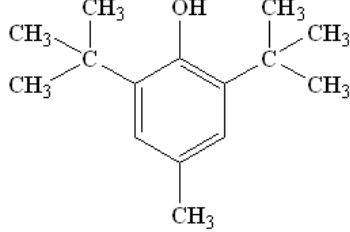
Tablo 5. Çalışmada Kullanılan Standartların Molekül Şekilleri ve Ağırlıkları

| | Standartın Adı | Standartın Molekül Şekli | Standartın Molekül Ağırlığı (g/mol) |
|---|--------------------|---|-------------------------------------|
| 1 | Gallik asit |  | 170,12 |
| 2 | Protokatekuik asit |  | 154,12 |
| 3 | Benzoik asit |  | 122,12 |
| 4 | Siringik asit |  | 180,12 |
| 5 | Gentisik asit |  | 154,12 |
| 6 | Vanilin |  | 152,15 |
| 7 | Şiringaldehit |  | 182,18 |

Tablo 5'in devamı

| | | | |
|----|-----------------|--|---------|
| 8 | Kafeik asit |  | 198,17 |
| 9 | Ferulik asit |  | 194,19 |
| 10 | Kateşin |  | 290,27 |
| 11 | Klorojenik asit |  | 354,31 |
| 12 | Kuersetin |  | 302,236 |
| 13 | Rutin |  | 610,52 |
| 14 | Troloks |  | 250,29 |

Tablo 5'in devamı

| | | | |
|----|-----|--|--------|
| 15 | BHT |  | 220,55 |
|----|-----|--|--------|

2.4. Bitkilerin Temini ve Ekstraktların Hazırlanması

Çalışmada kullanılacak numuneler seçilirken daha önce laboratuvarımızda yapılan münferit çalışmalarda antioksidan aktivite gösteren ve literatürde sıklıkla çalışılan numuneler tercih edilmiştir. Ayrıca renk ölçümü yapacağımız için seçilen bitki ekstraktlarının farklı renklere sahip olabilecek bitkiler olmasına dikkat edilmiştir. Çalışmada kullanılan yeşil çay, ıhlamur, havaciva, nane, biberiye, zerdeçal, kantaron, sarısabır, ısırgan otu, ebegümece, rezene ve ekinezya bitkileri 2013 yılında Trabzon' daki bir aktardan satın alınmıştır. Aktardan öğütülerek satın alınan toz halindeki bitkiler, tam olarak kuruması için bitki kurutma ünitesinde 30 °C'de yaklaşık 10 saat boyunca belli aralıklarla karıştırılarak kurutulmuştur. Tamamen kurutulmuş bu bitkilerin her birinden 10'ar g alınarak 100 mL çözücü ile iki saat süreyle magnetik karıştırıcı kullanılarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon işlemi sonunda bitki ekstraktları öncelikle adi süzgeç kağıdından süzildikten sonra ikinci aşamada mavi süzgeç kağıdından süzülmüştür. Ekstraktların daha berrak olması için son olarak şırınga yardımıyla filtreden (Minisart NY 25, NY 0.45 µm) geçirilerek, ekstraktlar analiz yapılana kadar oda sıcaklığında, serin ve karanlık bir ortamda bekletilmiştir.

Çalışmada kullanılan standartlar (gallik asit, protokatekuik asit, kafeik asit, kateşin, gentsik asit, şiringik asit, BHT, Troloks, klorojenik asit, kuersetin, rutin, vanilin, benzoik asit ve ferulik asit) ise yapılacak çalışmaya göre farklı konsantrasyonlarda metanol çözücüsü ile hazırlanmıştır.

2.5. Antioksidan Standartların ve Bitki Ekstraktlarının Antioksidan Aktiviteleri

Literatürde mevcut birçok çalışmada, çalışmamızda kullanılan standartların ve bitki ekstraktlarının yüksek antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Re vd., 1999; Vinson vd., 1995). Aynı zamanda laboratuvarımızdaki çeşitli araştırmalar ve münferit çalışmalarda bu duruma eşdeğer sonuçlar göstermiştir. Çalışmadaki standartlar ve numunelerin klasik yöntemlerle (spektrofotometrik) DPPH[•] (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikal temizleme ve FRAP (Fe(III) İndirgeme/Antioksidan Gücü) değerleri üzerinden antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Diğer yandan yeni geliştirilen metod ile de spektrofotometrik yöntemde olduğu gibi DPPH[•] radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) temizleme ve FRAP (Fe(III) İndirgeme/Antioksidan Gücü) yöntemleri uygulanmıştır. Bu yeni yöntemde farklı konsantrasyondaki antioksidan aktivite gösteren standartlar ve bitki ekstraktları İTK tabaka üzerine damlatılmış ve daha sonra İTK tabaka üzerinde reaktif ile etkileşim sonunda oluşan renk değerleri bir renk ölçüm programı yardımıyla değerlendirilmiştir.

2.5.1. DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi

Çalışmamızda antioksidan standartlar ve bitki ekstraktlarında Cuendet vd. (1997) tarafından geliştirilen DPPH yöntemi uygulanmıştır. DPPH[•] radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak satın alınabilen bir radikal olup, çalışmamızda satın alınan bu radikalin 2000 µM'lık metanolik çözeltisi kullanılmıştır.

2.5.1.1. Antioksidan Standartlar ve Bitki Ekstraktlarında Spektrofotometrik Yöntemle DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini

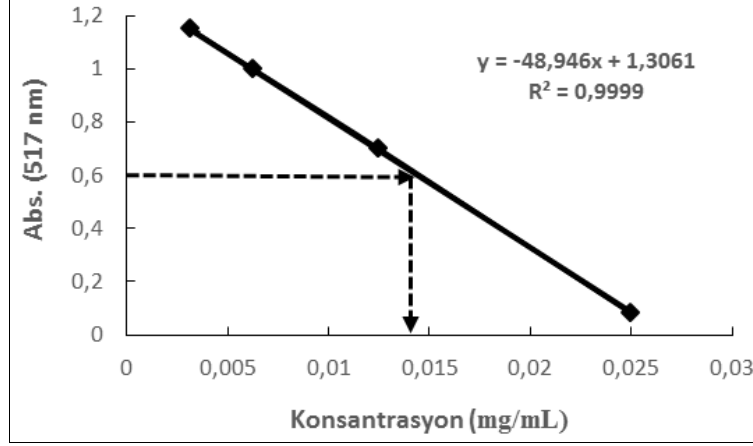
Analiz için kullanılan bitki ekstraktlarında (yeşil çay, ıhlamur, zerdeçal, havaciva, nane, yeşil çay (çözücüsü EtAc), sarısabır, biberiye ve kantaron) ve antioksidan standartlarda (gallik asit, şiringik asit, kateşin, kuersetin, ferulik asit, protokatekuik asit, klorojenik asit, rutin, kafeik asit ve BHT) 2000 µM'lık DPPH çözeltisi ile ön denemeler yapılarak farklı konsantrasyonlara sahip stok çözeltileri hazırlanmıştır. Her biri için belirlenen başlangıç (stok) konsantrasyonlarından başlayarak 1:1 oranında seyreltmek suretiyle 5 farklı konsantrasyonda ve iki paralel olacak şekilde deney tüplerine pipetlemeler yapılmış ve tüplerdeki çözeltiler üzerine eşit hacimlerde (750 µL) DPPH[•]

çözültisi aktarılmıştır. Tüplerde ki karışımlar vorteks yardımıyla homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda karışımlar 10 kat metanol çözücüsü ile seyreltikten sonra spektrofotometre ile DPPH'nin maksimum absorbans gösterdiği 517 nm'de absorbansları belirlenmiştir. Belirlenen bu absorbans verileri Microsoft Excel programı kullanılarak grafikler çizilmiş ve bu grafiklerden her bir antioksidan standartlar ve bitki ekstraktları için SC_{50} değerleri mg/mL cinsinden hesaplanmıştır.

2.5.1.1.1. SC_{50} Değerlerinin Bulunması

SC_{50} , radikal miktarını/absorbansını yarıya indiren numune konsantrasyonudur. SC_{50} değerinin bulunması için farklı konsantrasyonlarda çalışmak gerekir. Bu nedenle çalışmalarda en az 3 farklı konsantrasyonda ölçüm yapılmıştır. Numuneler yeterli miktarlarda farklı konsantrasyonlarda hazırlanıp absorbans ölçümleri yapılmış ve absorbanslar konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmiştir. Grafikten maksimum absorbansın yarısına karşılık gelen yani absorbansı yarıya düşüren konsantrasyon miktarı SC_{50} (temizleme konsantrasyonu) değerini vermektedir. SC_{50} değeri mg/mL veya μ M gibi birimlerle ifade edilebilmektedir. SC_{50} değeri ile antioksidan aktivite arasında ters orantı bulunmaktadır. Yani SC_{50} değeri ne kadar küçükse antioksidan aktivite o kadar büyüktür. Bu durumun tersi de doğrudur.

Numunelere ait SC_{50} değerleri; artan numune konsantrasyonuna karşı 517 nm'deki absorbanslar Microsoft Excel programında grafiğe geçirilerek elde edilen grafik denklemlerinden hesaplanmıştır. Aşağıda "A" standardı için elde edilen absorbans/konsantrasyon grafiğinden SC_{50} değerinin nasıl hesaplandığı gösterilmiştir.



Şekil 18. Farklı konsantrasyondaki A standardının 517 nm’de verdiği absorbans değerlerinin grafiğinden SC₅₀ değerinin hesaplanması (SC₅₀ = 0,0146 mg/mL)

2.5.1.2. Antioksidan Standartlar ve Bitki Ekstraktlarında Damlatma Yöntemi ile DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini

DPPH radikal temizleme aktivitesi tayini için geliştirilen bu yeni yöntemde spektrofotometre ile yapılan tayinde kullanılan antioksidan standartlar ve bitki ekstraktları (numuneler) kullanılmıştır. Damlatılarak yapılan DPPH testinde farklı konsantrasyonlarda hazırlanan antioksidan standartlar ve numuneler spektrofotometrik metotta olduğu gibi 750 µL olacak şekilde ve her biri 1:1 oranında seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda tüplere aktarılmış ve üzerlerine eşit hacimde DPPH çözeltisi (2000 µM) ilave edilmiştir. Tüpteki karışımlar karıştırıcı ile karıştırıldıktan sonra 60 dk. inkübasyona bırakılmış ve bekleme süresi sonunda 3 paralel olacak şekilde İTK tabaka üzerine damlatılmıştır. Standartların numune körleri renksiz oldukları için İTK plaka üzerinde renk değişimi göstermemişlerdir. Bu sebeple standartların kör denemeleri bu yeni yöntem ile değerlendirilememiştir. Bitki ekstraktları ise renkli oldukları için onlarda numune körü (numune + çözücü) çalışması da yapılmıştır. Bitki numunelerinin renkleri değerlendirilirken, DPPH radikali reaksiyonu sonucu oluşan renk değerlerinden bitkiden gelen renk değerleri yani kör değerleri çıkartılıp sonuçlar bu şekilde değerlendirilmiştir. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra İTK tabakanın üzerindeki spotların kuruması için 5 dk. oda sıcaklığında beklettikten sonra HP Deskjet Ink Advantage 2060 yazıcısının tarayıcı kısmıyla çeşitli renk ayarları yapılarak (parlaklık -100 ve karışıklık 85) resim olarak (JPEG) kaydedilmiştir. Kaydedilen bu görüntüler Image J programı yardımıyla her bir paralelin renk değeri belirlenerek Excel

programın da ortalamaları alınıp, grafikleri çizilmiştir. Oluşan bu renk değeri-konsantrasyon grafiklerinden CSC_{50} değerleri hesaplanmıştır.

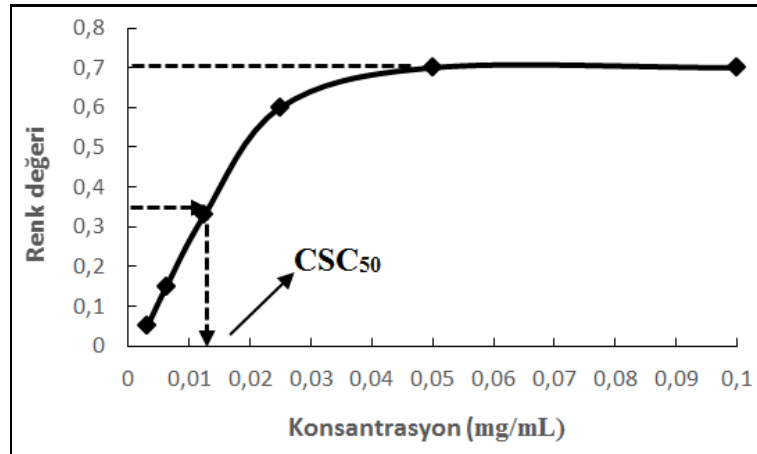
2.5.1.2.1. CSC_{50} Değerinin Hesaplanması

CSC_{50} renk değerini (yoğunluğunu) yarıya düşüren, numune konsantrasyonu olarak tanımlanabilir. SC_{50} değeri hesaplanırken olduğu gibi CSC_{50} değerini hesaplariken de farklı konsantrasyonlarda çalışmak gerekir.

Çalışmada numunelerin yeterli miktarda farklı konsantrasyonu hazırlanıp renk ölçümleri yapılır ve renk değerleri konsantrasyona karşı grafiğe geçirilir. Grafikten maksimum renk değerinin yarısına karşılık gelen yani renk değerini yarıya düşüren konsantrasyon miktarı CSC_{50} değerini vermektedir.

2.5.1.2.1.1. Doğrudan CSC_{50} Değerinin Hesaplanması Yöntemi

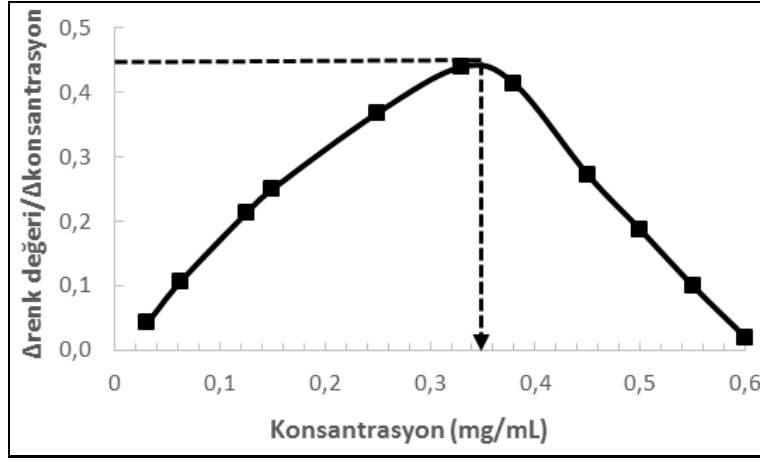
CSC_{50} maksimum renk değerini (yoğunluğunu) yarıya düşüren, numune konsantrasyonudur. Aşağıdaki grafikte bir “B” standardı” için CSC_{50} değerinin hesaplanması gösterilmiştir.



Şekil 19. Farklı konsantrasyondaki B standardının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiğinden CSC_{50} değerinin hesaplanması ($CSC_{50} = 0,013$ mg/mL)

2.5.1.2.1.2. Türev Alınarak CSC₅₀ Değerinin Hesaplanması Yöntemi

Standart ve numunelerin CSC₅₀ değerleri hesaplanırken hepsinin 1. dereceden türevi alınarak yani renk değerlerinin farkının konsantrasyon farkına bölünmesiyle ($\Delta_{\text{renk değeri}} / \Delta_{\text{konsantrasyon}}$) elde edilmiştir. Aşağıdaki grafikte “C” standardının 1. dereceden türevi alınarak elde edilen değerlere karşılık konsantrasyon grafiğinden CSC₅₀ değerinin nasıl hesaplandığı gösterilmiştir.



Şekil 20. Farklı konsantrasyondaki C standardının türev formülü kullanılarak CSC₅₀ değerinin hesaplanması (CSC₅₀ = 0,35 mg/mL)

2.5.1.3. Standartların ve Bazı Bitki Ekstraktlarının DPPH Testindeki Reaksiyon Kinetikleri

2.5.1.3.1. Standartların DPPH Testindeki Reaksiyon Kinetiği

DPPH radikali ile birçok antioksidan standartlar kullanılarak, hem laboratuvarımızdaki münferit çalışmalarda hem de literatürde yapılmış kinetik çalışmalar mevcuttur. Çalışmamızda bazı standartlar (gallik asit, Troloks, kateşin, kuersetin, rutin, BHT, protokatekuik asit, şiringik asit, ferulik asit, klorojenik asit, gentsik asit ve kafeik asit) kullanılarak, bu standartların optimize edilen 2000 μM konsantrasyondaki DPPH radikali ile verdikleri kinetik değerler karşılaştırılarak, reaksiyonun tamamlanma süresi optimize edilmiştir.

Bunun için daha önce spektrofotometre ile absorbansları ölçülüp SC_{50} değerleri belirlenen yukarıdaki paragrafta belirtilen standartlar bu SC_{50} değerlerinde hazırlanarak, tüplerde birebir oranında DPPH radikali ile karıştırıldıktan sonra her bekleme süresi dolduğunda 10 kat seyreltilerek belirli aralıklarla (0-120 dk.) absorbans değerleri okunmuştur. Çalışmada DPPH radikali çok yüksek konsantrasyonda çalışıldığı için bu konsantrasyonda absorbans değeri 2 ve üzerinde çıkmaktadır. Bu sebeple reaksiyon bu konsantrasyonda gerçekleştirilmiş ancak okuma yapılırken çözücü (metanol) ile 10 kat seyreltilip o şekilde absorbansları belirlenmiştir. Daha sonra belirlenen absorbans değerleri kullanılarak süreye karşı reaksiyon kinetiği grafikleri çizilmiştir. Çalışma sonunda reaksiyonun gerçekleşme süresi bu kinetik çalışma ile belirlenip, bütün çalışmalarda bu süre kullanılmıştır.

2.5.1.3.2. Bazı Bitki Ekstraktlarının DPPH Testindeki Reaksiyon Kinetiği

Standartların kinetik çalışması tamamlandıktan sonra, genel olarak bitki ekstraktlarının reaksiyon kinetiğini nasıl etkilediğini görmek amacıyla 3 metanolik bitki ekstraktı ile çalışma yapılmıştır. Bu üç bitki seçilirken, daha önce spektrofotometrik yöntem ile antioksidan aktiviteleri belirlenmiş olan numuneler arasından antioksidan aktivitesi yüksek, orta ve düşük olan bitkilerden birer tane ile yapılmıştır. Seçilen numunelerden en yüksek aktiviteye sahip olan yeşil çay 0,18 mg/mL, orta derecede aktiviteye sahip olan zerdeçal 0,38 mg/mL ve düşük aktivite de olan sarısabır 4,02 mg/mL konsantrasyonlarında çalışılmıştır. Standartlar ile yapılan kinetik çalışmasında olduğu gibi yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda hazırlanan numuneler ile 2000 μ M konsantrasyonda ki DPPH radikali 1:1 oranında karıştırılmış ve bekleme süresi dolduğunda 10 kat seyreltilerek, belirli aralıklarla (0-120 dk.) absorbans değerleri okunmuştur. Daha sonra bu absorbans değerleri süreye karşı grafiklere geçirilerek, her biri için reaksiyon kinetiği grafikleri çizilmiştir.

2.5.1.4. Yeni Geliştirilen Damlatma Yöntemi ile DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini İçin Yapılan Optimizasyonlar

2.5.1.4.1. Tarayıcı ve Renk Ölçüm Programının (Image J) Özelliklerinin Optimizasyonu

Çalışmanın tamamı HP Deskjet Ink Advantage 2060 yazıcısı ve bu yazıcının tarayıcı kısmı kullanılarak yürütülmüştür. Yeni geliştirilen damlatma ve püskürtme çalışmaları çeşitli kağıtlar üzerinde denenmiş fakat çok iyi sonuç alınamamıştır. Bunun için geliştirilen yeni antioksidan yöntemler İTK tabaka (silika gel 60 ve silika gel F₂₅₄) ile yürütülmüştür. Damlatma ve yazdırma sonucu tabaka üzerinde oluşan renkler ise renk ölçüm programı olan Image J programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Yapılan ön denemeler ile İTK tabaka üzerindeki oluşan spotların, hacimlerine göre en uygun renk ölçüm alanının DPPH testi için 1572 ve FRAP testi için ise 2100 olmasına karar verilmiştir. Bundan sonraki bütün çalışmalarda da her test için belirlenen değerler kullanılarak Image J programı ile renk değerleri ölçülüp, grafiklere geçirilmiştir.

Tarayıcı ayarları sürekli değiştirilerek, yapılan ön denemeler sonucunda en iyi görüntüyü verdiği için parlaklık -100 ve karşıtlık 85 olarak belirlenmiştir. Çalışmada tarayıcı ile kaydedilen bütün görüntüler (İTK tabaka üzerindeki) bu özelliklerde ayarlanıp kaydedilmiştir. DPPH ve FRAP testinin her ikisinde de bu ayarlara göre renk değerleri belirlenmiştir.

2.5.1.4.2. DPPH• Radikalinin Çalışma Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Yeni damlatma metodu için öncelikle, aynı şartları sağlamak adına DPPH konsantrasyonu optimize edilmiştir. Bu amaçla DPPH radikali 50-2000 µM konsantrasyon aralıklarında eş konsantrasyondaki gallik asit ve Troloks standartları ile birebir oranında karıştırılarak, 60 dakika inkübasyon süresinin tamamlanması sonrasında üç paralel şekilde İTK tabaka üzerine damlatılmıştır. İTK tabaka 5 dk. oda sıcaklığında kurumaması için bekletildikten sonra taratılarak resim olarak kaydedilmiştir. İTK plaka üzerindeki renk değerleri belirlendikten sonra üç paralelin renk değerlerinin ortalaması alınarak grafikler çizilmiştir. Çizilen konsantrasyon-renk değeri grafiklerinden DPPH radikalinin en iyi

görüntü verdiği konsantrasyon belirlenmiştir. Bu şekilde belirlenen DPPH konsantrasyonu bundan sonra yapılan bütün çalışmalarda kullanılmıştır.

2.5.1.4.3. Damlatma Hacminin (Damla Hacminin) Belirlenmesi

DPPH radikalinin hangi konsantrasyonu ile çalışılacağı belirlendikten sonra damlatma işlemi yapılırken damla hacminin yani mikropipet ile pipetlenecek miktarın belirlenebilmesi için denemeler yapılmıştır. Çalışma, optimize edilen DPPH konsantrasyonunda ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Troloks standardı ile yapılmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki (25-1500 μ M) Troloks standardı eşit miktardaki DPPH radikali ile deney tüplerinde karıştırılmış ve inkübasyon süresinin (60 dk.) tamamlanması sonunda 3'er paralel olacak şekilde farklı hacimlerde (5-10-15-20-30-50-100 μ L) bir mikropipet (10-100 μ L) yardımıyla İTK tabaka üzerine damlatılmıştır. İTK tabaka kuruduktan sonra taratılmış ve veriler resim olarak kaydedilmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda damlatma hacmi belirlenmiş ve çalışmaların hepsinde bu damlatma hacmi kullanılmıştır.

Damlatma hacminin belirlendiği bu çalışmanın yanında kaydedilen görüntüler ile başka bir çalışmada yapılmış, bu çalışmada kaydedilen görüntüler iki şekilde değerlendirilmiştir. İTK tabaka üzerinde oluşan spotlar Image J programının ayarlarından halka hacmi 1572 olacak şekilde seçilmiştir. Renk değerleri okunurken bir çalışmada bütün spotların tam orta kısımlarının renk değerleri okunmuş, diğer çalışmada ise her spotun rastgele bölgelerinin renk değerleri okunmuştur. Yapılan bu iki çalışmanın verilerinin konsantrasyon-renk değeri grafikleri çizilerek sonuçları karşılaştırılmıştır.

Yapılan bu çalışma sonunda hem en iyi damla hacmi belirlenmiş hem de farklı hacimlerde oluşan bu spotların renk değerlerinin nasıl okunacağı belirlenmiştir. Bu değerlendirmeler sonucunda hem kullanılan kimyasal miktarını en aza indirmek hem de renk değerinin en iyi belirlenebileceği hacim olması açısından damlatma hacmi optimize edilmiştir.

2.5.1.4.4. Reaksiyonun Gerçekleşme Ortamının Belirlenmesi

Kinetik çalışma ile reaksiyon süresi belirlendikten sonra reaksiyonun gerçekleşmesi için hangi ortamda olması gerektiği belirlenmiştir. Bu çalışma için belirlenen konsantrasyondaki DPPH radikali ile 0,5-20 mM konsantrasyonlarında hazırlanan şiringaldehit standardı kullanılmıştır. Bunun için yapılan ilk çalışmada yaygın olarak uygulanan spektrofotometrik yöntemdeki gibi reaksiyon tüp içinde gerçekleşmiş ve inkübasyon süresi dolduktan sonra İTK tabaka üzerine damlatılmıştır. Belirli aralıklarla (0-60 dk.) yeniden damlatılıp kaydedilmiştir. Dolayısıyla İTK dolgu maddesinin (silika) reaksiyona etkisi olmamıştır. Diğer çalışmada ise farklı konsantrasyonlardaki şiringaldehit standardı reaktifle tüpte karıştırıldıktan hemen sonra İTK tabaka üzerine damlatılmıştır. Bu İTK tabaka aynı ilk çalışmadaki gibi belirli sürelerle taratılmış ve kaydedilmiştir. Yapılan ikinci çalışmada reaksiyon tamamen İTK tabaka üzerinde gerçekleşmiş ve bu duruma İTK dolgu maddesinin etkisinin olup-olmadığı tespit edilmiştir.

2.5.1.5. Farklı Özellikteki İTK'ların Reaksiyona Etkisi

İTK farkının reaksiyona etkisi incelenirken laboratuvarımızda bulunan iki farklı özellikteki İTK Silika gel 60 ve İTK Silika gel 60 F₂₅₄ tabakaları kullanılmıştır. Çalışma 2000 µM konsantrasyonunda DPPH radikali ile farklı konsantrasyondaki (0,5-20 mM) şiringaldehit standardı ile yapılmıştır. Farklı konsantrasyondaki metanolik şiringaldehit çözeltilerinden tüplere 750'şer µL aktarıldıktan sonra üzerlerine eşit miktarda DPPH radikali (750 µL) ilave edilmiştir. Çalışmada farklı İTK'ların reaksiyonu nasıl etkilediğinin yanı sıra reaksiyonun gerçekleşme (İTK üzerinde ve tüpte) ortamının farklılıkları da belirlenmiştir. Bunun için belirli aralıkla (0-60 dk.) hem tüplerde bekletilerek damlatılmış hem de İTK tabaka üzerinde bekletilerek, bu iki farklı İTK tabaka ile çalışmalar yapılmıştır. Tüplerde bekletilen çözeltilerin her bekleme süresi sonunda tüplerden 15'şer µL alınarak üç paralel olacak şekilde her iki farklı özellikteki İTK tabaka üzerine damlatılmıştır. İTK tabakalar 5 dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakıldıktan sonra tarayıcı ayarları yapıp kaydedilmiştir. İTK tabaka üzerinde beklemede ise standart ve DPPH radikali tüplerde karıştırıldıktan sonra 15'şer µL alınarak hemen üç paralel olacak şekilde her iki farklı özellikteki İTK tabaka üzerine damlatılmış ve belirli aralıklarla (0-60

dk.) taratılmış sonuçlar gerekli ayarlar yapıldıktan sonra Image J programı kullanılarak renk değerleri belirlendikten sonra grafikler çizilmiştir.

2.5.2. Demir (III) İndirgeme/ Antioksidan Güç (FRAP) Tayini

1986 yılında Oyaizu tarafından kullanılan yöntemle göre indirgeme kuvveti, numunelerin dolaylı olarak toplam indirgeme potansiyelini göstermekte olup $Fe^{+3} \rightarrow Fe^{+2}$ indirgenmesi ile meydana gelen Fe^{+2} , 595 nm'de absorbanı veren $K_3(Fe)CN_6$ renkli kompleksini oluşturur. Bu yöntem daha sonraları TPTZ kullanılmasıyla geliştirilmiştir (Benzie ve Strain, 1996).

2.5.2.1. Standartlar ve Bitki Ekstraktlarında Spektrofotometrik Yöntem ile Demir (III) İndirgeme/ Antioksidan Güç (FRAP) Tayini

FRAP tayininde çalışılan standartların (benzoik asit, vanilin, kateşin, ferulik asit, klorojenik asit, BHT, şiringik asit, protokatekuik asit, kafeik asit ve gallik asit) ve numunelerin (ısırgan otu, ebegümece, rezene, sarısabır, ıhlamur, ekinezya, kantaron, yeşil çay, havacıva, zerdeçal, nane ve biberiye) farklı konsantrasyondaki metanolik çözeltileri kullanılmıştır. Ayrıca çözücü etkisinin de görülebilmesi adına metanolik ekstraktların yanı sıra yeşil çay, ısırgan otu ve ıhlamur bitkilerinin etil asetat ekstraktları da hazırlanmıştır. FRAP testi için yapılan ön denemeler baz alınarak bütün standartlar 400 μ M konsantrasyonunda ve bitki ekstraktları ise 1mg/mL konsantrasyonunda çalışılmıştır.

Standart kalibrasyon grafiğini elde etmek için antioksidan madde olan Troloks 5 farklı konsantrasyonda seyreltilerek (1000 - 500- 250- 125- 62,5 μ M) çalışılmıştır.

Numune (bitki ekstraktları) ve standart çözeltileri için hazırlanan deney tüplerine üç paralel olacak şekilde önce 50'şer μ L numune ya da standart çözeltileri aktarılmıştır. Reaktif körü tüplerine numune yerine 50'şer μ L çözücülerini (metanol ve etil asetat) aktarılmıştır. Numune körü tüplerine ise 50'şer μ L numune ya da standart çözeltileri aktarıldıktan sonra FRAP reaktifi yerine FRAP çözücüsü olan %60 metanollü saf su (1,5 mL) ilave edilmiştir. Sonrasında; numune körü tüpleri dışındaki tüm tüplere 20 saniye aralıklarla tek tek 1,5 mL taze olarak hazırlanmış FRAP reaktifi eklenerek, vortekslenmiş ve 20 dakika bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda ilk pipetlenen tüpten başlanarak 20.

dakikası dolan tüp alınıp plastik küvete aktarılmış ve absorbans değerleri 595 nm’de okunmuştur.

Sonuçlar, indirgeme potansiyeli yüksek ve aynı zamanda standart antioksidan madde olan Troloks ile karşılaştırılarak μM Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) cinsinden hesaplanarak yorumlanmıştır. Bunun için de bazı hesaplamalar yapılmıştır: Standart ve numune çözeltilerinin farklı konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerleri spektrofotometrik olarak ölçülüp (595 nm’de), değerler Microsoft Excel programına geçirilerek her bir standart grafik denkleminde ($y=ax+b$) yararlanılarak μM TEAC değerleri hesaplanmıştır. Bu yöntemde, artan absorbans değeri artan indirgeme kuvvetini gösterir. FRAP değeri= (Numune absorbansının karşılık geldiği [Troloks]) μM olarak gösterilmiştir.

2.5.2.2. Standartların ve Bazı Bitki Ekstraktlarının FRAP Testindeki Reaksiyon Kinetikleri

2.5.2.2.1. Standartların FRAP Testindeki Reaksiyon Kinetiği

FRAP testi ile reaksiyon kinetiğinin belirlenmesinde 11 farklı standart kullanılmıştır. Kullanılan standartların konsantrasyonları belirlenirken, ön denemeler yapılmış ve daha önce laboratuvarımızda yapılan münferit çalışmalar dikkate alınmıştır. Bu şekilde farklı konsantrasyonlara sahip 11 standardın metanolik çözeltileri hazırlanmış ve daha sonra Tablo 4 ‘te gösterildiği gibi FRAP reaktifi taze olarak hazırlanmıştır. Çalışmada ayrıca numune körü (numune + 2:3 oranında su: metanol karışımı) ve reaktif körü (numune çözücüsü + FRAP reaktifi)’nün de kinetik değerleri belirlenmiştir. Bunun için 120 dakika boyunca belirli aralıklarla spektrofotometre kullanılarak 595 nm’de absorbans ölçümü yapılmıştır. Elde edilen verilerle Microsoft Excel programında zamana bağlı toplam absorbans değişimi grafikleri çizilmiştir.

2.5.2.2.2. Bazı Bitki Ekstraktlarının FRAP Testindeki Reaksiyon Kinetiği

Bu çalışmada spektrofotometrik yöntemde olduğu gibi yapılan FRAP testinde antioksidan aktiviteleri yüksek, orta ve düşük derecede olan numunelerden birer tane seçilmiştir. Seçilen numunelerden en yüksek aktiviteye sahip olan yeşil çay 0,18 mg/mL,

orta derecede aktiviteye sahip olan zerdeçal 0,38 mg/mL ve düşük aktivite de olan sarısabır 3 mg/mL konsantrasyonlarında çalışılmıştır. Çalışmada taze hazırlanan FRAP reaktifi ile numune ve reaktif körü de yapılarak çalışma yürütülmüştür. 0-120 dakika aralığında belirli sürelerde 595 nm’de her birinin absorbands değerleri belirlenmiş ve daha sonra elde edilen bu değerlerle süreye karşı reaksiyon kinetiği grafikleri çizilmiştir.

FRAP testi ile antioksidan aktivite belirlenirken FRAP reaktifinin her çalışmada taze olarak hazırlanması ve bekletilmemesi gerekmektedir. Bitki ekstraktlarının reaksiyon kinetiğinin belirlendiği çalışmaya ek olarak, kullanılan reaktifin bozunma hızına göre reaksiyon kinetiğinin nasıl değiştiğini gösteren bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olan yeşil çay (0,18 mg/mL) ve en düşük aktiviteye sahip olan sarısabır (3 mg/mL) bitki ekstraktlarının uzun süre bozunmayan ve hızlı bir şekilde bozulan iki türlü FRAP reaktifi hazırlanarak reaksiyon kinetikleri takip edilmiştir.

2.5.2.2. Standartlar ve Bitki Ekstraktlarında Damlatma Yöntemi ile Demir (III) İndirgeme/Antioksidan Güç (FRAP) Tayini

Standart ve numunelerin spektrofotometrik ve damlatma yöntemiyle FRAP tayini eş zamanda yürütülmüştür. Dolayısıyla damlatma yöntemiyle FRAP tayini yapılırken spektrofotometrik yöntemde olduğu gibi aynı numune ve standartlar benzer konsantrasyonlarda çalışılmıştır. Spektrofotometrik yöntemle absorbands değerleri belirlenen tüplerden aynı anda 15'er µL alınarak her biri (reaktif körü ve numune körü) 3'er paralel olacak şekilde İTK tabaka üzerine damlatılmıştır. Spektrofotometrik yöntemde olduğu gibi standart olarak kullanılan Troloks aynı şekilde 5 farklı konsantrasyonda damlatılmıştır. FRAP reaktifi saf su içerdiği için İTK tabakaya damlatıldıktan sonra kuruması için 7 dakika bekletilip, kuruduktan sonra taratılmış ve gerekli görüntü ayarları (parlaklık -100 ve karşıtlık 85) yapıldıktan sonra kaydedilmiştir. Daha sonra kaydedilen resimler Image J programı yardımı ile renk ölçüm halkasının hacmi 2100 olarak ayarlanıp her birinin renk değerleri belirlenmiştir. Değerler Microsoft Excel programına geçirilerek paralellerin ortalaması alınmış ve grafikler çizilmiştir. Standart Troloks grafiğinin eşitlik denkleminde yararlanılarak her standart ve numune için µM CTEAC değerleri hesaplanmıştır.

2.6. Yazıcı ile Püskürtme Çalışması

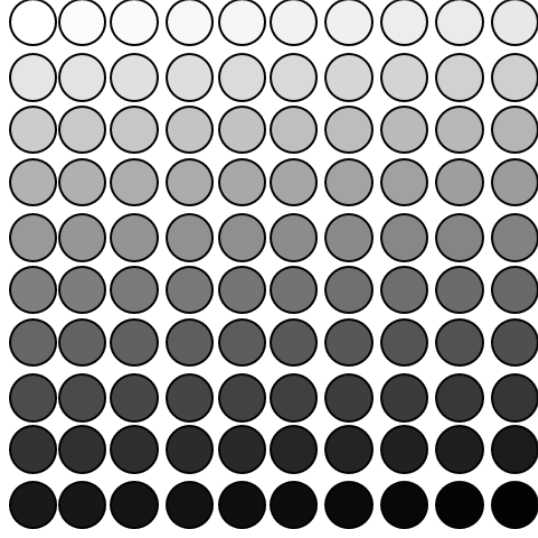
2.6.1. Püskürtme Çalışması Öncesinde Yapılan Optimizasyonlar

Püskürtme çalışmasında HP Deskjet Ink Advantage 2060 yazıcı kullanılmıştır. Çalışmada öncelikle yazıcıya ait 704 numaralı renkli ve siyah kartuşların kapakları dikkatli bir şekilde açılmış ve daha sonra kartuşlar içindeki süngerler çıkartılmıştır. Ayrıca kartuşlar içindeki renk hazneleri üzerini örten özel kağıtlar kopartılmış ve içindeki mürekkeplerin temizlenmesi için alkollü suda bekletilmiştir (2 gün boyunca). Kartuşların tamamen mürekkepten arındığını yani temizlendiğini garantiledikten sonra çalışmalara başlanmıştır.

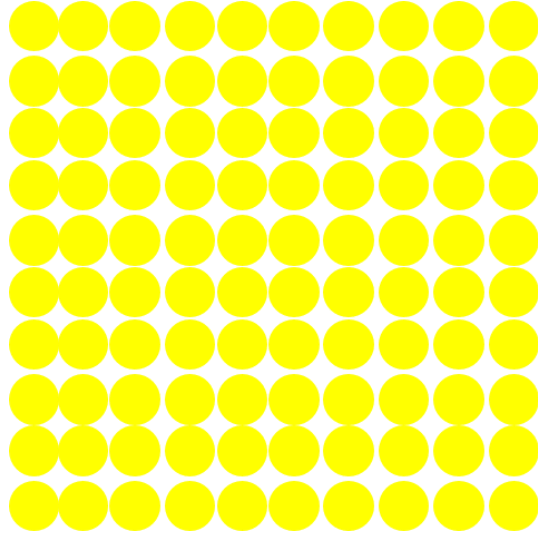
Bu çalışmada öncelikle kartuş bölmeleri ile ilgili bir çok optimizasyon işlemi yapılmıştır. Bunun için hangi kartuşa ve kartuşun hangi renk bölümüne DPPH radikalinin ve hangi kartuşa numune konulacağı belirlenmiştir. Yapılan denemelerde DPPH radikalinin renkli kartuşun her üç bölümüne (sarı, mavi ve kırmızı) konulup standart numunenin ise siyah kartuşa konulup yazdırıldığı zaman görüntünün daha belirgin olduğu tespit edilmiştir.

Kartuşlar belirlendikten sonra İTK tabaka (İTK silika gel 60) üzerine yazdırma sayısı optimize edilmiştir. Bunun için bir çok sayıda ve sırada denemeler yapılmıştır. Yapılan çalışmanın sonunda önce numune ve daha sonra DPPH radikali olmak üzere ve bu şekilde ard arda 10 kere yazdırılmasına karar verilmiştir.

Çalışmada kartuş bölmelerinin yeri ve yazdırma sayısı belirlendikten sonra DPPH radikalinin çalışma konsantrasyonu belirlenmiştir. Bunun için görüntü kalitesinin en yüksek ve madde sarfiyatının en az olduğu DPPH radikali konsantrasyonu tespit edilmiştir. Çalışmada öncelikle Windows power point programında ayarlanan % saydamlık şekillerine göre yazdırılma yapılmıştır. Renkli kartuşun üç bölümüne de DPPH radikali konulup Şekil 22'ye göre sabit yüzdede (%0), siyah kartuşa da eş konsantrasyonda standart konularak, % saydamlık ayarları 1'er arttırılarak (Şekil 21), optimize edilen sayıda ve sırada İTK tabaka üzerine yazdırılmıştır. Daha sonra İTK tabaka tarayıcı ile taratıldıktan sonra resim olarak kaydedilmiş oluşan görüntü renk ölçüm programı olan Image J programı ile değerlendirilmiştir. Belirlenen değerlerle grafikler çizilerek DPPH radikalinin çalışma konsantrasyonunun 3000 μM olmasına karar verilmiştir. Püskürtme çalışması belirlenen bu DPPH konsantrasyonunda yürütülmüştür.



Şekil 21. Standartlar için %1 oranında artan saydamlık değerlerine göre hazırlanan ve yazdırılan diagram



Şekil 22. DPPH radikali için %1 oranında artan saydamlık değerlerine göre hazırlanan ve yazdırılan diagram

2.6.2. Bazı Antioksidan Standartlar ile Yapılan Spektrofotometrik, Damlatma ve Püskürtme Çalışmaları

DPPH radikalinin çalışma konsantrasyonu belirlendikten sonra bu konsantrasyonda protokatekuik asit ve Troloks standartları ile çalışmalar yapılmıştır. Optimize edilen şartlar uygulanarak yazıcı kartuşları yardımıyla bu standartlar İTK tabaka üzerine püskürtülmüştür. Aynı standartlar ile aynı konsantrasyonlarda spektrofotometrik ve

damlatma çalışmaları da yapılarak bu iki standart ile yapılan üç farklı çalışma değerlendirilmiş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır.

İlk olarak püskürtme çalışması için seçilen protokatekuik asit ve Troloks standartları ile spektrofotometrik çalışma yapılmıştır. Püskürtme çalışması için belirlenen DPPH radikalinin konsantrasyonunda (3000 μM), spektrofotometre kullanılarak her iki standardın SC_{50} değerleri belirlenmiştir. Çalışmada öncelikle 3000 μM 'lık DPPH çözeltisi ile ön denemeler yapılarak farklı konsantrasyonlara sahip stok çözelti konsantrasyonları belirlenmiştir. Her biri için belirlenen başlangıç (stok) konsantrasyonlarından başlayarak 1:1 oranında seyreltmek suretiyle 5 farklı konsantrasyonda ve iki paralel olacak şekilde deney tüplerine pipetlemeler yapılmıştır. Daha sonra tüplerdeki çözelti üzerlerine eşit hacimlerde (750 μL) DPPH $^{\bullet}$ çözeltisi aktarılmıştır. Tüplerdeki karışımlar vorteks yardımıyla karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda karışımlar 15 kat metanol çözücüsü ile seyreltikten sonra spektrofotometre ile DPPH $^{\bullet}$ 'ın maksimum absorptans gösterdiği 517 nm'deki absorptans değerleri belirlenmiştir. Belirlenen bu absorptans verileri Microsoft Excel programında grafikler çizilerek bu grafiklerden her bir antioksidan standart için SC_{50} değerleri mg/mL cinsinden hesaplanmıştır.

Ayrıca püskürtme çalışmasında kullanılan bu iki standart (Troloks ve protokatekuik asit) için 3000 μM DPPH konsantrasyonunda damlatma çalışması yapılmıştır. Damlatılarak yapılan DPPH testinde farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Troloks ve protokatekuik asit standartları spektrofotometrik metotta olduğu gibi 750 μL olarak her biri 5 farklı konsantrasyonda tüplere aktarılmış ve üzerlerine eşit hacimde DPPH radikali ilave edilmiştir. Tüpteki karışımlar karıştırıcı ile karıştırıldıktan sonra 60 dakika inkübasyona bırakılmış ve bekletme süresi sonunda üç paralel olacak şekilde İTK tabaka üzerine damlatılmıştır. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra İTK tabakanın üzerindeki spotların kuruması için 5 dk. oda sıcaklığında beklettikten sonra tarayıcı ile çeşitli renk ayarları yapılarak (parlaklık -100 ve karışıklık 85) resim olarak (JPEG) kaydedilmiştir. Kaydedilen bu görüntüler Image J programı yardımıyla her bir paralelin renk değeri belirlenerek Microsoft Excel programı kullanılarak ortalamaları alınıp, grafikleri çizilmiştir. Oluşan bu renk değeri-konsantrasyon grafiklerinden Troloks ve protokatekuik asit için CSC_{50} değerleri hesaplanmıştır.

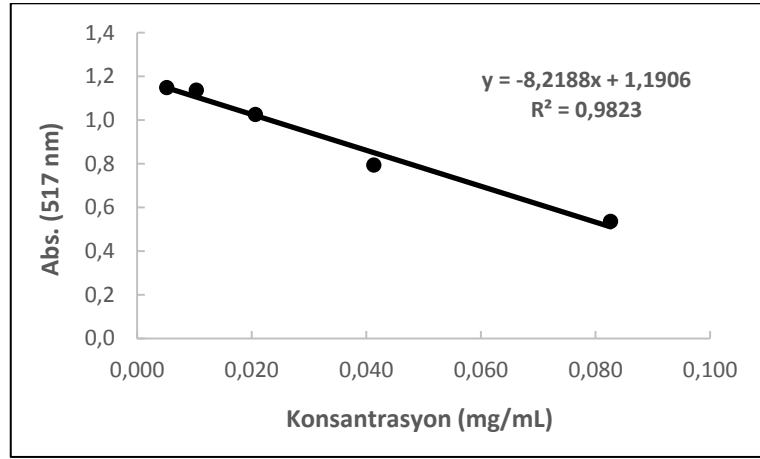
Spektrofotometrik ve damlatma çalışmaları ile SC_{50} ve CSC_{50} değerleri belirlenen iki standardın, yapılan optimizasyonlar ile püskürtme çalışması yapılmıştır. Püskürtme

çalışması için metanol çözücüsü ile 3000 µM konsantrasyonunda DPPH radikali ile eş konsantrasyonda Troloks ve protokatekuik asit standartları hazırlanmıştır. Renkli kartuşun üç bölmesine de DPPH radikali, siyah kartuşa ise antioksidan standart konulmuştur. Daha sonra yazıcının arka kısmına yerleştirilen İTK tabaka üzerine power pointte saydamlık ayarı % 1 oranında değişecek şekilde hazırlanan Şekil 21 ve Şekil 22'ye göre bilgisayardan komut verilerek yazdırılmıştır. Yazdırma işleminde önce DPPH radikali (yani renkli kartuş-sarı renk) sonra siyah renk yazdırılmak koşuluyla 10 kere ard arda yazdırılmıştır. Sonra İTK tabaka tarayıcı ile taratılmıştır. Kaydedilen görüntü Image J programı ile değerlendirilip, renk değeri-% saydamlık grafikleri çizilmiştir.

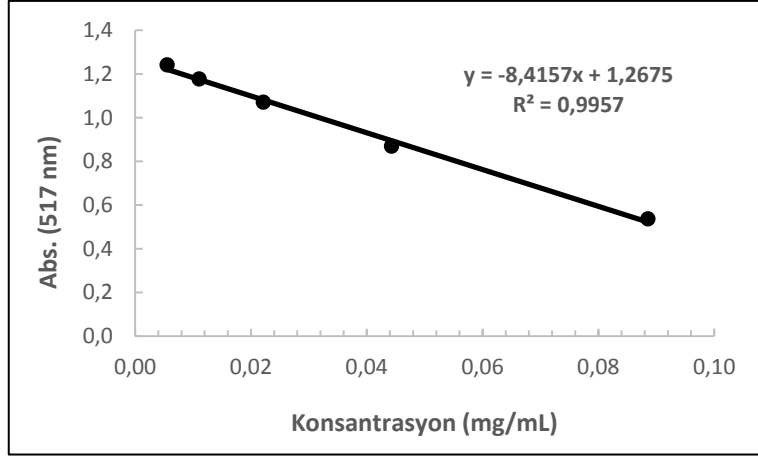
3. BULGULAR

3.1. Antioksidan Standartların Spektrofotometrik Yöntemle Belirlenen DPPH Radikal Temizleme Aktiviteleri

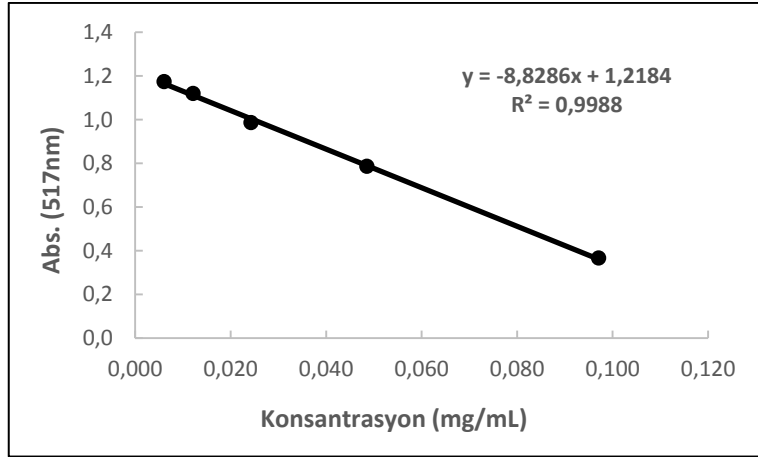
Farklı konsantrasyonlarda çalışılan BHT, klorojenik asit, ferulik asit, gallik asit, kafeik asit, kateşin, kuersetin, protokatekuik asit, rutin ve şiringik asit gibi antioksidan standartların spektrofotometrik yöntem ile 517 nm'de verdiği absorbans sonuçlarından mg/mL cinsinden SC₅₀ değerlerinin hesaplandığı konsantrasyon-absorbans grafikleri Şekil 23-32 de verilmiştir.



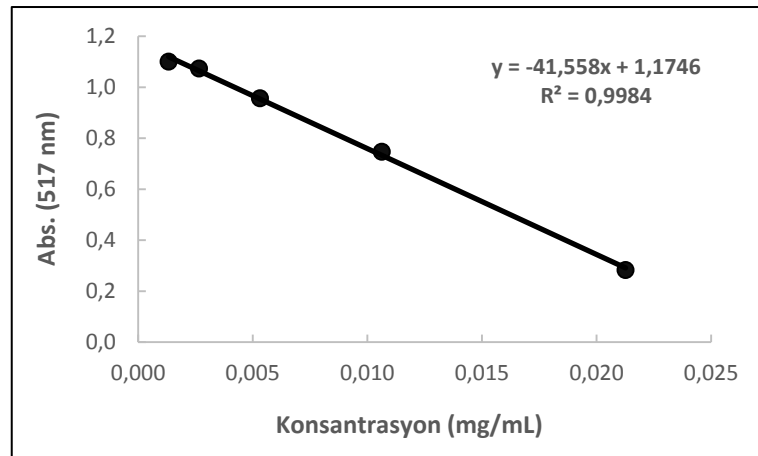
Şekil 23. Farklı konsantrasyondaki BHT standardının 517 nm'de verdiği absorbans değerlerinin grafiği (SC₅₀ = 0,07243 mg/mL)



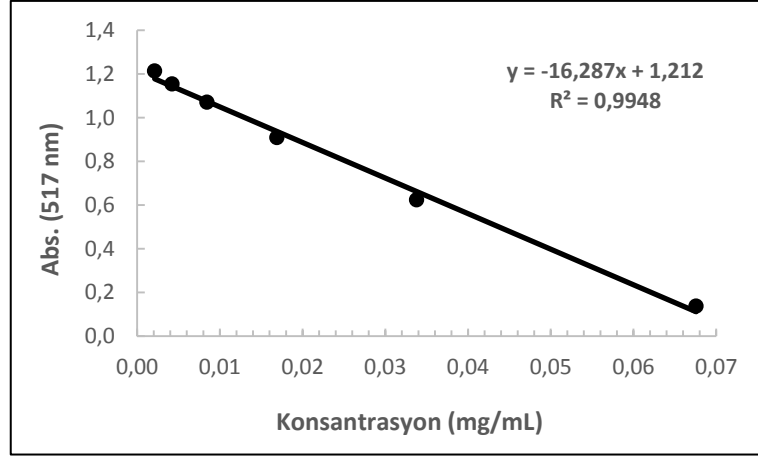
Şekil 24. Farklı konsantrasyondaki klorojenik asit standardının 517 nm'de verdiği absorbans değerlerinin grafiği ($SC_{50} = 0,0753$ mg/mL)



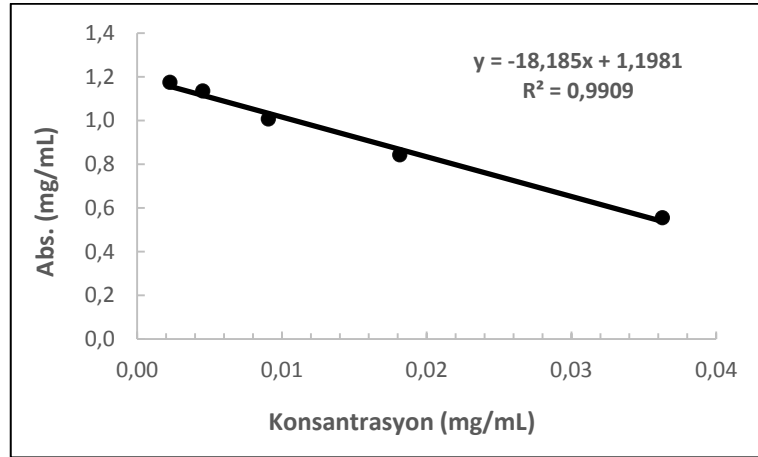
Şekil 25. Farklı konsantrasyondaki ferulik asit standardının 517 nm'de verdiği absorbans değerlerinin grafiği ($SC_{50} = 0,0690$ mg/mL)



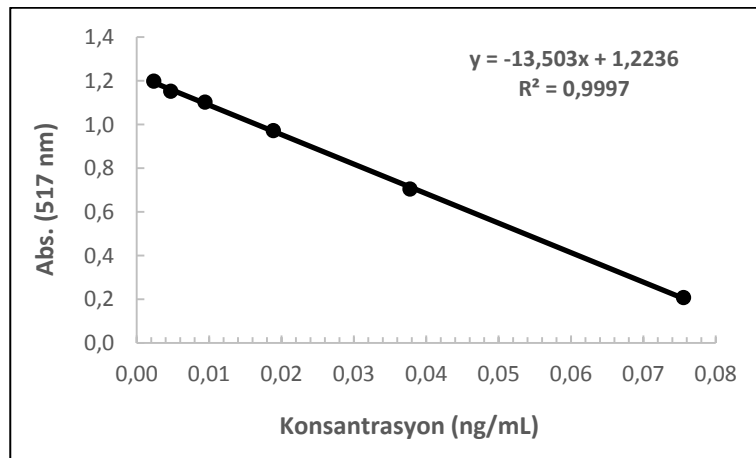
Şekil 26. Farklı konsantrasyondaki gallik asit standardının 517 nm'de verdiği absorbans değerlerinin grafiği ($SC_{50} = 0,0141$ mg/mL)



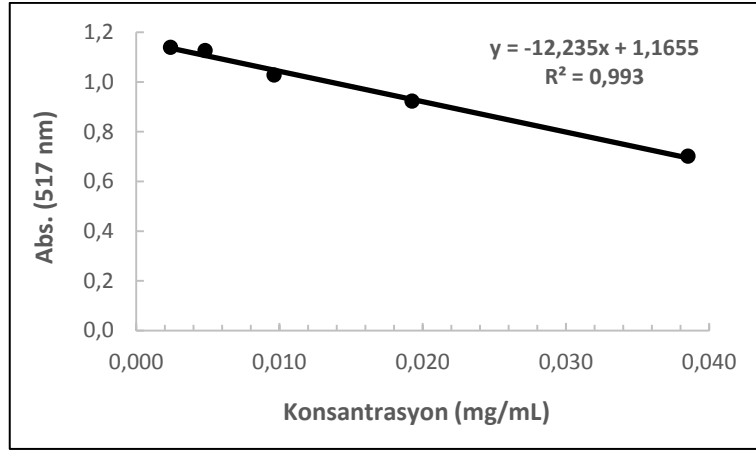
Şekil 27. Farklı konsantrasyondaki kafeik asit standardının 517 nm’de verdiği absorbans değerlerinin grafiği ($SC_{50} = 0,0372$ mg/mL)



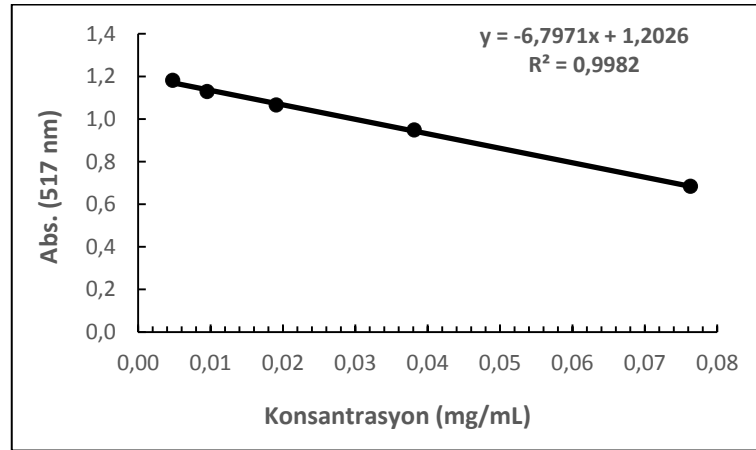
Şekil 28. Farklı konsantrasyondaki kateşin standardının 517 nm’de verdiği absorbans değerlerinin grafiği ($SC_{50} = 0,0329$ mg/mL)



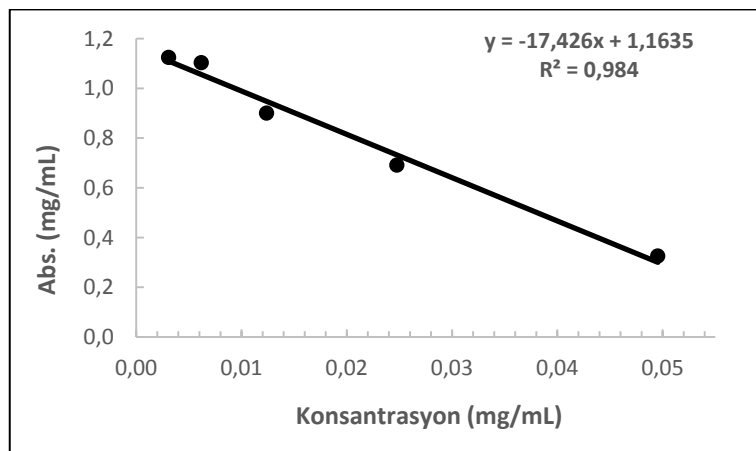
Şekil 29. Farklı konsantrasyondaki kuersetin standardının 517 nm’de verdiği absorbans değerlerinin grafiği ($SC_{50} = 0,0453$ mg/mL)



Şekil 30. Farklı konsantrasyondaki protocatekuik asit standardının 517 nm’de verdiği absorbans değerlerinin grafiği ($SC_{50} = 0,0476$ mg/mL)



Şekil 31. Farklı konsantrasyondaki rutin standardının 517 nm’de verdiği absorbans değerlerinin grafiği ($SC_{50} = 0,0885$ mg/mL)

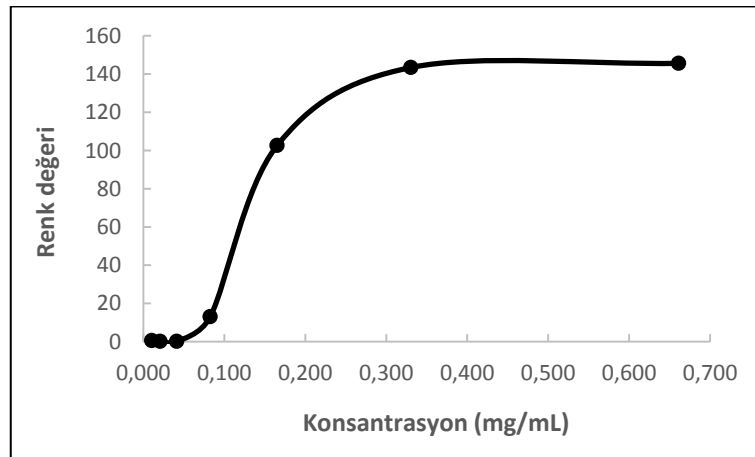


Şekil 32. Farklı konsantrasyondaki şiringik asit standardının 517 nm’de verdiği absorbans değerlerinin grafiği ($SC_{50} = 0,0334$ mg/mL)

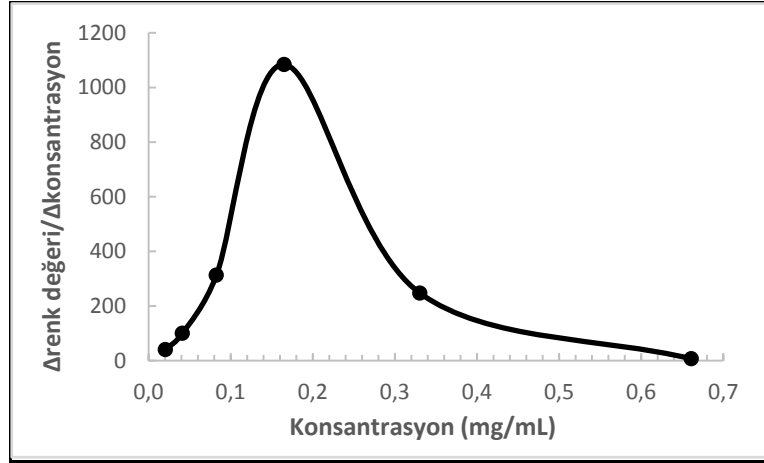
Elde edilen bu absorbans-konsantrasyon grafiklerinden her bir standart için maksimum absorbans değerini yarıya düşüren numune konsantrasyonu yani SC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Çalışılan standartlar arasında karşılaştırma yapıldığında SC_{50} değeri en küçük olan yani antioksidan aktivitesi en yüksek olan standart gallik asit standardı ve tam tersi yorum yapıldığında da en yüksek SC_{50} değerine sahip olan yani antioksidan aktivitesi en düşük olan standart ise rutin standardı olduğu görülmektedir.

3.2. Antioksidan Standartların Damlatma Yöntemi ile Belirlenen DPPH Radikal Temizleme Aktiviteleri

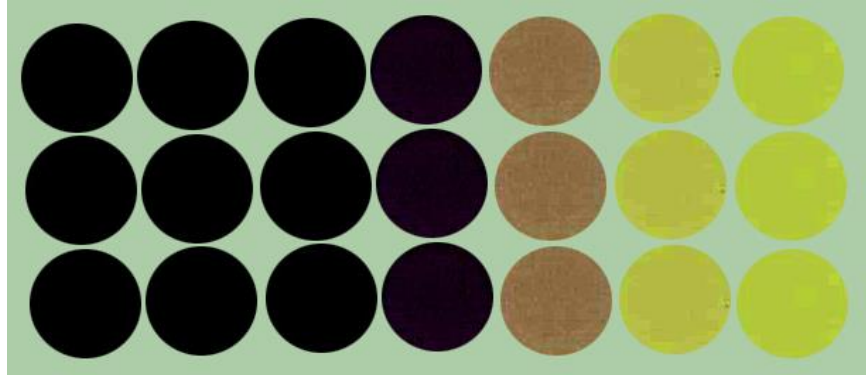
Farklı konsantrasyondaki antioksidan standartların yeni geliştirilen damlatma yönteminde Image J programıyla belirlenen renk değerlerinin grafikleri çizilerek, bu renk değeri-konsantrasyon grafiklerinden CSC_{50} değerlerinin nasıl bulunduğu Şekil 33-60 de ve daha iyi sonuç aldığımız türevlendirme işlemi yapılarak elde edilen CSC_{50} değerleri grafikleri ise Şekil 34-61'de verilmiştir. Damlatma yöntemi uygulanarak İTK tabaka üzerine damlatılan hem doğrudan hem de türevlendirilerek CSC_{50} değerlerinin hesaplandığı resimler Şekil 35-62 de gösterilmiştir. Her standart farklı konsantrasyonlardan başlayarak 1:1 oranında seyreltilmek suretiyle 7 farklı konsantrasyonda 3 paralel olacak şekilde damlatılmıştır. Çalışmada kullanılan standartlar renksiz oldukları için onlarda kör (numune+çözücü) çalışması yapılamamıştır.



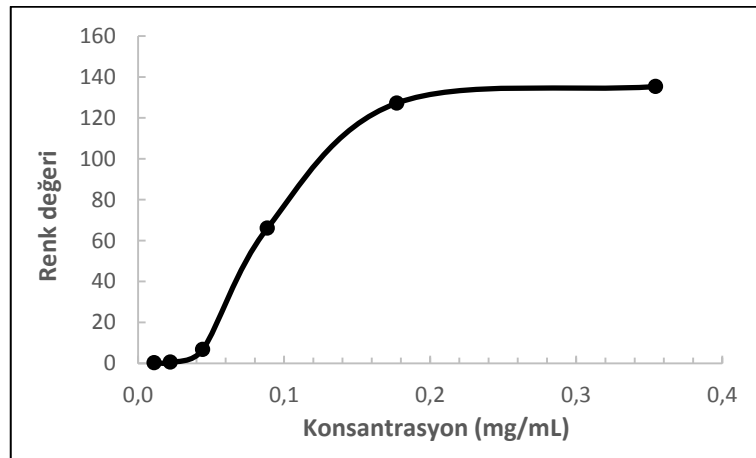
Şekil 33. Farklı konsantrasyondaki BHT standardının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği ($CSC_{50} = 0,13$ mg/mL)



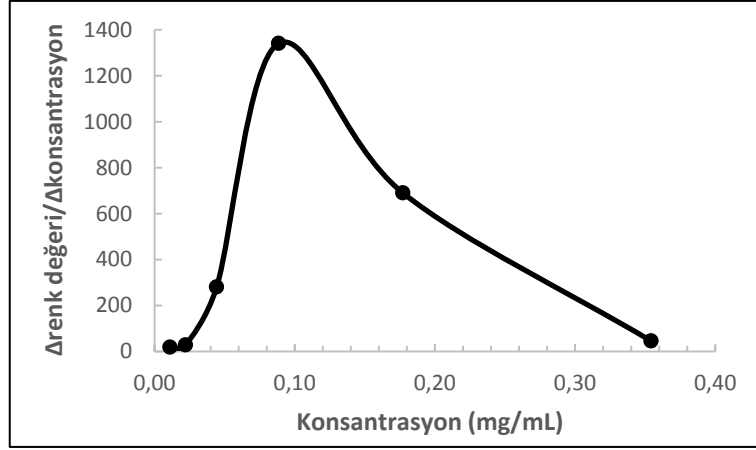
Şekil 34. Türev yöntemi kullanılarak BHT standardının CSC₅₀ değerinin hesaplandığı grafik (CSC₅₀ = 0,165 mg/mL)



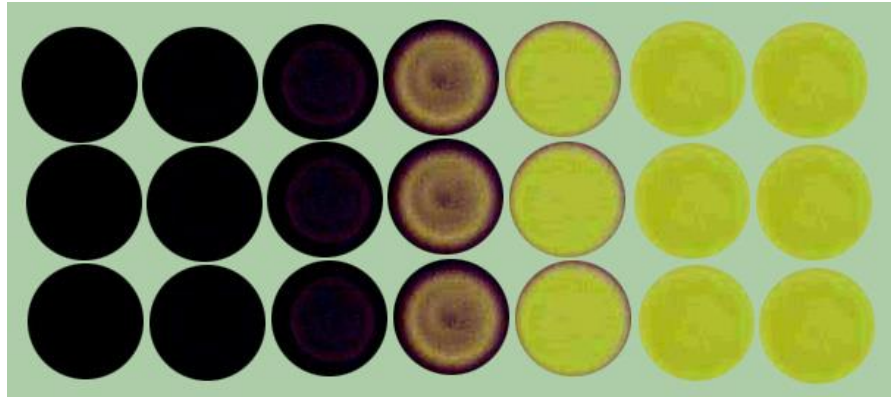
Şekil 35. 3000 µM konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan BHT standardının görüntüsü



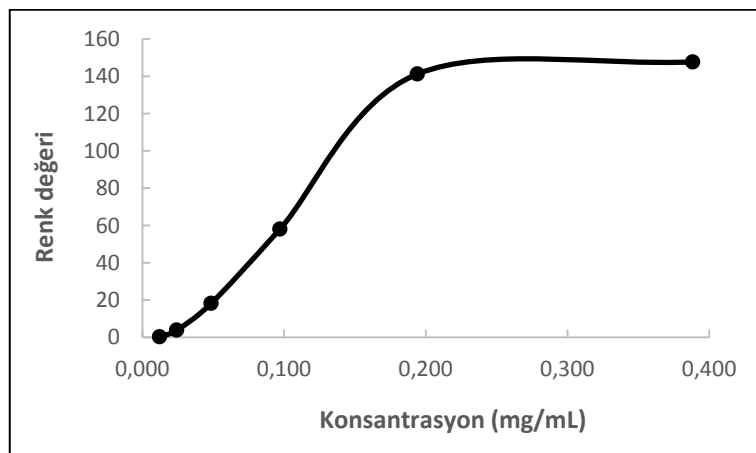
Şekil 36. Farklı konsantrasyondaki klorojenik asit standardının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği (CSC₅₀ = 0,089 mg/mL)



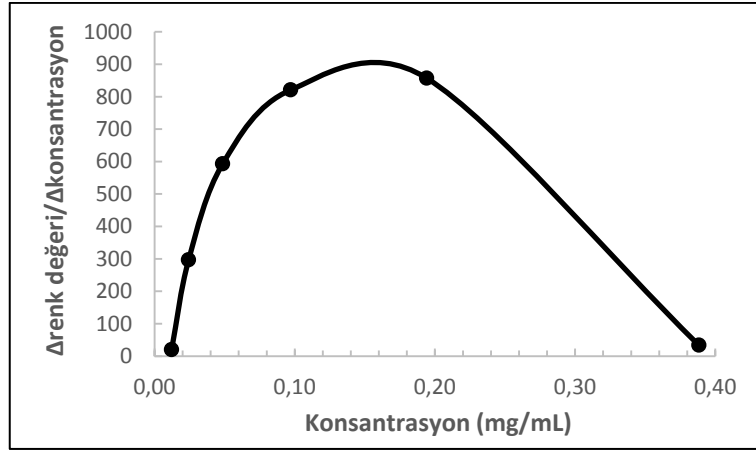
Şekil 37. Türev yöntemi kullanılarak klorojenik asit standardının CSC_{50} değerinin hesaplandığı grafik ($CSC_{50} = 0,090$ mg/mL)



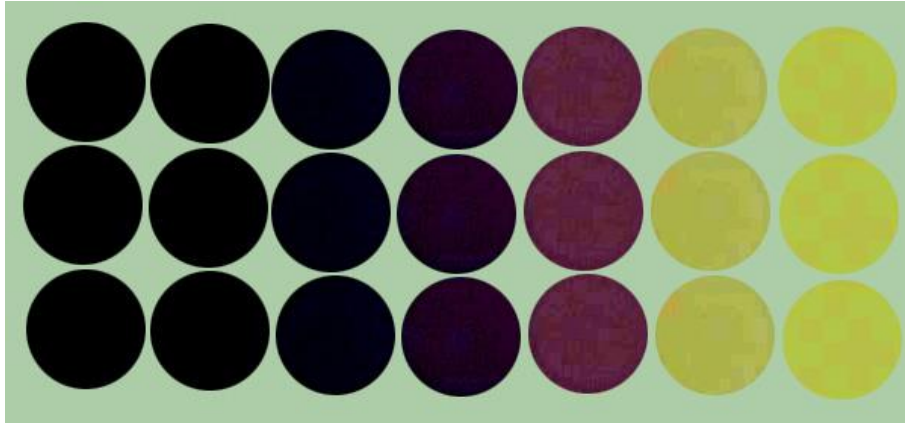
Şekil 38. 1000 μ M konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan klorojenik asit standardının görüntüsü



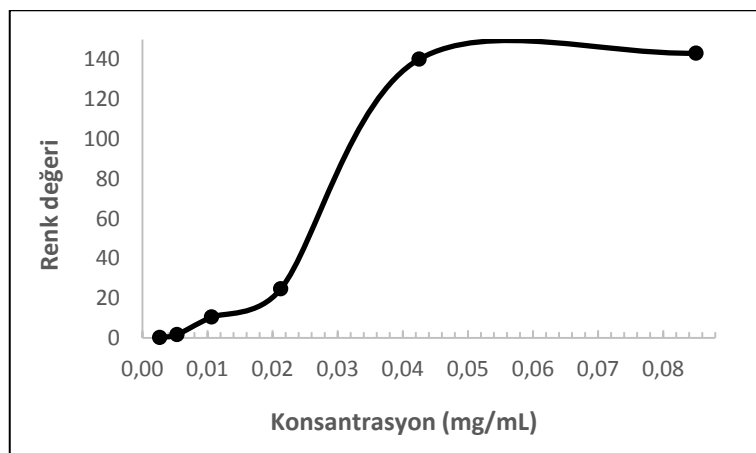
Şekil 39. Farklı konsantrasyondaki ferulik asit standardının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği ($CSC_{50} = 0,112$ mg/mL)



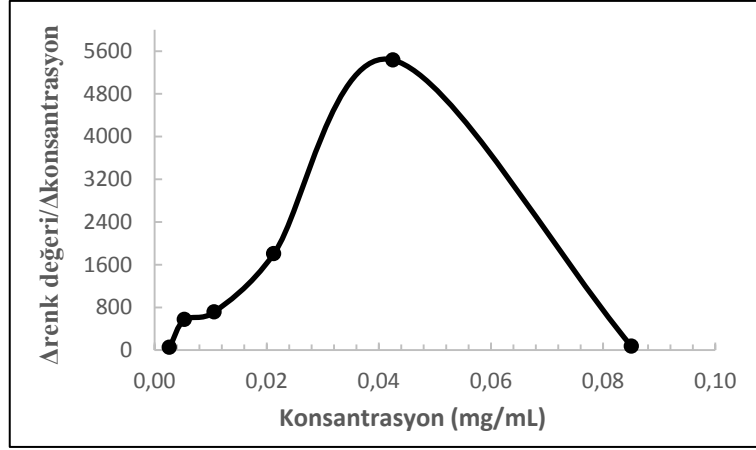
Şekil 40. Türev yöntemi kullanılarak ferulik asit standardının CSC_{50} değerinin hesaplandığı grafik ($CSC_{50} = 0,155$ mg/mL)



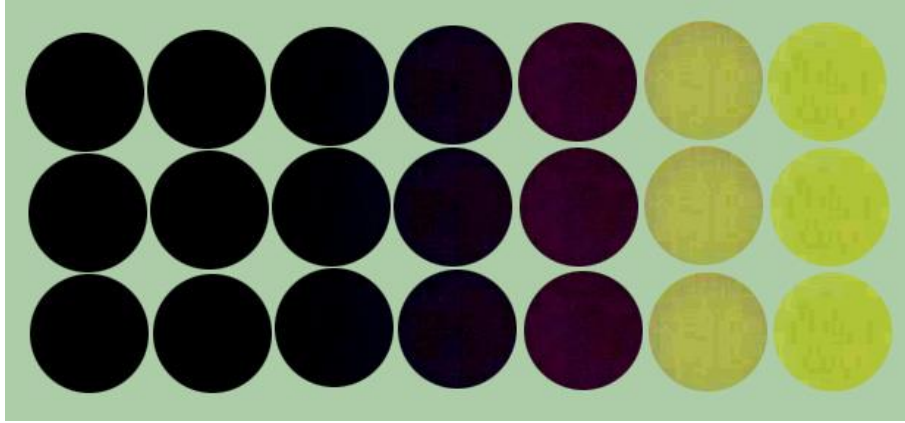
Şekil 41. 2000 μ M konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan ferulik asit standardının görüntüsü



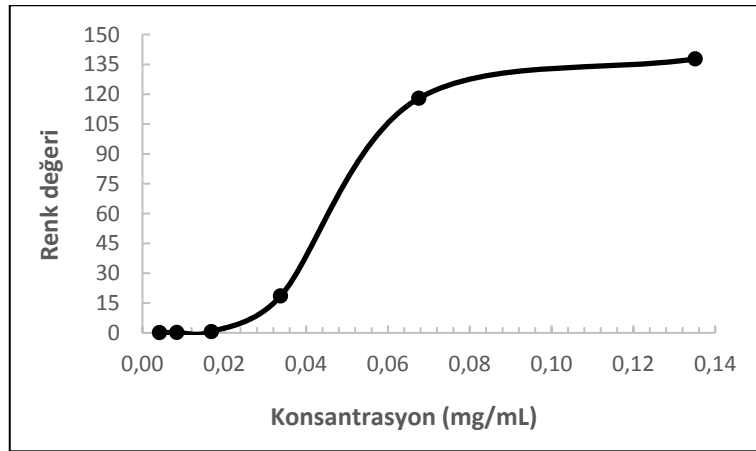
Şekil 42. Farklı konsantrasyondaki gallik asit standardının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği ($CSC_{50} = 0,028$ mg/mL)



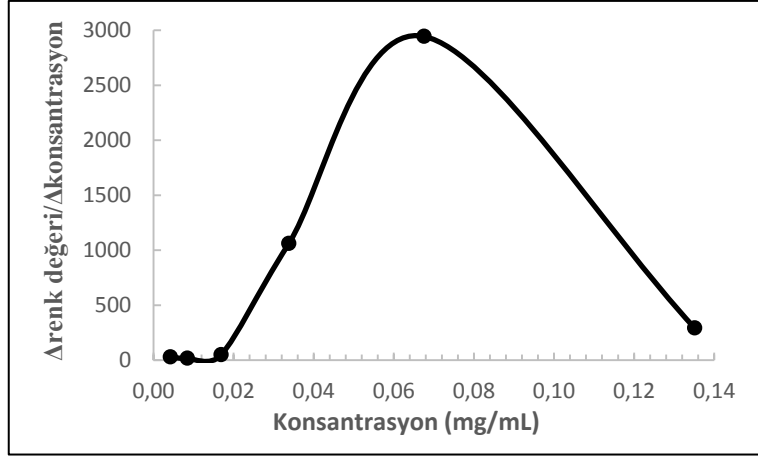
Şekil 43. Türev yöntemi kullanılarak gallik asit standardının CSC_{50} değerinin hesaplandığı grafik ($CSC_{50} = 0,042$ mg/mL)



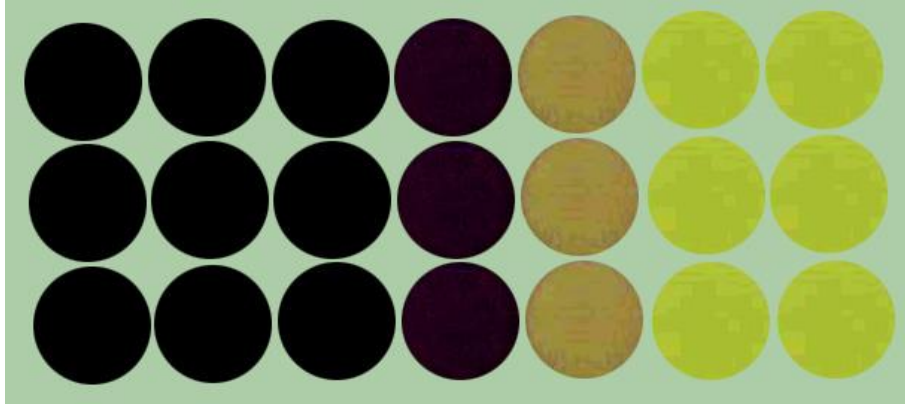
Şekil 44. 500 μ M konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan gallik asit standardının görüntüsü



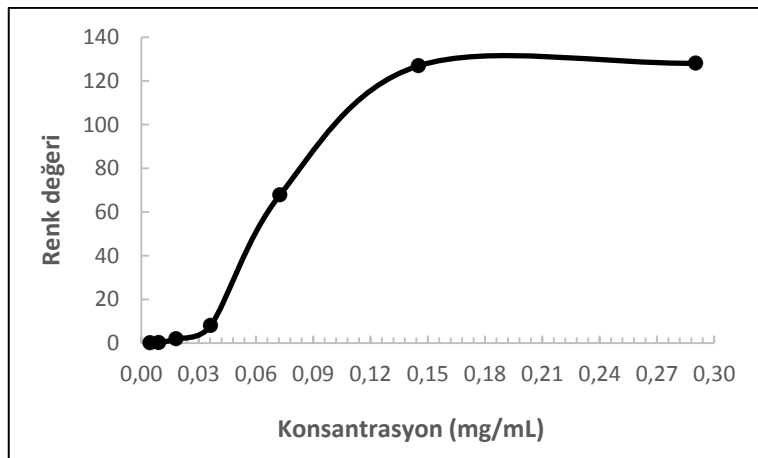
Şekil 45. Farklı konsantrasyondaki kafeik asit standardının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği ($CSC_{50} = 0,048$ mg/mL)



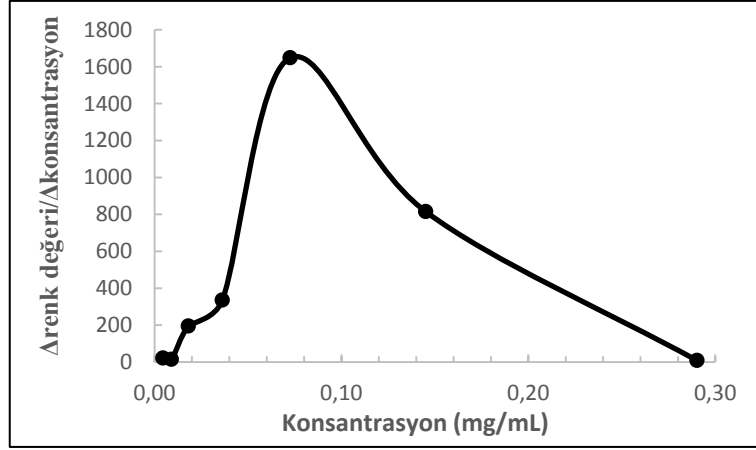
Şekil 46. Türev yöntemi kullanılarak kafeik asit standardının CSC_{50} değerinin hesaplandığı ($CSC_{50} = 0,065$ mg/mL)



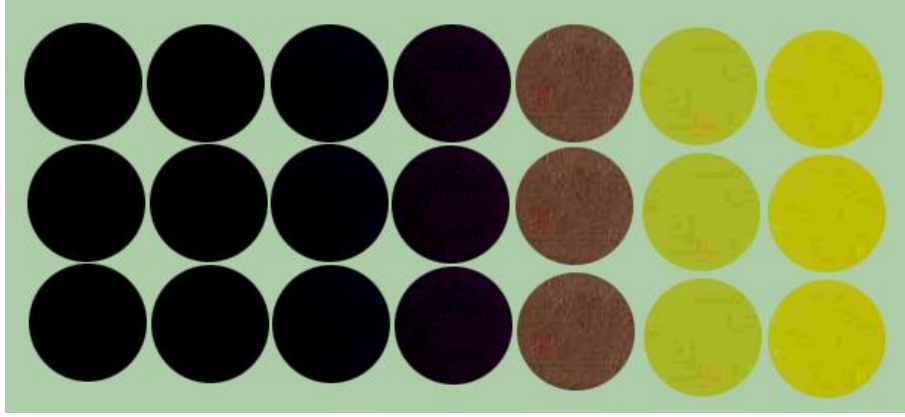
Şekil 47. 750 μ M konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan kafeik asit standardının görüntüsü



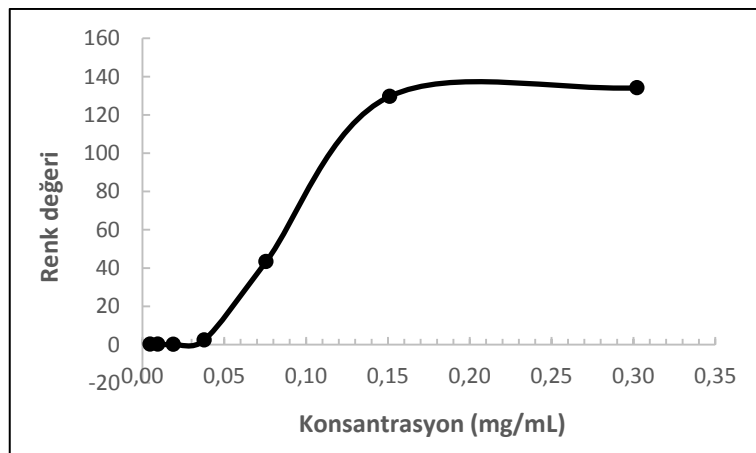
Şekil 48. Farklı konsantrasyondaki kateşin standardının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği ($CSC_{50} = 0,070$ mg/mL)



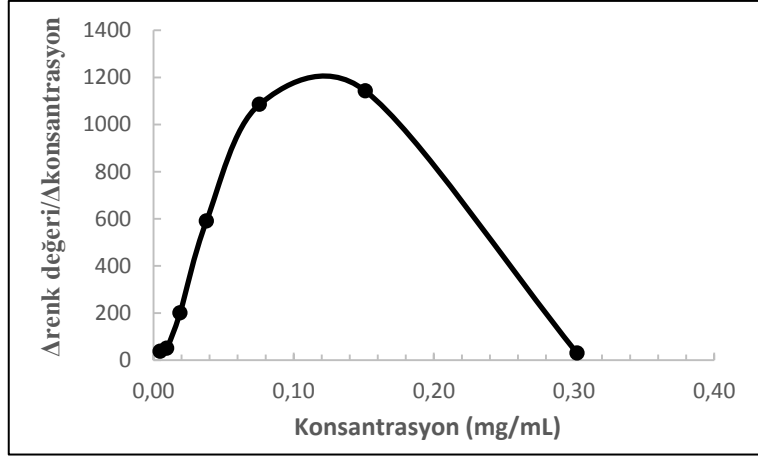
Şekil 49. Türev yöntemi kullanılarak kateşin standardının CSC_{50} değerinin hesaplandığı grafik ($CSC_{50} = 0,075$ mg/mL)



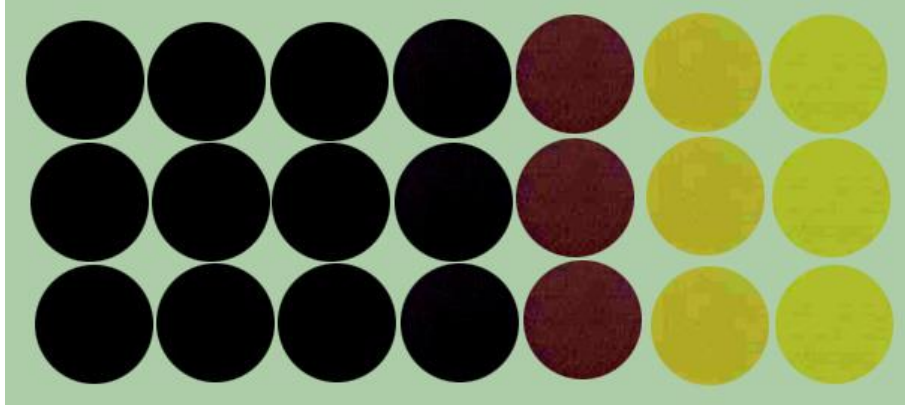
Şekil 50. 1000 μ M konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan kateşin standardının görüntüsü



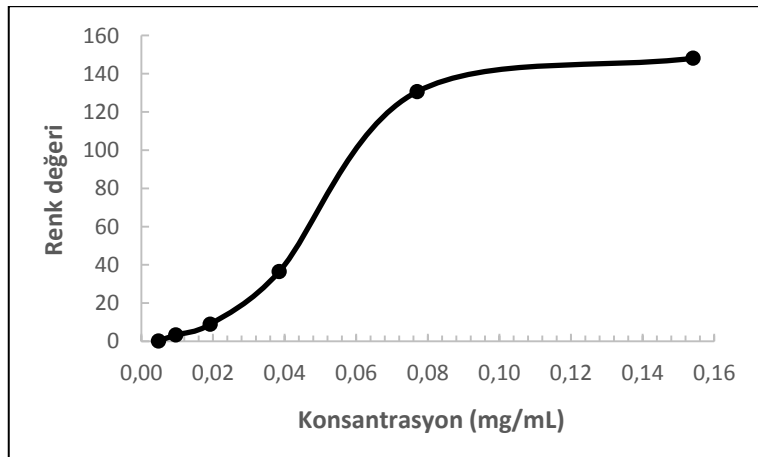
Şekil 51. Farklı konsantrasyondaki kuersetin standardının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği ($CSC_{50} = 0,092$ mg/mL)



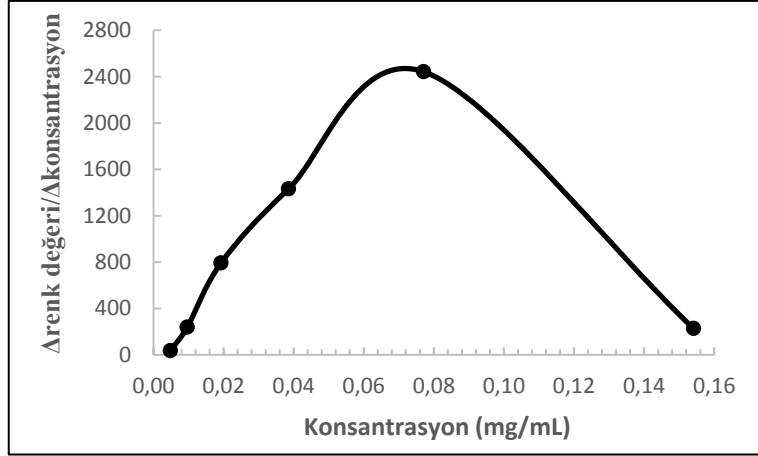
Şekil 52. Türev yöntemi kullanılarak kuersetin standardının CSC_{50} değerinin hesaplandığı grafik ($CSC_{50} = 0,110$ mg/mL)



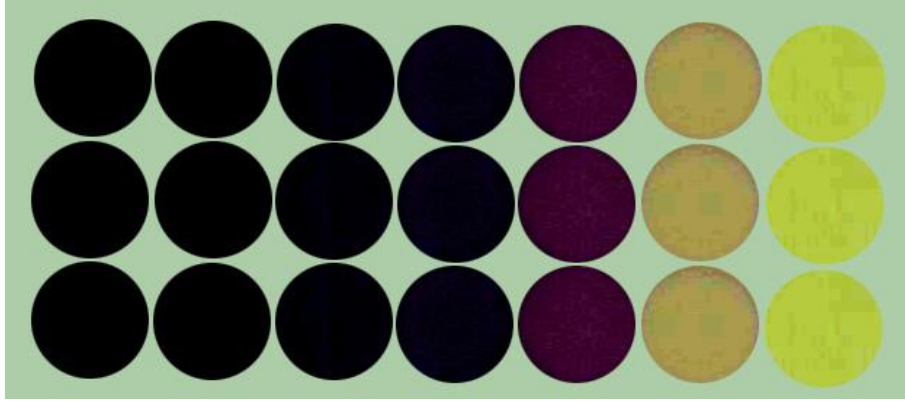
Şekil 53. 1000 μ M konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan kuersetin standardının görüntüsü



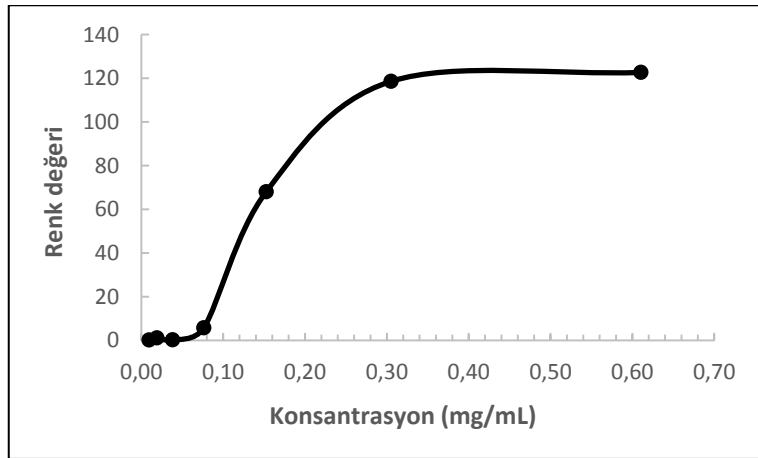
Şekil 54. Farklı konsantrasyondaki protokatekuik asit standardının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği ($CSC_{50} = 0,051$ mg/mL)



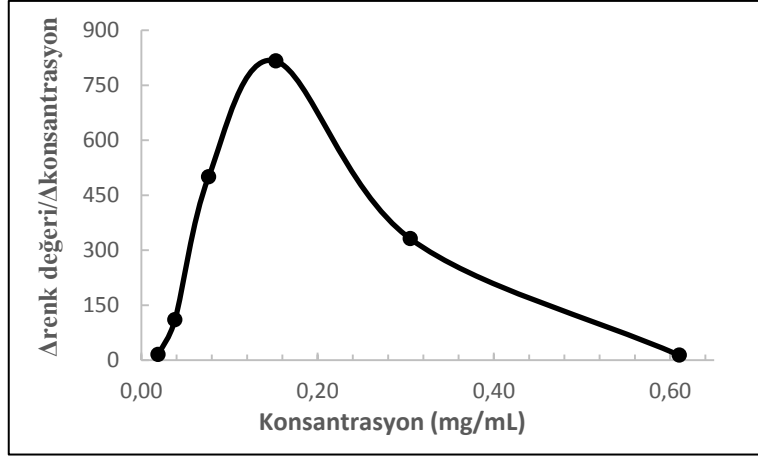
Şekil 55. Türev yöntemi kullanılarak protokatekuik asit standardının CSC_{50} değerinin hesaplandığı grafik ($CSC_{50} = 0,072$ mg/mL)



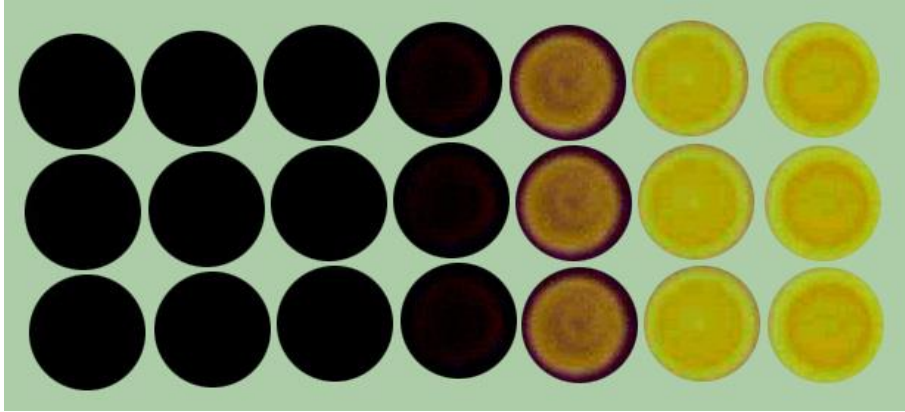
Şekil 56. 1000 μ M konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan protokatekuik asit standardının görüntüsü



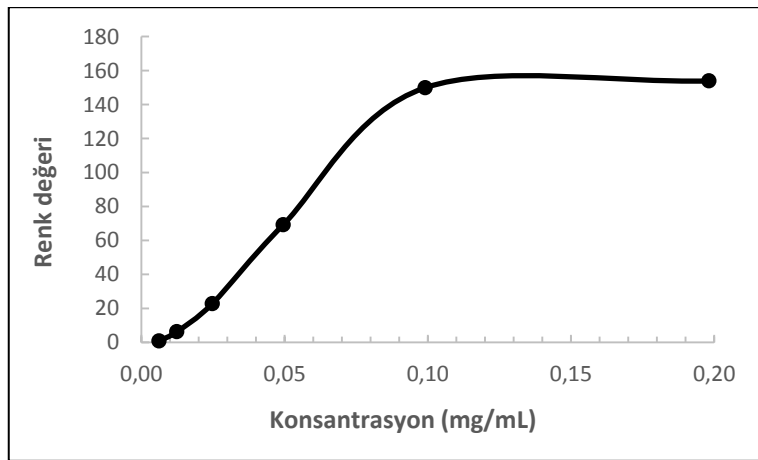
Şekil 57. Farklı konsantrasyondaki rutin standardının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği ($CSC_{50} = 0,135$ mg/mL)



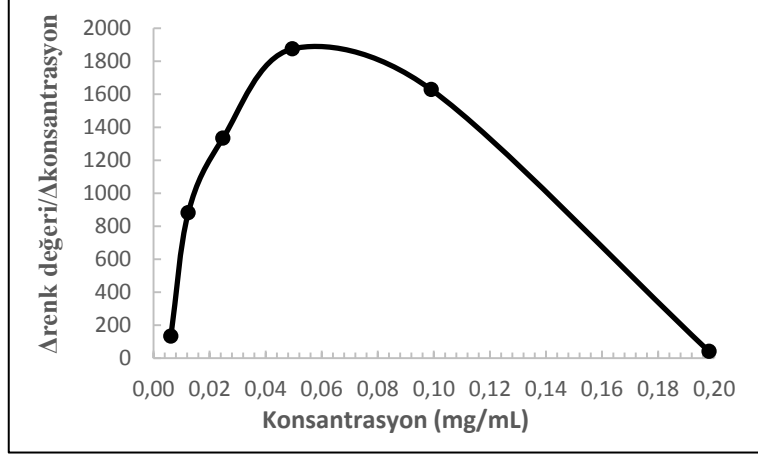
Şekil 58. Türev yöntemi kullanılarak rutin standardının CSC_{50} değerinin hesaplandığı grafik ($CSC_{50} = 0,160$ mg/mL)



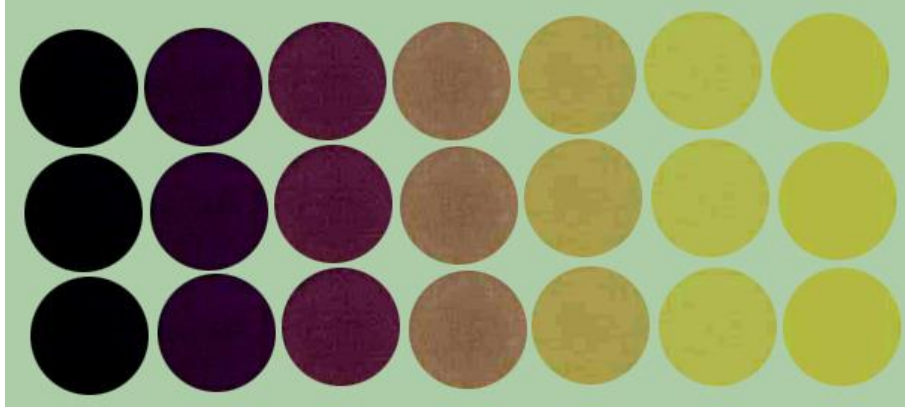
Şekil 59. 1000 μ M konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan rutin standardının görüntüsü



Şekil 60. Farklı konsantrasyondaki şiringik asit standardının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği ($CSC_{50} = 0,054$ mg/mL)



Şekil 61. Türev yöntemi kullanılarak şiringik asit standardının CSC_{50} değerinin hesaplandığı grafik ($CSC_{50} = 0,060$ mg/mL)

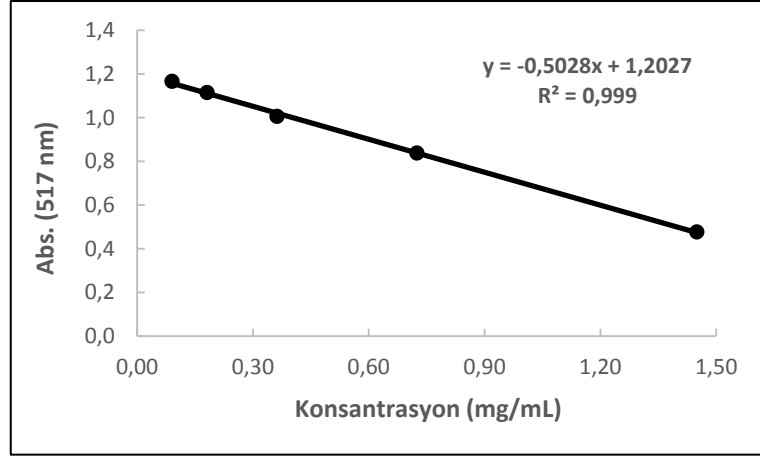


Şekil 62. 500 μ M konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan şiringik asit standardının görüntüsü

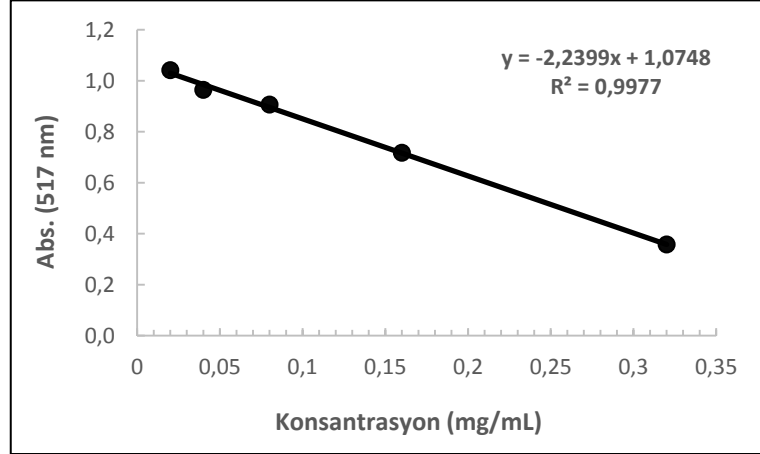
Damlatma yöntemi uygulanarak elde edilen 1. dereceden türevlendirme-konsantrasyon grafiklerinden her bir standart için maksimum renk değerine karşılık gelen konsantrasyondan CSC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Çalışılan standartlar arasında karşılaştırma yapıldığında, spektrofotometrik yöntemle SC_{50} değerlerinin hesaplamasında olduğu gibi CSC_{50} değeri en küçük olan yani antioksidan aktivitesi en yüksek olan standart gallik asit standardı ve tam tersi yorum yapıldığında da en yüksek CSC_{50} değerine sahip olan yani antioksidan aktivitesi en düşük olan standart spektrofotometrik teste rutin damlatma teste ise çok yakın değerde olan BHT standardı olduğu görülmüştür.

3.3. Bitki Ekstraktlarında Spektrofotometrik Yöntemle Belirlenen DPPH Radikal Temizleme Aktiviteleri

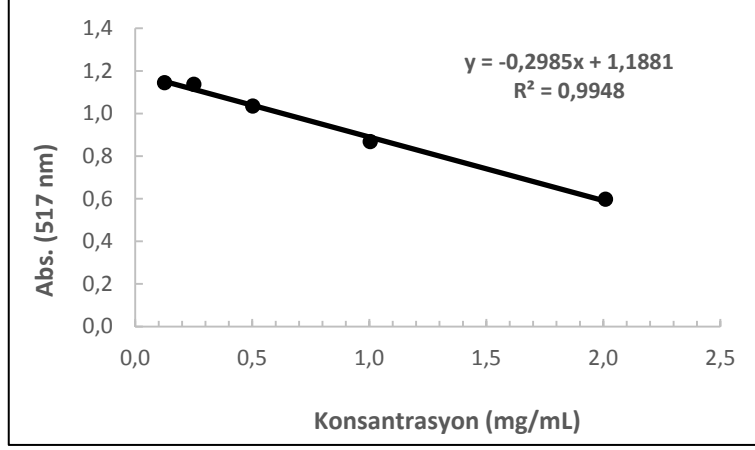
Farklı konsantrasyonda hazırlanan metanollü ve etil asetatlı (EtAc) bitki ekstraktlarının spektrofotometrik yöntem ile 517 nm’de verdiği absorbans sonuçlarından SC_{50} değerlerinin hesaplandığı grafikler Şekil 63-71 de verilmiştir.



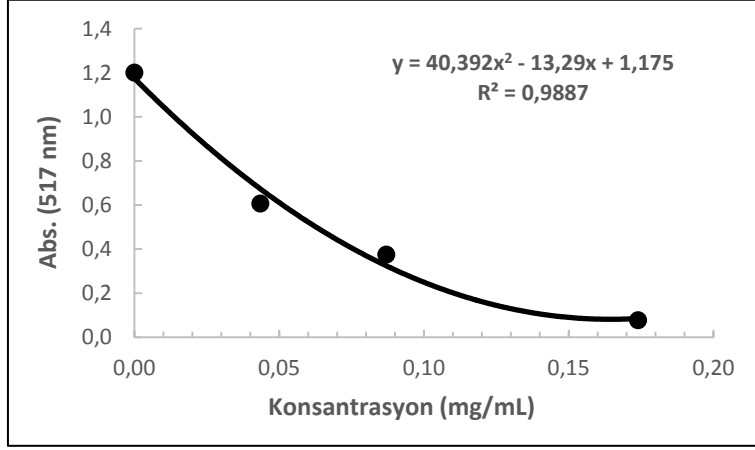
Şekil 63. Farklı konsantrasyondaki kantaron ekstraktının 517 nm’de verdiği absorbans değerlerinin grafiği ($SC_{50} = 1,1960$ mg/mL)



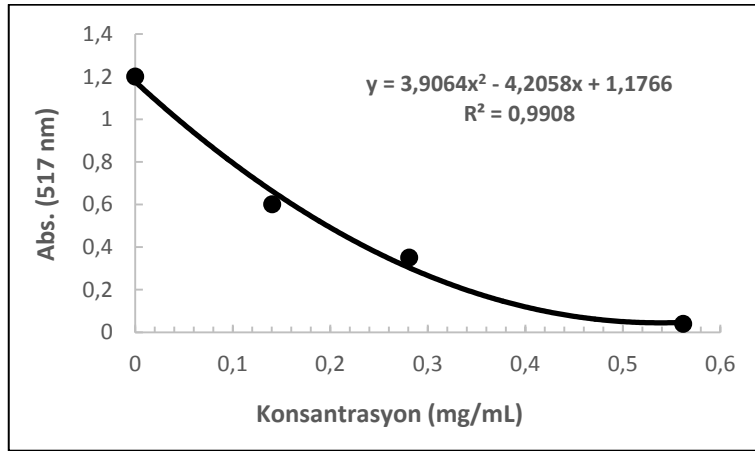
Şekil 64. Farklı konsantrasyondaki nane ekstraktının 517 nm’de verdiği absorbans değerlerinin grafiği ($SC_{50} = 0,2399$ mg/mL)



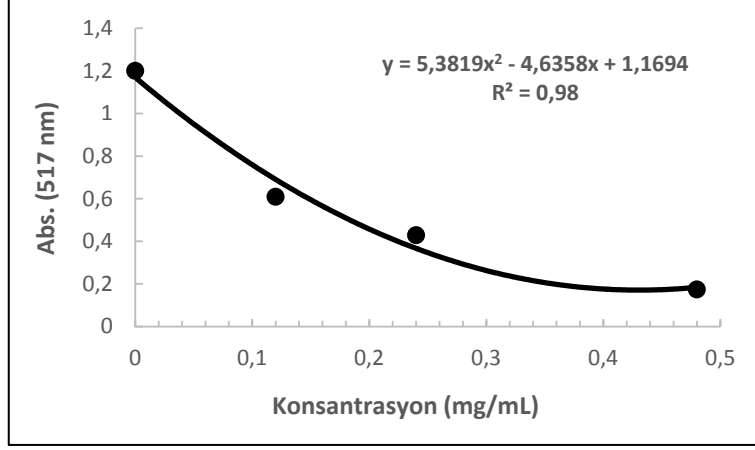
Şekil 65. Farklı konsantrasyondaki sarımsabır ekstraktının 517 nm’de verdiği absorbans değerlerinin grafiği ($SC_{50} = 1,9901$ mg/mL)



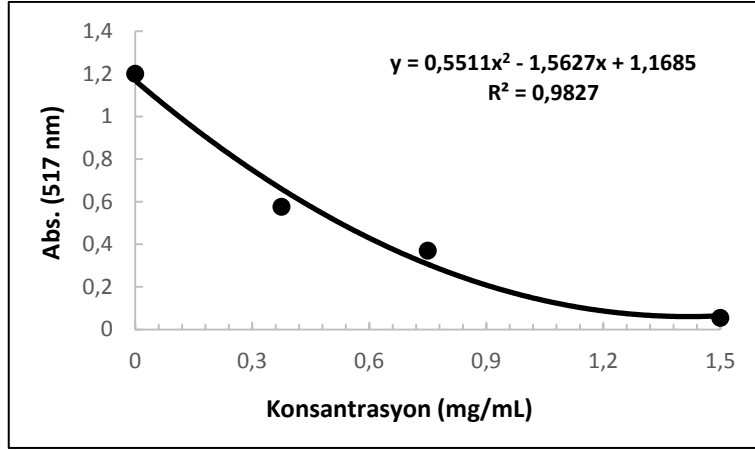
Şekil 66. Farklı konsantrasyondaki yeşil çay ekstraktının 517 nm’de verdiği absorbans değerlerinin grafiği ($SC_{50} = 0,052$ mg/mL)



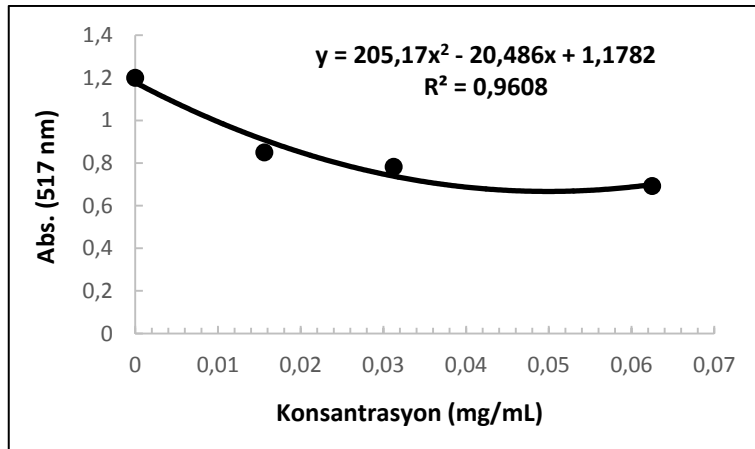
Şekil 67. Farklı konsantrasyondaki biberiye ekstraktının 517 nm’de verdiği absorbans değerlerinin grafiği ($SC_{50} = 0,221$ mg/mL)



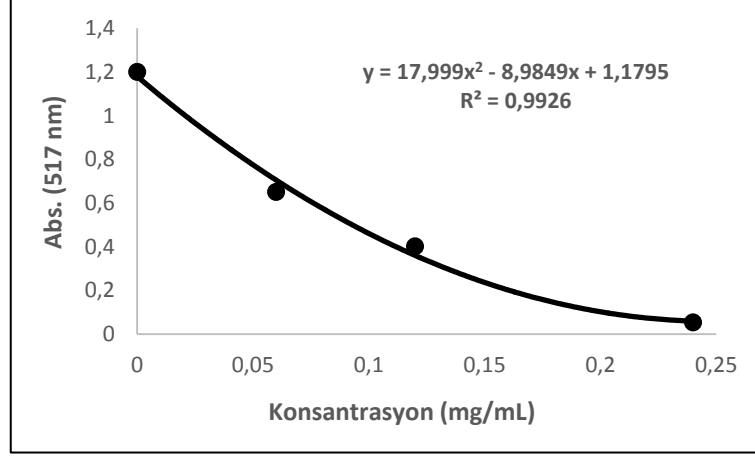
Şekil 68. Farklı konsantrasyondaki zerdeçal ekstraktının 517 nm’de verdiği absorbans değerlerinin grafiği ($SC_{50} = 0,130$ mg/mL)



Şekil 69. Farklı konsantrasyondaki yeşil çay (EtAc) ekstraktının 517 nm’de verdiği absorbans değerlerinin grafiği ($SC_{50} = 0,480$ mg/mL)



Şekil 70. Farklı konsantrasyondaki havaciva ekstraktının 517 nm’de verdiği absorbans değerlerinin grafiği ($SC_{50} = 0,087$ mg/mL)



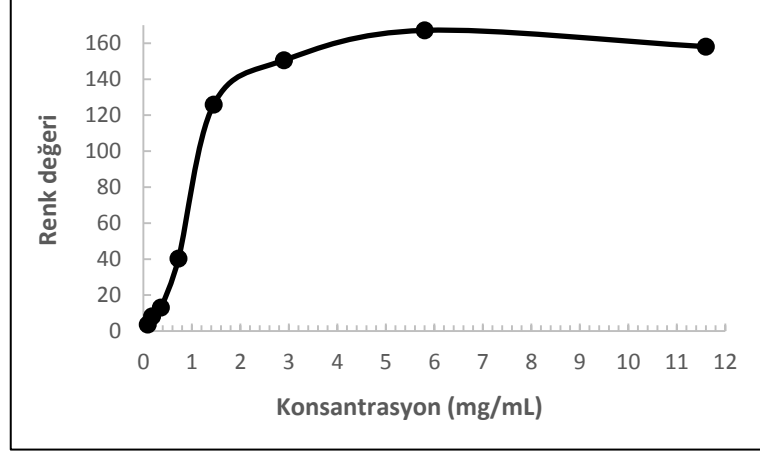
Şekil 71. Farklı konsantrasyondaki ıhlamur ekstraktının 517 nm’de verdiği absorbans değerlerinin grafiği ($SC_{50} = 0,08$ mg/mL)

Absorbans-konsantrasyon grafiklerden her bir bitki ekstraktı için maksimum absorbans değerini yarıya düşüren numune konsantrasyonu yani SC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Çalışılan numuneler arasında karşılaştırma yapıldığında SC_{50} değeri en küçük olan yani antioksidan aktivitesi en yüksek olan numune metanol ekstraktlı yeşil çay ve tam tersi yorum yapıldığında da en yüksek SC_{50} değerine sahip olan yani antioksidan aktivitesi en düşük olan numune ise sarısabır (*Aloe vera*) olmuştur.

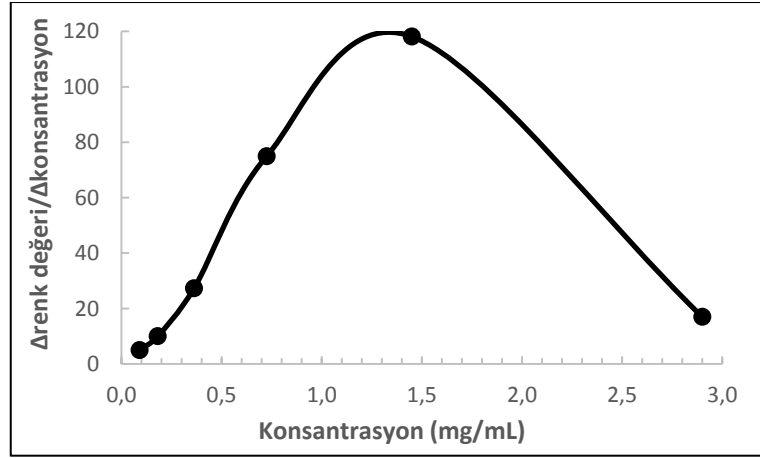
3.4. Bitki Ekstraktlarında Damlatma Yöntemi ile Belirlenen DPPH Radikal Temizleme Aktiviteleri

Farklı konsantrasyondaki bitki ekstraktlarının (numune) yeni geliştirilen damlatma yönteminde Image J programıyla belirlenen renk değerlerinin grafikleri çizilerek, bu renk değeri-konsantrasyon grafiklerinden CSC_{50} değerlerinin nasıl bulunduğu Şekil 72-96 ve daha iyi sonuç aldığımız türevlendirme işlemi yapılarak elde edilen CSC_{50} değerleri grafikleri ise Şekil 73-97 de verilmiştir. Damlatma yöntemi uygulanarak İTK tabaka üzerine damlatılan hem doğrudan hem de türevlendirilerek CSC_{50} değerlerinin hesaplandığı resimler Şekil 74-98 de gösterilmiştir. Her numune farklı konsantrasyonlardan başlayarak 1:1 oranında seyreltilmek suretiyle 10 farklı konsantrasyonda çalışılmıştır. Damlatma işlemi yapılırken numune ve DPPH radikal karışımı 3 paralel olacak şekilde İTK tabaka üzerine damlatılmıştır. Aynı şekilde renkli olan bitki ekstraktları için 3 paralel olacak şekilde kör (numune+çözücü) çalışması da

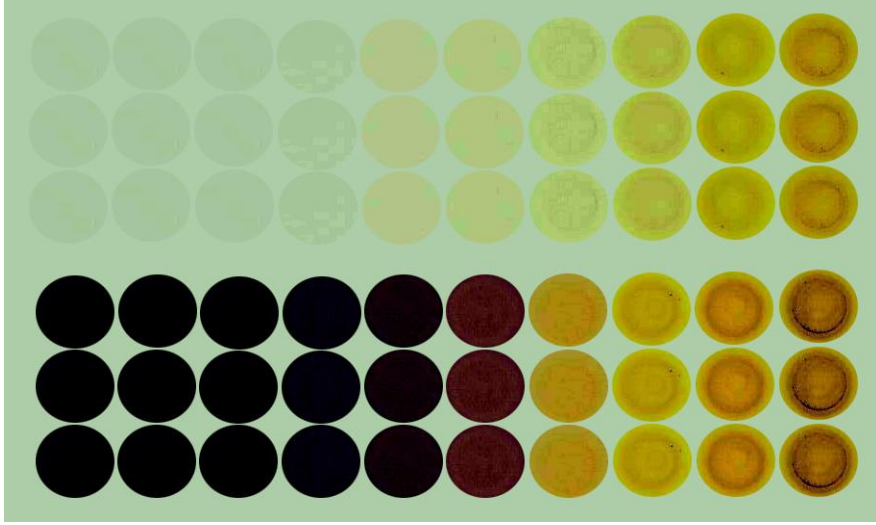
yapılmıştır. Çalışılan paralellerin ortalaması alınarak ve elde edilen renk değerlerinden kör değerleri çıkartılarak asıl reaktifle reaksiyon sonucu oluşan renk değerleri belirlenmiştir.



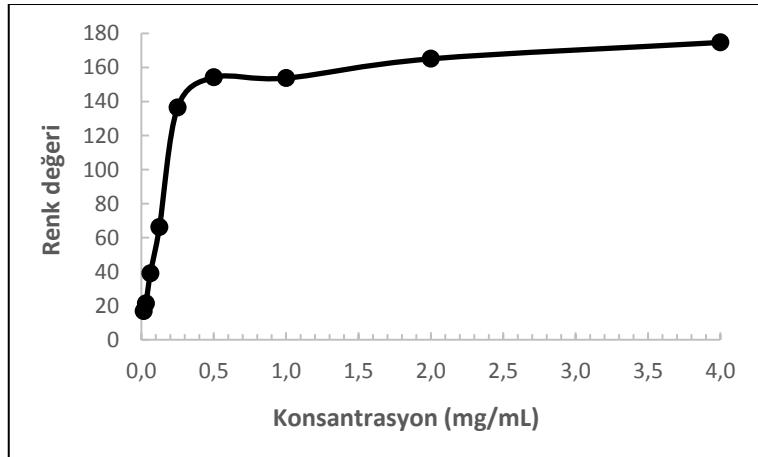
Şekil 72. Farklı konsantrasyondaki kantaron ekstraktının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği ($CSC_{50} = 1 \text{ mg/mL}$)



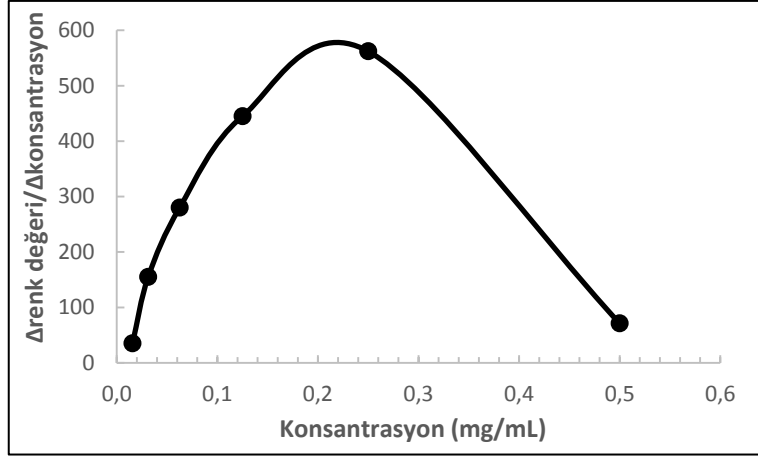
Şekil 73. Türev yöntemi kullanılarak kantaron ekstraktının CSC_{50} değerinin hesaplandığı grafik ($CSC_{50} = 1,20 \text{ mg/mL}$)



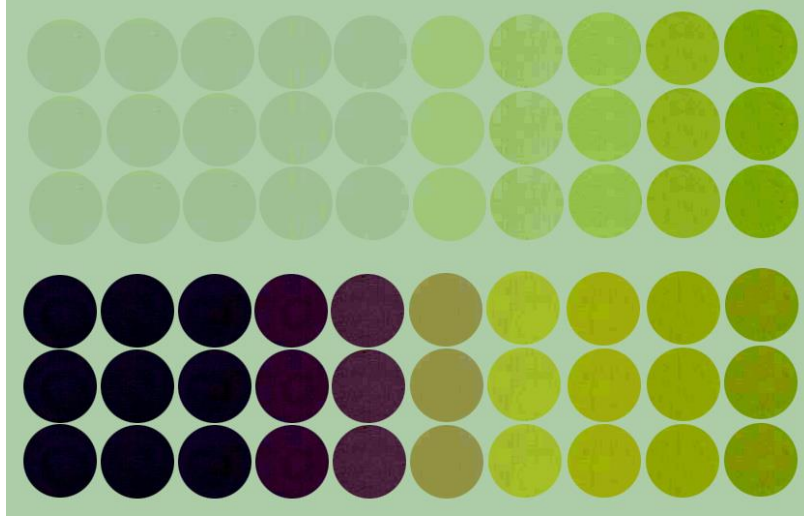
Şekil 74. 23,2 mg/mL konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan üst kısımda da kör damlatması yapılan kantaron ekstraktının görüntüsü



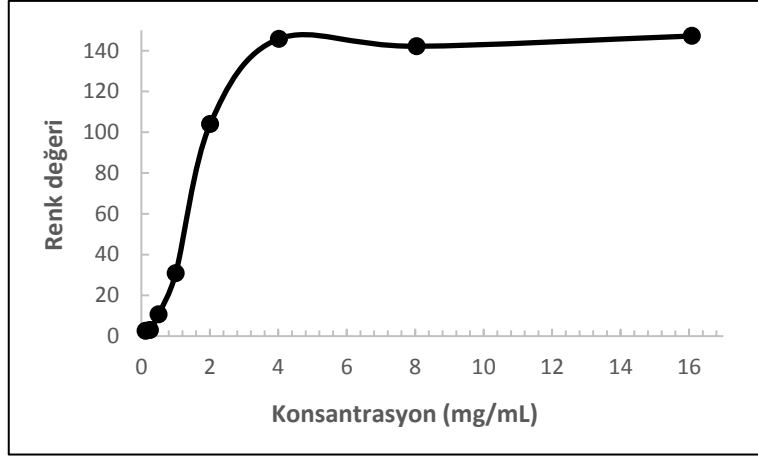
Şekil 75. Farklı konsantrasyondaki nane ekstraktının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği ($CSC_{50} = 0,15$ mg/mL)



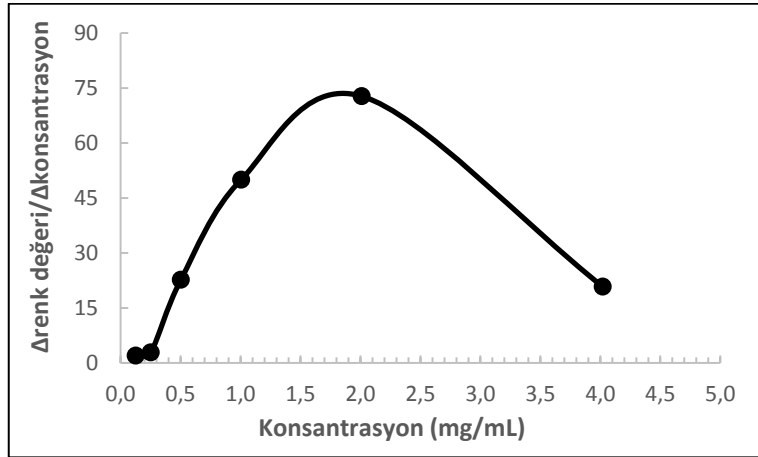
Şekil 76. Türev yöntemi kullanılarak nane ekstraktının CSC_{50} değerinin hesaplandığı grafik ($CSC_{50} = 0,225$ mg/mL)



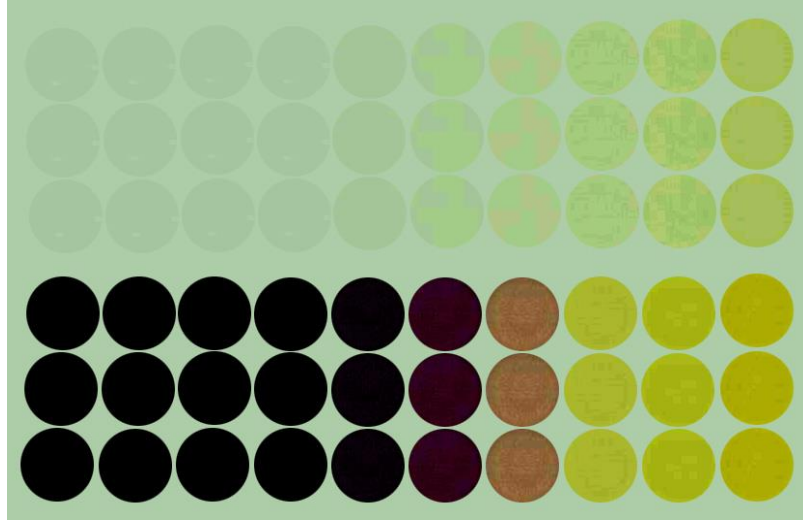
Şekil 77. 8 mg/mL konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan üst kısımda da kör damlatması yapılan nane ekstraktının görüntüsü



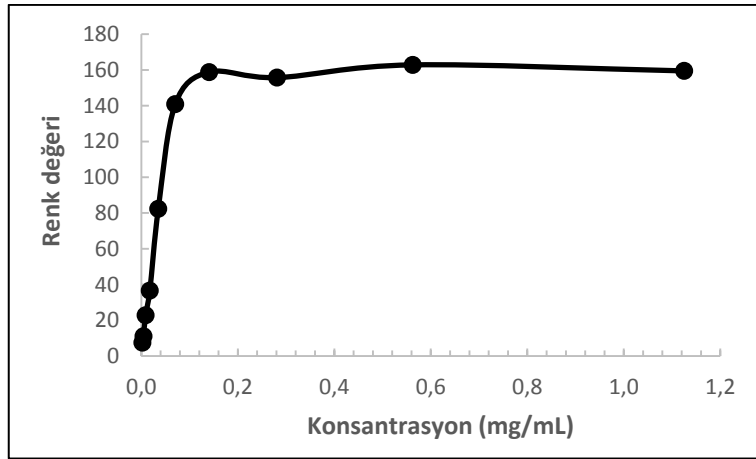
Şekil 78. Farklı konsantrasyondaki sarı sabır (aleo vera) ekstraktının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği ($CSC_{50} = 1,5$ mg/mL)



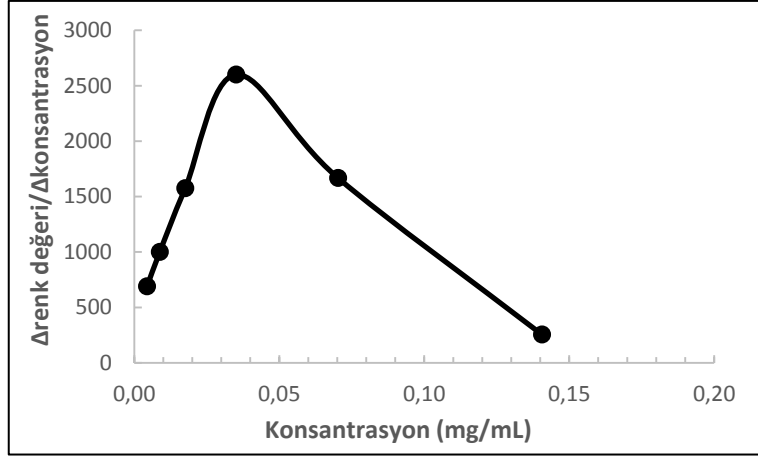
Şekil 79. Türev yöntemi kullanılarak sarı sabır ekstraktının CSC_{50} değerinin hesaplandığı grafik ($CSC_{50} = 2,00$ mg/mL)



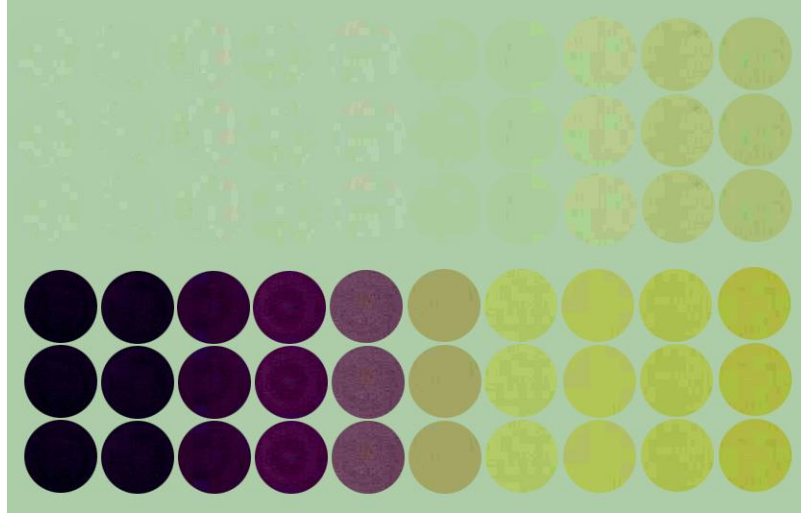
Şekil 80. 32,16 mg/mL konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan üst kısımda da kör damlatması yapılan sarısabır ekstraktının görüntüsü



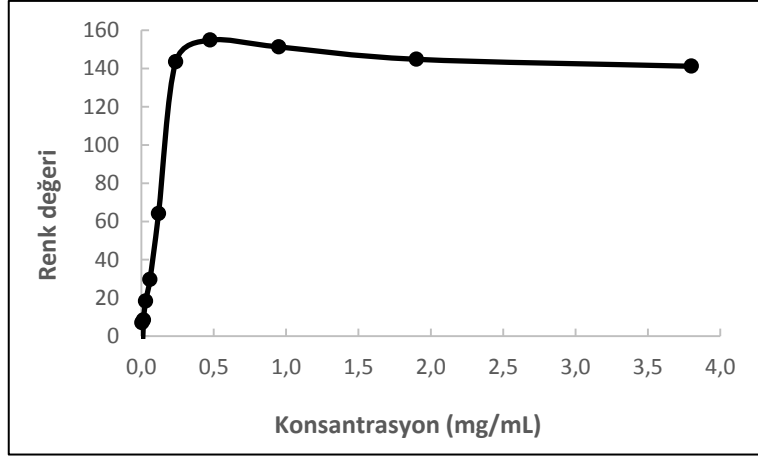
Şekil 81. Farklı konsantrasyondaki yeşil çay ekstraktının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği (CSC₅₀ = 0,033mg/mL)



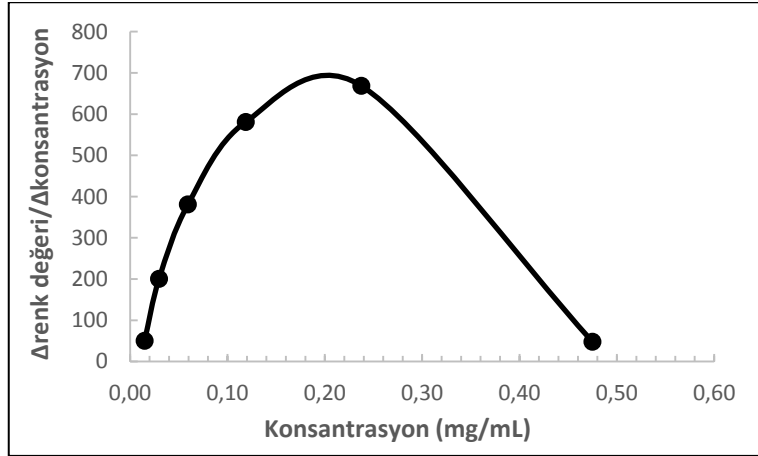
Şekil 82. Türev yöntemi kullanılarak yeşil çay ekstraktının CSC_{50} değerinin hesaplandığı grafik ($CSC_{50} = 0,035$ mg/mL)



Şekil 83. 2,25 mg/mL konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan üst kısımda da kör damlatması yapılan yeşil çay ekstraktının görüntüsü



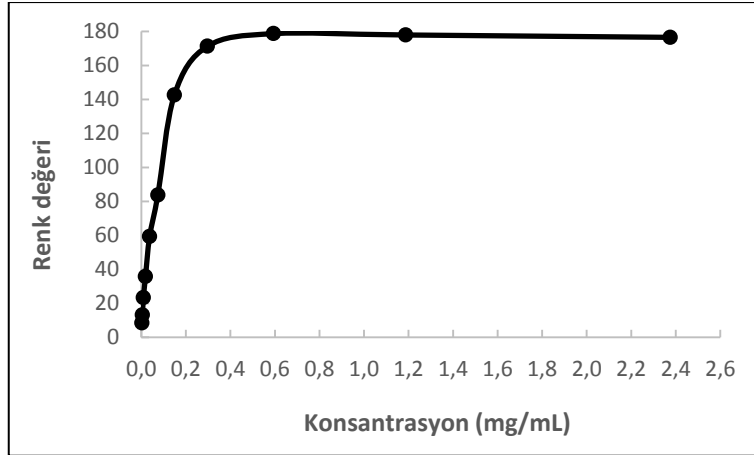
Şekil 84. Farklı konsantrasyondaki biberiye ekstraktının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği ($CSC_{50} = 0,13\text{mg/mL}$)



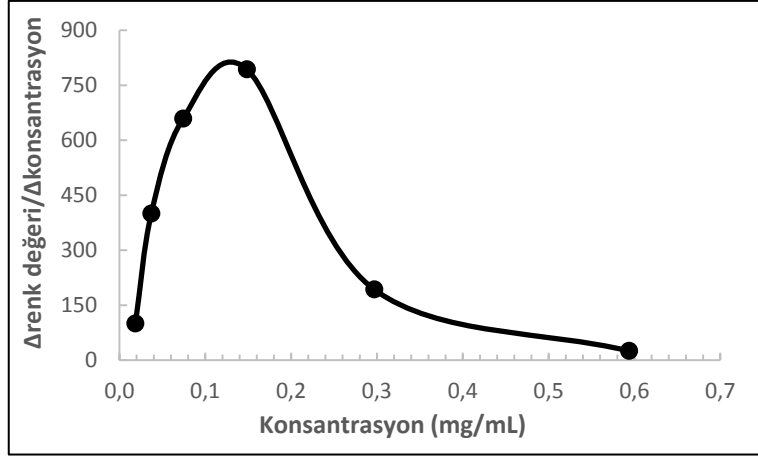
Şekil 85. Türev yöntemi kullanılarak biberiye ekstraktının CSC_{50} değerinin hesaplandığı grafik ($CSC_{50} = 0,210\text{ mg/mL}$)



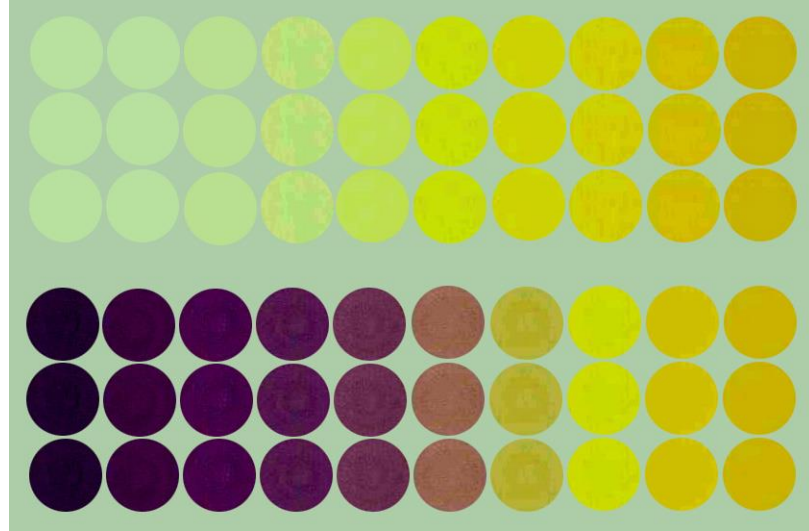
Şekil 86. 7,6 mg/mL konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan üst kısımda da kör damlatması yapılan biberiye ekstraktının görüntüsü



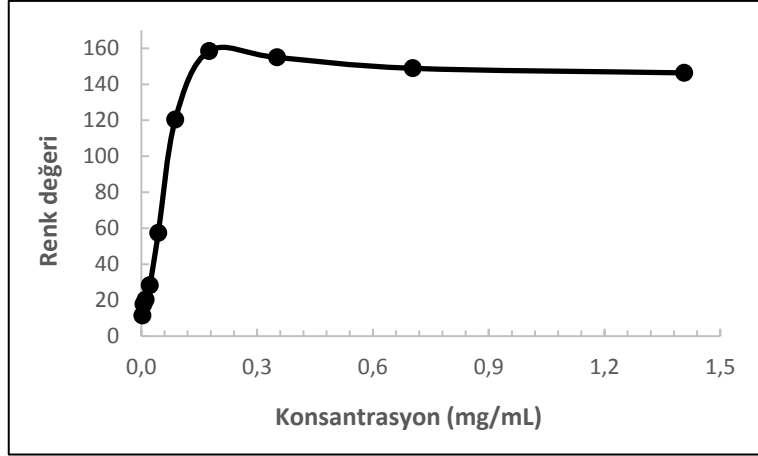
Şekil 87. Farklı konsantrasyondaki zerdeçal ekstraktının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği (CSC₅₀ = 0,08mg/mL)



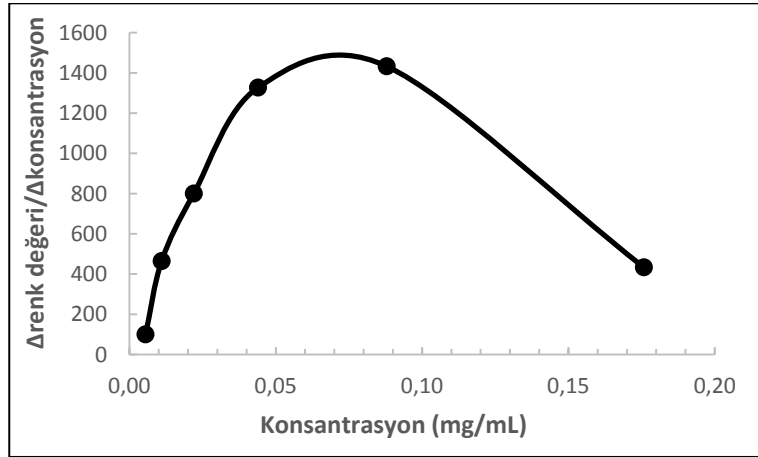
Şekil 88. Türev yöntemi kullanılarak zerdeçal ekstraktının CSC_{50} değerinin hesaplandığı grafik ($CSC_{50} = 0,130$ mg/mL)



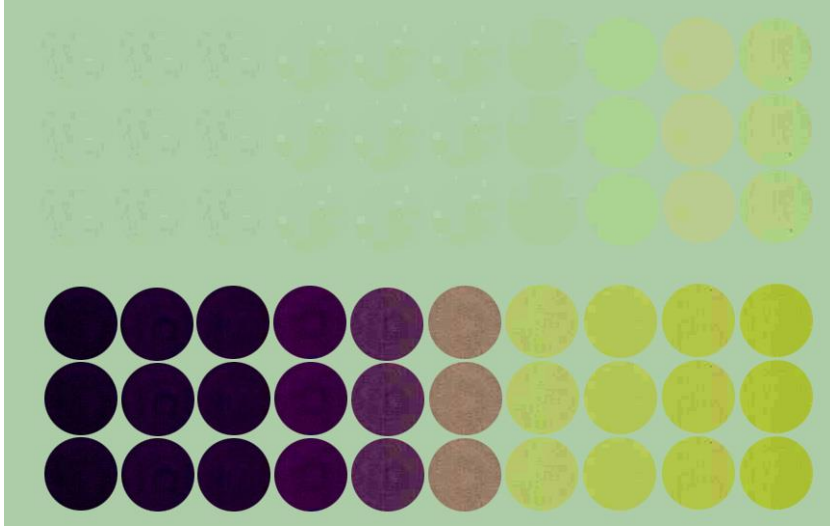
Şekil 89. 4,75 mg/mL konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan üst kısımda da kör damlatması yapılan zerdeçal ekstraktının görüntüsü



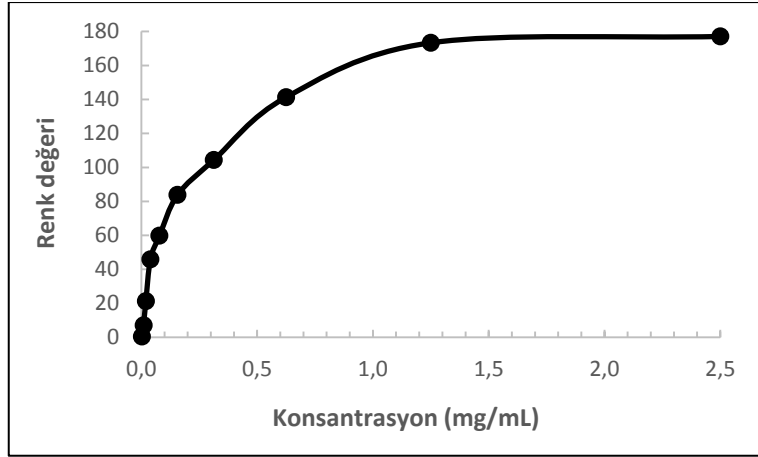
Şekil 90. Farklı konsantrasyondaki ıhlamur ekstraktının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği ($CSC_{50} = 0,06$ mg/mL)



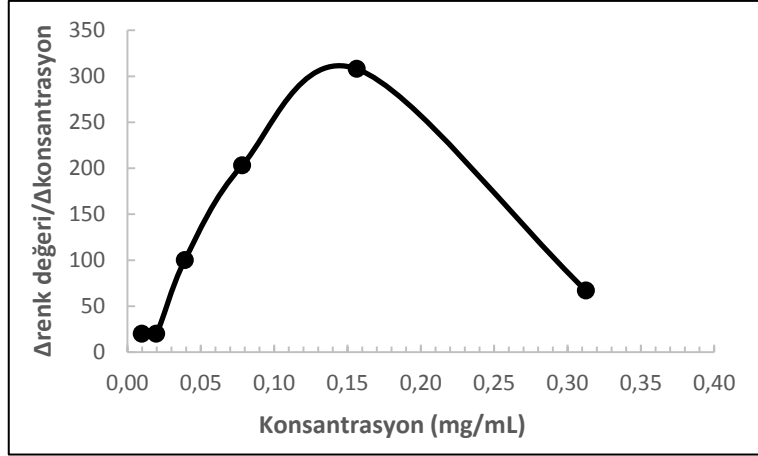
Şekil 91. Türev yöntemi kullanılarak ıhlamur ekstraktının CSC_{50} değerinin hesaplandığı grafik ($CSC_{50} = 0,070$ mg/mL)



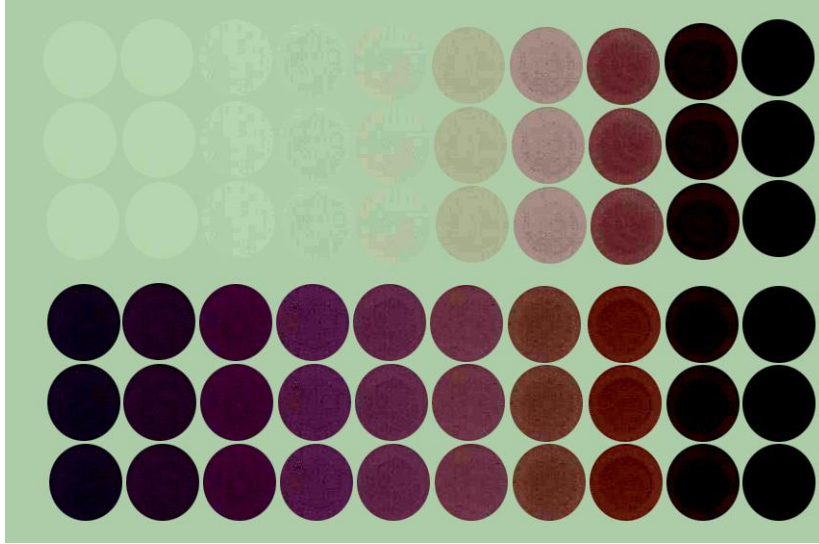
Şekil 92. 2,813 mg/mL konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan üst kısımda da kör damlatması yapılan ıhlamur ekstraktının görüntüsü



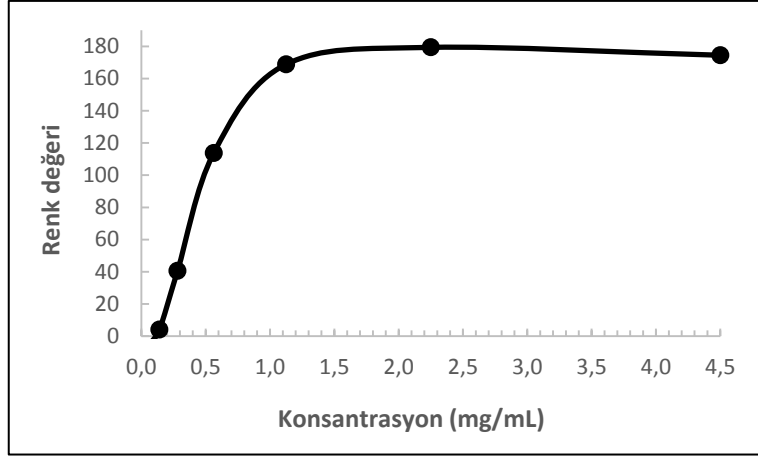
Şekil 93. Farklı konsantrasyondaki havaciva ekstraktının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği ($CSC_{50} = 0,1$ mg/mL)



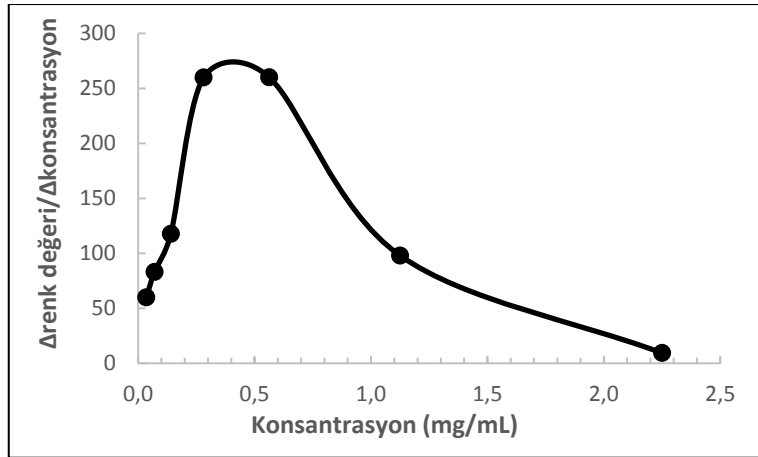
Şekil 94. Türev yöntemi kullanılarak havaciva ekstraktının CSC_{50} değerinin hesaplandığı grafik ($CSC_{50} = 0,120$ mg/mL)



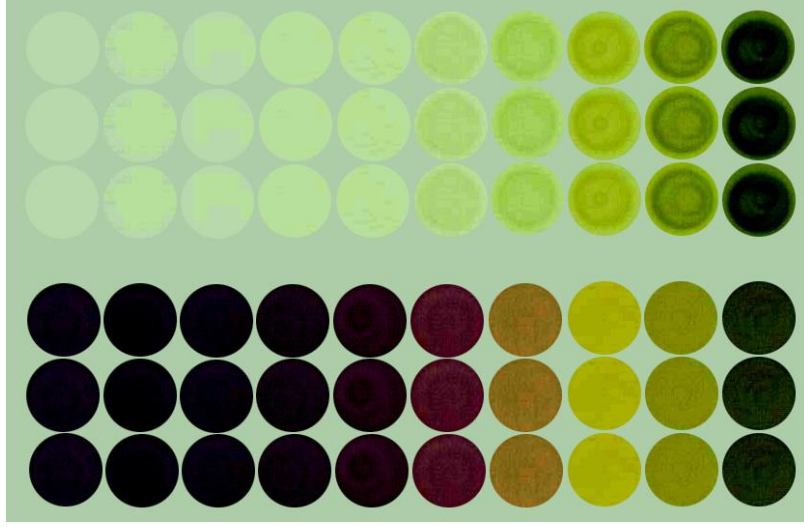
Şekil 95. 5 mg/mL konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan üst kısımda da kör damlatması yapılan havaciva ekstraktının görüntüsü



Şekil 96. Farklı konsantrasyondaki yeşil çay (EtAc) ekstraktının Image J programı ile ölçülen renk değerlerinin grafiği ($CSC_{50} = 0,45$ mg/mL)



Şekil 97. Türev yöntemi kullanılarak yeşil çay (EtAc) ekstraktının CSC_{50} değerinin hesaplandığı ($CSC_{50} = 0,40$ mg/mL)

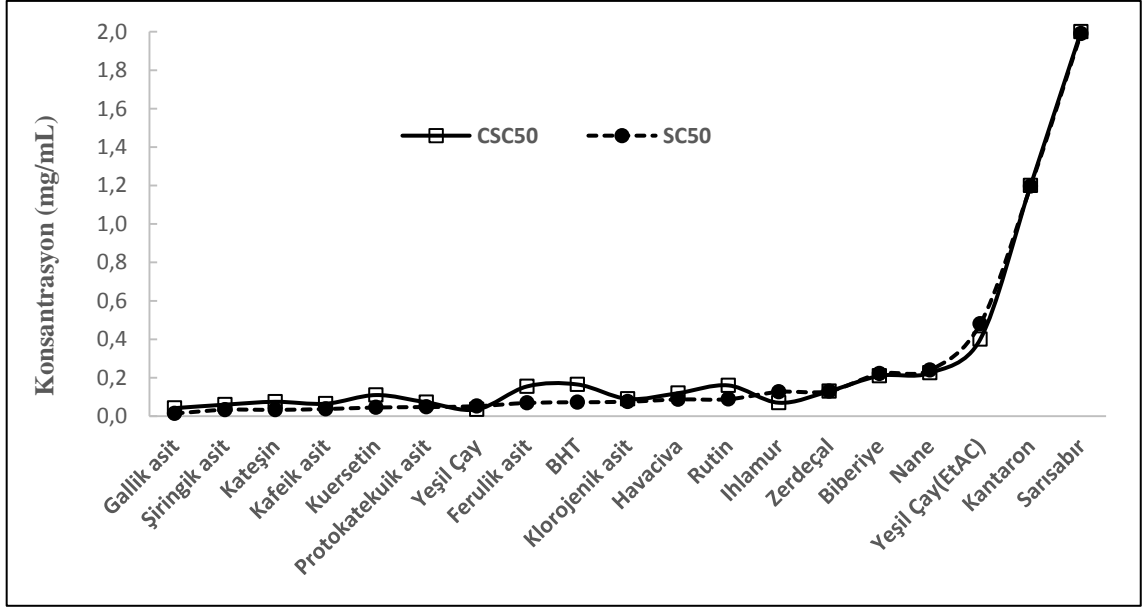


Şekil 98. 9 mg/mL konsantrasyonda başlayarak ve 1:1 oranında seyreltilerek İTK tabaka üzerine damlatılan üst kısımda da kör damlatması yapılan yeşil çay (EtAc) ekstraktının görüntüsü

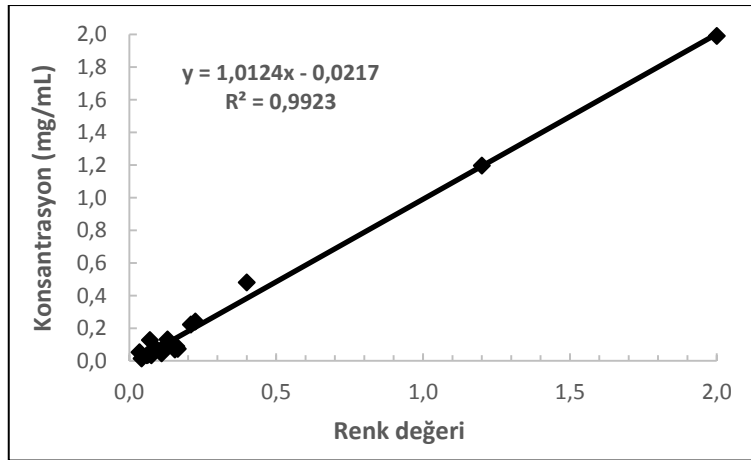
Bitki ekstraktları için yapılan damlatma çalışmasında 1. dereceden türev alınarak elde edilen renk değeri-konsantrasyon grafiklerinden her bir numune için maksimum renk değerine karşılık gelen konsantrasyon yani CSC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Çalışılan numuneler arasında karşılaştırma yapıldığında, spektrofotometrik yöntemle elde edilen sonuçlara benzer olarak antioksidan aktivitesi en yüksek olan numune yeşil çay (metanol ekstraktı) ve antioksidan aktivitesi en düşük olan numune ise sarısabır olmuştur.

3.5. DPPH Testinde Çalışılan Standart ve Bitki Ekstraktlarının Spektrofotometrik ve Damlatma Yöntemleri Arasındaki Korelasyon

Şekil 99'da spektrofotometrik ve damlatma çalışmasında kullanılan standart ve numunelerin SC_{50} ve CSC_{50} sonuçları karşılaştırılmıştır. Elde edilen Şekil 100'deki korelasyon grafiği incelendiğinde yeni geliştirilen damlatma yöntemi ile uzun yıllardır çok yaygın olarak kullanılan spektrofotometrik yöntem arasındaki uyumun yüksek olduğu görülmüştür.



Şekil 99. DPPH testinde çalışılan standartların ve bitki ekstraktlarının her iki yöntemle (spektrofotometrik ve damlatma) antioksidan aktivitelerinin karşılaştırıldığı grafik



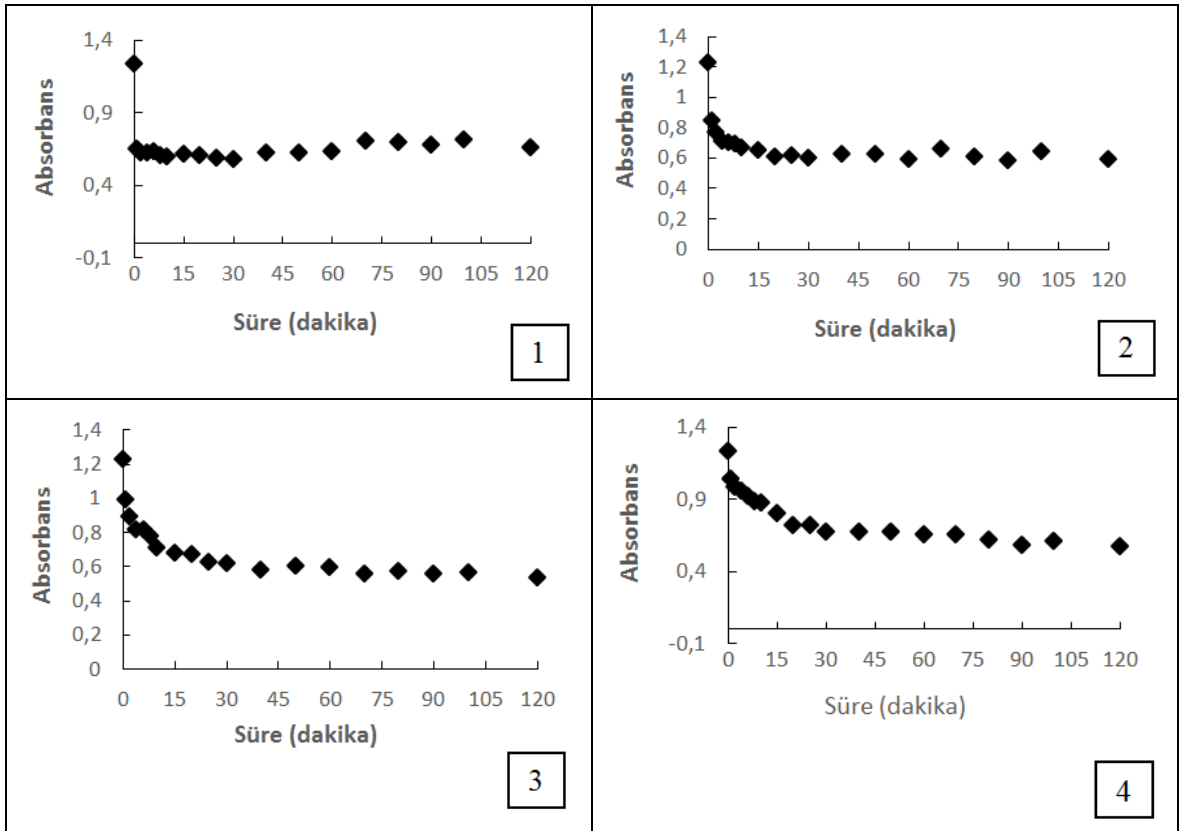
Şekil 100. DPPH testinde çalışılan standartların ve bitki ekstraktlarının spektrofotometrik ve damlatma yöntemleri arasındaki korelasyon grafiği

Standartlar ve numuneler için çalışılan iki yöntem karşılaştırıldığında, yeni geliştirilen yöntem ile spektrofotometrik yöntem arasındaki korelasyon değerinin ($R^2=0,9923$) yüksek olduğu görülmektedir.

3.6. Standartların ve Bazı Bitki Ekstraktlarının DPPH Testindeki Reaksiyon Kinetiği Sonuçları

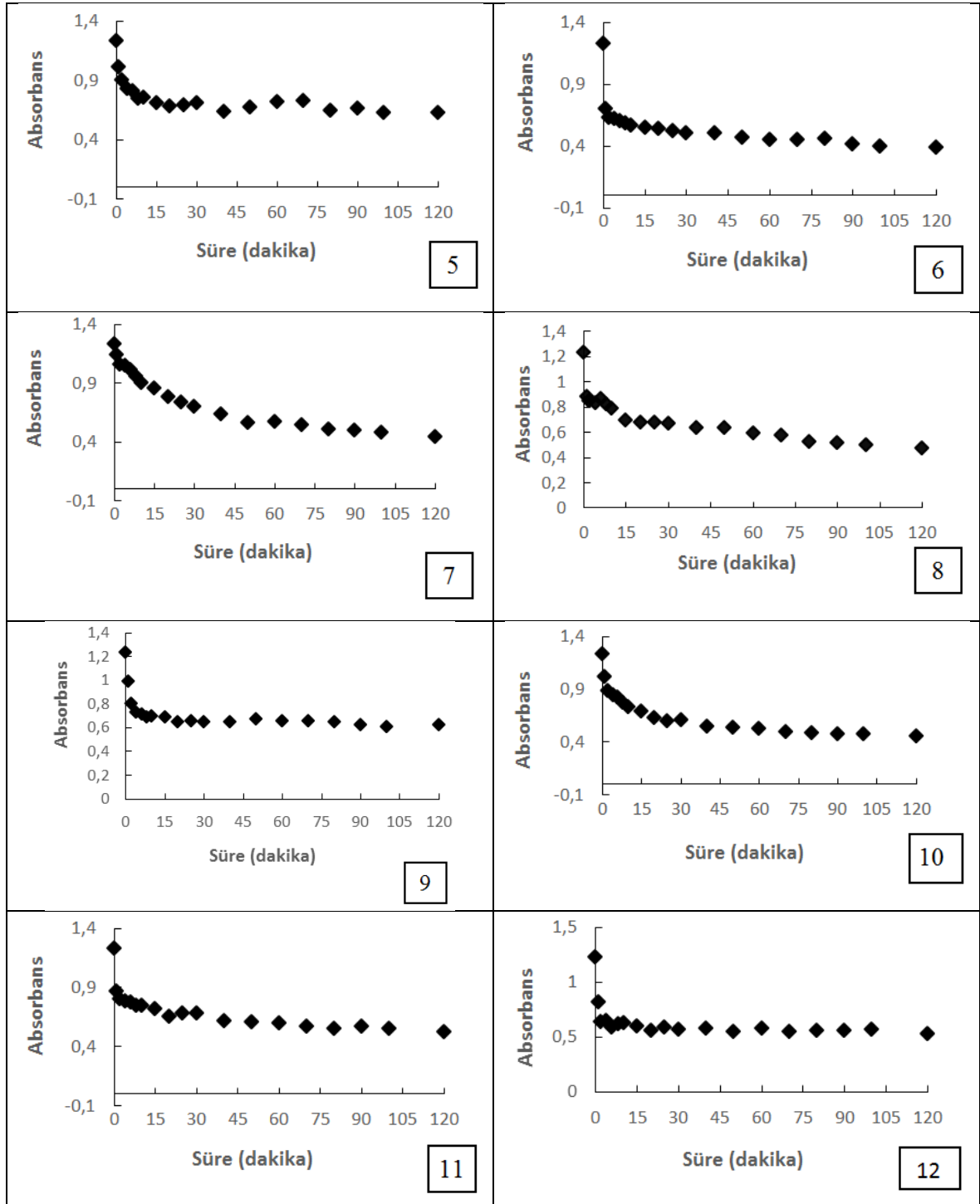
3.6.1. Standartların DPPH Testindeki Reaksiyon Kinetiği

Bekletme süresinin optimizasyonu için birçok antioksidan standartla belirli aralıklarla denemeler yapılmıştır. Çalışılan antioksidan standartların hepsinin bir arada verildiği reaksiyon kinetiği grafiği de Şekil 101’de gösterilmektedir.

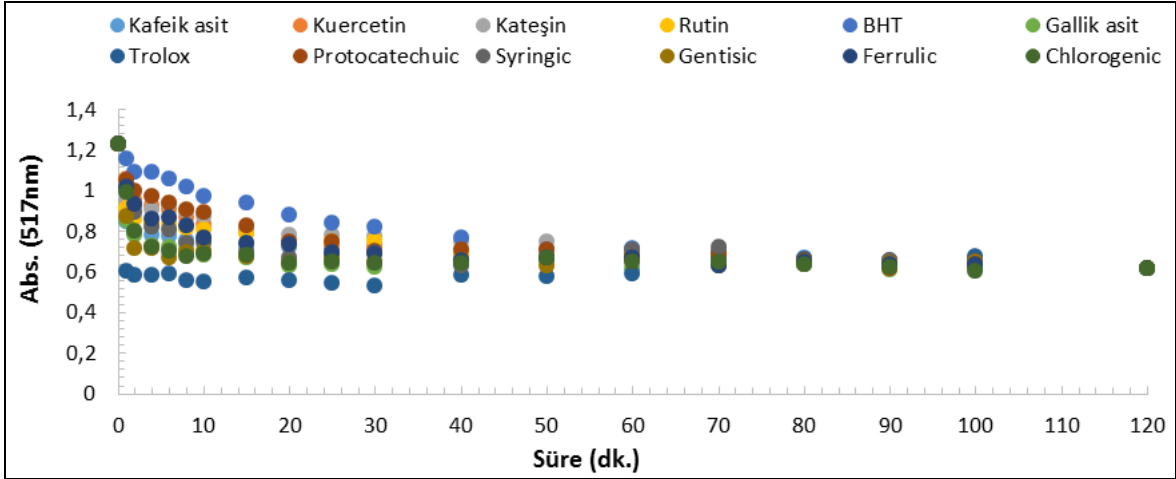


Şekil 101. Standartların DPPH radikal temizleme testindeki zamana bağlı absorban değişimi grafikleri, [1. trolox, 2. gallik asit, 3. ferulik asit, 4. protokatekuik asit, 5. şiringik asit, 6. kafeik asit, 7. BHT, 8. kateşin, 9. klorojenik asit, 10. kuersetin, 11. rutin, 12. Gentisik asit]

Şekil 101'in devamı



Her bir antioksidan standart için çalışılan SC_{50} konsantrasyonunda; Troloks (1) ve gentsik asidin (12) reaksiyonu tamamlama süresinin daha kısa olduğu görülmektedir. Ama genel olarak çalışılan standartlar incelendiğinde 60 dakikadan sonra reaksiyonun tamamlandığı görülmektedir.

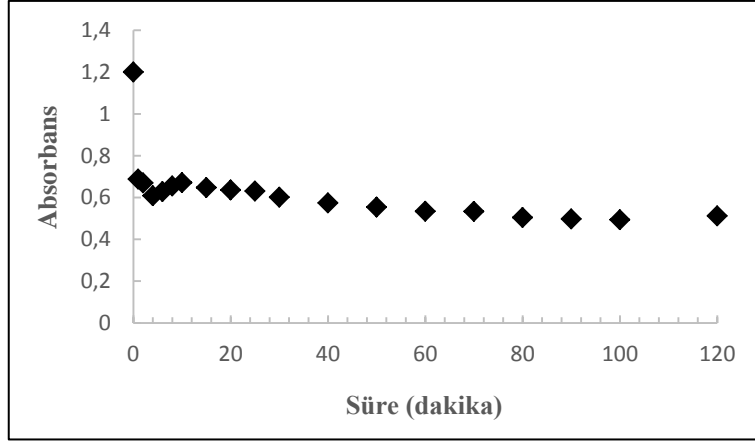


Şekil 102. Standartların hepsinin bir arada olduğu DPPH radikal temizleme testindeki zamana bağlı reaksiyon kinetiği grafiği

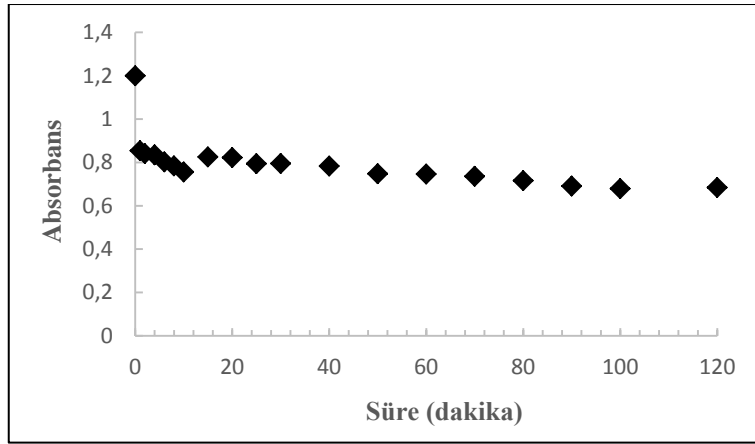
Standartların reaksiyon kinetiklerinin toplu olarak gösterildiği şekil 102’de, reaksiyon kinetiği belirlenen birçok standardın 60 dakikada reaksiyonu tamamladıkları görülmüştür. Çıkan sonuçlar literatürle karşılaştırıldığında da benzer sonuçlar elde edilmektedir.

3.6.2. Bazı Bitki Ekstraktlarının DPPH Testindeki Reaksiyon Kinetiği

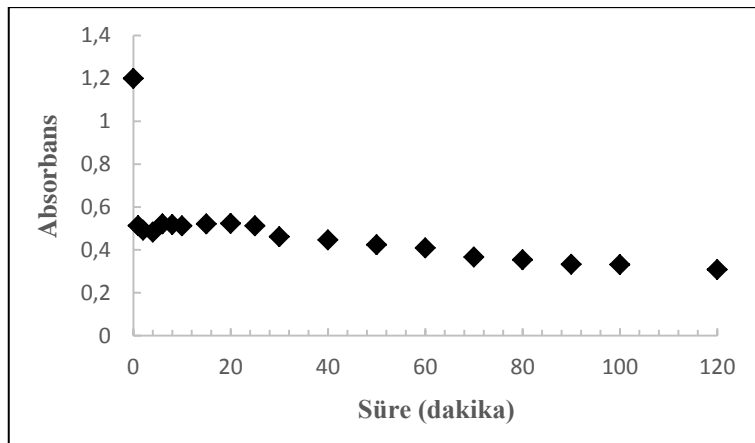
Farklı konsantrasyonlardaki üç bitki ekstraktının reaksiyon kinetikleri belirlenmiştir. Yeşil çay (0,18 mg/mL) için elde edilen reaksiyon kinetiği grafiği Şekil 103’de, zerdeçal (0,38 mg/mL) için Şekil 104 ve sarısabır için ise Şekil 105’te gösterilmiştir.



Şekil 103. Yeşil çay ekstraktının DPPH testindeki zamana bağlı reaksiyon kinetiği grafiği



Şekil 104. Zerdeçal ekstraktının DPPH testindeki zamana bağlı reaksiyon kinetiği grafiği



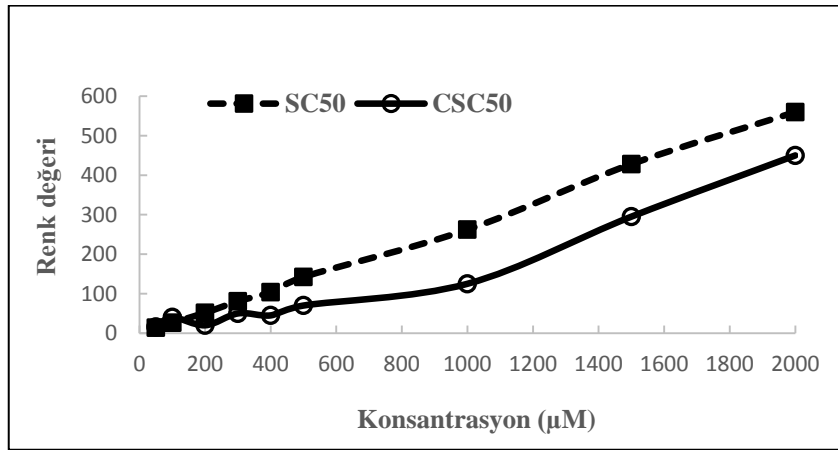
Şekil 105. Sarımsabır ekstraktının DPPH testindeki zamana bağlı reaksiyon kinetiği grafiği

Antioksidan aktivitesi en yüksek olan yeşil çay, orta derecede olan zerdeçal ve düşük aktiviteye sahip olan sarısabır bitki ekstraktlarının, reaksiyonu 60 dakika sonunda tamamladıkları görülmektedir. Bu sonuçlar bitki ekstraktlarının standartlara benzer reaksiyon kinetiği olduğunu göstermektedir.

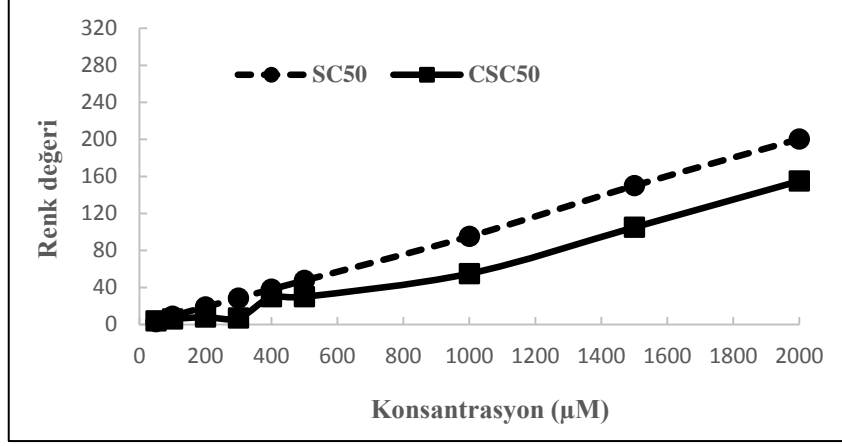
3.7. Yeni Geliştirilen Damlatma Yöntemi ile DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini İçin Yapılan Optimizasyon Sonuçları

3.7.1. DPPH[•] Radikalinin Çalışma Konsantrasyonunun Belirlenmesi

DPPH radikalinin çalışma konsantrasyonunun belirlenmesi için aynı konsantrasyonlarda kullanılan Troloks standardı ile yapılan denemelerin konsantrasyon-renk değeri grafiği Şekil 106'da ve gallik asit standardı ile yapılan denemelerin konsantrasyon-renk değeri grafiği Şekil 107'de verilmiştir. İki antioksidan standartlarla yapılan çalışmalar değerlendirilerek damlatma çalışması için kullanılan DPPH radikalinin konsantrasyonu belirlenmiştir.



Şekil 106. DPPH radikalinin çalışma konsantrasyonunun belirlenmesi için Troloks standardı için elde edilen renk değeri/konsantrasyon grafiği

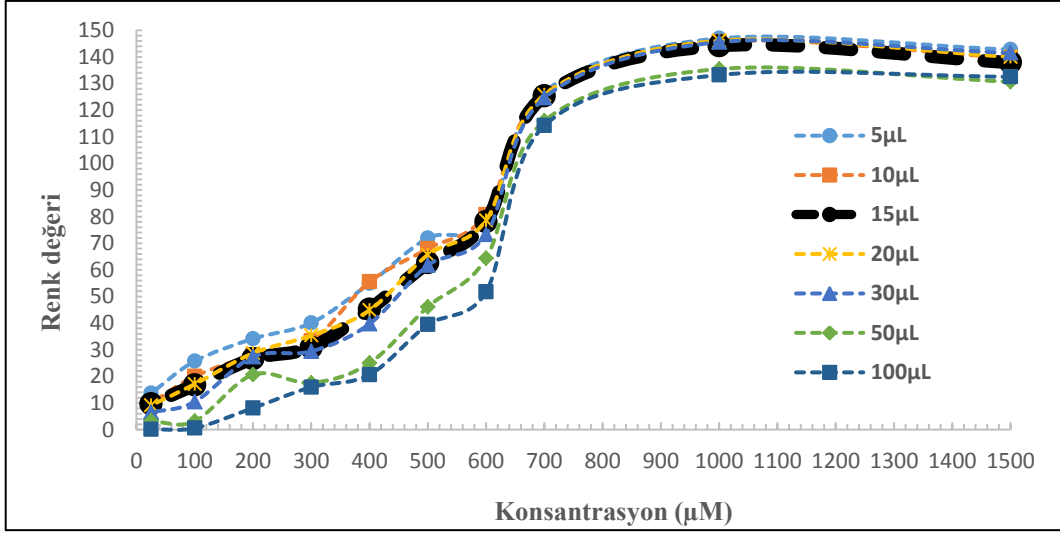


Şekil 107. DPPH radikalinin çalışma konsantrasyonunun belirlenmesi için gallik asit standardı için elde edilen renk değeri/konsantrasyon grafiği

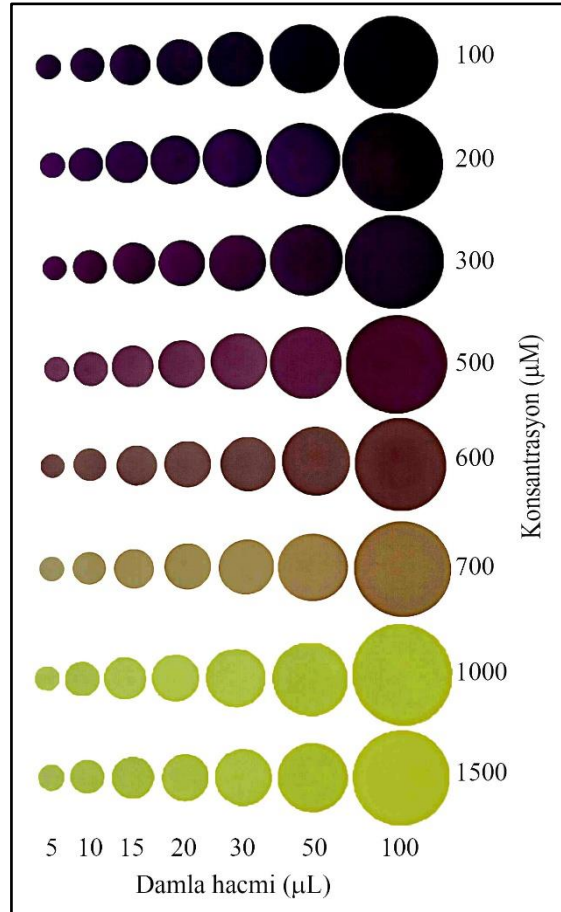
Her iki standart ile yapılan denemelerde de DPPH radikalinin konsantrasyonunun 500 µM'dan daha düşük olduğu zamanlarda, DPPH konsantrasyonu bu çalışma için yetersiz olmakta dolayısıyla İTK tabaka üzerinde numuneden gelen renk daha baskın olduğu için renk değerlerinin düzenli olmadığı görülmüştür. DPPH'in konsantrasyonu 1000 µM üzerine çıktığında DPPH'dan gelen mor-menekşe renk daha baskın olduğu için renk değerleri daha iyi belirlenebilmiştir. Bu sebeple damlatma çalışması için DPPH radikalinin konsantrasyonunun 500 µM'dan daha düşük konsantrasyonlarda çalışılmayacağı ve 1000 ile 2000 µM arasında herhangi bir konsantrasyon değerinde çalışılabileceği tespit edilmiştir.

3.7.2. Damlatma Hacminin (Damla Hacmi) Belirlenmesi

Damlatma hacminin belirlenebilmesi için sabit DPPH konsantrasyonunda (2000 µM) çalışılmıştır. Çalışmada farklı konsantrasyondaki Troloks standardı ile 10-100 µL hacimlerinde çözelti çekebilen mikropipetle yapılan çalışmada oluşan konsantrasyon-renk değeri grafiği Şekil 108'de ve bu grafiğe ait eş görüntü ise Şekil 109'da verilmiştir.



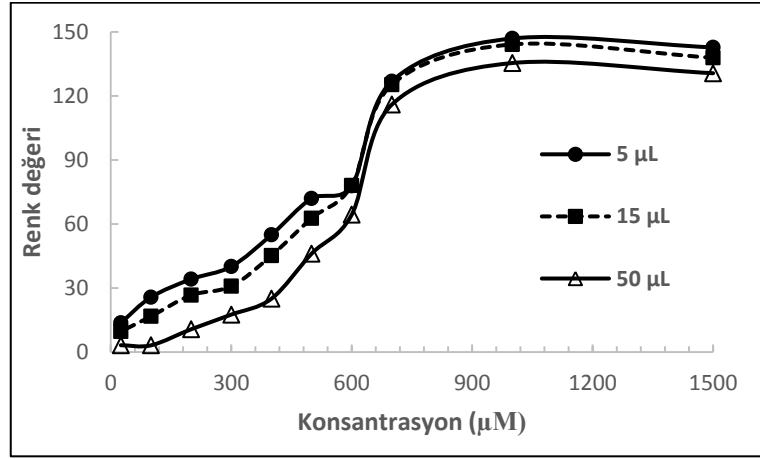
Şekil 108. Damla hacminin belirlenmesi için farklı konsantrasyonlardaki Troloks standardı ile yapılan çalışmanın grafiği



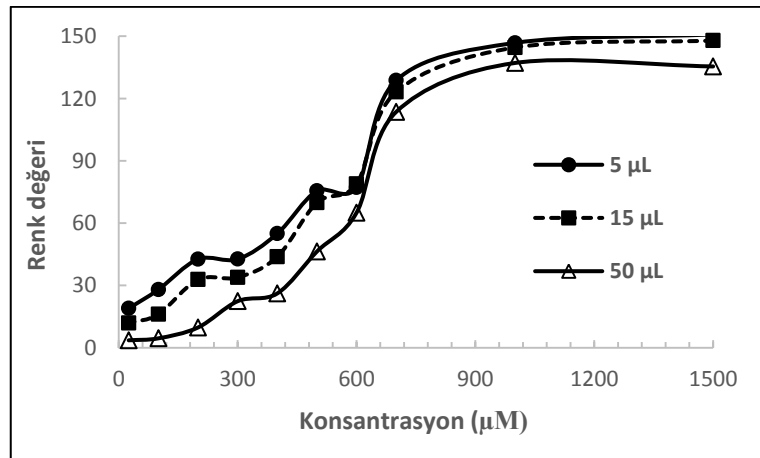
Şekil 109. Damlatma hacminin (damla hacminin) belirlenmesinde oluşan görüntü

Çalışılan damla hacimlerinden 5 ve 10 μL yetersiz olmuştur. 15, 20 ve 30 μL damla hacimleri grafikten de görüldüğü gibi birbirine çok benzemektedir. Bu anlamda üç miktarda kullanılabilir. 50 ve 100 μL gibi büyük hacimler hem madde sarfiyatını arttırmakta hem de grafikte olduğu gibi düzenli değerler vermemektedir.

Damla hacminin belirlenmesi için Troloks standardı ile yapılan çalışmada, İTK üzerinde oluşan spotlar değerlendirilirken başka bir çalışma da yapılmıştır. Bu çalışmada İTK tabaka üzerinde oluşan halkaların farklı kısımlarının renkleri, renk ölçüm programı olan Image J ile değerlendirilmiştir. Renk değerlendirmesi yapılırken Şekil 110'da spotların hepsinin tam orta kısımları değerlendirilmiş, Şekil 111'de ise her bir halkanın farklı kısımları değerlendirilmiştir.



Şekil 110. İTK üzerinde ki spotların orta kısımlarının renk değerlerinin belirlenmesi sonucu elde edilen grafik



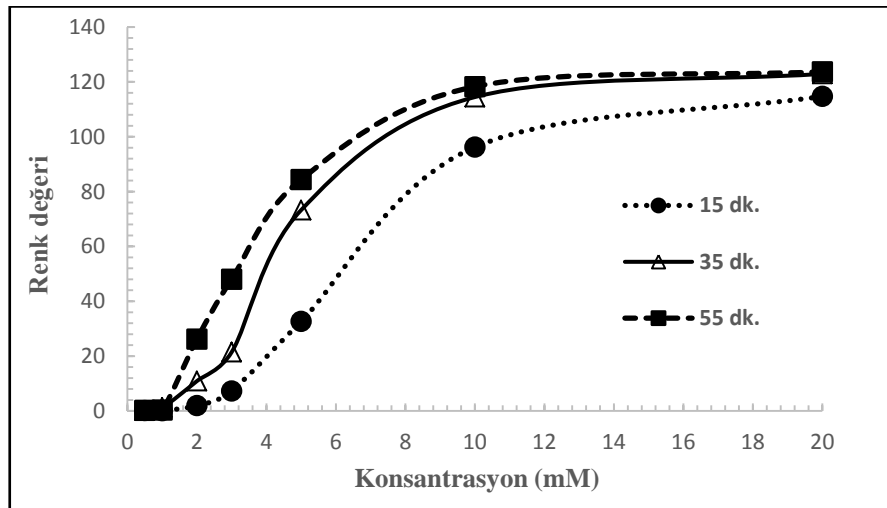
Şekil 111. İTK üzerinde ki spotların rastgele kısımlarının renk değerlerinin belirlenmesi sonucu elde edilen grafik

Sonuçlar değerlendirildiğinde grafikler arasında çok büyük farklılıkların olmadığı görülmektedir. Ancak spotların orta kısımları değerlendirildiğindeki çıkan sonucun diğerine nispeten daha düzenli olduğu görülmüştür.

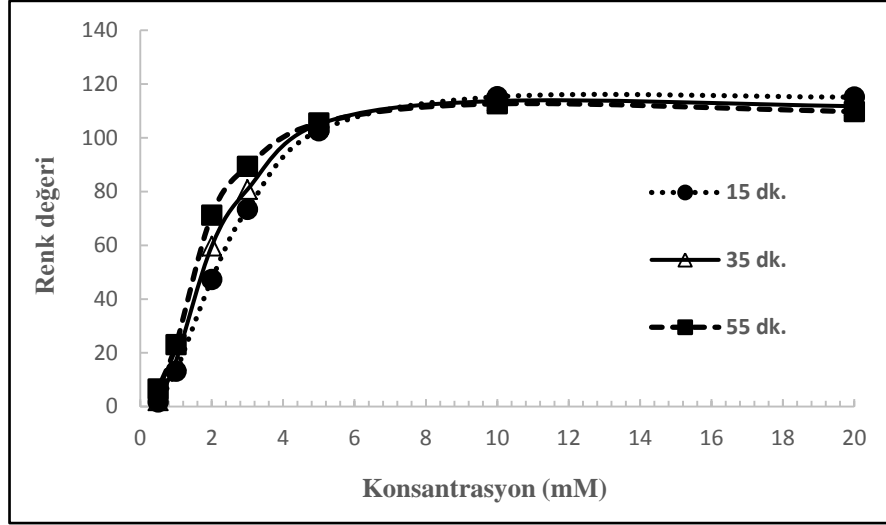
3.7.3. Reaksiyonun Gerçekleşme Ortamının Belirlenmesi

Reaksiyonun gerçekleşme ortamının belirlenmesi için sabit DPPH konsantrasyonunda yedi farklı konsantrasyonda hazırlanan şiringaldehit standardı ile çalışılmıştır. Reaksiyon ortamının belirlenmesi için yapılan çalışmaların ilkinde reaktif ile numuneler tüp içinde karıştırılmış ve tüp içinde bekletilerek 60 dakikaya kadar belirli aralıklarla İTK plaka üzerine damlatılıp değerlendirilmiştir (Şekil 112). Diğer kısmında ise, reaktif ve numuneler tüpte karıştırılmış ve hemen İTK plaka üzerine damlatılmıştır. Bu İTK tabaka ilkinde olduğu gibi aynı şekilde belli aralıklarla taratılıp değerlendirilmiştir (Şekil 113).

İlk denemede spektrofotometrik yöntemde olduğu gibi reaksiyonun tamamı deney tüpleri içinde gerçekleşmiştir. Reaksiyon süresi dolduğunda İTK tabaka üzerine damlatılmış ve değerlendirilmiştir. Reaksiyon İTK tabaka üzerinde gerçekleştiği zaman ise reaksiyona İTK'nın yapısında bulunan silika etki etmiştir.



Şekil 112. Şiringaldehit standardı ile reaksiyonun gerçekleşme ortamının belirlenmesi için tüplerde bekletilerek yapılan çalışma sonucunda elde edilen grafik

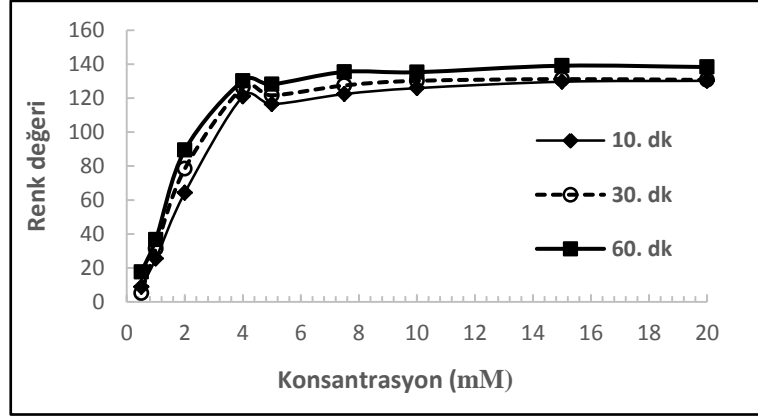


Şekil 113. Şiringaldehit standardı ile reaksiyonun gerçekleşme ortamının belirlenmesi için İTK tabaka üzerinde bekletilerek yapılan çalışma sonucunda elde edilen grafik

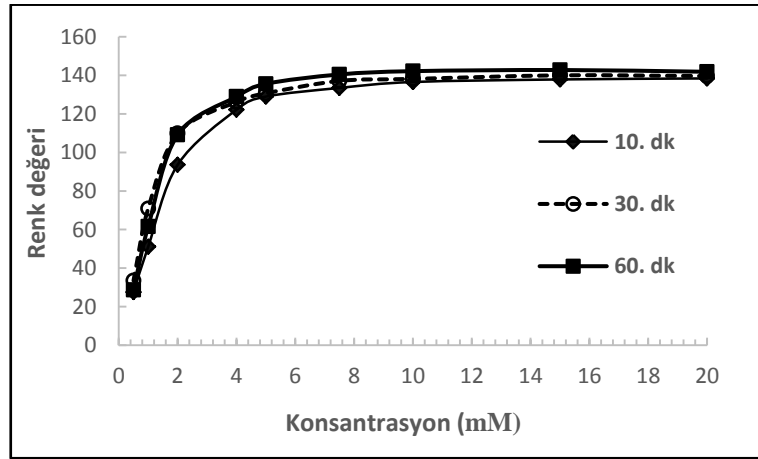
Bu çalışmaların sonunda reaksiyon İTK üzerinde gerçekleştiğindeki grafik (Şekil 113) daha düzgün çıkmış olsa da İTK üzerinde kısa bir süre geçtikten sonra sararmanın olduğu görülmüştür.

3.8. Farklı Özellikteki İTK'ların Reaksiyona Etkisi

Farklı özellikteki İTK tabakaların reaksiyona etkisi incelenirken laboratuvarımızda mevcut olan İTK silika gel 60 ve 60 F₂₅₄ özellikteki tabakalar kullanılmıştır. Aşağıda şiringaldehit standardı kullanılarak yapılan çalışmada Şekil 114'te reaksiyonun tüpte gerçekleştikten sonra İTK silika gel 60 üzerine damlatılıp ölçülen renk değerleri gösterilmektedir. Aynı çalışmanın İTK silika gel 60 F₂₅₄ ile elde edilen değerleri ise Şekil 115'de gösterilmektedir.

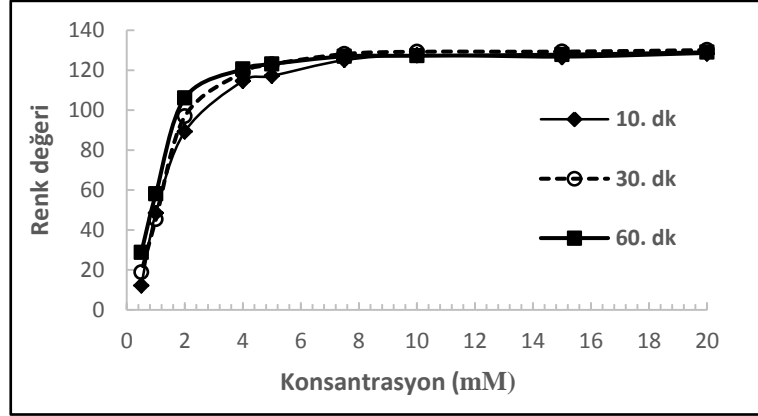


Şekil 114. İTK silika gel 60 ile reaksiyonun tüpte gerçekleştiği zaman elde edilen renk değeri/konsantrasyon grafiği

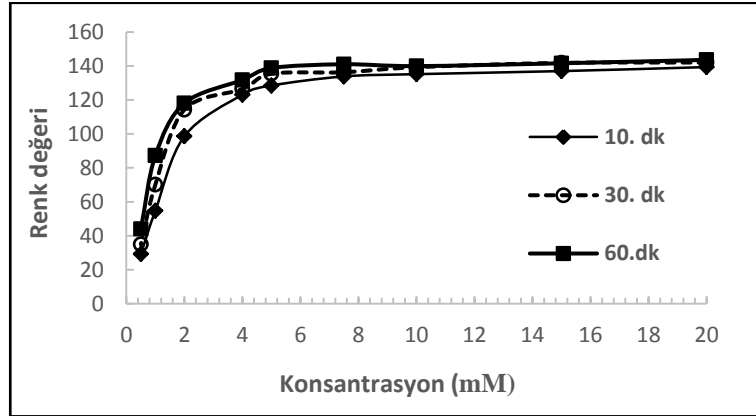


Şekil 115. İTK silika gel 60 F₂₅₄ ile reaksiyonun tüpte gerçekleştiği zaman elde edilen renk değeri/konsantrasyon grafiği

Çalışmada diğer kısmında reaktif ve numuneler deney tüplerinde karıştırıldıktan sonra hemen bu iki farklı özellikteki İTK tabaka üzerine damlatılmıştır. Belirli aralıklarla bu iki İTK tabaka taratılmış ve renk değerleri belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda İTK silika gel 60 tabaka ile yapılan verilerin grafiği Şekil 116'da gösterilmiştir. İTK silika gel 60 F₂₅₄ ile elde edilen sonuçlar ise Şekil 117'de verilmiştir.



Şekil 116. İTK silika gel 60 ile reaksiyonun İTK tabaka üzerinde gerçekleştiği zaman elde edilen renk değeri/konsantrasyon grafiği

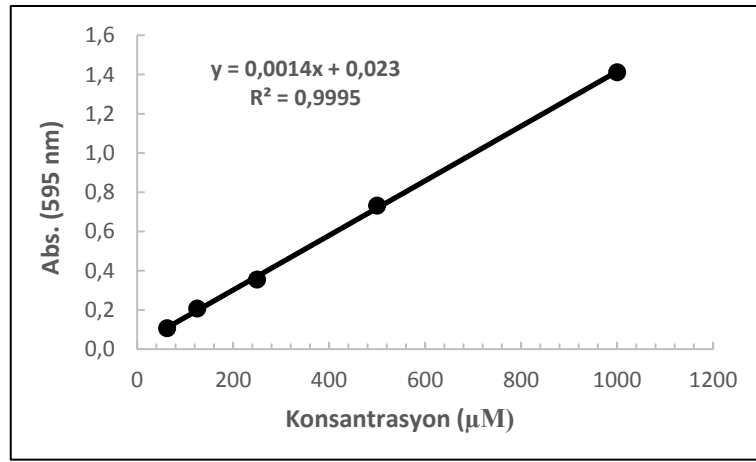


Şekil 117. İTK silika gel 60 F₂₅₄ ile reaksiyonun İTK tabaka üzerinde gerçekleştiği zaman elde edilen renk değeri/konsantrasyon grafiği

Elde edilen veriler değerlendirildiğinde bu çalışma da normal İTK (İTK silika gel 60) ile florasanlı İTK (İTK silika gel 60 F₂₅₄) arasında önemli bir fark olmadığını ve reaksiyonun gerçekleşme ortamı olarak farklı özellikteki bu İTK dolgu maddelerinin de önemli bir farklılık göstermediği belirlenmiştir.

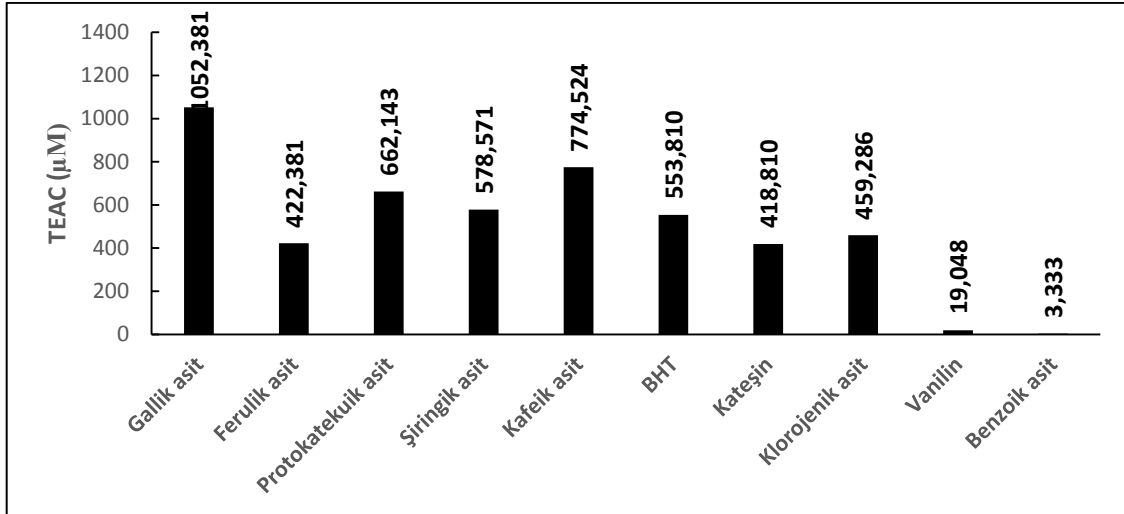
3.9. Standartlar ve Bitki Ekstraktlarında Spektrofotometrik Yöntem ile Demir (III) İndirgeme/ Antioksidan Güç (FRAP) Tayini Sonuçları

Troloks standardının farklı konsantrasyonlarına ait absorbans değerleri 595 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülüp, Microsoft Excel programı kullanılarak grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen grafik Şekil 118’deki gibidir.



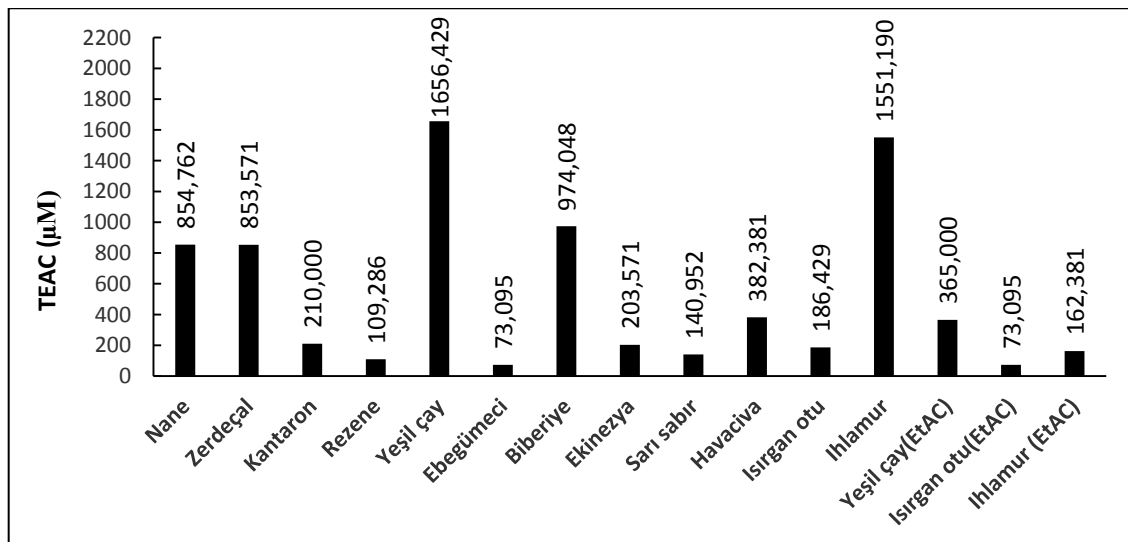
Şekil 118. Troloks’un farklı konsantrasyonlarına karşı FRAP analizi için 595 nm’de verdiği absorbans değerlerinin grafiği

Antioksidan standartların ve bitki ekstraktlarına ait 595 nm’de demir (III) indirgeme/antioksidan gücüne karşılık gelen absorbans değerleri spektrofotometrik olarak ölçülüp Troloks standardının grafik denkleminde ($y=ax+b$) yararlanılarak mikromolar (µM) TEAC değerleri hesaplanmış, grafiğe geçirilmiştir. Standartların antioksidan aktivitelerinin µM TEAC cinsinden karşılaştırılması Şekil 119’da ve numunelerinki ise Şekil 120’de verilmiştir.



Şekil 119. 400 µM konsantrasyonda ki standartların spektrofotometrik yönlemlerle 595 nm'de demir (III) indirgeme/antioksidan güçlerinin µM TEAC cinsinden karşılaştırılması

Standartların demir (III) indirgeme potansiyelleri µM TEAC cinsinden karşılaştırıldığında; en yüksek TEAC değerine yani en yüksek antioksidan aktiviteye gallik asidin onun ardından kafeik asidin sahip olduğunu görüyoruz. Bunun yanında demiri indirgeme potansiyeli yani antioksidan güçleri en düşük olan standartlar ise sırasıyla benzoik asit ve vanilin standartlarıdır.



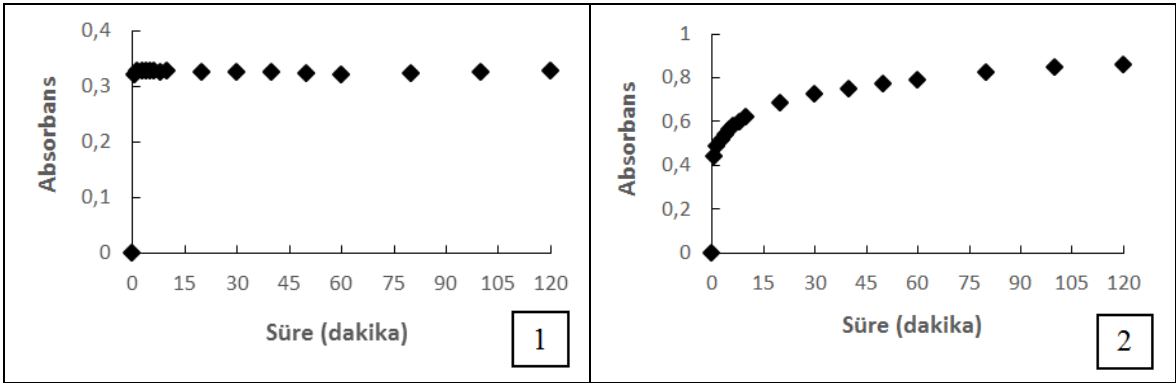
Şekil 120. 1 mg/mL konsantrasyonundaki bitki ekstraktlarının spektrofotometrik yönlemlerle 595 nm'de demir (III) indirgeme/antioksidan güçlerinin µM TEAC cinsinden karşılaştırılması

Bitki ekstraktları demir (III) indirgeme potansiyelleri μM TEAC cinsinden karşılaştırıldığında; antioksidan gücü en yüksek olan bitki ekstraktının metanolik yeşil çay ve ihlamur olduğu görülmektedir. Metanol ile ekstrakte edilen bitkilerden demir indirgeme gücü en düşük olanın ise ebegümece olduğu görülmektedir. Ayrıca metanolik ekstraktların dışında yapılan etil asetat ekstraktlarının ise metanolik ekstraktlara göre daha düşük aktivite gösterdiği görülmektedir.

3.10. Standartların ve Bazı Bitki Ekstraktlarının FRAP Testindeki Reaksiyon Kinetiği Sonuçları

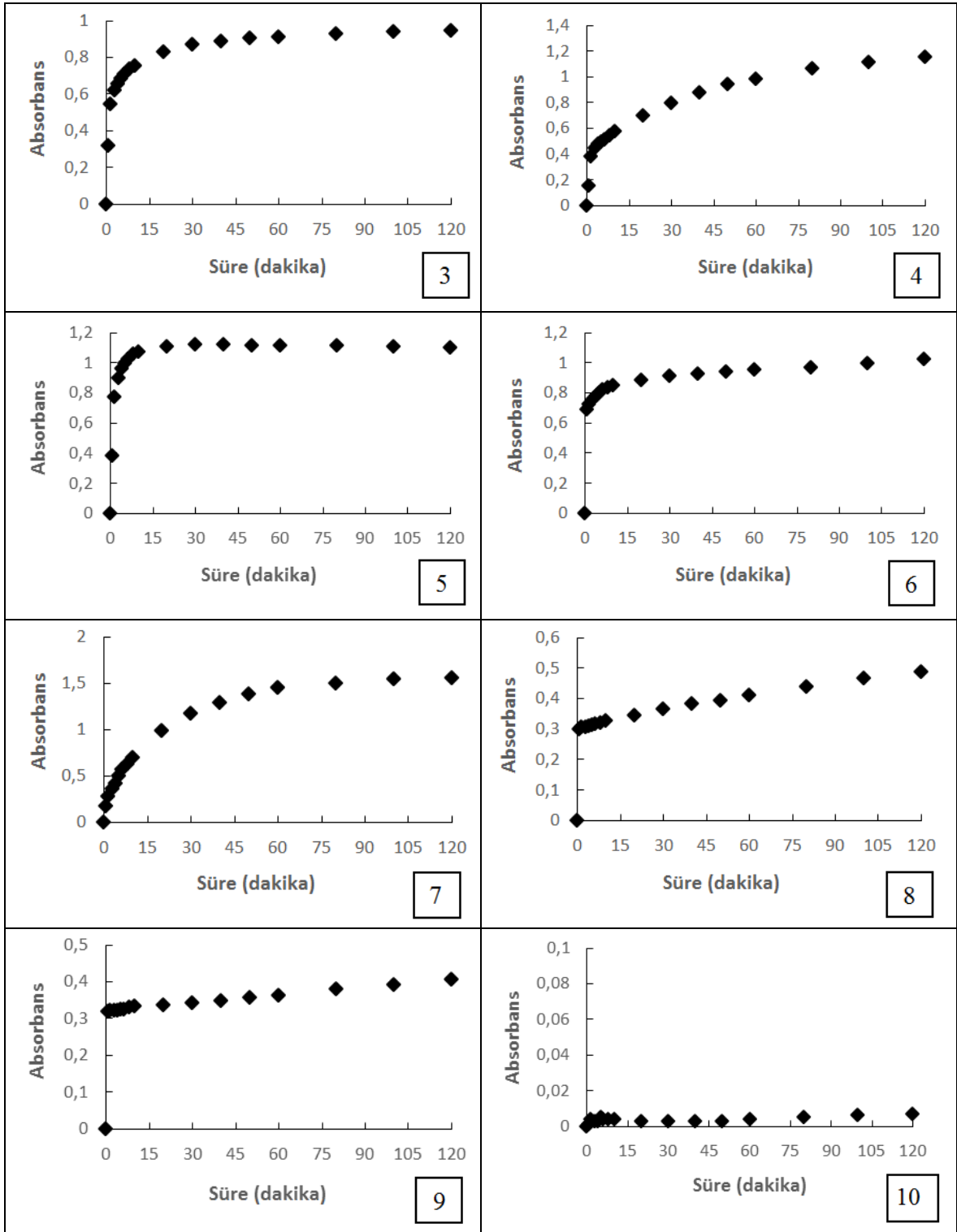
3.10.1. Standartların FRAP Testindeki Reaksiyon Kinetiği

Grafiklerde $x=0$ noktasına karşılık gelen y değeri FRAP reaktifinden gelen absorbanı vermektedir. Öyleyse, bu değer dikkate alınarak reaksiyonların gerçekleşme hızları konusunda yorum yapılabilir. Şekil 121’de çalışılan 11 standardın FRAP testindeki reaksiyon kinetikleri verilmiştir.

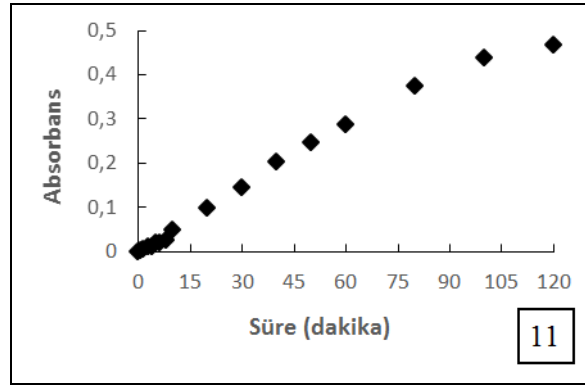


Şekil 121. Standartların FRAP radikal temizleme testindeki zamana bağlı absorban değişimi grafikleri, [1. trolox ($200 \mu\text{M}$), 2. gallik asit ($200 \mu\text{M}$), 3. Ferulik asit ($500 \mu\text{M}$), 4. protokatekuik asit ($300 \mu\text{M}$), 5. şiringik asit ($500 \mu\text{M}$), 6. kafeik asit ($300 \mu\text{M}$), 7. BHT ($500 \mu\text{M}$), 8. kateşin ($200 \mu\text{M}$), 9. klorojenik asit ($200 \mu\text{M}$), 10. vanilin ($1000 \mu\text{M}$), 11. Benzoik asit ($1000 \mu\text{M}$).

Şekil 121'in devamı



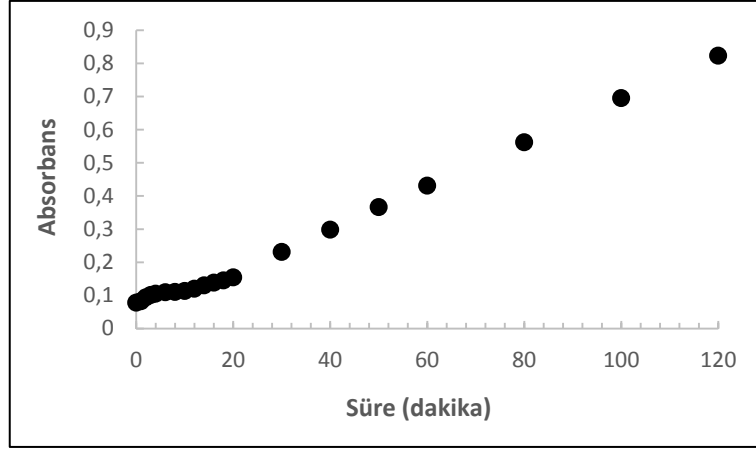
Şekil 121'in devamı



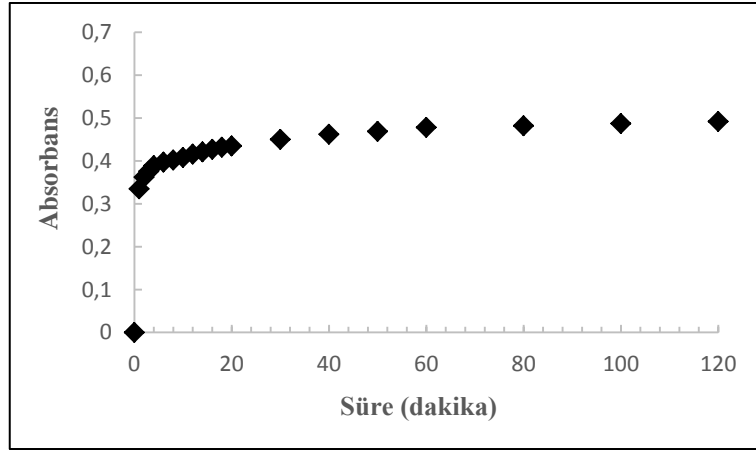
Çalışılan konsantrasyonda; Troloks (1), gallik asit (2), ferulik asit (3), şiringik asit (5), kafeik asit (6) ve klorojenik asit (9) standartlarının FRAP reaktifi ile reaksiyonu hızlı seyretmekte ve ilk 1 dakika içerisindeki absorbans değişimi diğer standartlara kıyasla daha fazladır. Protokatekuik asit (4) ve kateşin (8) standartlarının FRAP reaktifi ile reaksiyonu daha yavaş seyretmekte ve absorbans değişimleri 5-15 dakika arasında azalmakta ve bir optimum yakalamaktadır. BHT (7) ve benzoik asit (11) standartlarının FRAP reaktifi ile reaksiyonu ise oldukça yavaş seyretmekte ve reaksiyon 20 dakika sonunda bile tamamlanamamakta, absorbans değişimi devam etmektedir. Vanilin (10) standardının ise çalışılan bu konsantrasyonda FRAP antioksidan güçleri yok denecek kadar azdır. Bu bileşiklerin FRAP reaktifi ile reaksiyonları ilk 1-2 dakika içerisinde tamamlanmakta, absorbans değişimi sabitlenmektedir.

3.10.2. Bazı Bitki Ekstraktlarının FRAP Testindeki Reaksiyon Kinetiği

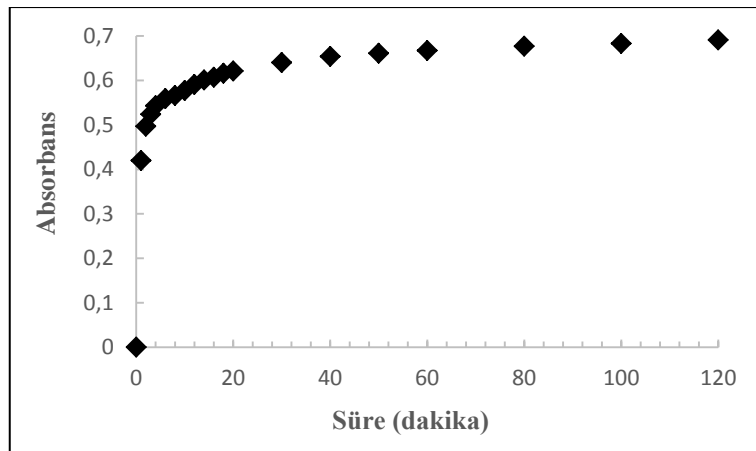
Bitki ekstraktlarının reaksiyon kinetiği belirlenirken iki farklı FRAP reaktifi ile çalışılmıştır. Birincisi olmasını istediğimiz yani yavaş bozulan FRAP reaktifi (Şekil 122), diğeri ise daha hızlı bozulan FRAP reaktifi Şekil 126'daki gibidir. Şekil 123'te yavaş bozulan FRAP reaktifi ile çalışılan konsantrasyonu 0,18 mg/mL olan yeşil çay ekstraktının, Şekil 124'te konsantrasyonu 0,38 mg/mL olan zerdeçal bitkisinin ve Şekil 125'de ise konsantrasyonu 3 mg/mL olan sarısabır bitkisinin reaksiyon kinetiği grafikleri verilmiştir.



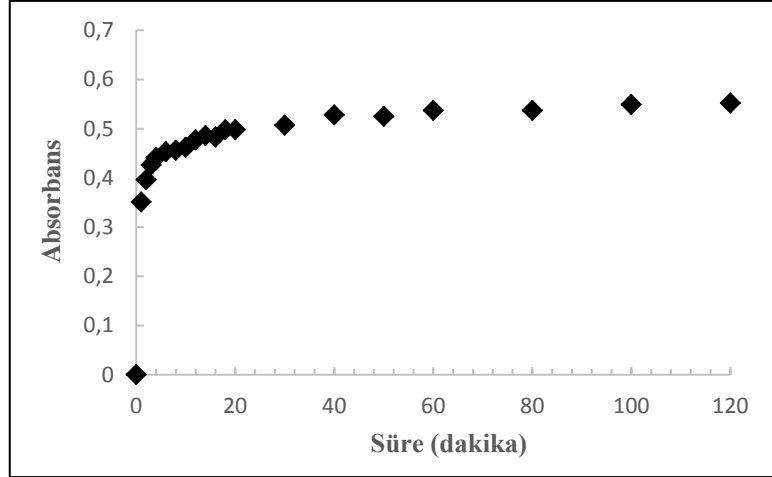
Şekil 122. Yavaş bozunan FRAP reaktifinin zamana göre absorbans değişimi grafiği



Şekil 123. Yavaş bozunan FRAP reaktifi ile çalışılan yeşil çay ekstraktının FRAP testindeki reaksiyon kinetiği



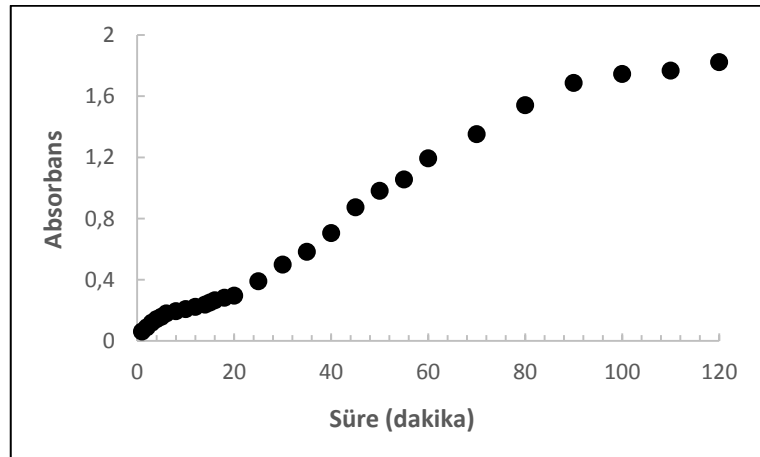
Şekil 124. Yavaş bozunan FRAP reaktifi ile çalışılan zerdeçal ekstraktının FRAP testindeki reaksiyon kinetiği



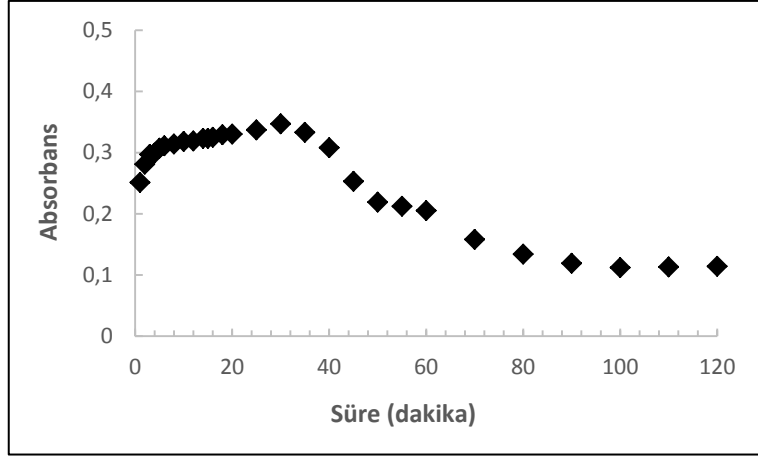
Şekil 125. Yavaş bozunan FRAP reaktifi ile çalışılan sarısabır ekstraktının FRAP testindeki reaksiyon kinetiği

Bitki ekstraktlarının reaksiyon kinetikleri incelendiğinde FRAP testinde 20 dk.' da reaksiyonun neredeyse % 90'ının tamamlandığını görmekteyiz.

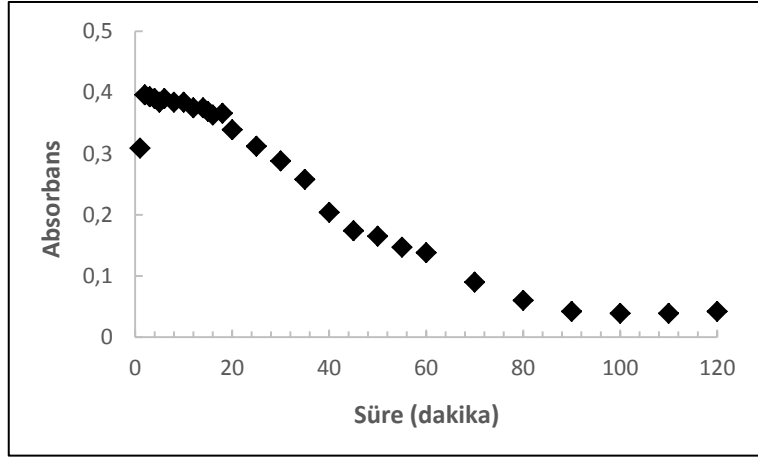
Aşağıda şekil 126'da çabuk bozunan FRAP reaktifinin absorbans değişimi grafiği gösterilmiştir. Şekil 127'de bu reaktif kullanılarak 0,18 mg/mL konsantrasyonundaki yeşil çay ile şekil 128'de 3 mg/mL konsantrasyonundaki sarısabır bitkisinin reaksiyon kinetikleri verilmiştir.



Şekil 126. Çabuk bozunan FRAP reaktifinin zamana göre absorbans değişimi grafiği



Şekil 127. Çabuk bozunan FRAP reaktifi ile çalışılan yeşil çay ekstraktının FRAP testinde ki reaksiyon kinetiği



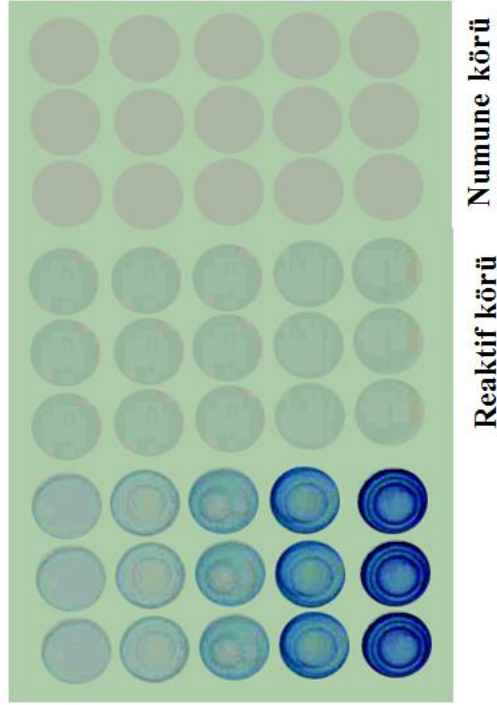
Şekil 128. Çabuk bozunan FRAP reaktifi ile çalışılan sarımsabır ekstraktının FRAP testinde ki reaksiyon kinetiği

Çabuk bozunan FRAP testinde reaktifin absorbans değerinin 2'lere kadar çıktığını görüyoruz. Ayrıca bu reaktif kullanılarak reaksiyon kinetiği belirlenen bitki ekstraktlarının reaksiyon kinetiklerinin belli bir zaman sonra düştüğünü görmekteyiz.

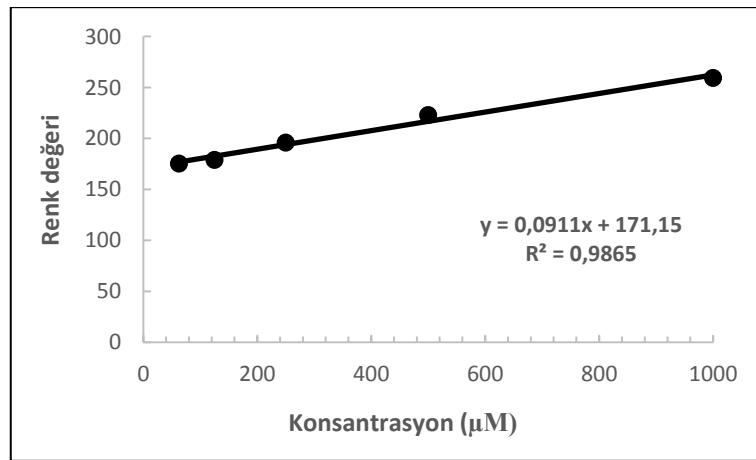
3.11. Standartlar ve Bitki Ekstraktlarında Damlatma Yöntemi ile Demir (III) İndirgeme/Antioksidan Güç (FRAP) Tayini Sonuçları

Troluks standardı 1000 μM konsantrasyonda hazırlanarak 1:1 oranda seyreltilmek koşuluyla 5 farklı konsantrasyonda 3 paralel olarak pipetlenmiştir. Aynı şekilde 3 paralel olarak reaktif körü (çalışılan numune çözücüsü + FRAP reaktifi) ve numune körü (numune

+ 2:3 oranında su:metanol karışımı) de çalışılmıştır. Damlatma sonucu İTK tabaka üzerinde oluşan görüntü Şekil 129’da verilmiştir. Bu görüntüye ait renk değerleri Image J programı ile ölçülüp her birinin ortalaması alınarak, Microsoft Excel programı yardımı ile konsantrasyona karşı renk değerleri grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen grafik Şekil 130’daki gibidir.

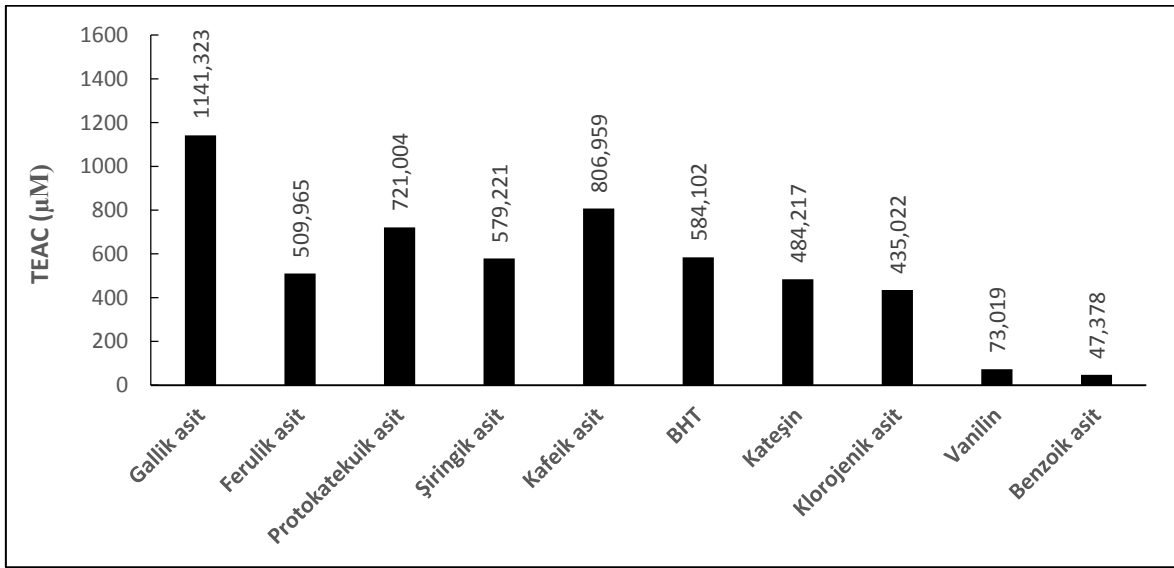


Şekil 129. 1000-500-250-125-62,5 µM konsantrasyonlarında standart Troloks grafiğinin elde edildi görüntü

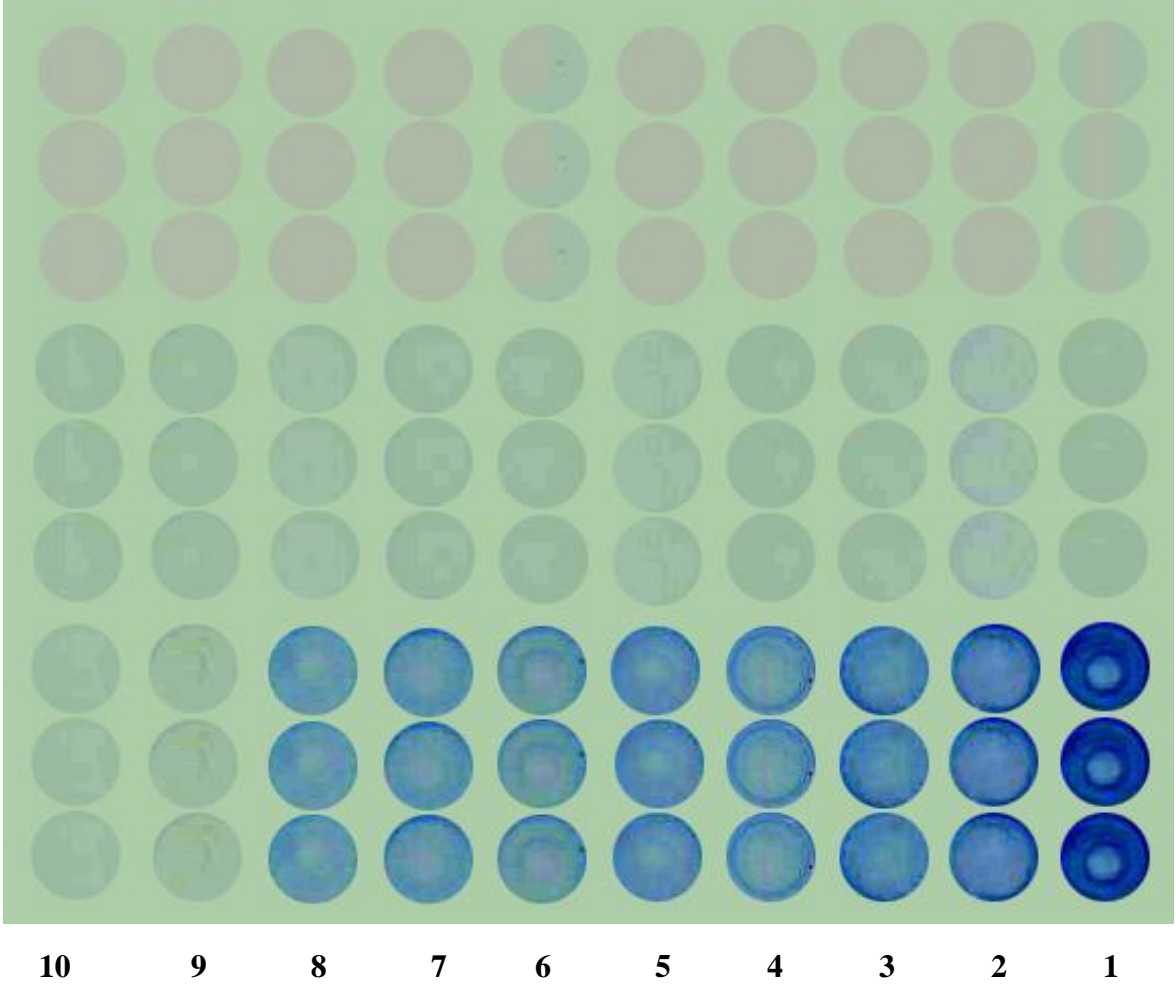


Şekil 130. Troloks’un farklı konsantrasyon değerlerine karşı ölçülen renk değerleri grafiği

Antioksidan standartların ve metanolik bitki ekstraktlarının renk değerleri renk ölçüm programı olan Image J programı ile ölçülüp Troloks standardının grafik denkleminde ($y=ax+b$) yararlanılarak μM CTEAC değerleri hesaplanmış, grafiğe geçirilmiştir. Standartlar ile yapılan çalışmada reaktif körü ve numune körü de çalışılmıştır. Aynı şekilde 3 paralel olarak İTK tabaka üzerine damlatılmıştır. Standartların antioksidan aktivitelerinin μM CTEAC cinsinden karşılaştırılmasının grafiği Şekil 131’de ve bu grafiğin elde edildiği görüntü ise Şekil 132’de verilmiştir. Numunelerin grafiği ise Şekil 133’te bu grafiğin elde edildiği görüntü ise Şekil 134’te verilmiştir.

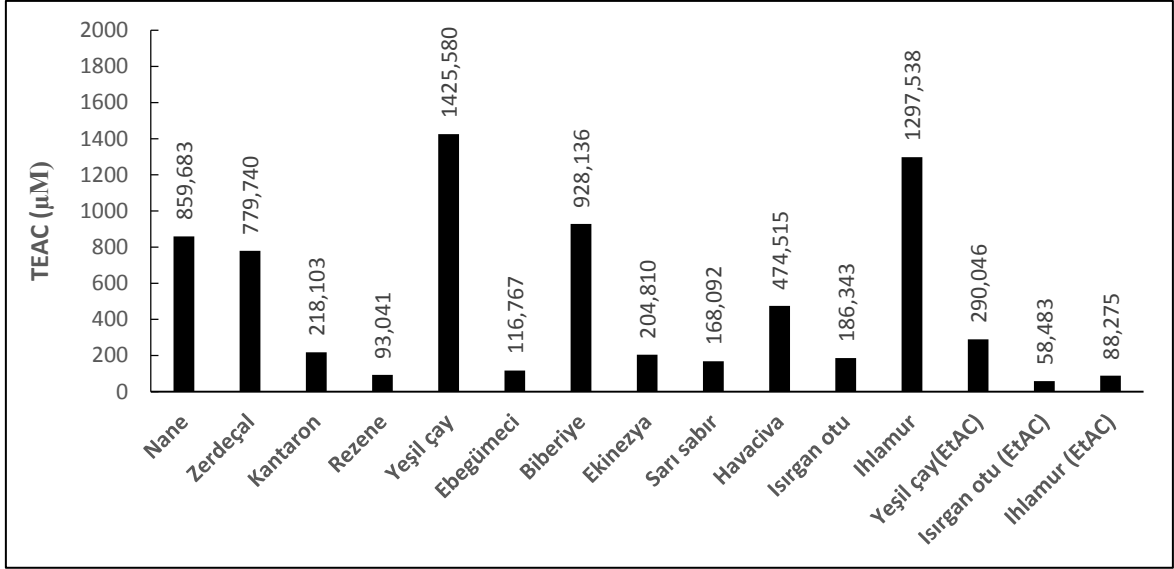


Şekil 131. 400 μM konsantrasyonunda ki standartların damlatma yöntemi ile demir (III) indirgeme/antioksidan güçlerinin μM CTEAC cinsinden karşılaştırılması

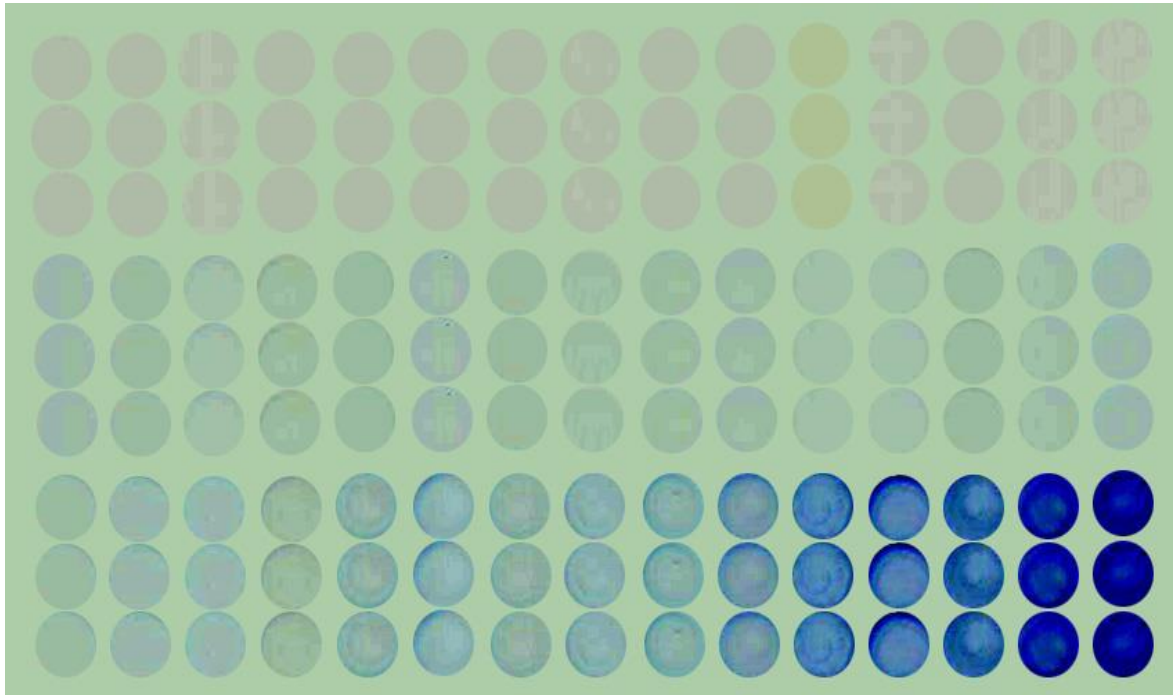


Şekil 132. Her biri 400 μ M konsantrasyonda çalışılan standartlar, [gallik asit (1), kafeik asit (2), protokatekuik asit (3), şiringik asit (4), BHT (5), ferulik asit (6), kateşin (7), klorojenik asit (8), vanilin (9) ve benzoik asit (10)]

Yapılan damlatma yönteminde standartlar yüksek antioksidan aktiviteden düşük aktiviteye doğru sıraya konulduğunda sıralama şöyle olmaktadır: gallik asit (1), kafeik asit (2), protokatekuik asit (3), şiringik asit (4), BHT (5), ferulik asit (6), kateşin (7), klorojenik asit (8), vanilin (9) ve benzoik asit (10)'tir.



Şekil 133. 1 mg/mL konsantrasyonunda ki bitki ekstraktlarının damlatma yöntemi ile demir (III) indirgeme/antioksidan güçlerinin μM CTEAC cinsinden karşılaştırılması



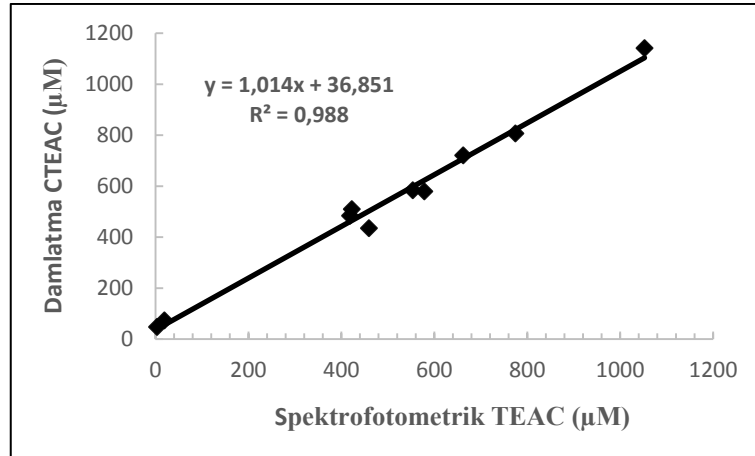
15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

Şekil 134. Her biri 1 mg/mL konsantrasyonunda çalışılan bitki ekstraktları, [yeşil çay (1), ihlamur (2), biberiye (3), nane (4), zerdeçal (5), havacıya (6), kantaron (7), ekinezya (8), ısırgan otu (9), sarı sabır (10), ebegümece (11), rezene (12), yeşil çay (EtAc) (13), ihlamur (EtAc) (14) ve ısırgan (EtAc) (15)]

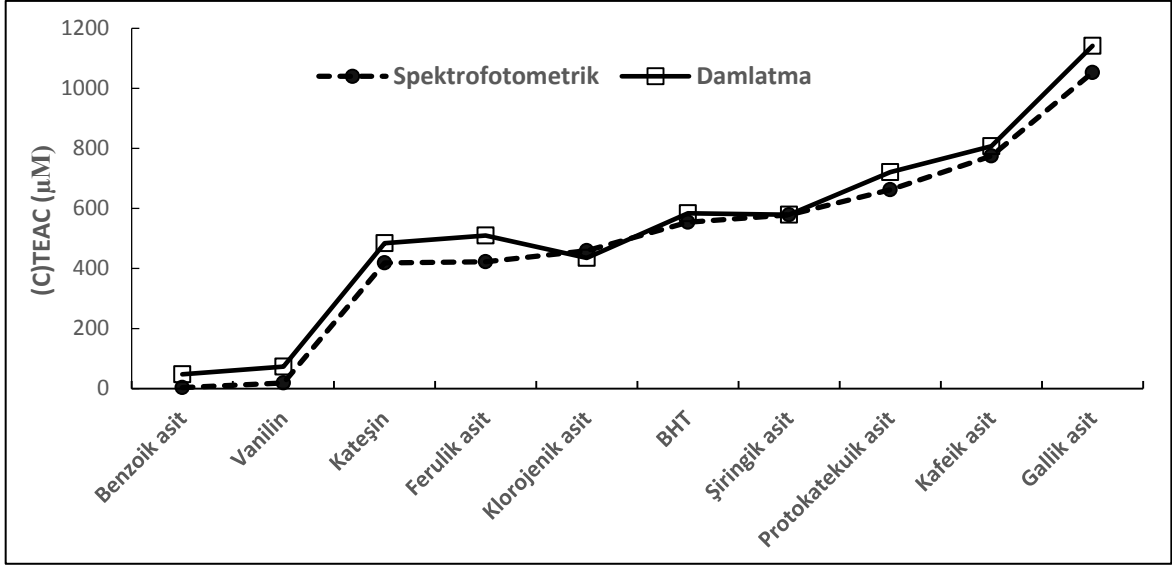
Damlatma yöntemi ile çalışılan bitki ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri yüksek olandan düşük olana doğru sıraya koyulduğunda, sıralama şöyledir: yeşil çay (1), ıhlamur (2), biberiye (3), nane (4), zerdeçal (5), havacıva (6), kantaron (7), ekinezya (8), ısırgan otu (9), sarısabır (10), ebegümece (11), rezene (12), yeşil çay (EtAc) (13), ıhlamur (EtAc) (14) ve ısırgan otu (EtAc) (15)'dur.

3.12. FRAP Testinde Çalışılan Standartların Spektrofotometrik ve Damlatma Yöntemleri Arasındaki Korelasyonu

FRAP testinde çalışılan 10 farklı antioksidan standardın spektrofotometrik yöntem ve damlatma yöntemi arasındaki korelasyon grafiği Şekil 135'te verilmiştir. Şekil 136'da ise bu iki yöntem uygulanarak çalışılan bu standartların μM TEAC ve μM CTEAC değerleri gösterilmiştir.



Şekil 135. FRAP testinde standartlara uygulanan spektrofotometrik ve damlatma yöntemi arasındaki korelasyon grafiği

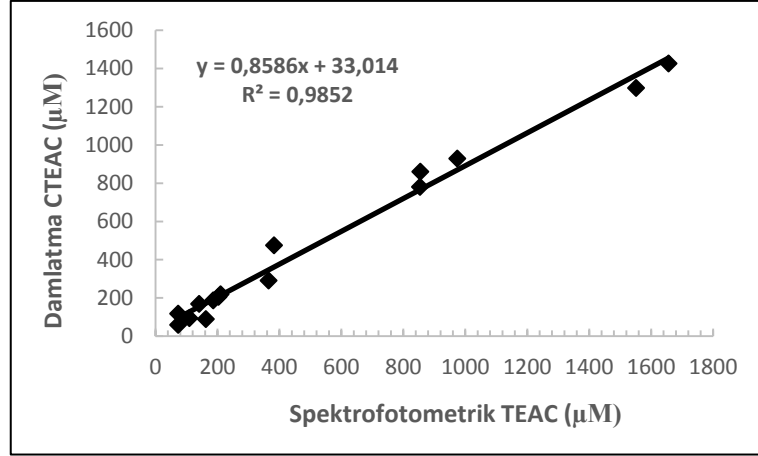


Şekil 136. FRAP testinde standartlara uygulanan spektrofotometrik ve damlatma yöntemi sonuçlarının çizgi grafiği ile gösterimi

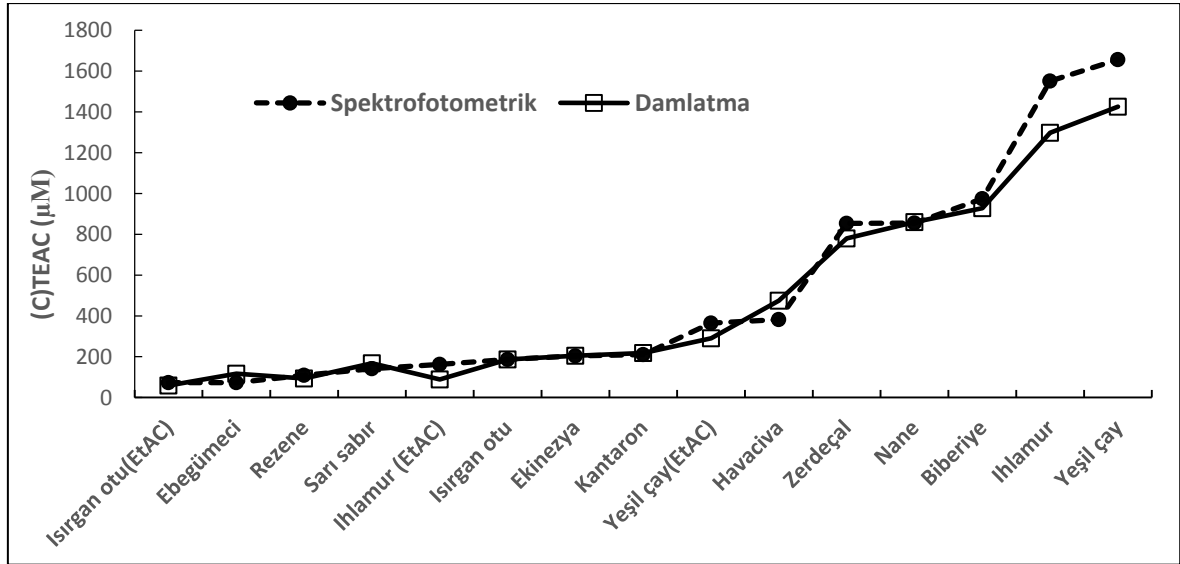
Grafikler değerlendirildiğinde standartlar için uygulanan her iki yöntem arasındaki korelasyonun ($R^2 = 0,988$) iyi olduğu görülmektedir. Ayrıca standartların spektrofotometrik ve damlatma yöntemiyle elde edilen (C)TEAC (μM) değerlerinin gösterildiği şekil 136'da iki yöntem arasında uyum olduğu görülmektedir.

3.13. FRAP Testinde Çalışılan Bitki Ekstraktlarının Spektrofotometrik ve Damlatma Yöntemleri Arasındaki Korelasyonu

12 farklı bitki ve iki farklı çözücü (metanol ve etil asetat) ile yapılan FRAP testinde spektrofotometrik ve damlatma yöntemi arasındaki korelasyon grafiği Şekil 137'de verilmiştir. Şekil 138'de ise bu iki yöntem uygulanarak çalışılan bu bitki ekstraktlarının μM TEAC ve μM CTEAC değerleri gösterilmiştir.



Şekil 137. FRAP testinde bitki ekstraktlarına uygulanan spektrofotometrik ve damlatma yöntemi arasındaki korelasyon grafiği

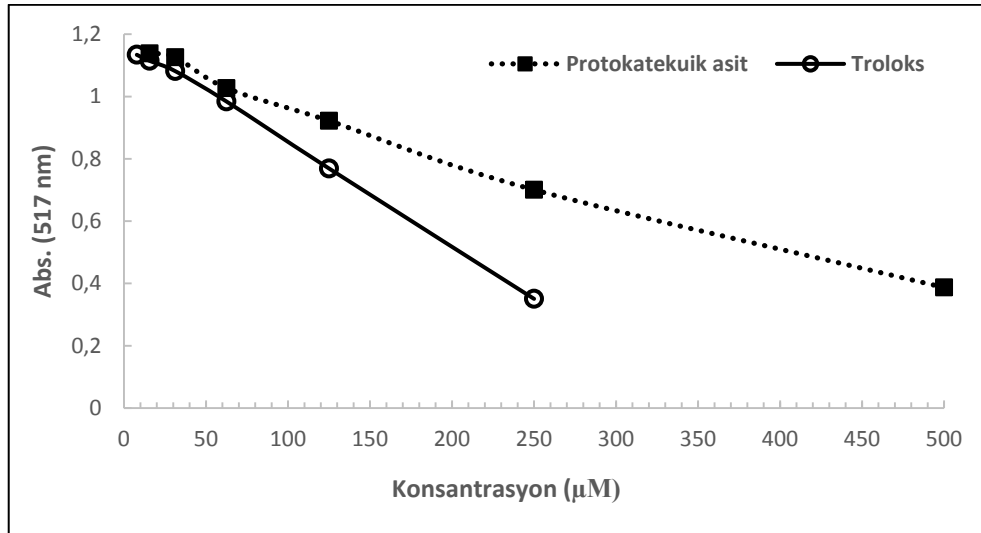


Şekil 138. FRAP testinde bitki ekstraktlarına uygulanan spektrofotometrik ve damlatma yöntemi sonuçlarının çizgi grafiği ile gösterimi

Değerlendirmeler sonucunda bitki ekstraktları için uygulanan her iki yöntem arasında ki korelasyonun ($R^2 = 0,985$) iyi olduğu görülmektedir. Ayrıca bitki ekstraktlarının spektrofotometrik yöntemle ve damlatma yöntemiyle elde edilen (C)TEAC (µM) değerlerinin gösterildiği şekil 138'de, iki yöntem arasında uyum olduğu görülmektedir.

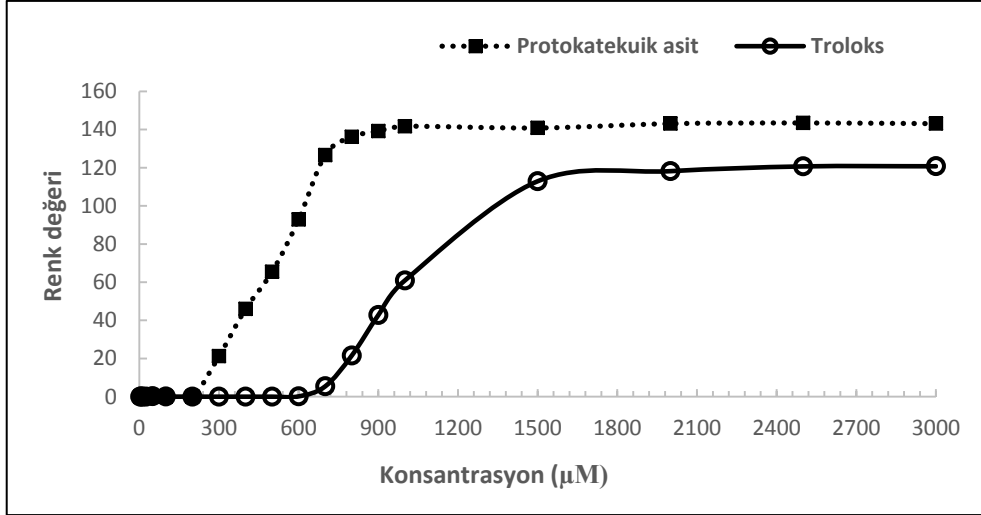
3.14. Bazı Antioksidan Standartlar ile Yapılan Spektrofotometrik, Damlatma ve Püskürtme Çalışmalarının Karşılaştırılması

Püskürtme çalışması diğer yöntemlerle karşılaştırılırken DPPH 3000 μM konsantrasyonunda çalışılmıştır. Çalışmada antioksidan standartlar olan ve her çalışma için farklı konsantrasyonlarda hazırlanan protokatekuik asit ve Troloks standartları kullanılmıştır. Bu iki standartla yapılan spektrofotometrik çalışmada elde edilen SC_{50} değerlerinin grafiği Şekil 139'da ve damlatma çalışması ile elde edilen CSC_{50} değerlerinin grafiği ise şekil 140'da verilmiştir. Bu iki standart için elde edilen püskürtme grafiği ise Şekil 141'de gösterilmiştir.



Şekil 139. Farklı konsantrasyondaki protokatekuik asit ve Troloks standartlarının 517 nm'de verdiği absorbans değerlerinin grafiği

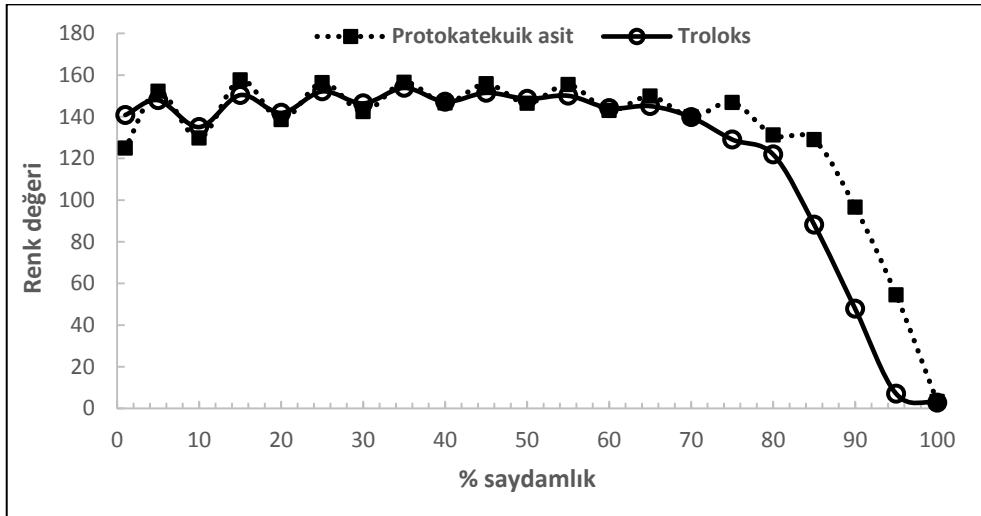
Protokatekuik ve Troloks standartları ile yapılan spektrofotometrik çalışmada elde edilen SC_{50} değerleri şöyledir: protokatekuik standardı için $\text{SC}_{50} = 356,2813 \mu\text{M}$ ve Troloks standardı için $\text{SC}_{50} = 177,8485 \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır. Elde edilen değerler karşılaştırıldığında Troloks standardının antioksidan değerinin protokatekuik asidin antioksidan aktivitesinden daha yüksek olduğu görülmektedir.



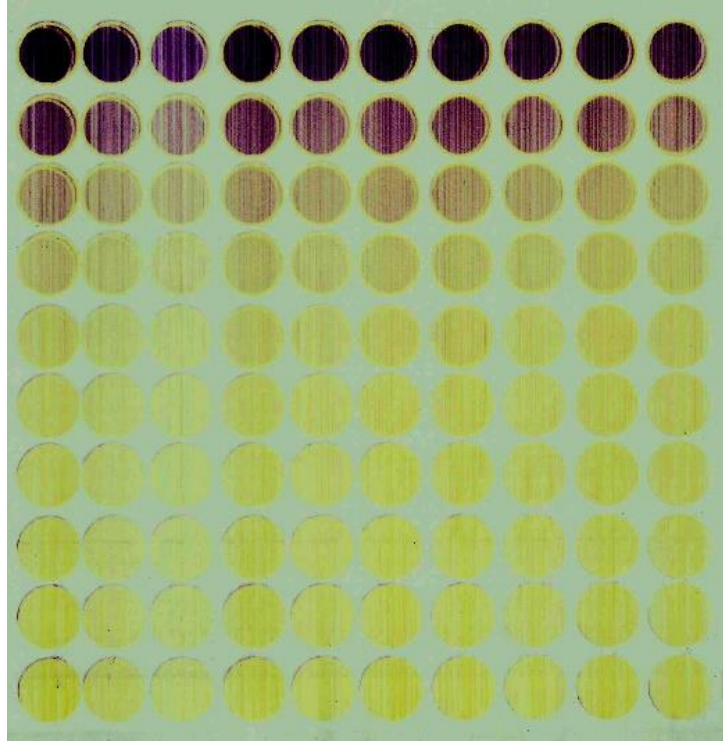
Şekil 140. Farklı konsantrasyondaki protokatekuik asit ve Troloks standartlarının damlatma yöntemine göre renk değeri/konsantrasyon grafiği

Damlatma çalışmasında her iki standart için CSC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Şekil 140'tan protokatekuik asit için $CSC_{50} = 525 \mu M$ olarak Troloks standardı için ise $CSC_{50} = 995 \mu M$ olarak hesaplanmıştır. Spektrofotometrik yöntemde olduğu gibi damlatma yönteminde de Troloks'un protokatekuik asitten daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmektedir.

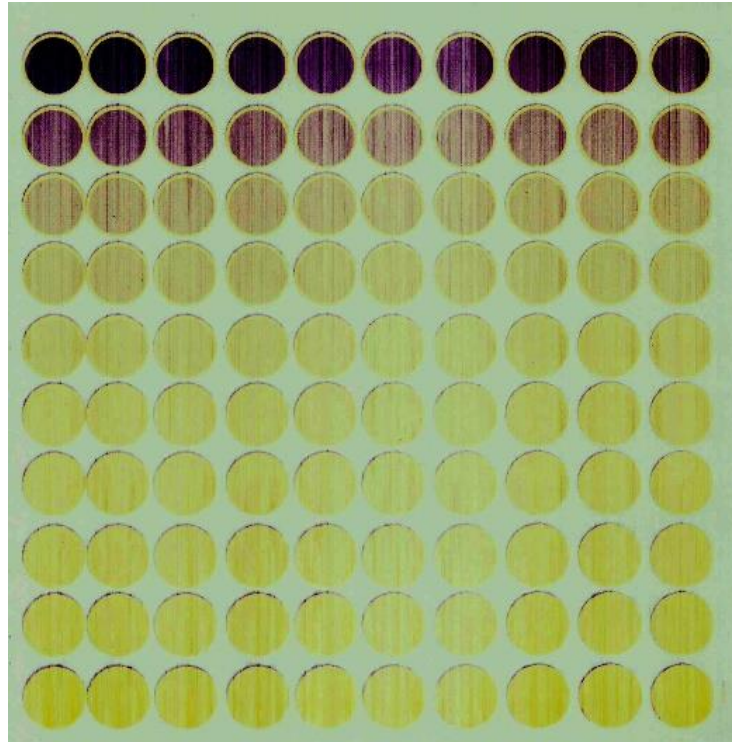
İki antioksidan standardın püskürtülmesiyle oluşan Şekil 142 ve Şekil 143 görüntülerinin Image J programı ile renk analizinin yapıp % saydımlığa karşılık çizilen renk değerleri grafiği Şekil 141'deki gibidir.



Şekil 141. Farklı konsantrasyondaki protokatekuik asit ve Troloks standartlarının % saydımlık ayarlarına göre püskürtülerek ölçülen renk değerlerinin grafiği



Şekil 142. Troloks standardının % saydamlık ayarlarına göre püskürtme sonucu oluşan görüntü



Şekil 143. Troloks standardının % saydamlık ayarlarına göre püskürtme sonucu oluşan görüntü

Elde edilen renk değeri-% saydamlık grafiği incelendiğinde, maksimum renk değerinin yarısına karşılık gelen % saydamlık değeri Troloks standardı için % 13 ve protokatekuik asit için ise % 7'dir. Dolayısıyla Troloks standardının % 6 oranında daha fazla DPPH radikalini temizlediğini görüyoruz.

4. TARTIŞMA

Tez kapsamında çalışmalara başlamadan önce yapılan literatür taramasında, literatürde klasik antioksidan yöntemler arasında yaygın olarak kullanılan DPPH radikal temizleme aktivitesi tayini ve demir indirgeme/antioksidan güç (FRAP) yönteminin kullanılarak yapıldığı çok sayıda çalışma incelenmiştir. Literatürde özellikle bitki kaynaklı fenolik bileşiklerin yüksek antioksidan aktivite içerdiğini kanıtlayan bir çok çalışma mevcuttur (Vinson vd., 1995; Re vd., 1999). Antioksidan aktivite ölçümlerinde, bitkilerden elde edilen ekstraktların toplam antioksidan aktivitesini belirleyecek in-vitro çalışmalar mevcuttur. Bu anlamda bitki bileşenlerinin antioksidan aktivitelerinin belirlenebilmesi için ve bazı antioksidan özellikteki maddelerin antioksidan aktivitelerinin karşılaştırılması için spektrofotometrik olarak birçok antioksidan tayin yöntemleri geliştirilmiştir. 2000'li yıllara gelindiğinde in-vitro çalışmaların yanında in-vivo çalışmalar da yaygınlaşmıştır (Bailey vd., 2014; Xin vd., 2014).

Günümüzde yapılan çalışmalarda özellikle HPLC cihazının önemini arttıracak şekilde HPLC sistemine kombine edilen ilave pompa ve dedektörler yardımıyla antioksidan bileşiklerin ve aktivitelerinin eşzamanlı olarak belirlenmesi sağlanmıştır (Koleva vd., 2000; Burnaz, 2013; Aktaş, 2012). Zaman geçtikçe antioksidan aktivitenin belirlenmesi için uygulanan yöntemlerin gelişmesiyle, yapılan ölçümlerin daha hassas olarak ölçülebilmesi sağlanmıştır. Ancak bu tür çalışmaların hassasiyetinin artmasının yanında birçok dezavantajı da ortaya çıkmıştır. Yöntem geliştikçe kullanılan cihazların kapsamı ve maliyeti artmıştır. Dolayısıyla son yıllarda maliyeti azaltmak için farklı materyaller kullanılarak biyoaktivite çalışmaları yapılmaya başlanılmıştır. Literatürde yapılan araştırmada İTK tabaka kullanılarak yapılmış bir FRAP çalışmasına rastlanmamıştır. İTK tabaka kullanılarak yapılmış DPPH çalışması mevcuttur (Ghafoori vd., 2013; Maksimovi, 2008; Cies'la vd., 2012; Olech vd., 2012). Ancak bu çalışmalarda İTK tabaka üzerine numune uygulanmış, fakat değerlendirilirken kromatografi yapmak için bir çözücü tankının içine daldırılarak, aldığı yola ve bant büyüklüğüne göre değerlendirme yapılmıştır. Bu anlamda özellikle enzimlerle kombine edilerek İTK tabaka ile biyootografik çalışmalar mevcuttur (Orhan vd., 2004; Caldero' n vd., 2013). Yapılan tez çalışmasında ise İTK tabaka ile kromatografik bir işlem yapılmamıştır. Silika kaplı İTK tabaka maddeleri absorbladığı ve daha net görüntü ortaya koyduğu için tercih edilmiştir.

İTK tabaka yerine çalışma için uygun olabilecek farklı özellikteki kağıtlar da kullanılabilir. İTK kullanımındaki tek dezavantajımız belli miktardaki sulu ekstraktlarla çalışabilmemizdir. Sulu çözeltiler ya da ekstraktlarda, su İTK tabaka üzerinde iyi difüzlendiği için çözeltideki bileşenler aynı zamanda oluşabilecek renkler orta kısımda toplanıyor ve homojen bir görüntü oluşmuyor. Bu anlamda sulu çözeltiler için süzgeç kağıdı kullanılabilir. Literatürde az da olsa süzgeç kağıdı kullanılarak fenolik bileşiklerin tanınması için yapılan çalışmalar mevcuttur (Arciuli vd., 2013).

Son yıllarda görüntülerin bilgisayara aktarılmasını ve bu görüntüler üzerinden ölçüm yapılmasını sağlayan farklı programlar geliştirilmiştir. Mevcut çalışmada İTK tabaka üzerinde oluşan renklerin değerlendirilip sonra bu renk değerlerinden yararlanılarak yeni yöntemde numunelerin antioksidan aktiviteleri hakkında yorum yapılmıştır. Bunun için renk ölçüm programı olan Image J programı kullanılmıştır. Bu program özellikle cevherlerdeki morfolojik yapıların tanımlanmasında ve partikül boyutlarının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Schneider vd, 2012; Vaher vd., 2014). Bu programı diğerlerinden ayıran özellik ücretsiz olması ve farklı çalışma alanları için kullanılıyor olmasıdır.

Günümüzde yaygın olarak kullanılan yazıcıların çalışma mantığı örnek alınarak ve daha kapsamlı hale getirilerek tıp ve sanayi alanında kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle 3D yazıcılar kullanılmaya başlandığı ilk günden itibaren akla gelebilecek çok çeşitli ürünlerin üretilmesi sağlanmıştır. Günümüzde 3D yazıcılar ile uçak ve otomobil yedek parçaları, çeşitli oyuncaklar, robot, heykel, aksesuar, el aletleri, müzik aletleri, tıbbi malzemeler, ilaç, takma diş, tıbbi protezler hatta silah gibi aklınıza gelebilecek her türden ürünler yapılabilmektedir. Özellikle 3D yazıcıların tıp sektöründe, biyolojik dokuların ve yapay organ üretiminde hücrelerin tutunabileceği kalıpların hazırlanmasında, kimyasal bileşik veya ilaç üretiminde, biyokimyada çok farklı fonksiyonlara sahip protein moleküllerinin tasarlanmasında, nano teknolojide ve biyomedikal sektöründe ise parça üretiminde kullanılması için çalışmalar yapılmaktadır. Bilimsel literatürde de bu konuda yapılan çalışmalara rastlanmaktadır. Çalışmalarda tam olarak püskürtme yöntemi kullanılarak 3 boyutlu olacak şekilde organ üretilememiş ancak hücreler özel bir zemin üzerine püskürtülerek doku ve kalıp halinde hücre baskılama çalışmaları yapılmıştır (Mironov vd., 2003; Mironov vd., 2011; Melchelsa vd., 2012; Xu vd., 2005; Mironov vd., 2009).

Mevcut çalışmada öncelikle laboratuvarımızdaki çeşitli araştırmalar ve münferit çalışmalarda aktiviteleri araştırılmış bitkilerden yüksek antioksidan aktiviteye sahip olanlardan bazıları ve antioksidan aktivite dereceleri farklılık gösteren bazı standart bileşikler kullanılarak çalışma yürütülmüştür. Bu antioksidan standart ve numunelerin toplam fenolik madde içeriklerini belirlemek için klasik yöntem olarak bilinen ve yaygın olarak kullanılan iki spektrofotometrik yöntem uygulanmıştır. Bu uygulama ile DPPH• radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) temizleme ve FRAP (Demir (III) İndirgeme/Antioksidan Gücü) değerleri üzerinden antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Bu çalışmaların yanında bu standart ve numunelerle yeni geliştirilen damlatma metodu uygulanarak DPPH ve FRAP testi yapılmış ve bu iki farklı uygulama arasında uyum olup olmadığı incelenmiştir. Ayrıca yeni geliştirilen antioksidan aktivite belirleme metodların da reaksiyon süresinin yeterli olup olmadığının belirlenmesi için çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan bütün standartların spektrofotometrik olarak DPPH ve FRAP reaksiyon kinetikleri incelenmiştir. Ayrıca her iki yöntemle çalışılan bitki ekstraktlarından farklı aktiviteye sahip 3 bitki seçilerek bunlarında reaksiyon kinetikleri incelenmiştir.

Diğer yandan yeni geliştirilen damlatma metodunun yanı sıra diğer bir yeni metod olan püskürtme çalışması da yapılmıştır. Püskürtme çalışmasında antioksidan olan iki standart ile DPPH radikal temizleme aktivitesi çalışılmıştır. Bu püskürtme çalışmasına ek olarak spektrofotometrik ve damlatma çalışması da yapılarak bu iki standarda ait sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Spektrofotometrik olarak çalışılan standartların DPPH radikal temizleme ve Fe (III) indirgeme gücü (FRAP) antioksidan aktivite testlerindeki zamana bağlı absorbans değişimlerini gösteren grafikleri incelendiğinde; çalışılan konsantrasyondaki standartların büyük çoğunluğunda reaksiyonun büyük oranda gerçekleşmesi için DPPH testinde 5-20 dakika, FRAP testinde ise 1-10 dakika yeterlidir. Ancak DPPH testinde BHT (7) standardının reaktifle reaksiyonu 60 dakika sonunda tamamlanabilmiştir. FRAP testinde ise protokatekuik asit (4), BHT (7) ve kateşin (8) standartlarının reaktifle reaksiyonu 20 dakika bitiminde bile hala devam etmektedir.

Bazı bitki ekstraktlarıyla yapılan reaksiyon kinetiği çalışmasında, bitki ekstraktlarının DPPH testi için reaksiyon kinetiği 60 dakika (Şekil 101), FRAP testi için ise 20 dakikada olduğu görülmektedir (Şekil 121). Dolayısıyla standartlar ile benzer reaksiyon kinetiği (süre olarak) göstermişlerdir. Ancak yapılan diğer bir çalışmada FRAP reaktifi taze hazırlansa bile eğer çabuk bozunuyorsa, bitkilerle (yeşil çay ve sarısabır) yapılan

çalışmada ölçülebilen aktivitenin belli bir süreye kadar arttığını sonra azaldığını görmekteyiz (Şekil 126). Dolayısıyla çabuk bozulan FRAP reaktifi ile yapılan çalışmalarda reaksiyon süresi 20 dakika olarak alınmalıdır. 60 dakika baz alınarak yapılan çalışmaların sonuçları yanlış yorumlara sebep olabilecektir.

DPPH testi ile damlatma çalışması yapılmadan önce bir çok optimizasyon işlemi yapılmıştır. Yapılan bu optimizasyon işlemlerinde DPPH radikalinin çalışma konsantrasyonu, damla hacmi, reaksiyonun gerçekleşme ortamı ve damlatma bölgeleri üzerinde renk değerlerinin hesaplanacağı en iyi bölgenin belirlenmesi gibi bir çok çalışma yapılmıştır. Yapılan bu optimizasyonlarda elde edilen sonuçlar çalışmanın bütününde eşitlik olması için kullanılmıştır. DPPH radikalinin konsantrasyonu belirlenirken gallik asit ve Troloks standardı kullanılarak yapılan çalışmada DPPH radikalinin konsantrasyonu 50-2000 μM olacak şekilde hazırlanarak damlatma çalışması yapılmıştır (Şekil 106 ve 107). Sonuçlar incelendiğinde DPPH çalışma konsantrasyonunun 1000-2000 μM konsantrasyon aralığında renk değerlerinin daha düzenli artış gösterdiği ve 500 μM 'dan daha düşük konsantrasyonlarda ise DPPH radikalinin renk olarak baskınlığı azaldığı için renk değerlerinin düzenli olmadığı görülmüştür. Bu sebeple DPPH radikalinin çalışma konsantrasyonunun 500 μM ve daha düşük konsantrasyonlarda olamayacağı belirlenmiştir. Çalışılabilir 1000-2000 μM konsantrasyon aralığından hangi konsantrasyon değeriyle çalışmanın yürütüleceğine karar verilirken, yeni geliştirilen bir metod olduğu için damlatmada oluşacak renklerin en belirgin olabileceği konsantrasyon olan 2000 μM seçilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre damlatma yöntemindeki DPPH radikalinin çalışma konsantrasyonu (2000 μM) her ne kadar spektrofotometrik metoda (genelde 50 veya 100 μM) göre fazla görünse de toplamda harcanan kimyasal miktarı düşünüldüğünde damlatma yönteminde kullanılan kimyasal miktarının daha az olduğu görülmektedir. İlerleyen zamanlarda bu metod için var olan olumsuzluklar giderilip, çalışma daha kapsamlı bir şekilde sürdürülmüştür.

Yeni geliştirilen yöntemde damlatma hacmi ya da damla hacmini belirlerken, optimize edilen DPPH konsantrasyonu (2000 μM) kullanılmıştır. Hacim belirleme çalışması sabit DPPH konsantrasyonunda 25-1500 μM aralığında konsantrasyonda hazırlanan Troloks standardı DPPH radikali ile 1:1 oranında karıştırılarak yapılmıştır. Reaksiyon tamamlandıktan sonra farklı hacimlerde sıvı çekebilen mikropipetler kullanılarak, her tüpten 5-10-15-20-30-50 ve 100 μL hacimlerinde çözelti çekilerek 3'er paralel olacak şekilde İTK tabaka üzerine damlatılmıştır. Yapılan çalışmanın sonuçları

değerlendirildiğinde çalışılan bu damla hacimlerinden 5 ve 10 µL yetersiz olmuştur (Şekil 108). Özellikle 10 µL çalışma için uygun olsa da mikropipetle damlatılırken, bu hacim bir damla için yetersiz miktarda olduğu ve dolayısıyla tabaka üzerine damlayamadığı için kullanılamamıştır. 15, 20 ve 30 µL damla hacimleri değerlendirildiğinde birbirine çok benzemektedir. Bu anlamda üç miktar da kullanılabilir. 50 ve 100 µL gibi büyük hacimler madde sarfiyatını arttırmakta, fazla hacim kapladığı için İTK tabaka sarfiyatını arttırmaktadır. Yapılan değerlendirmeler sonucunda, hem kullanılan kimyasal miktarını en aza indirmek ve İTK tabaka üzerine daha fazla numune damlatmak için hem de renk değerinin en iyi belirlenebileceği hacim olması açısından damlatma hacminin 15 µL olmasına karar verilmiştir.

Reaksiyonun gerçekleşme ortamının belirlenmesi için optimize edilen DPPH radikali çalışma konsantrasyonunda ve damla hacminde, 0,05-20 mM konsantrasyonlarında şiringaldehit standardı ile iki farklı deneme yapılmıştır. Bu çalışmada ve bundan sonraki zamanla reaksiyon sürecinin takip edildiği çalışmalarda genellikle reaksiyon kinetiği yavaş olduğu yani reaksiyon sürecini geç tamamladığı için şiringaldehit standardı kullanılmıştır. Yapılan çalışmanın ilkinde tıpkı spektrofotometrik yöntemde olduğu gibi reaksiyon tüpte tamamlandıktan sonra İTK tabaka üzerine damlatılmıştır. Dolayısıyla reaksiyon deney tüpünde başlayıp sonlandığı için yani reaksiyon bittikten sonra İTK tabaka üzerine damlatıldığı için burada, İTK yapısında bulunan dolgu maddesinin reaksiyona bir etkisi olmamıştır (Şekil 112). Diğer çalışmada ise çözelti deney tüplerinde karıştırıldıktan sonra hemen İTK tabaka üzerine damlatılmıştır (Şekil 113). Dolayısıyla reaksiyon İTK tabaka üzerinde gerçekleştiği için tabakanın yapısında bulunan silika dolgu maddesi de etkin olmuştur. Sonuçlar incelendiğinde damlatma çalışmasında, reaksiyon İTK tabaka üzerinde gerçekleştiğinde sonuçlar daha düzenli çıkmış gibi gözükse de, tabaka üzerine damlatılan çözeltilerin zamanla sararmış ve belli bir zaman sonra hepsi eşitmiş gibi görünmüştür. Yani tabaka üzerine damlatılan farklı konsantrasyonlar aynı renk değerlerini vermiştir. Reaksiyonun tüplerde tamamlandıktan sonra İTK tabaka üzerine damlatılmasının daha iyi sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. Dolayısıyla bu özelliği ile spektrofotometrik yöntemle de uyum göstermiştir.

Diğer bir optimizasyon çalışması da İTK tabaka üzerine damlatılan ve oluşan yuvarlak görüntülerin hangi bölgelerinin renk değerlerinin belirleneceğidir. Bu çalışmada damla hacminin belirlenmesi için Troloks standardı ile yapılan çalışma değerlendirilmiştir. Aynı şekilde konsantrasyonlar ve damla hacimleri kullanılmıştır. Çalışma ile İTK tabaka

üzerinde oluşan halkaların renk değerleri belirlenirken ilk çalışmada oluşan bütün halkaların tam orta kısımlarındaki alanın renk değerleri belirlenmiştir. Diğerinde ise halka içindeki rastgele bölgelerin renk değerleri belirlenmiştir. Bu çalışma ile aynı zamanda damla hacminin küçük ya da büyük olmasının ölçülen değeri ne kadar etkilediği de belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda iki yöntem arasında çok büyük farklılıklar gözlemlenmemiştir. Ancak yürütülen çalışmanın tamamında aynı olması açısından İTK tabaka üzerinde oluşan halkaların orta kısımlarının renk değerlerinin ölçülmesine karar verilmiştir. Ayrıca damla hacminin belirlenmesinde olduğu gibi halka çapının çok küçük (5 μL) ve çok büyük (50 ve 100 μL) olduğu hacimlerde ölçülen renk değeri de düzenli değişim göstermeyebiliyor. Bu şekilde yapılan optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra bu değerler bütün çalışmada kullanılmıştır.

Damlatma yönteminde yapılan diğer bir çalışma da farklı özelliklere sahip İTK tabakaların reaksiyonu nasıl etkilediğidir. Bu çalışmada laboratuvarımızda bulunan İTK Silika gel 60 ve İTK Silika gel 60 F₂₅₄ olmak üzere iki farklı İTK tabaka kullanılmıştır. Çalışma 0,5-20 mM konsantrasyonlarda hazırlanan şiringaldehit standardı ile yapılmıştır. İTK arasında fark olup olmadığını belirlemek için reaksiyon ortamının belirlenmesinde olduğu gibi reaksiyonun tüpte gerçekleşip sonra tabaka üzerine damlatıldığı ve reaksiyonun tabaka üzerinde gerçekleştiği her iki farklı İTK tabaka kullanılarak iki çalışma yapılmıştır. Çalışma sonucunda reaksiyon ortamının belirlenmesinde yapılan çalışmadaki gibi reaksiyon tüpte tamamlandıktan sonra tabaka üzerine damlatılmasının daha doğru olduğu görülmüştür. Farklı özellikteki İTK'ların değerlendirilmesinde çok büyük farklılık gözlemlenmemiştir. Yani çalışma için her iki İTK tabaka da kullanılabilir. Ancak bu iki İTK tabakanın özellikleri bir birine benzemektedir. İki İTK tabaka da polar dolgu maddelerine sahiptir. Sadece İTK Silika gel 60 F₂₅₄ tabaka floresans etkisi göstermektedir. Ama floresans etkiye sahip olması çalışma için farklılık göstermemiştir. Dolayısıyla çalışmada daha farklı özellikteki İTK tabakalarda kullanılıp değerlendirilebilir.

DPPH yöntemi ile antioksidan tayininde, damlatma yöntemi için DPPH çalışma konsantrasyonu, damla hacmi, reaksiyonun gerçekleşme ortamı ve reaksiyon süresi gibi optimizasyon çalışmaları yapıldıktan sonra standartlar ve numuneler ile hem spektrofotometrik hem de damlatma çalışmaları yapılmıştır. Çalışmada her iki yöntemde de antioksidan standartlar olan BHT, klorojenik asit, ferulik asit, gallik asit, kafeik asit, kateşin, kuersetin, protokatekuik asit, rutin ve şiringik asit ve metanol ve etilasetat ile hazırlanan kantaron, sarısabır, yeşil çay, ıhlamur, yeşil çay (EtAc), biberiye, zerdeçal ve

havacıva gibi bitki ekstraktları kullanılmıştır. Öncelikle spektrofotometrik yöntemde olduğu gibi farklı konsantrasyonlarda standartlar ve bitki ekstraktları ile 2000 μM DPPH konsantrasyonunda her birinin SC_{50} değerleri hesaplanmıştır (Şekil 23-32). Daha sonra aynı standart ve numunelerle farklı konsantrasyonlarda damlatma yöntemi uygulanarak CSC_{50} değerleri hesaplanmıştır (Şekil 35-62).

Spektrofotometrik yöntemde göre standartlar SC_{50} değeri en düşük olan yani antioksidan aktivitesi en yüksek olandan düşük olana doğru sıralamaya koyulduğunda sıralama şöyledir: gallik asit, şiringik asit, kateşin, kafeik asit, kuersetin, protokatekuik asit, ferulik, BHT, klorojenik asit ve rutin standardı ve bitki ekstraktları sıralandığında yeşil çay, havacıva, ıhlamur, zerdeçal, biberiye, nane, yeşil çay (EtAc), kantaron ve sarısabır bitki ekstraktıdır. Aynı düşünceyle damlatma yöntemine göre sıralama yapıldığında, standartlar için sıralama: gallik asit, şiringik asit, kafeik asit, protokatekuik asit, kateşin, klorojenik asit, kuersetin, ferulik asit, rutin ve BHT standardı ve bitki ekstraktları için sıralama: yeşil çay, ıhlamur, havacıva, zerdeçal, biberiye, nane, yeşil çay (EtAc), kantaron ve sarısabır bitki ekstraktıdır. Yapılan aktivite sıralaması değerlendirildiğinde, spektrofotometrik ve damlatma yöntemi arasında oldukça benzer bir uyumun olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca yeşil çayın metanol ve asetonitril ekstraktlarından metanol ekstraktının her iki yöntemde de daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği görülmüştür.

Yaygın olarak kullanılan diğer antioksidan yöntem olan FRAP testi sonuçları şöyledir: Bu çalışmada DPPH ile damlatma çalışmasında yapılan optimizasyon çalışmaları tekrar edilmemiştir. Bu çalışmada ön denemelerde FRAP reaktifinin spektrofotometrik çalışmalardaki konsantrasyon ile aynı değerde, yani en düşük konsantrasyonda çalışıldığında sonuç verdiği için bu konsantrasyonda çalışılmıştır. Damla hacmi optimize edildiği gibi 15 μL olarak kullanılmıştır. Çalışmada DPPH testinde olduğu gibi FRAP testinde de, 400 μM konsantrasyonunda standartlar (gallik asit, ferulik asit, protokatekuik asit, şiringik asit, kafeik asit, BHT, kateşin, klorojenik asit, vanilin ve benzoik asit) ve 1 mg/mL konsantrasyonunda bitki ekstraktları (nane, yeşil çay, havacıva, zerdeçal, biberiye, ekinezya, sarısabır, rezene, kantaron, ebegümece, yeşil çay (EtAc), ısırgan otu (EtAc) ve ıhlamur (EtAc) kullanılarak hem spektrofotometrik hem de damlatma metodu uygulanarak yapılmıştır. Spektrofotometrik FRAP testi laboratuvarımızda daha önce yapılmış çalışmalardaki gibi uygulanarak farklı konsantrasyonlarda Troloks standardı çalışılmış ve elde edilen grafik değerinden yararlanılarak her bir standardın ve numunenin μM TEAC değerleri belirlenmiştir. Damlatma çalışmasında ise Troloks ile farklı

konsantrasyonlarda reaktif körü ve numune körü de üçer paralel olacak şekilde çalışılmış ve sonuçlar grafiğe geçirilmiştir. Çalışılan standart ve numunelerde bu grafikten elde edilen değer kullanılarak her bir numunenin μM TEAC değerleri hesaplanmıştır.

Uygulanan her iki yöntemde de standart ve bitki ekstraktları antioksidan aktivitesi en yüksek olandan en düşük olana doğru sıralamaya konulduğunda sıralama şöyle olmuştur. Spektrofotometrik yöntemle göre standartlar için, gallik asit, kafeik asit, protokatekuik asit, şiringik asit, BHT, klorojenik asit, ferulik asit, kateşin, vanilin ve benzoik asit ve bitki ekstraktları için, yeşil çay, ıhlamur, biberiye, nane, zerdeçal, havacıva, yeşil çay (EtAc), kantaron, ekinezya, ısırgan otu, ıhlamur (EtAc), sarısabır, rezene, ebegümece ve ısırgan (EtAc)'dir. Damlatma yöntemine göre ise, standartlar için, gallik asit, kafeik asit, protokatekuik asit, şiringik asit, BHT, ferulik asit, kateşin, klorojenik asit, vanilin ve benzoik asit ve bitki ekstraktları için, yeşil çay, ıhlamur, biberiye, nane, zerdeçal, havacıva, yeşil çay (EtAc), kantaron, ekinezya, ısırgan otu, sarısabır, ebegümece, rezene, ıhlamur (EtAc), ve ısırgan (EtAc)'dir. Yapılan sıralandırma değerlendirildiğinde FRAP yöntemiyle yapılan spektrofotometrik testin ve damlatma testinin aktivite sonuçları hem standartlar hem de bitki ekstraktları için oldukça benzerdir. Hatta iki yöntem arasındaki uyum DPPH yöntemine göre daha iyidir (Şekil 136 ve 138).

Diğer yeni geliştirilen yöntem olan, HP 2060 yazıcı ve kartuşlarının kullanılarak yapıldığı püskürtme yöntemi iki antioksidan standart ile yürütülmüştür. Yapılan çalışmada püskürtme adına birçok olumsuzlukların yaşanmasından dolayı özet olarak sadece bu iki standart ile yapılan çalışmalar mevcut çalışmada yer almıştır. Protokatekuik asit ve Troloks standartları ile yapılan spektrofotometrik çalışmada SC_{50} değerleri belirlenmiştir: protokatekuik standardı için $SC_{50} = 356,2813 \mu\text{M}$ ve Troloks standardı için $SC_{50} = 177,8485 \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır. Değerler incelendiğinde Troloks standardının antioksidan aktivitesinin protokatekuik asidin antioksidan aktivitesinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Damlatma yöntemine göre elde edilen CSC_{50} değerleri ise, protokatekuik asit için $CSC_{50} = 525 \mu\text{M}$ olarak Troloks standardı için ise $CSC_{50} = 995 \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır. Spektrofotometrik yöntemde olduğu gibi damlatma yönteminde de Troloks'un protokatekuik asitten daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Esas yapılan püskürtme çalışmasında $3000 \mu\text{M}$ konsantrasyonunda hazırlanan metanolik DPPH radikali ve standartlar farklı yüzdelerde İTK tabaka üzerine püskürtülerek renk değerleri belirlenmiştir. Püskürtme yapılırken DPPH radikali sabit tutulmuş ama standartların konsantrasyonu %0-100 arasında artacak şekilde

püskürtülmüştür. Püskürtme sonunda Troloks standardının DPPH radikalinin %13'lük bir kısmını, protokatekuik asidin ise %7'lik bir kısmını temizlediği görülmüştür. Dolayısıyla püskürtme yönteminde de Troloksun protokatekuik asitten daha yüksek bir antioksidan aktiviteye sahip olduğunu görüyoruz.

Çalışmalar sonucunda yaygın olarak kullanılan iki antioksidan yöntemde de (DPPH ve FRAP yöntemi) uygulanan spektrofotometrik ve yeni geliştirilen damlatma yöntemi arasında hem standartlar hem de bitki ekstraktları için benzer sonuçların çıktığı görülmüştür. Dolayısıyla hem DPPH hem de FRAP testi için spektrofotometrik ölçüm yerine damlatma yöntemi uygulanabilir. Damlatma yöntemi uygulanarak yapılan her iki antioksidan testte de, yeni geliştirilen bu yöntemin, spektrofotometrik yöntemle göre birçok avantajının olduğunu ortaya koymaktadır. Özellikle spektrofotometre olmadan basit bir şekilde ve her laboratuvar ortamında bu iki antioksidan testin yapılabilineceği görülmüştür. Yeni yöntemle spektrofotometre olmadan sadece bedava ve kolaylıkla ulaşılabilecek bir program kullanılarak testler yapılabilir. Ayrıca bu yeni yöntemle özellikle DPPH testinde gün içinde çalışılacak madde sayısı arttırılabilir. Bu yöntemin diğer bir önemli yönü ise deney maliyetinin azalıyor olmasıdır. Bu yöntemle kullanılan reaktif ve kimyasal miktarı azalmıştır. Spektrofotometrik yöntemde daha düşük konsantrasyonda DPPH radikali kullanılsa da absorbans ölçümünde kullanılan hacmin fazla olmasından toplam olarak düşünüldüğünde damlatma yönteminde daha az reaktif kullanılmaktadır. Ayrıca bu yöntemle spektrofotometrik çalışmada kullanılan plastik küvetlerin harcanmasına da gerek kalmamaktadır. Kısacası mevcut çalışmada damlatma yönteminin spektrofotometrik yöntemle eşdeğerde ve birçok yönden daha avantajlı olduğu görülmüştür.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada kullanılan birçok antioksidan standardın ve iki farklı çözeltide hazırlanan, farklı derecelerde antioksidan aktiviteye sahip olan bitki ekstraktlarının hem spektrofotometrik hem de yeni geliştirilen damlatma yöntemine göre yapılan çalışmalar ve elde edilen verileri değerlendirilmiştir. Ayrıca diğer bir yeni geliştirilen ve tam olarak tamamlanamayan yazıcı yardımı ile iki antioksidan standart (Troloks ve protokatekuik asit) kullanılarak yapılan püskürtme çalışmasının sonuçları da değerlendirilmiştir.

Spektrofotometrik yöntemle DPPH testinde reaksiyon kinetikleri belirlenen standartlar ve bazı numunelerin genel olarak reaksiyon tamamlama sürelerinin 60 dk olduğu görülmüştür. FRAP testi ile yapılan çalışmada ise literatür ile eşdeğer olarak çalışılan standart ve numunelerin reaksiyonu tamamlama sürelerinin 20 dk olduğu görülmüştür. Ayrıca farklı hızda bozulan FRAP reaktifi ile yapılan reaksiyon kinetiği çalışması sonunda hızlı bozulan FRAP reaktifinin reaksiyonu belli bir yere kadar arttırdıktan sonra ölçülebilen antioksidan kapasitenin azaldığı görülmüştür. Dolayısıyla çabuk bozulan FRAP reaktifi ile çalışma yapıldığında FRAP testi için kullanılan 20 dakikalık süre aşılmamalıdır. Bu reaktif ile reaksiyon 60 dakika takip edildiğinde yanlış düşük aktivite ölçümleri yapılabilir.

DPPH testinde spektrofotometrik yöntemle göre çalışılan standartlar antioksidan aktivitesi en yüksek olandan düşük olana doğru sıralamaya koyulduğunda sıralama gallik asit, şiringik asit, kateşin, kafeik asit, kuersetin, protokatekuik asit, ferulik, BHT, klorojenik asit ve rutin standardı ve bitki ekstraktları sıralandığında yeşil çay, havacıva, ıhlamur, zerdeçal, biberiye, nane, yeşil çay (EtAc), kantaron ve sarısabır (aloe vera) bitki ekstraktıdır. Aynı düşünceyle damlatma yöntemine göre sıralama yapıldığında, standartlar için sıralama gallik asit, şiringik asit, kafeik asit, protokatekuik asit, kateşin, klorojenik asit, kuersetin, ferulik asit, rutin ve BHT standardı ve bitki ekstraktları için sıralama yeşil çay, ıhlamur, havacıva, zerdeçal, biberiye, nane, yeşil çay (EtAc), kantaron ve sarısabır (*Aloe vera*) bitki ekstraktıdır. Yapılan aktivite sıralaması ve belirlenen SC₅₀ ve CSC₅₀ değerleri karşılaştırması değerlendirildiğinde, spektrofotometrik ve damlatma yöntemi arasında oldukça benzer bir uyumun olduğu gözlemlenmiştir. İki yöntem arasındaki korelasyon yani R² değeri 0,9923'tür.

FRAP testinde spektrofotometrik yöntemle göre standartlar için sıralama gallik asit, kafeik asit, protokatekuik asit, şiringik asit, BHT, klorojenik ait, ferulik asit, kateşin, vanilin ve benzoik asit ve bitki ekstraktları için, yeşil çay, ıhlamur, biberiye, nane, zerdeçal, havacıva, yeşil çay (EtAc), kantaron, ekinezya, ısırgan otu, ıhlamur (EtAc), sarısabır, rezene, ebegümeci ve ısırgan (EtAc)'dir. Damlatma yöntemine göre ise, standartlar için, gallik asit, kafeik asit, protokatekuik asit, şiringik asit, BHT, ferulik asit, kateşin, klorojenik ait, vanilin ve benzoik asit ve bitki ekstraktları için, yeşil çay, ıhlamur, biberiye, nane, zerdeçal, havacıva, yeşil çay (EtAc), kantaron, ekinezya, ısırgan otu, sarısabır, ebegümeci, rezene, ıhlamur (EtAc), ve ısırgan (EtAc)'dir. İki yöntem için standartlar arasındaki korelasyon değeri R^2 0,988 ve bitki ekstraktları arasındaki korelasyon değeri ise R^2 0,9852'dir.

Spektrofotometrik ve damlatma yöntemi için korelasyon değerlerine bakıldığında iki yöntemin DPPH ve FRAP testlerinin her ikisinde gayet uyumlu oldukları görülmektedir. Dolayısıyla çıkan sonuçlara bakıldığında damlatma yöntemi uygulanarak spektrofotometre kullanmadan bu iki antioksidan testin rahatlıkla yapılabileceği görülmüştür. Dolayısıyla spektrofotometreye gerek duymadan sadece uygun bir zemin (İTK plaka veya kağıt) ve renk ölçüm programı (Image J) kullanılarak antioksidan testler her laboratuvar ortamında kolaylıkla yapılabilir.

Gelecekte püskürtme yöntemiyle yapılan çalışmaların değerinin artması ve tez kapsamında bu yöntem kullanılarak yapılan çalışmaların olumlu sonuç vermesinden dolayı daha sonraki zamanlarda bu yöntemin uygulanmasında ki sorunlar ortadan kaldırılarak daha kapsamlı çalışmalar yapılacaktır.

Bundan sonraki çalışmalarda, silika İTK tabaka yerine farklı özellikteki plakalar ve kağıtlar kullanılarak çalışma geliştirilebilir, benzer çalışma gıda ve ilaç analizi gibi çalışmalar için geliştirilebilir ve damlatma yöntemi ile başka renkli antioksidan yöntemler denenebilir.

6. KAYNAKLAR

- Akkuş, İ., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, 18, Konya.
- Aktaş, A., 2012. LC-ESI-MS ve on-line HPLC-ABTS Yöntemleriyle Belirlenen Gilaburu, Kızılcık, Kokulu Üzüm ve Karayemiş Meyvelerinin Biyoaktif Fenolik Bileşimi, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Akyüz E., 2007. *Polygonum bistorta ssp. carneum* Bitki Ekstraktlarının Kromatografik Yöntemlerle Kimyasal Bileşiminin Belirlenmesi ve Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktiviteleri, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Akyüz E., 2011. *Digitalis ferruginea ssp. schischkinii* ve Bazı Endemik *Digitalis* Türlerinin Ekstraktlarında Mevcut Kardiyak Glikozitleri Ve Fenolik Bileşiklerin Kromatografik Yöntemlerle Belirlenmesi, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Albayrak S., Sağdıç O. ve Aksoy, A., 2010. Bitkisel Ürünlerin ve Gıdaların Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 26, 4, 401-409.
- Arciuli M., Palazzob G., Gallonea A. ve Mallardiz A., 2013. Bioactive Paper Platform for Colorimetric Phenols Detection, Sensor and Actuators B: Chemical, 186, 557- 562.
- Ardağ A., 2008. Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemlerinin Analitik Açından Karşılaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Arslan Burnaz, N., 2007. *Viburnum opulus* ve *V. orientale* Bitki Ekstraktlarının Kimyasal Bileşimi ve Biyolojik Aktiviteleri, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Bailey D.M., Lundby C., Berg M.G., Taudorf S., Rahmouni H., Gutowski M., Mulholland C.W., Sullivan J.L., Swenson E.R., McEneny J., Young S., Pedersen B.K., Moller K., Pietri S. ve Culcasi, 2014. On the antioxidant properties of erythropoietin and its association with the oxidative–nitrosative stress response to hypoxia in humans, Acta Physiologica, 212, 175- 187.
- Balasundram N., Sundram K. ve Saman S., 2006. Phenolic Compounds in Plants and Agri-Industrial By-Products: Antioxidant Activity, Occurrence, and Potential Uses. Food Chemistry, 99, 191–203.

- Barbalán Á.M.A., Zorro L., Guillén D.A. ve Barroso C.G., 2003. Study of Polyphenol Content of Red and White Grape Varieties by Liquid Chromatography- Mass Spectrometry and Its Relationship to Antioxidant Power, Journal of Chromatography A, 1012, 31-38.
- Benzie I.F.F. ve Strain J.J., 1999. Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay: Direct Measure of Total Antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic Acid Concentration, In Methods in Enzymology, 299, 15–27.
- Benzie I.F.F. ve Strain, J.J., 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay , Anal. Biochem., 239, 1, 70-76.
- Bilaloğlu G.V. ve Harmandar M., 1999. Flavonoidler. Aktif Yayınevi, İstanbul, 334-354.
- Blomhoff R., 2005. Dietary antioxidants and cardiovascular disease, Current Opinion in Lipidology, 16,47-54.
- Bravo L., 1998. Polyphenol Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significance, Nutr. Rev., 56, 317-333.
- Burnaz A.N., 2013. On-Line HPLC-FRAP Antioksidan Aktivite Tayin Yönteminin Geliştirilmesi ve Bazı Doğal Ürünlere Uygulanması, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Caldero' n A.I., Simithy-Williamsa J., Sanchezb R., Espinosa A., Valdespinoc I. ve Gupta M.P., 2013. Lycopodiaceae from Panama: A new source of acetylcholinesterase inhibitors, Natural Production Research, 4-5, 500- 505.
- Can Z., 2014. Biyoaktiviteleri Yönünden Türkiye Florasına Ait Baskın Ballar İle Manuka Ballarının Karşılaştırılması, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Casagrande F. ve Darbon, J.M., 2001. Effects of Structurally Related Flavonoids on Cell Cycle Progression of Human Melanoma Cells: Regulation of Cyclin- Dependent Kinases. Biochemical Pharmacology, 61, 1205–1215.
- Chen J., Lindmark-Mansson, H., Gorton L. ve Akesson B., 2003. Antioxidant Capacity of Bovine Milk as Assayed by Spectrophotometric and Amperometric Methods, International Dairy Journal, 13, 927-935.
- Cies'la L., Kryszew' J., Stochmalb A., Oleszekb W. ve Waksmundzka-Hajnos M., 2012. Approach to develop a standardized TLC-DPPH• test for assessing free radical scavenging properties of selected phenolic compounds, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 70, 126- 135.

- Cuendet M., Hostettmann K., Potterat O. ve Dyatmiko W., 1997. Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties from *Fagraea blumei*, Helvetica Chimica Acta, 80, 1144-1152.
- Cuvelier M.E., 1996. Antioxidative Activity and Phenolic Composition of Pilot Plant and Commercial Extracts of Sage and Rosemary , Journal of American Oil Chemistry Society, 73, 5, 645-652.
- Durling N.E., Catchpole O.J., Grey J.B., Webby R.F., Mitchell K.A., Foo L.Y. ve Perry N.B., 2007. Extraction of Phenolics and Essential Oil from Dried Sage (*Salvia officinalis*) Using Ethanol-Water Mixtures, Food Chemistry, 101, 1417-1424.
- Elmastaş M. ve Gerçekçioğlu R., 2006. Bazı Üzüksü Meyve Türlerinin Antioksidan Aktiviteleri, II. Ulusal Üzüksü Meyveler Sempozyumu, Tokat, Bildiriler Kitabı, 295-298.
- Erel Ö., 2004. A Novel Automated Direct Measurement Method for Total Antioxidant Capacity Using A New Generation, More Stable ABTS Radical Cation, Clinical Biochemistry, 37, 277– 285.
- Fabre N., Rustan I., Hoffmann D.E. ve Quetin-Leclercq J., 2001. Determination of Flavone, Flavonol and Flavanone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry, J. Am. Soc. Mass Spectrom., 12,707-715.
- Fang Z., Zhan M. ve Wang L., 2007. HPLC-DAD-ESI-MS Analysis of Phenolic Compounds in Bayberries (*Myrica rubra* Sieb. Et Zucc.), Food Chemistry, 100, 845-852.
- Gaulejac N.S.C., Provost C. ve Vivas N., 1999. Comparative Study of Polyphenol Scavenging Activities Assessed by Different Methods, J. Agric. Food Chem., 47, 2, 425-431.
- Ghafoori H., Sariri R. ve Naghavi M.R. 2013. Study of Effect of Extraction Conditions on The Biochemical Composition and Antioxidant Activity of *Artemisia absinthium* by HPLC and TLC, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 37, 11, 1558- 1567.
- Ghiselli A., Serafini M., Natella F. ve Scaccini C., 2000. Total Antioxidant Capacity as a Tool to Assess Redox Status: Critical Review and Experimental Data, Free Radical Biology and Medicine, 29, 1106-1114.
- Güçlü K., Sözgen, K., Tütem E., Özyürek M. ve Apak R., 2005. Spectrophotometric Determination of Ascorbic Acid Using Copper (II)-neocuproine Reagent in Beverages and Pharmaceuticals. Talanta, 65, 1226-1232.

- Günaydın B. ve Çelebi H., 2003. Genel Anesteziklerin Serbest Radikaller ve Antioksidanlarla İlişkileri, Anestezi Dergisi, 11, 87-98.
- Gunduz A., Türedi S. ve Ayaz A.F., 2011. Deli Balın İçindeki Zehir: Grayanotoxin, Journal of Applied and Environmental Microbiology, 95-96.
- Hallaç Türk F., 2009. Bazı Sofralık Üzüm Çeşitlerinde Farklı Dönemlerde Alınan Yapraklardaki Fenolik ve Mineral Madde Değişimlerinin Belirlenmesi, Doktora Tezi, S.D.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Halliwell B., 1995. Antioxidant Characterization: Methodology and Mechanism, Biochem Pharmacol., 49, 10, 1341-8.
- Halliwell B., Cross C.E. ve Gutteridge J.M.C., 2002. Free Radicals, Antioxidants, and Human Disease. Where are We Now?, Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 119, 598-620.
- Havsteen B.T., 2002. The Biochemistry and Medical Significance of the Flavonoids, Pharmacology ve Therapeutic, 96, 67-202.
- Huang D., Ou B. ve Prior R.L., 2005. The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays, J. Agric. Food Chem., 53, 1841-1856.
- Karovicova J. ve Simko P., 2000. Determination of Synthetic Phenolic Antioxidants in Food by High-Performance Liquid Chromatography, Journal of Chromatography A, 882, 271-281.
- Kishorea R.K., Halima A.S., Syazanaa M.S.N. ve Sirajudeenb K.N.S., 2011. Tualang honey has higher phenolic content and greater radical scavenging activity compared with other honey sources, Nutrition Research, 31,322-325.
- Koleva I.I., van Beek T.A., Linnsen J.P.H., de Groot A. ve Evstatieva, L.N., 2002. Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: A Comparative Study of Three Testing Methods, Phytochemical Analysis. 13, 8-17.
- Krishnaiah D., Sarbatly R. ve Nithyanandam R., 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. Food and Bioproducts Processing, 89, 217-233.
- Küçük M., Kolaylı S., Karaoğlu Ş., Ulusoy E., Baltacı C. ve Candan F., 2007. Biological Activities and Chemical Composition of Three Honeys of Different Types from Anatolia, Food Chemistry, 100, 526-534.
- Lazarus S.A. ve Schmitz H.H., 2000. Dietary Flavonoids May Promote Health, Prevent Heart Disease, California Agriculture, 54, 5, 33-39.

- Lee J., Koo, N. ve Min D.B., 2004. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 3, 21-33.
- Lushchak V., 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification, Chemico- Biological Interactions, 224, 164–175.
- MacDonald-Wicks L.K., Wood L.G ve Garg M.L., 2006. Methodology for the Determination of Biological Antioxidant Capacity in vitro: A Review, J. Sci. Food Agric., 86, 2046–2056.
- Macheix J-J., Fleuriet A. ve Billot J., 1990. Fruit Phenolics, USA: CRC Press, Boca Raton.
- Maksimovi Z., 2008. In Vitro Antioxidant Activity of Ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L., Asteraceae) herb, Industrial Crops and Products, 28, 356- 360.
- Mandal S., Yadav S., Yadav S. ve Nema, R.K., 2009. Antioxidants: A Review, Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 1, 1, 102-104.
- Matés J. M., Pérés-Gomez C. ve de Castro I. N., 1999. Antioxidant Enzymes and Human Diseases, Clinical Biochemistry, 32,8, 595-603.
- Melchelsa F.P.W., Domingosc M.A.N., Kleina T.J., Maldaa J., Bartoloc P.J. ve Hutmachera D.W., 2012. Additive Manufacturing of Tissues and Organs, Progress in Polymer Science, 37, 1079- 1104.
- Miller N.J., Rice-Evans C.A., Davies M.J., Gopinathan V. ve Milner, A., 1993. A Novel Method For Measuring Antioxidant Capacity And Its Application To Monitoring The Antioxidant Status In Premature Neonates, Clinical Science, 84, 407-412.
- Mironov V., Boland T., Trusk T., Forgacs G. ve Markwald R.R., 2003. Organ Printing: Computer-Aided Jet-Based 3D Tissue Engineering, TRENDS in Biotechnology, 21.
- Mironov V., Kasyanov V. ve Markwald R.R., 2011. Organ Printing: From Bioprinter to Organ Biofabrication Line, Current Opinion in Biotechnology, 22, 667- 673.
- Mironov V., Visconti R.P., Kasyanov V., Forgacs G., Drake C.J. ve Markwald R.R., 2009. Organ Printing: Tissue Spheroids as Building Blocks, Biomaterials, 30, 2164-2174.
- Murakami M., Yamaguchi T., Takamura H. ve Matoba T., 2003. Effects of Ascorbic Acid and α -Tocopherol on Antioxidant Activity of Polyphenolic Compounds, Journal of Food Science, 68, 5, 1622-1625.
- Nizamoglu M.N. ve Nas S., 2010. The Phenolic Compounds in Vegetables and Fruit; Structures and Their Importance, Electronic Journal of Food Technologies, 5, 20-35.

- Oğuz A., 2008. Bazı Çerez Gıdaların Antioksidan Kapasiteleri, Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.
- Olech M., Komsta L., Nowak R., Cies'la L. ve Waksmundzka-Hajnos M., 2012. Investigation of antiradical activity of plant material by thin-layer chromatography with image processing, Food Chemistry, 132, 549- 553.
- Onat T., Emerk K. ve Sözmen E.Y., 2002. İnsan Biyokimyası , Palme Yayıncılık, Ankara.
- Orhan I., Sener B., Choudhary M.I. ve A. Khalid A., 2004. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants, Journal of Ethnopharmacology, 91, 57- 60.
- Ou B., Hampsch-Woodill M. ve Prior R.L., 2001. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Using Luorescein as the Fluorescent Probe, J. Agric. Food Chem., 49, 4619–4626.
- Oyaizu M., 1986. Studies on Product of Browning Effect Reaction Prepared from Glucose Amine. Journal of Nutrition, 44, 307–315.
- Özgen M., Reese R.N., Tulio Jr., A.Z., Scheerens J.C. ve Miller A.R., 2006. Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) Method to Measure Antioxidant Capacity of Selected Small Fruits and Comparison to Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Methods. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 1151-1157.
- Öztan T., 2006. Mor Havuç, Konsantresi, Şalgam Suyu, Nar Suyu ve Nar Ekşisi Ürünlerinde Antioksidan Aktivitesi Tayini ve Fenolik Madde Profilinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Pellegrini N., Re R., Yang M. ve Rice-Evans C.A., 1999. Screening of Dietary Carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying the 2, 2' azobis (3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic) acid radical cation decolorization assay. Methods in Enzymology, 299, 379-389.
- Pellegrini N., Serafini M., Colombi B., Rio D.D., Salvatore S., Bianchi M. ve Brighenti F., 2003. Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy by Three Different in vitro Assays. Journal of Nutrition, 133, 2812-2819.
- Plochmann K., Korte, G., Koutsilieri E., Richling E., Riederer P., Rethwilm A., Schreier P. ve Scheller C., 2007. Structure-Activity Relationships of Flavonoid- Induced, Cytotoxicity on Human Leukemia Cells, Archives of Biochemistry and Biophysics, 460,1-9.
- Prior R.L. ve Cao G., 1999. In Vivo Total Antioxidant Capacity: Comparison of Different Analytical Methods, Free Radical Bio. Med., 27, 1173-1181,.

- Prior R.L., Wu X. ve Schaich K., 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, J. Agric. Food Chem., 53, 4290-4302.
- Pyrzynska K., 2009. Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey, Magdalena Biesaga Trends in Analytical Chemistry, 28, 7.
- Ramis S., Alkasir J., Ornatska M. ve Andreescu S., 2012. Colorimetric Paper Bioassay for the Detection of Phenolic Compounds, Analytical Chemistry, 84, 9729- 9737.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. ve Rice-Evans C., 1999. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. Free Radical Biology & Medicine 26, 9-10, 1231-1237.
- Rice-Evans C. ve Miller N.J., 1994. Total Antioxidant Status in Plasma and Body Fluids, Methods in Enzymology, 234, 279–293.
- Robards K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitang P. ve Glover W., 1999. Phenolic Compounds and Their Role in Oxidative Processes in Fruits, Food Chemistry, 66, 401-436.
- Şahin H., 2014. Ormangülü Balı ve Bitkisindeki GTX-III İzoformunun LC- MS/MS ile Aydınlatılması Doktora Tezi, K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Saura-Calixto F. ve Goni I., 2006. Antioxidant Capacity of the Spanish Mediterranean Diet, Food Chemistry, 94, 442-447.
- Scherer P.M., Murray B.K. ve O'Neill K.L., 2007. Comparison of the Total Oxyradical Scavenging Capacity and Oxygen Radical Absorbance Capacity Antioxidant Assays, J. Med. Food, 10, 2, 337- 344.
- Schneider C.A., Rasband W.S. ve Eliceiri K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Focus on Bioimage Informatics Historical Commentary, Nature America, 617-6175.
- Schoneich C., 1999. Reactive Oxygen Species and Biological Aging:a Mechanistic Approach, Exp Gerontol, 34, 19-34.
- Sellapan S., Akoh C.C. ve Krewer G., 2002. Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Georgia Grown Blueberries and Blackberries, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 2432-2438.
- Şensoy N.D., 2007. Adaçayı (*Salvia officinalis*) Yapraklarından Süperkritik Karbon Dioksit Ekstraksiyonu ile Doğal Antioksidan Eldesi ve Tayini, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Sergeyeva T.A., Gorbach L. A., Slinchenko O.A., Goncharova L.A. Piletska O.V., Broyko O.O., Sergeeva L.M. ve Elska G.V., 2010. Towards Development of Colorimetric Test Systems for Phenols Detection Based on Computationally Designed Molecularly Imprinted Polymer Membrans, Materials Science and Engineering C, 30, 431- 436.
- 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, USA, Bilim Yayıncılık, Ankara.
- Slinkard K. ve Singleton V.L., 1977. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods, Am. J. Enol. Vitic., 28, 49-55
- Szöllösi R. ve Szöllösi Varga I., 2002. Total Antioxidant Power in Some Species of Labiatae (Adaptation of FRAP method), Acta Biologica Szegediensis, 46, 3-4, 125-127.
- Thomas M.J., 1995. The role of free radicals and antioxidants: How do we know that they are working?, Critical Reviews in Food Science, 35, 21-39.
- Tsao R. ve Deng Z., 2004. Separation Procedures For Naturally Occurring Antioxidant Phytochemicals, Journal of Chromatography B, 812, 85-99.
- Tsimogiannis D. I. ve Oreopoulou V., 2006. The Contribution of Flavonoid C-Ring on The DPPH Free Radical Scavenging Efficiency. A Kinetic Approach for The 3',4'-Hydroxy Substituted Members, Innovative Food Science & Emerging Technologies, 7,140-146.
- Tubaro F., Ghiselli A., Papuzzi P., Maiorino M. ve Ursini F., 1998, Analysis of Plasma Antioxidant Capacity by Competition Kinetics, Free Radical Biology & Medicine, 24, 1228-1234.
- Tütem E. ve Apak R., 1991. Simultaneous Spectrophotometric Determination of Cystine and Cysteine in Amino Acid Mixtures Using Copper(II)-Neocuproine Reagent, Analytica Chimica Acta, 255, 121-125.
- Tütem E., Apak R., Günaydın E. ve Sözgen K. 1997. Spectrophotometric Determination of Vitamin E (α -tocopherol) Using Copper(II)-Neocuproine Reagent, Talanta, 44, 249-255.
- Ulusoy E., 2010. Anzer Balı ve Poleninin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Fenolik Bileşiminin Belirlenmesi ve Antioksidan Özellikleri, Doktora Tezi, K.T.Ü. Fen Bilimlerinin Enstitüsü, Trabzon.
- Vaher M., Borissova M., Seiman A., Aid T., Kolde H., Kazarjan J. ve Kaljurand M., 2014. Automatic Spot Preparation and Image Processing of Paper Microzone-based Assays for Analysis of Bioactive Compounds in Plant Extracts, Food Chemistry, 465- 471.

- Vermerris W. ve Nicoloson R., 2006. Phenolic Compounds Biochemistry, Springer, The Netherlands, 89-90.
- Wang C.C., Chu C.Y., Chu K.O., Choy K.W., Khaw K.S., Rogers M.S. ve Pang C.P., 2004. Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity Assay Versus Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay in Plasma, Clinical Chemistry, 50, 952-954.
- Wettasinghe M. ve Shahidi F., 1999. Antioxidant and Free Radical-Scavenging Properties of Ethanolic Extracts of Defatted Borage (*Borago officinalis L.*) Seeds, Food Chemistry, 67,4, 399-414.
- Winston G. W., 1991. Oxidant and Antioxidants, in Aquatic Animals, Comp. Biochem.Phys., 100, 173-176.
- Wollgast J. ve Anklam E., 2000. Review on Polyphenols in Theobroma Cacao: Changes in Composition During the Manufacture of Chocolate and Methodology for Identification and Quantification, Food Research Institutes, 33, 347- 423.
- Xin X., Yang W., Yasen M., Zhao H. ve Aisa H., 2014. The mechanism of hepatoprotective effect of sesquiterpene-rich fraction from *Cichorium glandulosum* Boiss et Huet on immunoreaction-induced liver injury in mice, Journal of Ethnopharmacology, 155, 1068- 1075.
- Xu T., Jin J., Gregory C. Hickman J.J. ve Boland T., 2005. Inkjet Printing of Viable Mammalian Cells, Biomaterials, 26, 93- 99.
- Yapar S.B., 2006. Alfa Lipoik Asidin Rat Karaciğer Homojenatlarında İndüklenmiş Lipid Peroksidasyonuna Etkisi, Uzmanlık Tezi, Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Edirne.
- Yeziel E., Feature Article: Anti-Oxidants, Oxidative Stress, and Cellular Aging <http://www.topical-formulations.com/topical/200503/antioxidants.htm> 5 Aralık 2012.
- Yıldız L., 2007. Bazı Bitki Örneklerinde Antioksidan Kapasitenin Spektrofotometrik ve Kromatografik Tayini, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

ÖZGEÇMİŞ

Zeynep İSKEFİYELİ, 1984 yılında Trabzon'da doğdu. Yıldızlı İlköğretim okulu'nu bitirdikten sonra, lise öğrenimini Trabzon Lisesi'nde tamamladı. 2003 yılında Kafkas Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümüne kayıt yaptırdı. 2007 yılında bu bölümden Kimyager ünvanıyla mezun oldu. Bir yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi'nde yabancı dil eğitimi aldı ve aynı üniversitede Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Programı'na başladı. 2010 yılında yüksek lisans eğitimini tamamladıktan sonra aynı anabilim dalının Biyokimya bilim dalında doktora programına başladı. 2009-2010 yıllarında Münir Bozkurt adlı gıda ürünleri firmasında sorumlu yönetici olarak çalıştı. 2010-2013 yıllarında lisanüstü öğrenci olarak ve KYK bursu kapsamında K.T.Ü. Fen Fakültesi Kimya ve Biyoloji Bölümleri öğrenci laboratuvarlarında kısmi zamanlı olarak araştırma görevlisi statüsünde görev yaptı. Yabancı dili İngilizce'dir. Halen bu eğitime devam etmektedir.