



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN PRO-OKSİDAN
AKTİVİTELERİNİN ÖLÇÜMÜ İÇİN YENİ BİR
SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ**

**Kimyager Esin KONDAKÇI
Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı**

**Danışman
Prof. Dr. Reşat APAK**

Kasım, 2011

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN PRO-OKSİDAN
AKTİVİTELERİNİN ÖLÇÜMÜ İÇİN YENİ BİR
SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ**

Kimyager Esin KONDAKÇI

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

Danışman

Prof. Dr. Reşat APAK

Kasım, 2011

İSTANBUL

Bu çalışma 26/12/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi


Prof. Dr. Reşat APAK (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi


Prof. Dr. Esmâ TÜTEM
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi


Prof. Dr. İnci SÖNMEZOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi


Prof. Dr. Hayati FİLİK
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi


Doç. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 7364 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımlarından dolayı çok değerli hocam ve yüksek lisans tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Reşat APAK'a en derin şükranlarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca desteklerini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Kubilay GÜÇLÜ'ye ve Sayın Yard. Doç. Dr. Mustafa ÖZYÜREK'e en içten dileklerle teşekkür ederim.

Bu çalışma boyunca bana destek olan grup arkadaşlarım Araş Gör. Dr. S. Esin ÇELİK'e, Araş. Gör. Burcu BEKDEŞER'e, Araş. Gör. Mustafa BENER'e, Yük. Kimyager Nilay GÜNGÖR'e, Yük. Kimyager Sefa BAKI'ye, Kimyager Merve E. KAYALILAR'a, Kimyager Ayşenur TUFAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma her türlü desteklerinden ve yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Değerli aileme desteklerinden ve gösterdikleri hoşgörüden dolayı yürekten teşekkür ederim.

Tezimle aynı adı taşıyan 7364 numaralı yüksek lisans tez projesine destek sağlayan İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Kasım, 2011

Esin KONDAKÇI

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ	vii
SEMBOL LİSTESİ	viii
ÖZET.....	x
SUMMARY	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. OKSİDATİF GERİLİM, ANTİOKSİDANLAR VE PRO- OKSİDANLAR.....	3
2.2. ENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR.....	9
2.2.1. Süperoksit dismutaz (SOD).....	9
2.2.2. Katalaz	9
2.2.3. Glutasyon peroksidaz (GPx)	10
2.2.4. Glutasyon redüktaz (GR)	10
2.2.5. Glutasyon-S-transferaz (GST)	10
2.3. ENZİMATİK OLMAYAN ANTİOKSİDANLAR.....	10
2.3.1. Sentetik Antioksidanlar	10
2.3.2. Doğal Antioksidanlar	11
2.3.2.1. C Vitamini	11
2.3.2.2. E Vitaminleri (tokoferoller).....	13
2.3.2.3. Karotenoidler	14
2.3.2.4. Polifenolik Bileşikler	15
2.4. POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİ.....	21

2.5. POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN PRO-OKSİDAN AKTİVİTELERİ	24
2.6. PROTEİN OKSİDASYONU	26
2.7. PRO-OKSİDAN AKTİVİTE TAYİN YÖNTEMLERİ.....	30
2.7.1. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler (TBARS) Yöntemi	30
2.7.2. ORAC (Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi) Yöntemi	31
2.7.3. Etidiyum Bromür (EB) Yöntemi	32
2.7.4. Batokuproin Disülfonat (BCS) Yöntemi.....	33
2.7.5. Krosin (CBA) Yöntemi	33
2.7.6. Luminol Yöntemi	34
2.7.7. AAPH Esaslı Yöntem.....	35
2.7.8. HPLC Yöntemi.....	35
2.7.9. Pirogallol Yöntemi	36
2.7.10. Karbonil Tayini Yöntemi.....	37
3. MALZEME VE YÖNTEM	38
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR	38
3.2. KİMYASAL MADDELER	38
3.3. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI.....	39
3.4. UYGULANAN YÖNTEMLER.....	39
3.4.1. Modifiye CUPRAC Yöntemi.....	39
3.4.2. AAS Yöntemi	41
3.4.3. Karbonil Tayini Yöntemi	42
3.4.4. Sentetik Karışımların Pro-oksidan Aktivitelerinin Tayini	43
3.4.5. Bitki Örneklerine Rozmarinik Asid (ROS) ve Kafeik Asid (CFA) Standart Katkısı Yapılması.....	43
4. BULGULAR	44
4.1. OPTİMUM DENEY KOŞULLARININ BELİRLENMESİ	44
4.1.1. Sıcaklık Çalışması	44
4.1.2. Zaman Çalışması.....	44
4.2. POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN PRO-OKSİDAN AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ.....	47

4.2.1. Polifenolik Bileşiklerin Modifiye CUPRAC, AAS ve Karbonil Tayini Yöntemlerine Göre Molar Absorplama Katsayıları, Lineer Çalışma Aralıkları ve Korelasyon Katsayılarının Belirlenmesi	47
4.2.2. Polifenolik Bileşiklerin Modifiye CUPRAC, AAS ve Karbonil Tayini Yöntemlerine Göre TPA (Toplam Pro-oksidan Aktivite) Değerlerinin Belirlenmesi.....	51
4.2.3. Polifenolik Bileşiklerin İkili Sentetik Karışımlarının Beklenen ve Deneysel Olarak Ölçülen Pro-oksidan Aktiviteleri.....	64
4.2.4. Bitki Örneklerine Rozmarinik Asid ve Kafeik Asid Standart Katkıları Yapılması.....	67
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	68
KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ.....	88

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	: Serbest radikaller ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin reaktif türler lehine bozulmuş olması (oksidatif gerilim)	4
Şekil 2.2	: Kateşinlerde bulunan gallat halkasındaki eşleşmemiş elektronun rezonans kararlılığı	7
Şekil 2.3	: Sentetik antioksidanların kimyasal yapıları	11
Şekil 2.4	: C- vitamininin molekül yapısı	12
Şekil 2.5	: Askorbik asidin pro-oksidan aktivitesi [7]	12
Şekil 2.6	: α -tokoferolün molekül yapısı	13
Şekil 2.7	: α -tokoferolün pro-oksidan aktivitesi [7]	14
Şekil 2.8	: β -karotenin yapısı	15
Şekil 2.9	: Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı	16
Şekil 2.10	: Flavonların temel kimyasal yapısı	17
Şekil 2.11	: Flavonollerin temel kimyasal yapısı	17
Şekil 2.12	: Flavanonların temel kimyasal yapısı	17
Şekil 2.13	: İzoflavonların temel kimyasal yapısı	18
Şekil 2.14	: Flavanollerin temel kimyasal yapısı	18
Şekil 2.15	: Antosiyanidinlerin temel kimyasal yapısı	18
Şekil 2.16	: Fenolik asitlerin kimyasal yapıları	19
Şekil 2.17	: Fenolik polimerlerin yapısı	20
Şekil 2.18	: Tanenlerin kimyasal yapısı	20
Şekil 2.19	: Flavonoidlerin klasik antioksidan kapasitelerini belirlemede önemli olan özellikleri gösteren kimyasal yapı	22
Şekil 2.20	: Metal iyonlarıyla flavonoidler arasındaki kompleks oluşumu (B halkasındaki 3'-4'-o-difenolik grup (a), C halkasındaki 4-keto, 3-hidroksi (b) veya A ve C halkaları arasındaki 4-keto, 5-hidroksi (c) pozisyonlarından gerçekleşir)	23
Şekil 2.21	: Bitkisel fenoliklerin antioksidan ve prooksidan karakterlerinin dengesini gösteren Yin-Yang sembolü	26
Şekil 2.22	: Protein ve peptidlerde C-3 alkoksil radikallerinin oluşum mekanizması ve onların α -karbon radikalleri vermek üzere β yarılmaları ile açığa çıkan karbonil bileşikleri	27
Şekil 2.23	: Otooksidasyon sırasında, kateşol tipi polifenollerin oksidatif deaminasyonunun mekanizması	29
Şekil 2.24	: Eğri altında kalan net alan (AUC) tekniği yoluyla ORAC aktivitesinin gösterilmesi	31
Şekil 4.1	: Kuersetin bileşiği kullanılarak yapılan sıcaklık çalışması	44
Şekil 4.2	: Kuersetin bileşiği kullanılarak yapılan zaman çalışması	45
Şekil 4.3	: Gallik asid bileşiği kullanılarak yapılan zaman çalışması	46
Şekil 4.4	: İlgili polifenolik bileşiklerin 10^{-3} M konsantrasyonda Modifiye CUPRAC, AAS ve Karbonil Tayini yöntemlerine göre TPA değerleri	53

Şekil 4.5	: İlgili polifenolik bileşiklerin $5 \cdot 10^{-4}$ M konsantrasyonda Modifiye CUPRAC, AAS ve Karbonil Tayini yöntemlerine göre TPA değerleri	55
Şekil 4.6	: İlgili polifenolik bileşiklerin 10^{-4} M konsantrasyonda Modifiye CUPRAC, AAS ve Karbonil Tayini yöntemlerine göre TPA değerleri	57
Şekil 4.7	: İlgili polifenolik bileşiklerin 10^{-5} M konsantrasyonda Modifiye CUPRAC, AAS ve Karbonil Tayini yöntemlerine göre TPA değerleri	59
Şekil 4.8	: İlgili polifenolik bileşiklerin Modifiye CUPRAC, AAS ve Karbonil Tayini yöntemlerine göre QREPA katsayıları	61
Şekil 4.9	: Polifenolik bileşiklerin QREPA katsayılarının Modifiye CUPRAC ile AAS yöntemleri korelasyonu	62
Şekil 4.10	: Polifenolik bileşiklerin QREPA katsayılarının Modifiye CUPRAC ile Karbonil Tayini yöntemleri korelasyonu	63
Şekil 5.1	: <i>p</i> -kumarik asid, kafeik asid ve gallik asid bileşiklerinin molekül yapıları	71
Şekil 5.2	: Kateşin, epikateşin ve epigallokateşin gallat bileşiklerinin molekül yapıları	72

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1	: Reaktif türler [29,30]	4
Tablo 2.2	: Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar	9
Tablo 4.1	: Mutlak EtOH çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin Modifiye CUPRAC yöntemi verileri	48
Tablo 4.2	: Mutlak EtOH çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin AAS yöntemi verileri	49
Tablo 4.3	: Mutlak EtOH çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin Karbonil Tayini yöntemi verileri	50
Tablo 4.4	: İlgili polifenolik bileşiklerin 10^{-3} M konsantrasyonda TPA değerleri ...	52
Tablo 4.5	: İlgili polifenolik bileşiklerin $5 \cdot 10^{-4}$ M konsantrasyonda TPA değerleri	54
Tablo 4.6	: İlgili polifenolik bileşiklerin 10^{-4} M konsantrasyonda TPA değerleri ...	56
Tablo 4.7	: İlgili polifenolik bileşiklerin 10^{-5} M konsantrasyonda TPA değerleri ...	58
Tablo 4.8	: İlgili polifenolik bileşiklerin QREPA (Kuersetin Eşdeğeri Pro-oksidan Aktivite) katsayıları	60
Tablo 4.9	: İlgili polifenolik bileşiklerin ikili sentetik karışımlarının TPA değerleri	65
Tablo 4.10	: İkili sentetik karışımların ölçülen ve beklenen TPA değerleri arasındaki lineer doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları.....	66
Tablo 4.11	: İkili sentetik karışımların TPA değerleri kullanılarak Modifiye CUPRAC yönteminin ayrı ayrı AAS ve Karbonil Tayini yöntemleriyle karşılaştırılması sonucu elde edilen lineer doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları.....	66
Tablo 4.12	: Bitki örneklerine Modifiye CUPRAC yöntemi uygulanması sonucunda ölçülen ve beklenen pro-oksidan aktivite değerleri	67
	a: Adaçayı örneğinin tek başına Modifiye CUPRAC yöntemine göre pro-oksidan aktivitesi	67
	b: Rozmarinik asid örneğinin tek başına Modifiye CUPRAC yöntemine göre pro-oksidan aktivitesi	67
	c: Kafeik asid örneğinin tek başına Modifiye CUPRAC yöntemine göre pro-oksidan aktivitesi	67
	d: Yeşil çay örneğinin tek başına Modifiye CUPRAC yöntemine göre pro-oksidan aktivitesi	67
	e: Mercanköşk örneğinin tek başına Modifiye CUPRAC yöntemine göre pro-oksidan aktivitesi	67
	f: Nane örneğinin tek başına Modifiye CUPRAC yöntemine göre pro-oksidan aktivitesi	67

SEMBOL LİSTESİ

CUPRAC	: bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite
Cu(II)-Nc	: bakır(II)-neokuproin
Cu(I)-Nc	: bakır(I)-neokuproin
DNPH	: dinitrofenilhidrazin
DNP	: dinitrofenilhidrazon
TCA	: trikloroasetik asid
SDS	: sodyumdodesil sülfat
HPLC	: yüksek performanslı sıvı kromatografisi
AOx	: antioksidan
ROS	: reaktif oksijen türleri
RNS	: reaktif azot türleri
TEAC	: troloks esdegeri antioksidan kapasite
TAC	: toplam antioksidan kapasite
QREPA	: kuersetin eşdeğeri pro-oksidan aktivite
TPA	: toplam pro-oksidan aktivite
ORAC	: oksijen radikal absorban kapasitesi
ABTS⁺	: ABTS radikal katyonu
TRAP	: toplam radikal tutma parametresi
AAPH	: azobis (2-amido propan)dihidroklorür
DPPH	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
FRAP	: demir(III) iyonu indirgeyici antioksidan gücü
TBARS	: tiyobarbitürik asit reaktif maddeler
TBA	: tiyobarbitürik asit
MDA	: malondialdehit
BCS	: batokuproin disülfonat
BPS	: batofenantrolin disülfonat
EB	: etidiyum bromür
LDL	: düşük yoğunluklu lipoprotein
DNA	: deoksiribonükleik asid
HAT	: hidrojen atomu transferi
SET	: tek elektron transferi
IP	: iyonizasyon potansiyeli
SOD	: süperoksid dismutaz
GPx	: glutatyon peroksidaz
CAT	: katalaz
GR	: glutatyon redüktaz
BHA	: butillenmiş hidroksianizol
BHT	: butillenmiş hidroksitoluen
TBHQ	: tersiyer butilhidrokinon
NDGA	: nordihidroguareyetik asit

PE	: fikoeritrin
AUC	: eğri altında kalan alan
GA	: gallik asid
ROS	: rozmarinik asid
CFA	: kafeik asid
<i>p</i>-COU	: para kumarik asid
CT	: kateşin
EC	: epikateşin
EGCG	: epigallokateşingallat
QR	: kuersetin
NG	: naringin
AA	: askorbik asid
Vit E	: E vitamini
TR	: troloks

ÖZET

POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN PRO-OKSİDAN AKTİVİTELERİNİN ÖLÇÜMÜ İÇİN YENİ BİR SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

Organizmadaki antioksidan ve pro-oksidan dengenin bozulması olarak tanımlanan oksidatif stres koşulları altında oluşan reaktif türlerin birikimi canlı hücrelerde biyolojik makromoleküllerde onarılamayan hasarlara sebep olurlar. Polifenoller, C ve E vitaminleri meyve ve sebzelerde bulunan doğal antioksidanlardır. Ancak göreceli yüksek derişimde bulunmaları halinde veya bazı özel koşullar altında pro-oksidan aktivite gösterebilmektedirler. Bu nedenle antioksidan aktiviteye sahip bileşiklerin pro-oksidan aktivitelerini tayin edebilecek basit, kullanışlı, hızlı, değişik ortamlara uygulanabilen, duyarlı yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Mevcut pro-oksidan aktivite tayin yöntemleri değerlendirildiğinde bu aktivitenin nesnel bir tanımına dayalı somut bir yöntem bulunmadığı gibi aynı zamanda hem protein hem de polifenolik bileşik içeren sistemlerde pro-oksidan aktivite tayin edilmemiştir. Bu eksiklikten yola çıkılarak tiyol grubu içeren protein ortamında polifenolik bileşiklerin, C ve E vitaminlerinin ve antioksidan karakterli bileşikleri içerebilen bitki örneklerinin geçiş metal iyonu (Cu(II))–katalizli pro-oksidan aktivitelerinin tayin edilebilmesi için Modifiye CUPRAC (Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite) yöntemi geliştirilmiştir. Pro-oksidan aktivite, antioksidan bileşiklerin geçiş metal iyonlarını, Fenton-tipi reaksiyonlarla reaktif türler oluşumuna yol açabilen alçak oksidasyon basamaklarına indirgeme aktivitesi olarak tanımlanmıştır. Bu tez çalışması kapsamında, Modifiye CUPRAC yönteminin yumurta akı proteinleri ortamında polifenolik bileşiklere uygulanarak bu bileşiklerin pro-oksidan aktivitelerinin belirlenmesi ve bulunan bu değerlerin referans yöntemlerle elde edilen değerlerle karşılaştırılarak doğruluğunun ispatlanması amaçlanmaktadır.

Geliştirilen yöntemin prensibi; polifenolik bileşikler tarafından ortamdaki serbest bakır(II) iyonlarının bakır(I)'e indirgenerek proteine bağlanması ve inkübasyon ürününe neokuproin (Nc)-amonyum asetat (NH₄Ac) karışımı ilave edilerek Cu(I)-Nc kelatının oluşturulmasıdır. Oluşan Cu(I)-Nc kelatının 450 nm'de maksimum absorpsiyon yapmasından faydalanılarak polifenolik bileşiklerin pro-oksidan aktiviteleri tayin edilmiştir. Bu çalışmada karşılaştırma için referans yöntemler olarak atomik absorpsiyon spektrometrisi (AAS) ve literatürde mevcut olan protein karbonili tayin yöntemi kullanılmıştır. AAS yöntemi, inkübasyon ürününe CUPRAC reaktifi yerine protein çözücü tamponu ilave edilerek oluşturulan çözeltide AAS ile bakır tayini yapılması esasına dayanır. Karbonil tayini ise protein oksidasyonu sonucunda açığa çıkan karbonil gruplarının 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile oluşturdukları dinitrofenilhidrazonların (DNP) absorbans değerlerinin 370 nm'de ölçülmesi esasına dayanır.

Bu bağlamda Modifiye CUPRAC yöntemi ve referans yöntemler uygulanarak her bir polifenolik bileşimin pro-oksidan aktiviteleri belirlenmiş ve QREPA (Kuersetin Eşdeğeri Pro-oksidan Aktivite) katsayıları bulunmuştur. Antioksidan bileşiklerin QREPA_{Modifiye-CUPRAC} katsayılarına göre pro-oksidan aktivite sırası: gallik asid > epikateşin > kateşin > α -tokoferol > rozmarinik asid > troloks > kafeik asid > askorbik asid şeklindedir. İkili sentetik karışım çözeltileri hazırlanarak bu sentetik karışımların beklenen ve ölçülen pro-oksidan aktiviteleri mM kuersetin (QR) eşdeğeri cinsinden hesaplanıp birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Bu değerler incelendiğinde, genel olarak 5×10^{-4} - 10^{-4} M'lık karışım çözeltilerinin ölçülen ve beklenen pro-oksidan aktivitelerinin daha uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Modifiye CUPRAC yöntemiyle elde edilen sonuçlar her aşamada AAS ve karbonil tayini yöntemlerinininkilerle karşılaştırılmıştır.

SUMMARY

DEVELOPMENT OF A NEW SPECTROPHOTOMETRIC METHOD TO DETERMINE PRO-OXIDANT ACTIVITIES OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS

Oxidative stress is defined as an imbalance of pro-oxidants and antioxidants in the organism, and cause accumulation of reactive species which induce irreversible damage on biological macromolecules. Polyphenols, vitamin C and E are natural antioxidants existing in fruits and vegetables. However, at relatively high concentrations or under specific conditions, they may show pro-oxidant activities. For this reason, simple, practical, rapid, versatile and sensitive methods are required to to determine the pro-oxidant activity of compounds having antioxidant activity. When existing methods of pro-oxidant activity determination are evaluated, there is no substantial method based on an objective definition of such activity, and at the same time, pro-oxidant activity has not been determined in systems including both protein and polyphenolic compounds. To fill in this literature gap, Modified CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity) method was developed to determine transition metal ion (Cu(II))–catalyzed pro-oxidant activity of the polyphenolic compounds, C and E vitamins and herbal samples including antioxidant compounds in the presence of proteins containing thiol groups. Pro-oxidant activity is defined as the transition metal ion reducing ability of antioxidant compounds to their lower oxidation states which may produce reactive species via Fenton-type reactions. Within the scope of this thesis work, it was aimed to determine the pro-oxidant activities of polyphenolic compounds through application of the Modified CUPRAC method to these compounds in the presence of egg white proteins, and to validate the proposed methodology by comparison of the results obtained with those of reference methods.

The basic principle of the developed method involves the reduction of copper (II) ions to copper(I) by polyphenolic compounds, binding of Cu(I) to protein thiol groups, and formation of copper(I)-neocuproine (Cu(I)-Nc) chelate by treating the incubation product with a neocuproine (Nc)-ammonium acetate (NH₄Ac) mixture. The pro-oxidant activities of polyphenolic compounds were determined by measuring the 450-nm absorbance of the Cu(I)-Nc chelate formed. In this study, atomic absorption spectrometry (AAS) and protein carbonyl assay (existing in literature) were used as reference methods of comparison. AAS method is based on adding protein dissolution buffer to incubation product instead of CUPRAC reagents and determining copper in solution by AAS. Carbonyl assay is based on the measurement of the absorbance values at 370 nm of dinitrophenylhydrazones (DNP) formed from 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) and the carbonyl groups emerging from protein oxidation.

By applying Modified CUPRAC and reference methods, the pro-oxidant activities were determined for each polyphenolic compound and their QREPA (Quercetin Equivalent Pro-oxidant Activity) coefficients were found. The order of pro-oxidant activities of antioxidant compounds in terms of QREPA_{Modified-CUPRAC} coefficients was: gallic acid > epicatechin > catechin > α -tocopherol > rosmarinic acid > trolox > caffeic acid > ascorbic acid. Synthetic mixtures were prepared, and their pro-oxidant activities experimentally measured as mM quercetin (QR) equivalents and compared with those theoretically found. When these values are investigated, generally, it was noted that the experimental and theoretical values of mixtures at $5 \cdot 10^{-4}$ - 10^{-4} M concentrations were more compatible. The Modified CUPRAC values were compared at every stage with those of AAS and carbonyl assay.

1. GİRİŞ

Organizmada oksidatif gerilim; antioksidanlar ve pro-oksidanların dengelenememesi durumunda ortaya çıkan bir durum olup, biyolojik makromoleküllerin oksidatif hasarına yol açarak başta kanser olmak üzere koroner kalp rahatsızlığı, diyabet, hipertansiyon, hücrel yıpranma ve yaşlanma, mutajenizm, bağışıklık sistemi rahatsızlıkları gibi çeşitli hastalıklara neden olmaktadır [1]. Oksidatif gerilim koşulları altında oluşan reaktif türlerin birikimi canlı hücrelerde lipidler, proteinler, karbonhidratlar, enzimler ve nükleik asitler gibi biyolojik makromoleküllerde onarılamayan hasarlara sebep olurlar [2-5]. İnsan vücudu, fizyolojik koşullarda meydana gelen reaktif oksijen (ROS) ve reaktif azot (RNS) türlerini inaktive etmek için antioksidan savunma mekanizmaları geliştirmiştir [5,6].

Polifenoller, C ve E vitaminleri meyve ve sebzelerde bulunan doğal antioksidanlardır. Bu bileşiklerin sağlığa yararlı etkileri antioksidan özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Ancak fazla miktarlarda bulunmaları veya bazı koşullar altında pro-oksidan aktiviteleri sebebiyle toksik etki gösterebilmektedirler [7]. Örneğin yüksek dozda α - tokoferolün insanlarda lipid peroksidasyonu seviyesinin düşürülmesinde zayıf etki gösterdiği söylenmektedir [8]. Askorbik asid ise serbest demir iyonlarıyla etkileşerek askorbat radikalini oluşturur. Oluşan bu radikalın, biyomoleküllerde oksidatif hasara neden olduğu bilinmektedir [9,10].

Fenolik bileşiklerin metal katalizli yükseltgenmesinin sonucunda reaktif oksijen türlerinin oluşmasının dışında farklı türler de meydana gelmektedir. Bunlar serbest tiyol içeren bileşiklerle etkileşebilen, yüksek elektrofilik türler olan, semikinon radikalleri ve nihayetinde kinonlardır [11,12]. Bunun dışında kateşol ve galloil yükseltgenmesi, metal indirgenmesi ile eş zamanlı gerçekleşen reaksiyonlardır (Örneğin; $Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$). Geçiş metallerinin indirgenmiş formlarının, lipid hidroperoksid ile hidrojen peroksidin sırasıyla lipid alkoksil ($LO\cdot$) ve hidroksil ($\cdot OH$) radikallerine bozunmasını katalizledikleri bilinmektedir. Bu sonuçlar *in vitro* ve *in vivo* olarak yapılan

çalışmalarda, geçiş metallerinin polifenolik bileşiklerin pro-oksidan aktiviteleri konusunda etkin rolü olduğunu göstermektedir.

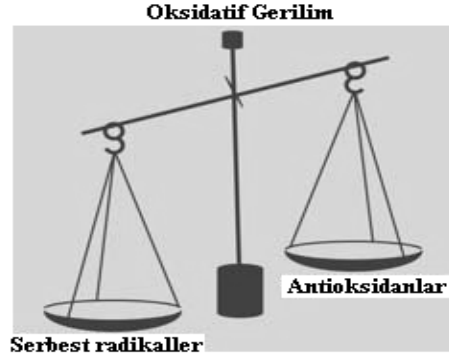
Literatürde mevcut pro-oksidan aktivite ölçümünde spektrofotometrik olarak lipid peroksidasyonu için TBARS (tiyobarbitürük asit reaktif maddeler) yöntemi [13], protein oksidasyonu için karbonil tayini [14] ve batokuproin disülfonat (BCS) [15] yöntemleri, süperoksit anyon radikali süpürme için pirogallol yöntemi [16], spektroflorometrik olarak peroksil radikali süpürme için ORAC [17,18], krosin [19], luminol [20] ve etidiyum bromür (EB) [21] yöntemleri kullanılmaktadır. Sağlık açısından yararlı bileşikler olduğu bilinen polifenolik bileşiklerin bazı koşullar altında pro-oksidan etki gösterebilmeleri nedeniyle pro-oksidan aktivitelerini tayin edebilecek kullanışlı, hızlı, duyarlı ve basit yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Mevcut pro-oksidan aktivite tayin yöntemlerinin çoğunda ya protein kullanılmadan polifenolik bileşiklerin metal katalizli gerçekleşen çeşitli oksidasyon mekanizmaları incelenmiş ya da polifenolik bileşikler kullanılmadan yine metal katalizli protein oksidasyonu ölçülmüştür. Aynı anda hem polifenolik bileşikler hem de protein içeren sistemlerde pro-oksidan aktivite ölçülmemiştir. Bu eksiklikten yola çıkılarak tiyol grubu içeren protein ortamında polifenolik bileşiklerin (gallik asid, rozmarinik asid, kafeik asid, kumarik asid, kateşin, epikateşin, epigallokateşin gallat, kuersetin, naringin, askorbik asid, α -tokoferol, troloks), C ve E vitaminlerinin ve antioksidan karakterli bileşikleri içerebilen gerçek örneklerin (ada ayı, yeşil çay, mercanköşk, nane) metal katalizli (Cu^{2+}) pro-oksidan aktivitelerinin tayin edilebilmesi için spektrofotometrik CUPRAC (Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Tayini) yöntemi esaslı Modifiye CUPRAC yöntemi geliştirilmiştir. Modifiye CUPRAC yöntemiyle bulunan sonuçlar atomik absorpsiyon spektroskopisi (AAS) yöntemi ve referans yöntem olan Karbonil Tayini yöntemi sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. OKSİDATİF GERİLİM, ANTIOKSİDANLAR VE PRO-OKSİDANLAR

Oksidasyon ya da yükseltgenme, elektronların bir atom ya da molekülden ayrılmasını sağlayan kimyasal tepkimedir. Bir elementin kimyasal reaksiyonda elektron alması olayına indirgenme denir. İndirgenme olayına redüksiyon, yükseltgenme olayına oksidasyon denir [22]. Reaksiyonda elektron vererek yükseltgenen element karşısındakini indirgediği için indirgen, elektron alarak indirgenen element karşısındakini yükselttiği için yükseltgen olarak tanımlanır. Serbest radikaller, atomik veya moleküler orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulunduran moleküller olarak ifade edilirler [9]. Bu eşleşmemiş elektronlar genellikle serbest radikallerin reaktivitesinin göstergesidir. Oksijen türevi radikaller, canlı organizmalarda bulunan radikaller arasında en önemli radikal sınıfını oluştururlar [23,24].

Oksijen canlılar için hayati önemi olan bir moleküldür ve hücrede enerji üretim süreçlerinde kullanılır. Canlı organizmalarda normal hücrel metabolizma esnasında oluşan reaktif oksijen türleri ve serbest radikaller; sigara, hava kirliliği ve ultraviyole ışığa maruz kalma gibi çeşitli dış etkenler aracılığıyla da meydana gelebilmektedir. Biyolojik serbet radikaller oldukça kararsız ve aynı zamanda reaktif moleküller olup, elektronları hücredeki diğer moleküllerle etkileşime girerek oksidatif stres meydana getirirler. Organizmadaki antioksidan ve pro-oksidan dengenin bozulması olarak tanımlanan (Şekil 2.1) [25] oksidatif stres koşulları altında, Alzheimer ve Parkinson gibi çeşitli hastalıkların oluşumunu tetikleyen ROS türleri oluşur [26].



Şekil 2.1: Serbest radikaller ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin reaktif türler lehine bozulmuş olması (oksidatif gerilim)

Oksijenli solunum yapan canlı organizmaların normal metabolizma sürecinde oluşan serbest radikaller; hava kirliliği, sigara dumanı, radyasyon, tarım ilaçları, gıda katkı maddeleri gibi çeşitli dış etkenler nedeniyle de meydana gelebilmektedir. Serbest radikalleri de kapsayan reaktif türler; süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($\cdot OH$), alkoksil radikali ($RO\cdot$), peroksil radikali ($ROO\cdot$), singlet oksijen (O_2) gibi reaktif oksijen (ROS), hipokloröz asit (HOCl) gibi reaktif klor ve azot oksit ($NO\cdot$), azot dioksit ($NO_2\cdot$) ve peroksinitrit ($ONOO^-$) gibi reaktif azot (RNS) türleridir (Tablo 2.1). Reaktif türler çeşitli hastalıkların başlangıç ve ilerleme safhalarında önemli rol oynarlar [27].

Tablo 2.1: Reaktif türler [29,30]

RADIKALLER		RADİKAL OLMAYANLAR	
Reaktif Oksijen Türleri (ROS)			
Süperoksit	$O_2^{\cdot-}$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Hidroksil	$\cdot OH$	Hipokloröz asit	HOCl
Peroksil	$ROO\cdot$	Hipobromöz asit	HOBr
Alkoksil	$RO\cdot$	Singlet oksijen	1O_2
Hidroperoksil	$HO_2\cdot$	Ozon	O_3
Reaktif Azot Türleri (ROS)			
Azot oksit	$NO\cdot$	Nitröz asit	HNO_2
Azot dioksit	$NO_2\cdot$	Diazot trioksit	N_2O_3
		Peroksinitrit	$ONOO^-$
		Alkil peroksinitrit	LOONO

Oksidatif hasara karşı iç enzimatik savunmalar tamamen etkili değildir ve bir seri iç ve dış serbest radikal yok edici antioksidanlar ikinci savunma sistemi olarak hareket ederler. Antioksidanlar, okside olabilen bileşikten daha düşük konsantrasyonda, o bileşiğin oksidasyonunu önleyen ya da geciktiren bileşiklerdir. Biyolojik sistemlerdeki antioksidan aktiviteye sahip bileşiklerin bulunması yaşam için önemli, temel bir ihtiyaçtır. Antioksidanlar kompleks bir yapıya sahiptirler ve iki çeşit mekanizmada etki gösterirler. Bunlar, direkt antioksidanlar ve indirekt antioksidanlar olarak tanımlanırlar. Direkt antioksidanlar (glutatyon, fenolik bileşikler, tokoferoller, askorbik asit ve karotenoidler gibi) fizyolojik, biyokimyasal veya hücrel proseslerde yer alarak serbest radikalleri inaktive ederler veya serbet radikaller tarafından başlatılan kimyasal reaksiyonları önlerler [5]. Direkt antioksidanların aynı zamanda pro-oksidan etkilerinin olduğu da deneysel olarak saptanmıştır. Ancak bu reaksiyonların *in vivo* olarak önemli olup olmadığı henüz çok kesin değildir. İndirekt antioksidanlar ise serbest radikal veya redoks reaksiyonlarının engellenmesinde rol oynamazlar. Bunlar hücrenin antioksidan kapasitesini güçlendirirler. Bunun nedeni insan vücudunda bulunan bir grup enzimin (glutatyon transferaz, kinon redüktaz, epoksit hidrolaz) elektrofilik türlerin detoksifikasyonuna neden olmasıdır.

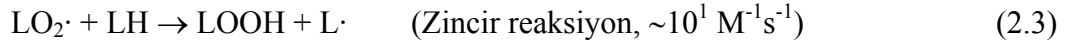
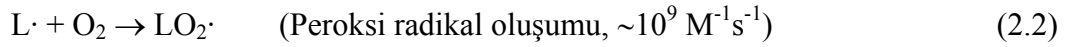
Canlı organizmalar serbest radikallerin etkisinden korunmak için antioksidatif korunma sistemine sahiptirler. Antioksidanlar, yiyeceklerde veya vücutta düşük derişimlerde bulunduğunda bu serbest radikallerin ve reaktif türlerin biyolojik makromoleküllere karşı olumsuz etkilerini önemli derecede engelleyen veya geciktiren maddelerdir [30]. Bir antioksidanın aktivitesi şu esaslara bağlıdır;

- Radikal süpürme yeteneği,
- Hidrojen atomu veya elektron donör aracı olarak göstermiş olduğu reaktivite (redüksiyon potansiyeline bağlı olan),
- Metal kelatlama potansiyeli,
- Diğer antioksidanlarla olan etkileşim [31].

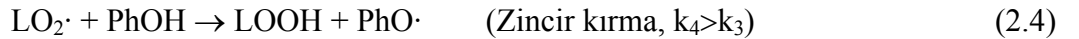
Antioksidanlar; yükseltgenebilen substratlara göre daha düşük konsantrasyonlarda, substratın pro-oksidanlarla başlatılan oksidasyonunu ciddi derecede engelleyen ya da geciktiren maddelerdir. Pro-oksidanlar; biyolojik sistemlerin temel bileşenlerinin (karbonhidratlar, lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi) oksidatif hasarına sebep

olan ve bunun sonucunda çeşitli patolojik olaylara veya hastalıklara yol açan toksik maddeler ya da reaktif türlerdir [17].

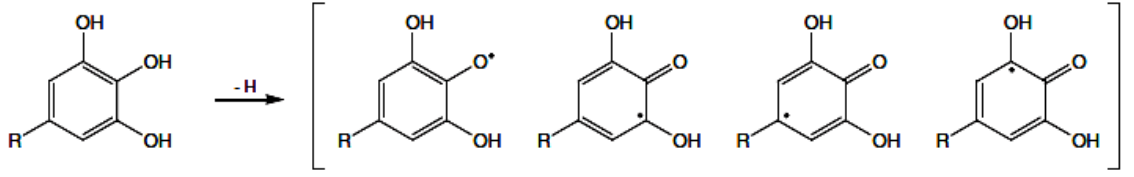
Antioksidan bileşiklerin önleyici rol oynadığı oksidasyon prosesinde iki yol izlenmektedir. Bu yollar temel olarak hidrojen atomu transferi (HAT) ya da tek elektron transferi (SET) reaksiyonlarından kaynaklanmaktadır. Birincisi, aşağıda verilen lipid peroksidasyonda gerçekleşen H-atomu transferidir.



Lipid peroksidasyonu, doymamış yağ asitlerinde alkil radikalinin ($\text{L}\cdot$) oluşumuyla başlayan bir radikal zincir reaksiyonudur (Eşitlik 2.1). Alkil radikali ($\text{L}\cdot$), lipid hidroperoksil radikalini ($\text{LOO}\cdot$) meydana getirmek üzere moleküler oksijenle (O_2) reaksiyona girer (Eşitlik 2.2). Zincir kırıcı antioksidanların olmadığı durumlarda oluşan bu peroksil radikalleri, yükseltgenmemiş lipid substratlardan (LH) hidrojen atomu transfer ederek yeni alkil radikallerinin ($\text{L}\cdot$) oluşmasıyla sonuçlandığından zincir reaksiyonunu çoğaltırlar (Eşitlik 2.3). Eşitlik 2.3'te oluşan lipid hidroperoksitler (LOOH), geçiş metal iyonu katalizli veya Fenton tipi reaksiyonla kararsız alkoksil radikalleri ve sonunda ikincil oksidasyon ürünlerini (malondialdehit gibi) meydana getirirler. Eşitlik 2.3'teki lipid peroksil radikali ile yükseltgenmemiş lipid substrat arasındaki reaksiyon göreceli yavaş ($10^1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) olduğundan fenolik antioksidanlar (PhOH) peroksil radikalleri ile etkileşerek araya girerler ve bu zincir reaksiyonu durdururlar.



Eşitlik 2.4'ün hızı, fenolik bileşiklerin bağ enerjilerine bağlıdır. Hidroksil grubunun O-H bağı daha zayıf olduğundan peroksil radikalleri ile reaksiyon hızlı gerçekleşmektedir [41]. Sonrasında oluşan semikinon radikalleri ($\text{PhO}\cdot$) daha kararlı olduğundan yükseltgenmemiş lipid substratlar ile yavaş etkileşirler. Semikinon radikallerinin kararlılığı, rezonans kararlılığından ileri gelmektedir (Şekil 2.2) [33].



Şekil 2.2: Kateşinlerde bulunan gallat halkasındaki eşleşmemiş elektronun rezonans kararlılığı

Antioksidan bileşikler ikinci olarak elektron transfer reaksiyonları ile serbest radikal süpürücü olarak rol oynarlar. Bu mekanizmada, ilk olarak deprotonasyon ile fenolik katyon radikalleri meydana gelir.



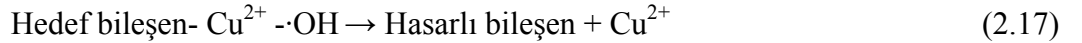
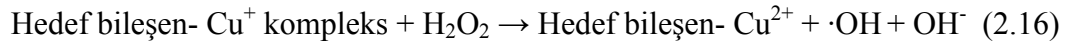
Fenolik antioksidan ve lipid peroksil radikali içeren SET reaksiyonları sonuç itibariyle HAT reaksiyonları ile aynı ürünleri verir (LOOH, PhO• gibi). Ancak hızları hidroksil gruplarının iyonizasyon potansiyeline (IP) bağlı olduğundan çözücünün türüne bağlı reaksiyonlardır. Polifenolik bileşiklerin zincir kırma aktiviteleri hem HAT hem de SET mekanizmasını içermesine rağmen HAT mekanizma ağırlıktadır.

Polifenolik bileşiklerin oksidasyonu pH'nın fonksiyonu olarak artan pH ile artar. Bu bağlamda baz katalizli oksidasyon da otooksidasyon olarak ifade edilmektedir. Otooksidasyonda oksijen fenolat anyonlarıyla daha hızlı reaksiyon vermektedir. Ancak bu reaksiyon termodinamik açıdan uygun iken kinetik açıdan uygun değildir. Nedeni ise elektronların aynı kuantum sayısında, yeni orbitallerde olması gerekmesi ve bunun Pauli prensibinden sapmasıdır [34]. Bununla birlikte geçiş metal iyonları (bakır ve demir gibi) fenolik oksidasyonu başlatır ve bu prosesi katalizlerler. Bu reaksiyon, süperoksit anyon radikalini ($\text{O}_2^{\cdot-}$) veya asidik koşullarda onun protonlanmış formu olan hidroperoksil radikalini ($\text{HO}_2\cdot$) oluşturur (Eşitlik 2.9). Oluşan hidroperoksiller daha sonra hidrojen peroksit indirgenirler (Eşitlik 2.11).





Fenolik bileşiklerin metal katalizli yükseltgenmesinin sonucunda reaktif oksijen türlerinin oluşmasının dışında farklı türler de meydana gelmektedir. Bunlar serbest tiyol içeren bileşiklerle etkileşebilen, yüksek elektrofilik türler olan, semikinon radikalleri ve nihayetinde kinonlardır [35,12]. Bunun dışında kateşol ve galloil yükseltgenmesi, metal indirgenmesi ile eş zamanlı gerçekleşen reaksiyonlardır (Örneğin; $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$). Geçiş metallerinin indirgenmiş formlarının, lipid hidroperoksid ile hidrojen peroksidin sırasıyla lipid alkoksil ($\text{LO}\cdot$) ve hidroksil ($\cdot\text{OH}$) radikallerine bozunmasını katalizledikleri bilinmektedir. Bu sonuçlar *in vitro* ve *in vivo* olarak yapılan çalışmalarda, geçiş metallerinin polifenolik bileşiklerin pro-oksidan aktiviteleri üzerine rolü olduğunu göstermektedir. Pro-oksidanların etki mekanizmaları ise şu şekildedir:



(F-OH: Flavonoid bileşiği, F=O: Yükseltgenmiş flavonoid bileşiği) [17]

Canlı hücreler normal fizyolojik koşullarda, serbest radikal ürünleri ve peroksitler gibi moleküllerin neden olabileceği oksidatif hasara karşı antioksidan savunma sistemleri tarafından korunur. Antioksidan savunma sistemleri enzimatik ve enzimatik olmayan iki kategoride incelenebilir (Tablo 2.2) [36].

Tablo 2.2: Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar

ENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR	ENZİMATİK OLMAYAN ANTİOKSİDANLAR	
	Doğal Antioksidanlar	Sentetik Antioksidanlar
Süperoksit dismutaz (SOD)	C Vitamini	Butillenmiş hidroksianizol (BHA)
Glutasyon peroksidaz (GPx)	E Vitamini	Butillenmiş hidroksitoluen (BHT)
Glutasyon-S-transferaz (GST)	Karotenoidler	Tersiyer butilhidrokinon (TBHQ)
Katalaz (CAT)	Polifenolik bileşikler	Nordihidroguareyetik asit (NDGA)
Glutasyon redüktaz (GR)		Alkil gallat türevleri

Enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), glutasyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) enzimlerini içerir. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise askorbik asit (C vitamini), α -tokoferol (E vitamini), glutasyon (GSH), karotenoidler, flavonoidler ve diğer antioksidanları içerir. Reaktif oksijen türlerini deaktive etmede intraselüler antioksidan enzimler ilk savunma sistemi olarak etki gösterirler. İlk reaksiyon süperoksit dismutaz enzimi tarafından süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit ve oksijene dismutasyonudur. Bunu takiben hidrojen peroksit, katalaz ve glutasyon peroksidaz katalizörlüğünde ortamdan uzaklaştırılır.

2.2. ENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR

2.2.1. Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit anyon radikalini hidrojen peroksit ve moleküler oksijene çeviren reaksiyonu katalizleyen bir metalloenzimdir.



Bu reaksiyon “oksidatif strese karşı ilk savunma” olarak da isimlendirilir.

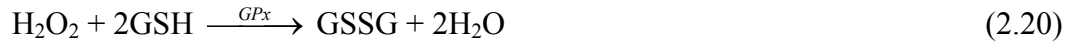
2.2.2. Katalaz (CAT)

Katalaz, peroksidomlarda lokalize ve yapısında 4 “hem” grubu bulunan bir hemoproteindir. Karaciğer ve eritrositlerde en yüksek aktiviteye sahiptir. SOD aracılığı ile oluşan hidrojen peroksit bir radikal olmamasına karşın en reaktif tür olan HO \cdot radikalinin öncüsüdür. Katalaz hidrojen peroksiti su ve oksijene parçalar.



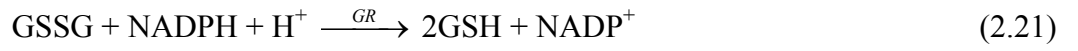
2.2.3. Glutasyon peroksidaz (GPx)

Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksit ve makromoleküllü lipid hidroperoksitlerinin indirgenmesinden sorumludur. GPx, aşırı hidrojen peroksit varlığında glutasyonun (GSH) okside glutatyona (GSSG, glutasyon disülfür) oksidasyonunu katalize ederken, hidrojen peroksiti de suya dönüştürür.



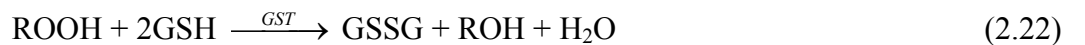
2.2.4. Glutasyon redüktaz (GR)

GPx tarafından H_2O_2 ve diğer lipid peroksitlerin indirgenmesi esnasında glutasyon, okside glutatyona dönüşmektedir. Bu okside halin tekrar redükte glutatyona dönüştürülmesi gereklidir. Çünkü organizmanın glutasyon deposu sınırlıdır. GR, NADPH varlığında glutasyon disülfürü (GSSG) tekrar redükte glutatyona çevirir.



2.2.5. Glutasyon-S-transferaz (GST)

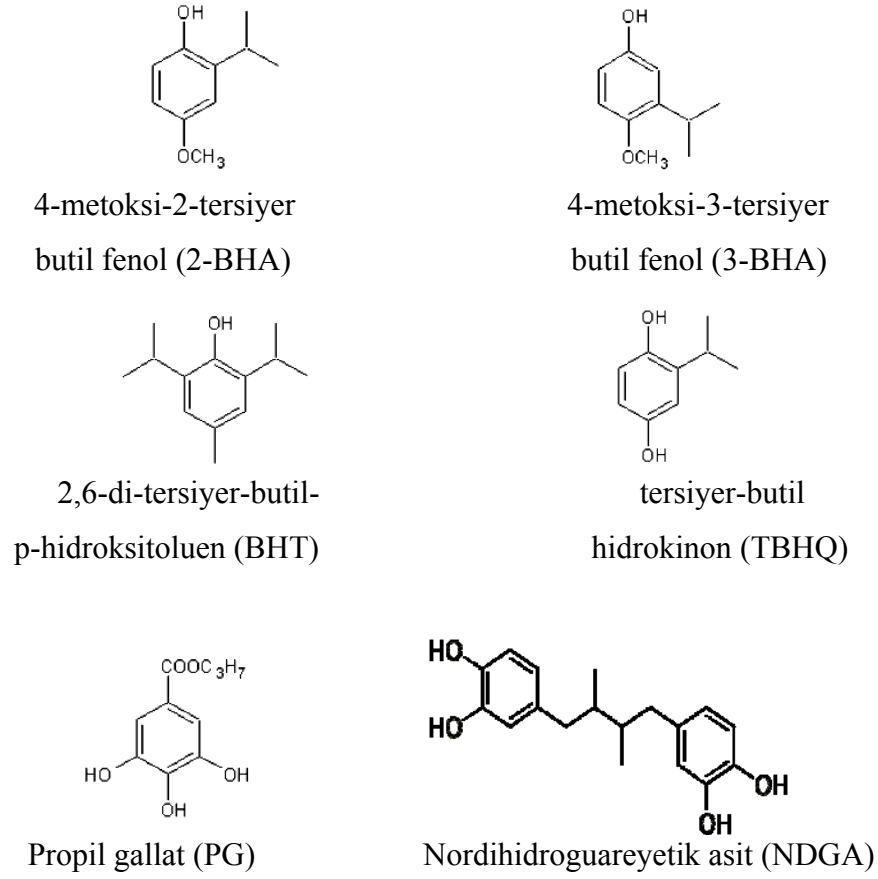
Lipid hidroperoksitlere (ROOH) karşı GST'lar Se-bağımsız glutasyon peroksidaz aktivitesi gösterirler.



2.3. ENZİMATİK OLMAYAN ANTİOKSİDANLAR

2.3.1. Sentetik Antioksidanlar

Besinlerin tat, renk ve vitamin değerlerinin korunması için antioksidan ilavesi gereklidir. Endüstride, sentetik fenolik antioksidanlardan en çok kullanılanları BHA, BHT, TBHQ ve PG'dir (Şekil 2.3). Gıda maddelerine oksidasyonu geciktirmek veya engellemek amacıyla katkı maddesi olarak ilave edilirler.



Şekil 2.3: Sentetik antioksidanların kimyasal yapıları

2.3.2. Doğal Antioksidanlar

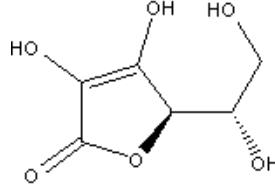
C vitamini, E vitamini, karotenoidler ve polifenoller meyve ve sebzelerde yararlı bileşenler olarak bulunan, doğal antioksidanlardır. Bu bileşiklerin antioksidan özellikleri sağlığa yararlı etkilerinden kaynaklanmaktadır. Ancak fazla miktarlarda bulunmaları veya bazı koşullar altında pro-oksidan aktiviteleri sebebiyle toksik etki gösterebilmektedirler [7]. Fenolik bileşikler genel olarak aşağıdaki gibi sınıflandırılırlar:

- C ve E vitamini
- Karotenoidler
- Polifenolik Bileşikler [37].

2.3.2.1. C Vitamini

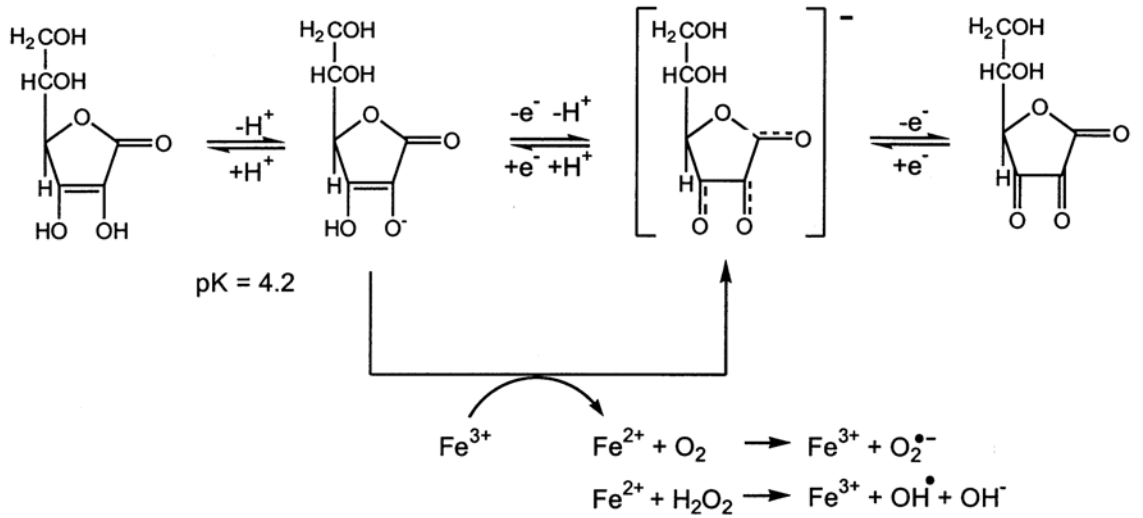
Organizmanın en çok gereksinim duyduğu C-vitamini (Şekil 2.4), diğer adıyla askorbik asid, meyve ve sebzelerde bulunup, suda çözünebilir ve serbest radikalleri doğrudan süpürebilen güçlü bir antioksidan kaynağıdır. Ayrıca çeşitli besin maddelerinde

acılaşma ve ekşimeyi, meyvelerde renk değişimini önler. Doğal kaynaklardan elde edilebildiği gibi kimyasal olarak da sentezlenebilirler [38].



Şekil 2.4: C- vitamininin molekül yapısı

Yaygın olarak askorbik asidin tüketim miktarının artmasıyla yararlı etkisinin de arttığına inanılır. Normal koşullarda antioksidan özelliğinden ötürü oksidatif strese karşı direnç sağlar. Ancak askorbik asidin antioksidan özellikleri iyi bilinmesine rağmen çevreye ve aktif molekül içeren koşullara bağlı olarak pro-oksidan aktivite gösterebilmektedir (Şekil 2.5).

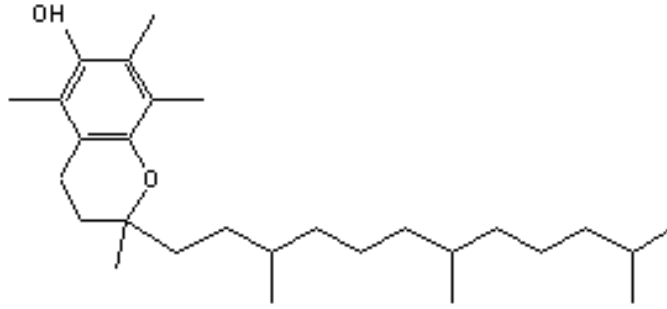


Şekil 2.5: Askorbik asidin pro-oksidan aktivitesi [7]

In vitro koşullarda, askorbat-demir sistemi ile lipid peroksidasyonu, oksidatif stres oluşturduğunu gösteren iyi bir örnektir. Bu model sistemde askorbat'ın Fe^{3+} 'ü indirgemesiyle açığa çıkan Fe^{2+} , oksijen ve hidrojen peroksid ile etkileşime girer ve reaktif türlerden süperoksid anyon radikali ile hidroksil radikali meydana getirir [39]. Askorbik asid ve Fe^{3+} 'ün indirgenme potansiyelleri sırasıyla 0.25 V ve 0.77 V olduğundan askorbat radikali ve Fe^{2+} iyonu oluşumu kolaylıkla gerçekleşmektedir [10].

2.3.2.2. E Vitaminleri (tokoferoller)

Doğada 7 farklı izomer yapısında bulunan tokoferoller, başlıca bitkisel ürünlerde mevcuttur. Hayvan organizması pek az miktarda içerir. Özellikle bitkisel yağlarda, yeşil yapraklı sebzelerde, baklagillerde, ceviz, fındık, süt, yumurtada bulunurlar. Tokoferollerin kimyasal yapıları birbirine benzese de, bunların biyolojik etkileri oldukça farklıdır. 3 metil grubu taşıyan α -tokoferol vitamin olarak en etkili olanıdır ve sadece 'E-vitami' dendiğinde α -tokoferol anlaşılır. β ve γ tokoferoller, α izomerinin yarısı kadar, δ izomeri ise ancak yüzde biri kadar etkilidir. Tokoferoller, monofenolik yapıdaki doğal antioksidanlardır. Antioksidan etkileri vitamin etkilerinin tersine olarak α 'dan γ 'ya doğru artar [40].



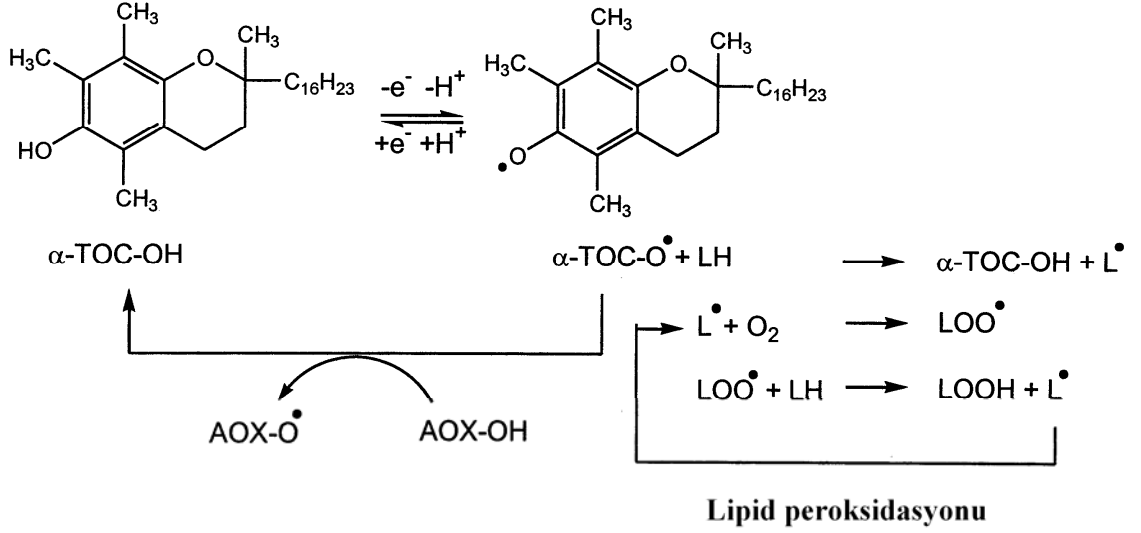
Şekil 2.6: α -tokoferolün molekül yapısı

Lipofilik bir antioksidan olan α -tokoferolün hidrofobik ortamlarda serbest radikal süpürücü olduğu bilinmektedir. Ancak izole LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein) ortamında hem antioksidan hem de pro-oksidan aktivite gösterebilmektedir. Bu bağlamda insan plazmasında, *in vivo* koşullarda bu aktivitelerin nasıl dengelendiği tam olarak bilinmemektedir. Zayıf veya güçlü oksidatif koşullar oluşturularak α -tokoferolün antioksidan/pro-oksidan aktivitesi incelenmiş ve güçlü oksidatif koşullarda antioksidan, zayıf oksidatif koşullarda ise pro-oksidan gibi davrandığı tespit edilmiştir.

Güçlü oksidatif koşullar: Seyreltik plazma ortamında α -tokoferol, yüksek konsantrasyonda Cu^{2+} veya AAPH ile başlatılan oksidasyonu antioksidan aktivite göstererek azaltmaktadır. Bu aktivitesi plazma ortamında askorbattan bağımsızdır.

Zayıf oksidatif koşullar: Seyreltik plazma ortamında α -tokoferol, düşük konsantrasyonda Cu^{2+} veya AAPH ile başlatılan oksidasyonu pro-oksidan aktivite

göstererek artırmaktadır. Ancak ortamda fizyolojik oranda askorbat olduğu durumda antioksidan aktivite göstermektedir [41].

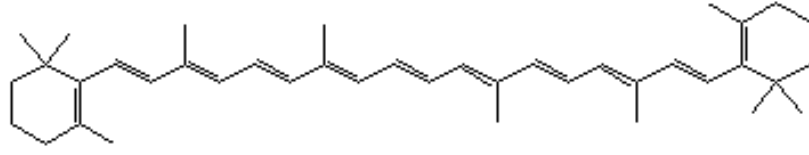


Şekil 2.7: α -tokoferolün pro-oksidan aktivitesi [7]

Tokoferoller antioksidan olarak bilinmelerine rağmen her koşulda koruyucu etki göstermezler [42]. Oksidatif stres koşullarında artan oranlarda α -tokoferol varlığında lipid peroksidasyonunu başlatabilen α -tokoferol radikalleri oluşur. Organizmada antioksidan oranı dengede olduğu durumlarda, diğer antioksidan tarafından α -tokoferol radikalleri tekrar α -tokoferole indirgenir ve pro-oksidan aktivitesi durdurulur [7]. Ancak artan oksidatif stres koşulları altında, artan miktarda α -tokoferol ile meydana gelen α -tokoferol radikalleri daha fazla oluşacaktır ve organizmadaki diğer antioksidanlar bu radikalleri durdurmaya yeterli gelmeyecektir. E vitamini yaygın olarak güneş kremleri ve cilt kozmetiklerinde bulunduğu için kullanımına dikkat edilmelidir. Aşırı kullanımında cilt kanserlerine yol açtığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [43].

2.3.2.3. Karotenoidler

Birçok bitki, alg ve küçük organizmalarda bulunan karotenoidler yağda çözünebilen doğal antioksidanlardır. 600'den fazla karotenoid çeşidinin var olduğu bilinmektedir. Karotenoidlerin çoğunun temel yapısı poliizoprenoidden oluşmaktadır [44]. Yapıda bulunan çifte bağlardan dolayı sarı, turuncu veya kırmızı renkte olmalarının yanı sıra antioksidan aktiviteleri bu çifte bağların sayısına bağlıdır.



Şekil 2.8: β -karotenin yapısı

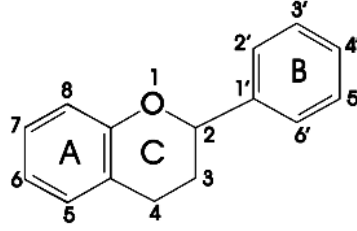
2.3.2.4. Polifenolik Bileşikler

Polifenoller; bitki dünyasının büyük bir kısmında mevcut olan, fitokimyasalların en geniş kategorilerinden birini oluşturan ve insan yaşamında gerekli olan bileşiklerdir. Besin fenolikleri; flavonoidleri, fenolik asitleri ve fenolik polimerleri içerir. En çok fenilpropanoid yolu ile sentez edilen fenolik bileşikler, halkalı yapıdaki fonksiyonel hidroksil gruplarının farklı pozisyonlarda bulunmasına göre karakterize edilirler [47]. Elektrofilik özellikteki bu hidroksil grupları hücre hasarlarına neden olabilen serbest radikallerle etkileşirler [46]. Bitki polifenollerini doğal antioksidanlar olarak bilinmelerine rağmen tek başlarına ya da bakır gibi geçiş metal iyonu varlığında, oksidatif DNA bozunmalarını katalizlerler. Bu bağlamda birçoğu hem antioksidan hem de pro-oksidan aktiviteye sahiptirler [47,48].

Polifenoller güçlü antioksidanlardır ve aktiviteleri kimyasal yapılarına bağlıdır. Bitki polifenollerini multifonksiyonel bileşikler olup, indirgeme aracı, hidrojen atom-donör antioksidanlar ve singlet oksijen söndürücü olarak, bazıları metal iyonu kelatlama özelliklerine sahip antioksidanlar olarak davranırlar [49]. Polifenolik bileşikler, askorbik asid ve karotenoidlerin serbest radikalleri süpürerek antioksidan gibi davrandıkları bilinmektedir. Ancak geçiş metal iyonlarının varlığı gibi bazı deneysel koşullarda, geri dönüşümsüz DNA hasarına neden olarak pro-oksidan aktivite gösterirler [4,17,50-52].

Flavonoidler; önemli antioksidan ve kelatlama özelliğine sahip, düşük molekül ağırlıklı ve en geniş bitki fenolikleri sınıfıdır. Fenolik ve furan halkalarından oluşan benzo- γ -furan türevleridirler [53]. Bitki fenolikleri olan flavonoidler; flavanoller, flavonlar, izoflavonlar, flavonoller ve antosiyanidinler alt sınıflarını içeren difenilpropan

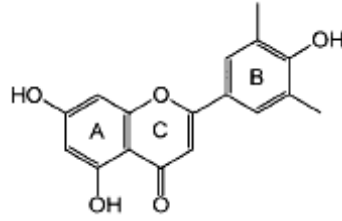
türevleridirler [54]. 6 karbonlu A, B ve C halkalarından oluşan heterosiklik bileşikler, hetero halkanın yükseltgenme derecesine göre farklılaşırlar. Aromatik halkalar A ve B, hetero halka ise C olarak ifade edilir. Karbon atomları C halkasındaki oksijenden başlayarak, B halkasındaki karbon atomları ise üssü (') rakamlarla numaralandırılır (Şekil 2.9).



Şekil 2.9: Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı

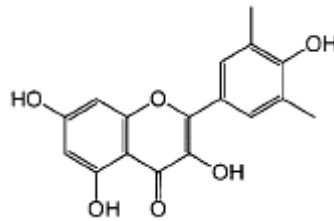
Doğada bitki, meyve ve sebzelerde mevcut, birçoğu yaprak, çiçek ve kökte bulunan 4000'den fazla flavonoid çeşidi mevcuttur [55]. Meyve, sebze, şarap, kakao ve çayda bol miktarda bulunurlar. Antioksidan aktivitelerini belirleyen ve aromatik halkalara bağlı olan birçok fenolik hidroksil grupları içerirler. Metal kelatlama, lipid peroksidasyonunu engelleme, reaktif oksijen türlerini içeren diğer prosesleri azaltma özellikleri vardır. Yiyeceklerde genellikle 3-*orto* glikozidleri ve polimerleri şeklinde bulunurlar. Glikozid birimi genellikle glukozdur ancak glukoramnoz, galaktoz, arabinoz ve ramnoz da bulunabilmektedir. Bu bileşikler yapılarına bağlanan grupların çeşidi, pozisyonu ve sayısına göre farklı radikal süpürme ve kelatlama aktivitesine sahiptirler [54]. Bu bileşikler; A, B ve C halkalarından oluşan halka yapısında çeşitli hidroksil, metoksi ve glikozid yan grupları içerirler. Halkalar arasındaki yapısal değişiklikler flavonoidleri çeşitli sınıflara ayırmaktadır. Bu sınıflardan biri antoksaninler diğeri antosiyaninlerdir. Antoksaninler kendi arasında flavonlar, flavonoller, flavanoller, izoflavonlar ve flavanonlar olmak üzere 5 farklı sınıfa ayrılmaktadır.

Flavonoidler sınıfının temel maddesi 2-*fenil kromon* olan *flavon*'dur (Şekil 2.10) [56]. En önemli flavonlar; rutin, apigenin, krisin ve luteolin'dir. Rutin kuersetinin glikozidi olup kırmızı şarap ve domateste mevcuttur. Apigenin; maydonoz ve kereviz sapında, krisin; meyve kabuğunda, luteolin ise acı biberde bulunmaktadır.



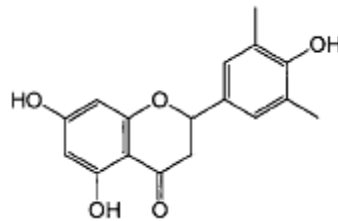
Şekil 2.10: Flavonların temel kimyasal yapısı

Flavonoller (3-hidroksiflavon), flavonun 3. karbon atomuna bağlı bir hidroksil grubu taşırlar. Flavonoidlerin bitkilerde en yaygın olarak bulunan sınıfıdır. En önemli flavonoller kuersetin, mirisetin, fisetin ve kaempferol'dur. Kuersetin flavonoidlerin en önemli bileşiği ve bitkilerin temel fenolik bileşenidir. Soğanda, elmada ve lahanada bol miktarda bulunur.



Şekil 2.11: Flavonollerin temel kimyasal yapısı

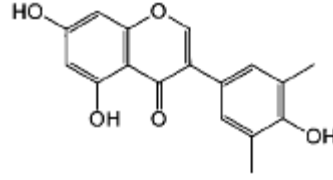
Flavonun dihidroksi türevi *flavanon*'dur. En önemlileri naringenin, naringin, hesperidin ve hesperetin'dir. Naringenin 3-hidroksi flavanon'dur. Greyfurtun karakteristik acılığını veren bileşik naringenin glikozidi olan naringin'dir. Turunçgillerden ekşi portakalda bulunur ve son derece acıdır. Naringenin aglikonu olan naringenin ise acı değildir. Hesperidin ve hesperetin limon ve portakalda bolca bulunur. Hesperidin, hesperetin glikozitidir.



Şekil 2.12: Flavanonların temel kimyasal yapısı

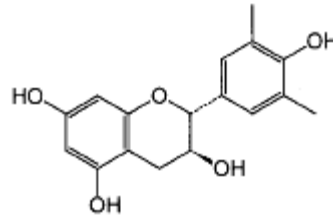
Flavonların izomeri olan *izoflavonlar* ise aromatik B halkasının, C halkasının 3. karbon atomuna bağlanmasıyla oluşur. Genistein, daidzein ve bunların glikozidleri olan

genistin ve daidzin başlıca izoflavonlar olup soya fasulyesi ve soya fıstığında mevcuttur [57].



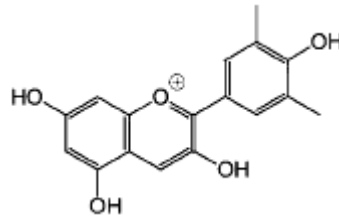
Şekil 2.13: İzoflavonların temel kimyasal yapısı

Flavonollerin C halkasında bulunan çifte bağlı oksijen atomunun yerine $-CH_2$ grubu geldiğinde *flavanol* oluşur. Flavonların indirgenmiş türevleridir. En önemlileri kateşin ve epikateşin'dir. Kateşin ve epikateşinin gallik asitle kombinasyonları sonucu kateşin ve epikateşin gallatlar meydana gelir. Bu bileşikler çoğunlukla yeşil ve siyah çayda, kırmızı ve beyaz şarapta, şeftalide ve elmada bol miktarda bulunurlar [40].



Şekil 2.14: Flavanollerin temel kimyasal yapısı

Antosiyaninler, flavanollerin B aromatik halkasına bir hidroksil grubunun bağlanmasıyla meydana gelir. Aglikonları *antosiyandinler*'dir. Bitkilerde suda çözünebilir pigmentlerin en geniş sınıfını oluştururlar [61]. En önemlileri; apigenidin, siyanidin, malvidin ve delphinidin'dir. Renkli meyvelerde özellikle kırmızı ve mor renkli meyvelerde bol miktarda bulunur [40].

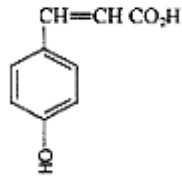


Şekil 2.15: Antosiyanidinlerin temel kimyasal yapısı

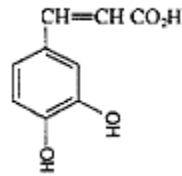
Bitkilerde çok miktarda bulunan fenolik asidler, diğer ismiyle fenil propanoidler, hidroksi sinamik asidler ve hidroksi benzoik asidler içeren iki gruptan oluşur. Fenolik asidlerin çoğunu hidroksi sinamik asidler oluşturur. L-fenil alanin veya L-tirosinden *p-*

kumarik, ferulik, kafeik, sinapik ve klorojenik asidler meydana gelir. Yapılarındaki $-CH=CH-COOH$ gruplarının varlığı, hidrojen verebilme yeteneklerini arttırmakla birlikte benzoik asidlere göre radikalleri daha kararlı hale getirebilirler. Benzoatlardan daha etkilidirler.

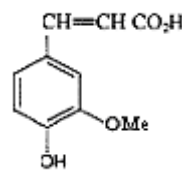
Hidroksi benzoik asidler yapılarındaki hidroksi ve metoksi gruplarının yerleşimi ve sayılarına göre çeşitlenirler. Bunlardan birkaçı; gallik asid, vanilik asid, şiringik asid, resorsilik ve protokateşuik asid'dir. Mono hidroksi benzoatlar etkili hidroksil radikal süpürücülerdir çünkü hidroksillenmeye ve hidroksil radikallere yüksek reaktivite göstermeye eğilimlidirler. Fenolik halka ile karboksilat grubu arasında metilen grubu girmesiyle oluşan fenil asetik asidlerde *orto* ve *meta* hidroksi türevleri 1 mM'a yakın antioksidan aktivite gösterirler. Dihidroksi benzoik asid türevlerinin antioksidan aktiviteleri hidroksil gruplarının pozisyonlarına bağlı olup, *o-p* pozisyonlarında aktivite yüksek olurken, *m-p* pozisyonlarına sahip olanlarda aktivite düşer.



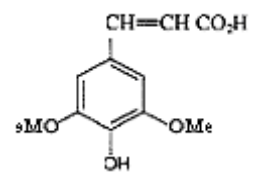
p-kumarik asid



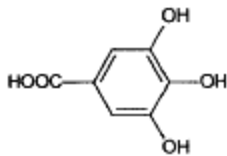
kaffeik asid



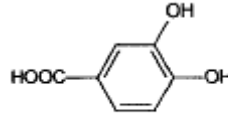
ferulik asid



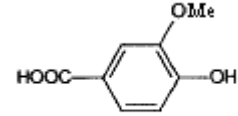
sinapik asid



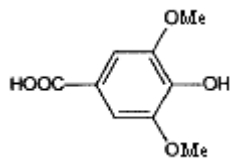
gallik asid



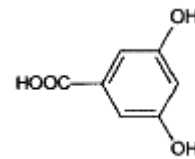
protokateşuik asid



vanilik asid



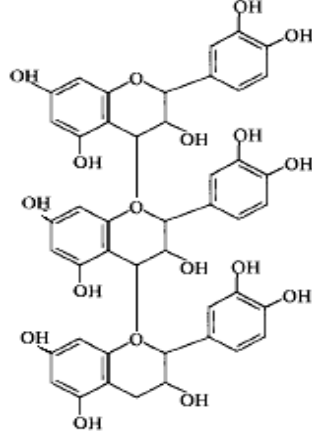
şiringik asid



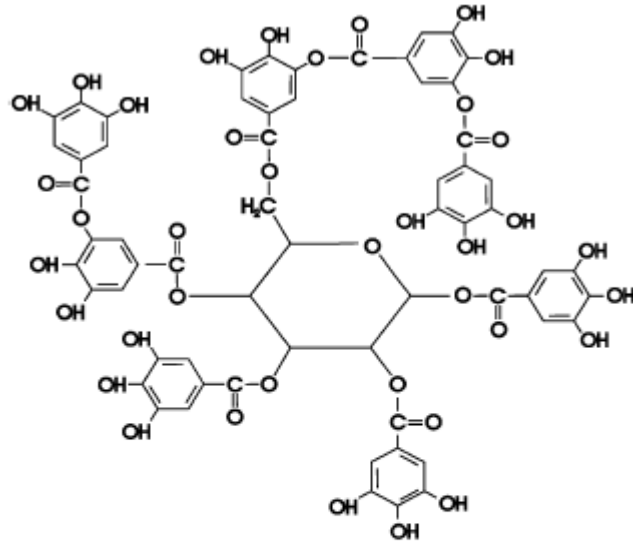
resorsilik asid

Şekil 2.16: Fenolik asidlerin kimyasal yapıları

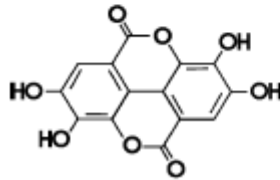
Fenolik polimerler, yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Suda çözünebilir bitki polifenollerini olan tanenler bu gruba girerler. Bugün besin tanenleri denilince genellikle kateşin ve epikateşinin polimerleri anlaşılmalıdır. Koyu renkli ve tadı buruk bileşiklerdir. Kırmızı şarap, beyaz şarap, elma ve nar suyunda mevcuttur [59,60].



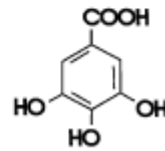
Şekil 2.17: Fenolik polimerlerin yapısı



tannik asid



ellagik asid



gallik asid

Şekil 2.18: Tanenlerin kimyasal yapısı

2.4. POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİ

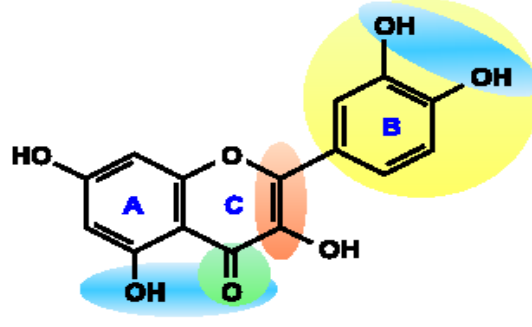
Polifenoller, askorbik asid ve karotenoidler reaktif oksijen, azot ve klorür türlerini süpürücü etkiye sahip olduklarından *in vitro* olarak güçlü antioksidan aktiviteye sahiptirler [61,62]. Fitofenoliklerin yararlı etkilerinin büyük ölçüde antioksidan ve kelatlama özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir [17,63].

Flavonoidlerin ve metabolitlerinin antioksidan aktivitesi halkalı çekirdeksel yapılarındaki fonksiyonel grupların yerleşmesine bağlıdır. Flavonoidlerin yapılarındaki sübstitüentlerin yerleşimi flavan iskeletinin tek başına göstermiş olduğu antioksidan aktivitesinden daha yüksek olabilmektedir. Birçok polifenolik antioksidan birbirleriyle karşılaştırıldığında, hem konfigürasyonun hem de toplam hidroksil gruplarının antioksidan aktivitesini büyük oranda etkilediği görülmüştür [17,64]. Serbest radikal süpürme kapasitesinin hidroksil sübstitüentlerinin yüksek reaktivitesine bağlı olduğu aşağıdaki reaksiyonda görülmektedir:



Flavonoidlerin antioksidan etkileri hidroksillenme derecesine göre artarken, yapıya bağlanan şekere ve cinsine göre de azalır. Flavonoidlerin yapılarına bağlı olarak antioksidan kapasitelerinin farklılaşmasında kapasite değerlerini belirleyen birkaç husus vardır [65]:

- B halkasındaki *o*-dihidroksi yapısı (radikal formun yüksek kararlılığını sağlayan ve elektron delokalizasyonuna katılan)
- 2. ve 3. karbon atomları arasındaki çifte bağ (C halkasında 4. karbon atomunda keto grubu oluşturan ve radikalın B halkasından elektron delokalizasyonunu arttıran)
- C ve A halkalarındaki 3. ve 5. pozisyonadaki hidroksil grupları (maksimum radikal-süpürme potansiyeli için gerekli olan)



Şekil 2.19: Flavonoidlerin klasik antioksidan kapasitelerini belirlemede önemli olan özellikleri gösteren kimyasal yapı

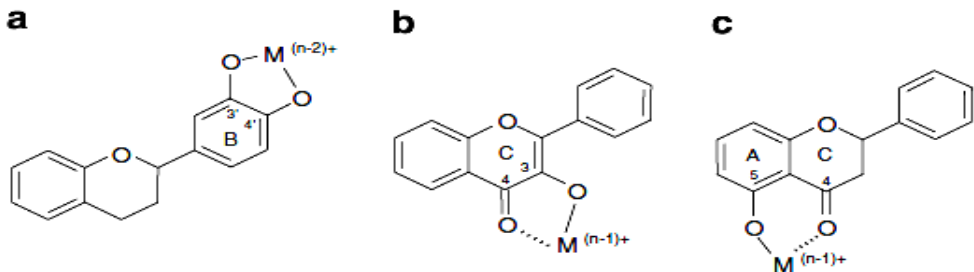
B halkası hidroksil konfigürasyonu; reaktif oksijen (ROS) ve reaktif azot (RNS) türlerinin süpürülmesinde en önemli ögedir. B halkasındaki hidroksil grupları; hidroksil, peroksil ve peroksinitrit radikallerine hidrojen ve elektron vererek onları kararlı hale getirirler [17].

B halkasındaki 3',4'-kateşol yapısı lipid peroksidasyonunu çok kuvvetli şekilde azaltır. Bu yerleşim çoğu antioksidanın en göze çarpan özellikleridir. Örneğin luteolin kaempferol'den daha güçlü antioksidan kapasitesine sahiptir. Her ikisi de benzer hidroksil konfigürasyonuna sahip olmalarına rağmen kaempferol B halkasındaki kateşol yapısından yoksundur. Kateşinin radikal süpürme yeteneği çoğunlukla bu kateşol yapısına sahip olmasından kaynaklanır. Kateşol veya pirogallol sistemlerinden yoksun flavonlar kararsız radikaller oluşturur ve zayıf süpürücülerdir [64].

Flavonoidler tarafından serbest radikallerin süpürülme yeteneği, en çok serbest 3-OH grubunun varlığına bağlıdır. 3-OH ve 3',4' kateşol yapısına sahip olan flavonoidler radikallere karşı daha etkilidirler. Örneğin kuersetin, siyanidin ve kateşinin antioksidan kapasiteleri bu özelliklerinden dolayı yüksektir [53]. Şekil 2.19'de, çok güçlü bir antioksidan olan kuersetinin kimyasal yapısı üzerinde antioksidan kapasitesini belirleyen özellikleri incelediğimizde, bu özelliklerden en önemlisi daha önce belirtildiği gibi sarı renkle gösterilen kateşol veya *orto*-dihidroksillenmiş B halkasıdır. Diğer önemli özellikler; C halkasında kırmızı renkle gösterilmiş olan doymamış yapı, yeşil renkle gösterilen 4-okso fonksiyonunun varlığıdır. Kateşol grubu ve diğer fonksiyonlar (mavi renkli) demir ve bakır gibi transisyon metalleri kelatlama yeteneği sağlar [66].

Kırmızı şaraptaki fenolik bileşiklerin insanlarda bakır iyonu kaynaklı LDL oksidasyonunu E vitamininden daha iyi koruduğu ifade edilmektedir [67]. Kuersetin, gallik asid ve kafeik asid gibi birçok sentetik ve besinsel polifenoller ise hidrojen peroksit kaynaklı sitotoksositeye karşı hücreleri korurlar [68]. Ancak BHA, BHT, dopamin, ferulik asid, kafeik asid, tannik asid vb. fenolik bileşikler ise bakır iyonları varlığında DNA hasarına sebep olmaktadır [69-71]. Bu bağlamda bir sistemde antioksidan olan madde her sistemde antioksidandır denilemez [72]. Fitofenoliklerin antioksidan/pro-oksidan aktiviteleri redoks potansiyeli, metal kelatlama kapasitesi, pH gibi etkenlere bağlıdır [52,72,73].

Bakır, birçok enzim ve protein ile bağlı formları olan, insan organizması için esansiyel bir element olup [74], çeşitli mekanizmalarla indirgenerek oksidatif hasara neden olduğu bilinen, fizyolojik öneme sahip, redoks aktif bir metaldir [75]. İndirgenmiş formu ise Fenton reaksiyonu ile kolaylıkla hidroksil radikallerini üretir [76]. Geçiş metal iyonu kelatlayıcılar, oksidasyonu kompleks oluşturarak veya koordinasyon bileşikleri meydana getirerek önlerler. Bunlar; transferrin, ferritin ve laktalbumin gibi proteinlerdir. Ayrıca polifosfatlar, etilendiamintetraasetik asid (EDTA), sitrik asid, fenolik asidler ve flavonoidler bilinen diğer metal kelatlayıcılarıdır. Flavonoidlerin metal iyonlarıyla yaptıkları kompleksleşme ise 3 şekilde gerçekleşebilir (Şekil 2.20). Bunlar; B halkasında bulunan, *o*-difenolik grup olan 3',4'-dihidroksi pozisyonu (a), C halkasında bulunan 4-keto, 3-hidroksi (b) veya 4-keto, 5-hidroksi (c) yapılarıdır. Bu bağlamda yapıdaki hidroksil grupların glikozidlenmesi metal kelatlama potansiyelini azaltmaktadır [77].



Şekil 2.20: Metal iyonlarıyla flavonoidler arasındaki kompleks oluşumu

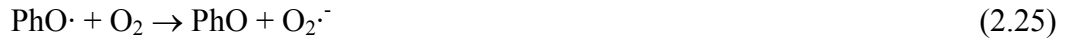
2.5. POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN PRO-OKSİDAN AKTİVİTELERİ

Biyoaktif maddelerin yapılarına ve buldukları deneysel koşullara göre antioksidan/pro-oksidan davranışlarının anlaşılması son derece önemlidir [77]. Birçok bitki polifenollerini hem antioksidan hem de pro-oksidan aktiviteye sahiptirler. Son yapılan çalışmalarda, flavonoidlerin geçiş metal iyonu varlığında pro-oksidan etkiye sahip olduğu kanıtlanmıştır [54,79,80]. Örneğin; kuersetin, mirisetin ve kamferol gibi flavonoidlerin geçiş metal iyonu varlığında, lipid peroksidasyonu veya DNA hasarına neden olabildikleri yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Aynı şekilde askorbik asidin de geçiş metal iyonu varlığında antioksidan özelliğinden çok pro-oksidan özelliğinin öne çıktığı bilinmektedir. Son yapılan çalışmalarda ise kateşin türü polifenollerin, pro-oksidan aktivitelerinden dolayı proteinlerde protein karbonili oluşumuna neden olduğu ifade edilmektedir [78]. Flavonoidlerin antioksidan/pro-oksidan dengesi, özellikle metal kelatlayıcılar ile hedef biyomoleküllerin (lipidler, proteinler, nükleik asitler vb.) varlığı ve çevreye bağlıdır. Polifenolik bileşikler Fe(III), Cu(II) gibi metalleri Fe(II), Cu(I) türlerine indirgeyerek serbest radikal oluştururlar ve protein ve DNA oksidatif hasarına neden olurlar [81].

Flavonoidlerin aktiviteleri ile yapıları arasındaki ilişki incelendiğinde; A halkasında (baicalein, kuersetajetin) veya B halkasında (delfinidin, epigallokateşin gallat, mirisetin, kuersetajetin) trihidroksil grup içerenler NO varlığında yüksek aktivite göstermektedirler. Bu flavonoidlerin NO varlığındaki pro-oksidan etkisinin nedeni semikinon/kinon türevleri ile NO arasındaki reaksiyon sonucu oluşan peroksinitrit, nitroksil radikali ve NO_x gibi reaktif azot türleri olabilir. Eş zamanlı olarak plazmid DNA, kateşol veya pirogallol gibi bir polihidroaromatik bileşik ve nitrik oksit (NO) açığa çıkaran bir bileşik ile inkübasyonunun, sinerjetik etkiyle DNA'da zincir kırılmalarına yol açtığı tespit edilmiştir [54]. Özellikle epigallokateşin gallat, mirisetin ve kuersetajetin büyük oranda zincir kırılmalarına neden olmaktadır. Bu bileşiklerle yapısal benzerlik gösteren siyanidin ve epigallokateşin gibi diğer flavonoidlerin aktiviteleri daha azdır.

Antioksidan aktivitelerinin yanı sıra antosiyaninler DNA hasarını artırma potansiyeline sahip olduklarından pro-oksidan etki gösterebilmektedirler [82]. Örneğin; flavonoidler

ve dihidroksisinnamik asitler Cu(II) ve O₂ varlığında radikal üretimini artırdıklarından DNA zincir kırılmalarına sebep olurlar. O₂ varlığında bakır ve demir gibi geçiş metalleri, DNA, lipid ve diğer biyolojik moleküllere hasar veren, reaktif oksijen türleri ve organik radikallerin oluşumuyla sonuçlanan, fenolik bileşiklerin redoks reaksiyonlarını katalizlerler [50,83,84]. Ksenobiyotik fenolikler ve kinon türevleri, pro-oksidan özelliklerinden ötürü genotoksik ve mutajenik etki gösterdikleri bilinmektedir. Cu varlığında aşağıdaki reaksiyonlar sonucu ·OH radikali oluşmaktadır: [83]

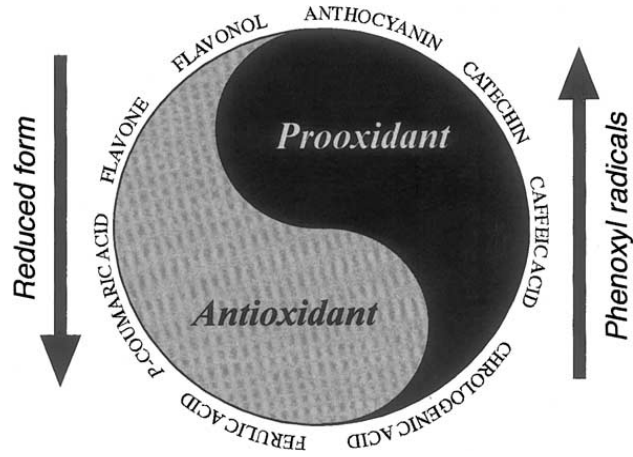


↓

DNA hasarı

Kateşol grubu Cu²⁺'yi Cu⁺'e indirgeyerek Fenton reaksiyonunu katalizler ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunu artırarak pro-oksidan aktivite göstermiş olurlar [76]. Kateşollerin Cu(II) ile başlangıç oksidasyonunda, oksijenle süperoksit anyon radikali üretmek (Eşitlik 2.25) üzere etkileşime giren semikinon (Eşitlik 2.24) oluşmaktadır. Bu reaksiyon süperoksit anyon radikalının fenolik bileşiği yükseltgeyerek semikinon ve hidrojen peroksit ürettiğinden (Eşitlik 2.26) otokatalitik karakterlidir. Ayrıca H₂O₂, süperoksit anyon radikalının disproporsiyonlanmasıyla da (Eşitlik 2.27) meydana gelebilmektedir. Cu(I) varlığında H₂O₂ hızlı bir şekilde Fenton tipi reaksiyonla (Eşitlik 2.28) hidroksil radikaline dönüşmektedir. Fenolik bileşiklerin pro-oksidan aktiviteleri; indirgeme potansiyeli, metal kelatlama özelliği ve O₂-indirgeme kapasitesine bağlıdır. Fenolik bileşiklerin indirgeme potansiyeli yükseltgenmiş türlerin redoks potansiyeli ve fenoksil radikallerinin yarı ömürleri ile bağlantılıdır. Pro-oksidan özelliği sınırlayan iki etken vardır. Bunlar fenoksil radikallerinin [86] halkalı yapısında bulunan çifte bağların rezonans delokalizasyonu (kafeik asit gibi) ve terminal karboksil grupların

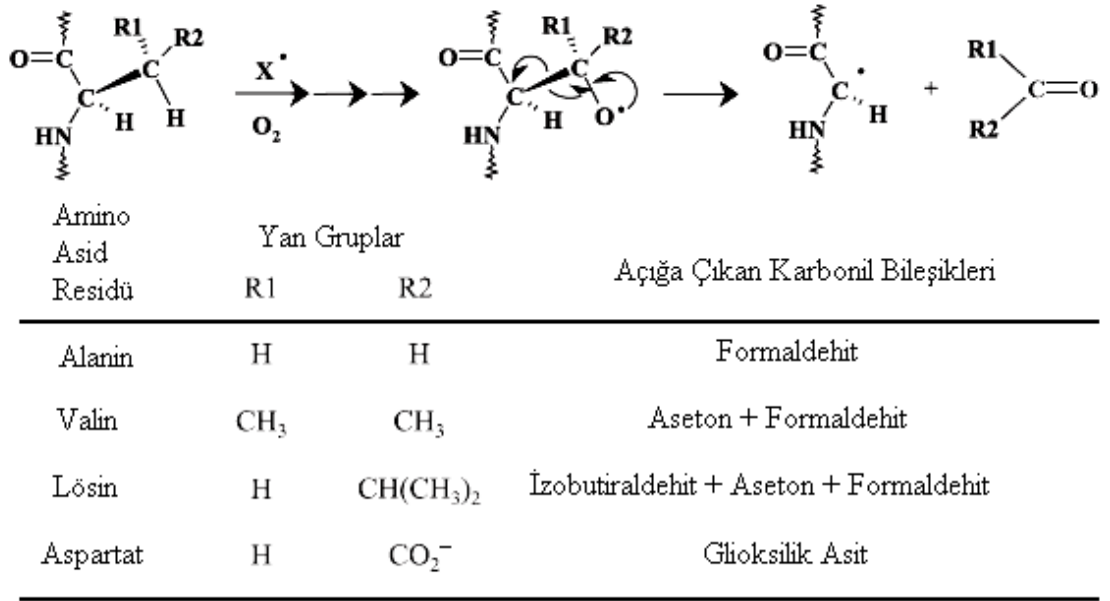
esterifikasyonudur (CGA gibi). Fitofenoliklerin indirgenmiş formlarının antioksidan gibi davranmalarına karşın yükseltgenmiş formları olan fenoksil radikalleri, radikal yarı ömürlerini uzatan koşullar altında pro-oksidan aktivite gösterebilmektedirler (Şekil 2.22) [83].



Şekil 2.21: Bitkisel fenoliklerin antioksidan ve prooksidan karakterlerinin dengesini gösteren Yin-Yang sembolü

2.6. PROTEİN OKSİDASYONU

Proteinlerin oksijen varlığında serbest radikal saldırılarına maruz kalması sonucunda hedef moleküllerde çeşitli değişiklikler meydana gelir. Bunlar yan zincir oksidasyonu, ana zincir parçalanması, çapraz bağlanma, hidrofobiklikte ve yapısında değişiklik ile yeni reaktif bileşiklerin (karboniller, hidroperoksitler, 3,4-dihidroksi fenilalanin) oluşmasıdır. Bu prosesler proteinlerin yapısal ve enzimatik aktivitesinde azalmayla sonuçlanır [86]. Ana zincir parçalanması, α -karbon pozisyonunda ağırlıklı olarak karbon merkezli radikaller ve sonrasında ise peroksil türlerin oluşması sonucu meydana geldiğine inanılır. Peroksil radikalleri iki temel yolla parçalanmaya neden olurlar. Bunlardan birincisi; $\text{HOO}\cdot$ radikalinin ve sonrasında imin hidrolizinden açığa çıkan amid ve α -diketo türlerinin yok edilmesi [87], ikincisi; α -karbon alkoksil radikalinin β karbondan ayrılmasıdır [87]. Ana zincir yarımları ve α -karbon radikalleri, amino asit yan zincirlerinde β pozisyonunda alkoksil radikallerinden meydana gelirler [89,90].



Şekil 2.22: Protein ve peptidlerde C-3 alkoksil radikallerinin oluşum mekanizması ve onların α -karbon radikalleri vermek üzere β yarılmaları ile açığa çıkan karbonil bileşikleri

Çeşitli oksidanlar ve BSA (bovine serum albumin, 2 mg mL⁻¹)'nin reaksiyonu sonucunda oluşan karbonil ürünleri hidrazon türevlendirme ile tayin edilir. Protein TCA ile çöktürülür ve materyalin UV absorbansının (365 nm) ölçülmesi esasına dayanır [91].

Proteinlerin oksidatif hasarı, serbest radikal varlığında karbonil bileşiklerinin oluşması ile gerçekleşir [92]. Proteinlerin serbest radikal hasarlarından ne derecede etkileneceği, proteinin amino asit kompozisyonuna bağlıdır. Özellikle doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi daha yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin ve sistein gibi amino asitleri içeren proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenmektedirler [93,94].

“Hem” proteinleri de serbest radikallerin oluşturduğu hasarlardan büyük ölçüde etkilenirler. Özellikle oksihemoglobin, süperoksit ve hidrojen peroksit ile reaksiyona girerek methemoglobini oluşturur [95].

Proteinlerin tiyol gruplarının oksidasyonu, enzim fonksiyonunda kayıplar, membran iyon ve metabolit transportunda aksamalar gibi çeşitli fonksiyonlarda bozulmalara

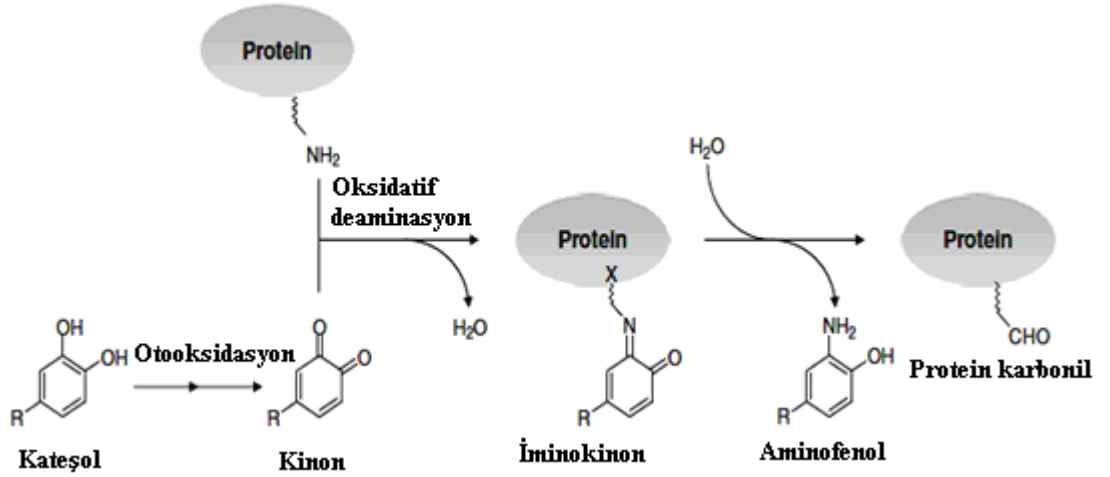
neden olmaktadır [96]. Serbest radikallerin proteinler üzerinde neden olduğu başlıca değişiklikler şunlardır;

- Aminoasitlerin modifikasyonu,
- Proteinlerin fragmantasyonu,
- Proteinlerin agregasyonu ve çapraz bağlanmalar.

Protein oksidasyonu, reaktif oksijen türleri (ROS) ile direkt olarak veya oksidatif gerilimin ikincil ürünleri ile reaksiyonu sonucu indirekt olarak indüklenen, proteinlerin kovalent modifikasyonu olarak tanımlanmaktadır [97]. Reaktif oksijen türleri ile protein ana yapısının reaksiyonu, amino asit α karbonundaki bir H atomunun fizyolojik şartlarda H_2O_2 'in demir veya bakır ile olan reaksiyonu sonucu meydana gelen $\cdot OH$ 'e bağlanarak ayrılması ve H_2O oluşturması ile başlar [98]. Devamında oluşan karbon merkezli radikal oksijen varlığında hızlı bir şekilde peroksil radikaline dönüşür. Peroksil radikali de kolaylıkla süperoksit radikalinin protonlanmış formu veya başka bir molekülden H atomu alarak alkil peroksite dönüşür. Alkil peroksite ise $HO_2\cdot$ ile daha ileri bir reaksiyonla alkoksil radikaline ve daha sonra da alkoksil radikali yine $HO_2\cdot$ ile hidroksi türevine dönüşür [98]. Reaksiyonlar karbon merkezli radikale oksijenin bağlanmasına bağlıdır. Oksijenin varlığında ilerleyen bu ileri reaksiyonlar $HO_2\cdot$ dışında Fe^{2+} aracılığı ile de gerçekleşebilmektedir. Eğer oksijen yoksa karbon merkezli radikal, karbon-karbon çapraz bağlı türevleri üretmek üzere bir başka karbon merkezli radikal ile reaksiyona girebilir. Protein karbonil grupları oksidatif kaynaklı hücresel hasarın en genel göstergesi olarak kabul görmekte ve yaygın olarak kullanılmaktadır [98]. Bunun nedenleri arasında protein karbonil gruplarının birçok farklı mekanizma ile ortaya çıkabilmesi, kararlı olması ve basit, duyarlı yöntemlerle ölçülebilir olması sayılabilir [99]. Proteinlerin konformasyonel değişimi, agregasyon ve parçalanmadaki artışın yanı sıra sekonder ve tersiyer yapının bozulmasında da artışa yol açarak proteinlerin proteolize yatkınlığına ve normal fonksiyonlarında azalmaya yol açar.

Son yapılan çalışmalar sonucunda kateşinleri de içeren çeşitli polifenolik bileşiklerin pro-oksidan aktivite göstererek proteinlerde protein karbonili oluşturduğu ifade edilmektedir. Her ne kadar polifenolik bileşiklerin kimyasal yapıları ile pro-oksidan aktiviteleri arasındaki ilişki detaylı bir şekilde karakterize edilememiş olsa da kateşin türleri karşılaştırıldığında; pirogallol tipi kateşinlerin kateşol tipi kateşinlerden daha

fazla protein karbonili oluşturduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra galloil grup içeren kateşinlerin galloil grup içermeyen kateşinlerden yine daha fazla protein karbonili oluşturduğu söylenmektedir. Bu sonuçlar yeşil çay kateşinlerinin HSA'de protein karbonili oluşturmasında en önemli yapının B halkasındaki galloil gruptan sonra pirogallol grup olduğunu göstermektedir.



Şekil 2.23: Otoksidasyon sırasında, kateşol tipi polifenollerin oksidatif deaminasyonunun mekanizması

Her bir kateşinin yapısında ve fonksiyonundaki farklılığın nedeni B halkasındaki hidroksil grup sayısı ve bir galloil grubun varlığı ya da yokluğudur. Bu bileşiklerin serbest radikal süpürücü olarak davrandıkları bilinmekte ve antioksidan aktiviteleri geniş çapta *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir. Buna karşın birçok veri, hastalık oluşumunun engellenmesinde bu bileşiklerin antioksidan gibi davranmalarının aksine hedef proteinlerle direkt etkileşmesinden ötürü pro-oksidan gibi davrandığını göstermektedir [100].

Bazı çalışmalar *o*-difenolik bileşiklerin nötral veya alkali çözeltilerde zayıf stabiliteye sahip olduğunu göstermektedir. B halkasında *o*-difenolik grup içeren kateşinlerin oksidasyonu sonucu kinon yapı oluşur ve pro-oksidan aktivite gösterirler. Örneğin; zayıf bazik çözeltilerde kateşol ve pirogallol tipi kateşinler otoksidasyona uğrar ve reaktif oksijen türlerini (ROS) oluştururlar. Bunun yanı sıra, elektrofilik özellikteki kinon hızlıca, indirgenmiş glutatyonun sülfhidril grupları veya protein sistein kalıntıları ile sisteinil ürünleri oluşturmak üzere etkileşime girer [101]. ROS ve elektrofiller, proteinlerin fonksiyonlarının değişmesine neden olan oksidatif modifikasyonlara neden

olabilirler. Protein karbonili genellikle oksidatif stresin bir belirtisi olarak bilinir. Yeşil çay gibi polifenollerce zengin içecekler ile BSA (bovine serum albumin) proteininin fizyolojik pH ve sıcaklıkta inkübasyonu sonucu protein karbonili oluşmaktadır [78].

2.7. PRO-OKSİDAN AKTİVİTE TAYİN YÖNTEMLERİ

2.7.1. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler (TBARS) Yöntemi

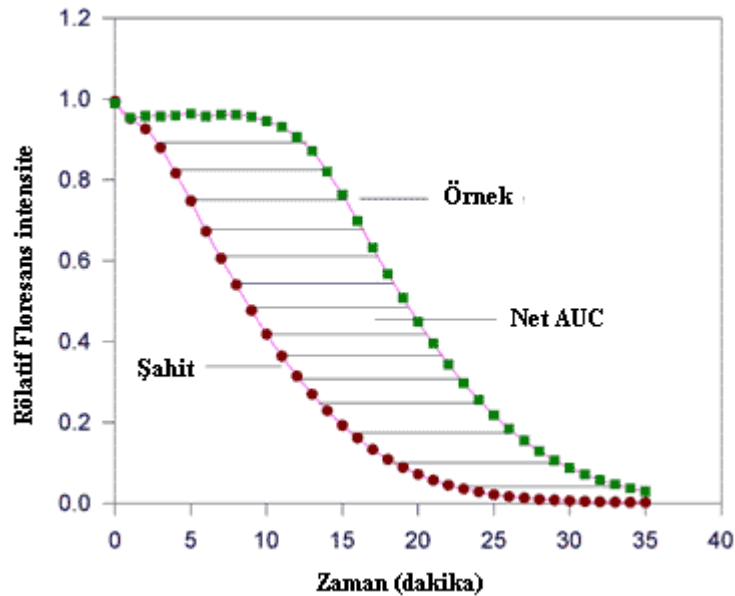
TBARS yöntemi ilk olarak 1978'de Buege [102] tarafından bulunmuş, Halliwell [13,103] tarafından geliştirilmiştir. Genellikle biyolojik örnekler ve gıda maddelerindeki lipid peroksidasyonu veya oksidatif hasar ölçümlerinde sıklıkla kullanılan en eski yöntem olarak bilinmektedir [4]. Yöntem, malondialdehit bileşiğinin tiyobarbitürik asid (TBA) ile reaksiyona girmesi sonucu, 532 nm'de maksimum absorpsiyon veren pembe renkli kompleksin absorbansının ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Basit, kolay ve tekrarlanabilir bir yöntem olmasına karşın inkübasyon süresinin uzun olduğu TBARS yönteminde, oksidasyon araçları olarak linoleik asid, deoksiriboz veya LDL kullanılmaktadır. Metal iyonları, oksidasyonun hem başlangıç basamağı hem de ara reaksiyonlarda önemli katalitik rol oynamaktadır [104]. Bu gibi hasarların birincil ürünleri kompleks peroksit karışımlarıdır. Bu karışımlar daha sonra çeşitli karbonil bileşikleri üretir. Üç karbonlu malondialdehit bileşiği bu karbonillerden biridir. Bu yöntemde en önemli sorun; TBA'nın şekerler, proteinler, amino asitler, diğer aldehitler, nükleik asitler ve bilirubin gibi bileşiklerle etkileşime girerek, MDA'nın kolorimetrik ve florimetrik tayininde interferans etkileri göstermesidir [105]. Yöntemin bir diğer önemli dezavantajı ise MDA'nın sadece en az üç çifte bağ içeren yağ asitlerinden oluşabilmesidir [77].

A. Patetti ve diğ. yaptıkları bir çalışmada kırmızı renkli sebzelerin sularının kaynatılması sonucunda bazılarında antioksidan aktivitenin düştüğünü bazılarında ise pro-oksidan aktivitenin arttığını TBARS testiyle göstermişlerdir. Yüksek molekül ağırlıklı fraksiyonlar (MA>3500 Da) antioksidan aktivite gösterirken, düşük molekül ağırlıklı fraksiyonların (MA<3500 Da) pro-oksidan aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir [5].

2.7.2. ORAC (Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi) Yöntemi

ORAC (Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi) yöntemi; reaktif oksijen türleri ile oksidasyonu sonucunda floresans miktarı düşen, yükseltgenir substrat olan fikoeritrinin (phycoerythrin, β -PE) kullanımına dayalı olup [17,18], yöntemde flavonoidlerin antioksidan ve pro-oksidan davranışları ile yapısal aktiviteleri arasındaki ilişki incelenmektedir.

Serbest radikal etkisini inceleyen ve eğri altında kalan alan tekniğini miktar tayininde kullanan bu yöntem, antioksidanların serbest radikalleri hem inhibe etme yüzdesini hem de süresini tek bir değer olarak ifade edebilen bir yöntemdir [110]. Hidrojen atom transfer (HAT-based) esaslı bir yöntemdir. Flavonlar, izoflavonlar ve flavononlar gibi bazı flavonoidler, peroksil ve hidroksil (\cdot OH) radikallerine karşı antioksidan gibi davranırken, Cu^{2+} varlığında pro-oksidan gibi davranmaktadırlar. Antioksidan ve pro-oksidan aktivitelerinin her ikisi de flavonoidin iskelet yapısındaki OH gruplarının sayısına bağlıdır. Bir flavonoidin 3' ve 4' pozisyonlarında di-OH grup içermesi peroksil süpürme aktivitesi için önemliken sadece 5-pozisyonunda tek hidroksil içermesiyle aktivite göstermezler. Flavonoidlerin OH gruplarının *o*-metilasyonu hem antioksidan hem de pro-oksidan aktiviteyi durdurur [32].



Şekil 2.24: Eğri altında kalan net alan (AUC) tekniği yoluyla ORAC aktivitesinin gösterilmesi. ORAC yönteminde prooksidan olarak peroksil ve hidroksil radikalleri kullanılması, yöntemi pro-oksidan olmayan yükseltgenler içeren yöntemlerden ayırmaktadır. Peroksil

radikali kaynağı olarak AAPH, hidroksil radikali kaynağı olarak ise Cu^{2+} - H_2O_2 kullanılmaktadır. Sonuçlar PE'in azalan eğrisinin altında kalan, referansın ve örneğin alanlarının farkları kullanılarak hesaplanmakta (Eşitlik 2.24) ve μmol örneğe karşılık μmol troloks eşdeğeri şeklinde ifade edilmektedir. Bir flavonoidin pro-oksidan aktivitesi aşağıdaki eşitlik ile hesaplanır pro-oksidan ünite şeklinde ifade edilir. ORAC yönteminde, PE'in azalan eğrisinin altında kalan alanı %1 azaltan pro-oksidan aktivite 1 üniteye eşittir [32].

$$\frac{(\text{Alan}_{\text{Referans}} - \text{Alan}_{\text{Örnek}})}{\text{Alan}_{\text{Referans}}} \times 100 \quad (2.24)$$

Yöntemde oksidasyon için bir protein substrat (PE) kullanılması da substrat olarak luminol [114] veya krosin [108] kullanılan yöntemlerden ayıran önemli bir farktır. Ancak gecikme zamanı (lag phase) oluşturmeyen bileşiklerin (glutatyon) antioksidan aktivitelerinin ölçülememesi önemli bir eksikliklerdir [17].

2.7.3. Etidiyum Bromür (EB) Yöntemi

Genellikle DNA hasarı ölçümünde kullanılan etidiyum bromür (EB) yöntemi, floresan özellikte bir indikatörün kullanılması ve oksidasyon sonucunda meydana gelen floresans miktarındaki azalmaya dayalıdır [21].

Fenolik asitler (kafeik asit, klorojenik asit, sinapik asit, ferulik asit, 3-hidroksisinamik asit ve 4-hidroksisinamik asit) [21], resveratrol ve onun sentetik analoglarının (3,4,4'-trihidroksi-trans-stilben (3,4,4'-THS), 3,4,5-trihidroksi-trans-stilben (3,4,5-THS), 3,4-dihidroksi-trans-stilben (3,4-DHS), 4,4'-dihidroksi-trans-stilben (4,4'-DHS), 2,4-dihidroksi-trans-stilben (2,4-DHS), 3,5-dihidroksi-trans-stilben (3,5-DHS) ve 3,5,4'-trimetoksi-trans-stilben (3,5,4'-TMS)) [105] pro-oksidan aktivitelerinin tayini için Cu^{2+} iyonu varlığında DNA'ya verdikleri hasar miktarı üzerine çalışılmıştır. Kafeik asit ve klorojenik asit gibi *o*-dihidroksil grup veya sinapik asit ve ferulik asit gibi 4-hidroksi-3-metoksil grup ihtiva eden bileşikler DNA hasarında daha yüksek aktivite göstermişlerdir. CuSO_4 , PBS, DNA ve örnek içeren karışımların inkübasyona bırakılmalarının ardından EB ilavesiyle spektrofotometrik olarak 510 nm'de uyarılma ve 590 nm'de emisyonları ölçülmüştür. Kontrol olarak fenolik asitler dışında DNA ve diğer tüm reaktifleri içeren çözelti %100 floresans, DNA dışındaki kontrol ise sıfır

floresans olarak kullanılmıştır. Floresans miktarının azalması DNA hasarı olarak ölçülmüştür.

2.7.4. Batokuproin Disülfonat (BCS) Yöntemi

DNA hasarı [15] veya düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonu [107] tayinlerinde kullanılabilen yöntem, spesifik olarak bakır(I) ve demir(II) gibi geçiş metal iyonlarının indirgenmiş formlarına cevap veren, sırasıyla batokuproin disülfonat (BCS) ve batofenantrolin disülfonat (BPS) indikatörlerinin kullanılması esasına dayanmaktadır. Bu indikatör moleküller yükseltgenmiş formda bakır (Cu^{2+}) ve demir (Fe^{3+}) iyonları ile şiddetlerenklenmiş yük-transfer kompleksleri vermediğinden Cu^+ -BCS ve Fe^{2+} -BPS komplekslerinin sırasıyla 480 ve 535 nm'de maksimum absorptans vermeleri ile kantitatif tayinleri yapılabilmektedir [107].

DNA moleküllerine verilen hasar miktarı, tris-HCl tamponlu ortamda Cu^{2+} , hidroliz olabilen tanen bileşikleri ve BCS içeren çözeltinin, 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmasının ardından 480 nm'de renklenen Cu^+ -BCS kompleksinin absorptansının ölçülmesi suretiyle tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre tanen konsantrasyonu arttıkça Cu(I) oluşumunun arttığı dolayısıyla pro-oksidan aktivitesinin arttığı söylenebilmektedir [15].

2.7.5. Krosin (CBA) Yöntemi

Plazma antioksidanlarının antioksidan kapasitelerini ölçmek için ilk olarak Bors ve arkadaşları tarafından [19] önerilen, Tubaro ve diğ. [108] tarafından geliştirilen yöntemde kinetik parametreler kullanılmıştır. Bu yöntem; AAPH (2,2'-azo-bis-(2-aminopropan)dihidroklorür) tarafından meydana gelen peroksil radikalleri sayesinde krosinin yükseltgenmesi (renginin giderilmesi) esasına dayanmaktadır.

Krosinin peroksil radikalleri tarafından oksidasyon yani renk giderim hızı, ortamda antioksidan bileşiklerin bulunmadığı haldeki hızı (V_0) ve bulunduğu haldeki hızı (V), 10 dakikalık süre içinde ölçülüp kaydedilir. [A (antioksidan konsantrasyonu)/ C (krosin konsantrasyonu)] ile V_0/V arasında çizilen grafiğin eğimi, teorik olarak k_a (antioksidan ve peroksil radikalleri arasındaki reaksiyon hız sabiti) ile k_c (krosin ile peroksil radikalleri arasındaki reaksiyon hız sabiti) arasındaki oranı (k_a/k_c) verir, yani peroksil

radikalleri ile etkileşen bileşiğin rölatif kapasitesini belirtir. İncelenen antioksidanın k_a/k_c değeri troloksun k_a/k_c değerine bölünüp sonuçlar troloks eşdeğeri cinsinden ifade edilmektedir [109].

Tubaro ve diğ., bu kinetik yaklaşım sayesinde antioksidan koruma etkinliğinin kesin olarak değerlendirilebileceğine inanmaktadırlar. Ancak bu yöntem bir antioksidanın diğer bir antioksidana karşı yarışma yeteneğini ölçmektedir. Ayrıca kullanılan krosinin konsantrasyonu sabittir, fakat analizlenecek olan bileşiğin farklı konsantrasyonlarının kullanılması için farklı krosin konsantrasyonları gerekmektedir. Bu yöntemin diğer bir eksikliği, askorbik asid için bulunan troloks cinsinden antioksidan kapasitesinin 7.7 olması ve bu sonucun diğer yöntemlerle bulunanlardan çok daha yüksek olmasıdır [110]. Bu yöntemle hem hidrofilik hem de lipofilik ortamda çalışılabilmektedir. Ayrıca bileşik veya karışımların antioksidan/pro-oksidan aktivitelerinin tayin edilebilmesi bir diğer önemli avantajıdır [111, 112].

Isabel López-Galilea ve arkadaşları kahvenin içerdiği bileşiklerin pro-oksidan kapasitesini, örnek ilavesini takiben 5 dakika sonrasında 443 nm'de absorbansta meydana gelen düşüş kullanımı ile hesaplamışlardır [113].

2.7.6. Luminol Yöntemi

İlk olarak Metsä-Ketelä ve diğ. [114] tarafından 1991'de geliştirilen ve yayınlanan kemiluminesans bazlı TRAP yöntemi, daha sonra Alho ve Leinonen tarafından detaylı şekilde tanımlanmıştır [20]. AAPH bileşiğinden meydana gelen peroksil radikallerinin yükseltgenebilir substratı (luminol) oksidasyonu sonucu ışık yayan luminol radikalleri oluşmaktadır. Oluşan ışık luminolmetre denilen cihazlarla ölçülmektedir. Antioksidan özelliği olan bir madde, kemiluminesans ışımalarının oluşumunu belli bir zaman (gecikme zamanı) için engeller. Gecikme zamanı, bir örnekteki toplam antioksidan potansiyeli ile doğrudan orantılıdır.

Elde edilen sonuçlar troloks eşdeğeri cinsinden hesaplanmaktadır. Işığın luminol radikalleri tarafından yayılması için ortamdaki bütün antioksidanların tüketilmesi gerekmektedir. Bu nedenle bu yöntem antioksidan girişimine karşı duyarlıdır. Bu

yöntemin en önemli dezavantajı, incelenen antioksidanların yalnızca AAPH'dan oluşan radikalleri değil luminol radikallerini de indirgemesidir.

Dihidroksibenzen türevleri süperoksit süpürerek antioksidan aktivite gösterirken, trihidroksibenzen türevleri (pirogallol, 1,2,4-trihidroksibenzen, 1,3,5-trihidroksibenzen) süperoksit üreterek pro-oksidan aktivite göstermektedir. Bu bağlamda fenolik bileşiklerin hidroksil gruplarının sayısı ve pozisyonu, bunların antioksidan/pro-oksidan nitelikleri ve aktivitelerinin tayini bakımından en önemli özelliktir [85].

2.7.7. AAPH Esaslı Yöntem

α -Tokoferol serbest radikal süpürücü olarak bilinen lipofilik bir antioksidandır. Bununla birlikte düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) yanında hem antioksidan hem de pro-oksidan aktivite gösterebilmektedir. Zayıf veya güçlü oksidatif koşullar oluşturularak α -tokoferolün antioksidan/pro-oksidan aktivitesi incelenmiş ve güçlü oksidatif koşullarda antioksidan, zayıf oksidatif koşullarda ise pro-oksidan gibi davrandığı tespit edilmiştir. Yöntemde, AAPH radikal üreticisi olarak kullanılırken, metal iyonu varlığında α -tokoferolün LDL oksidasyonunu azaltması veya artırmasına bakılmaktadır.

Elde edilen sonuçlara göre seyreltik plazma ortamında α -tokoferol, yüksek konsantrasyonda Cu^{2+} veya AAPH ile başlatılan oksidasyonu antioksidan aktivite göstererek azaltırken, yine seyreltik plazma ortamında, düşük konsantrasyonda Cu^{2+} veya AAPH ile başlatılan oksidasyonu pro-oksidan aktivite göstererek artırdığı tespit edilmiştir. Oksidasyon 360/430 nm'de floresans artışı ile karakterize edilmiştir [41].

2.7.8. HPLC Yöntemi

HPLC yöntemi 1992'de Osawa ve Shibamoto [115] tarafından modifiye edilmiş ve primer antioksidanların aktivitelerinin tayini için kullanılmıştır. Yöntemin orjinalinde; antioksidan ve metal katalizli pro-oksidan aktivite tayini için oksidasyon $\text{FeCl}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ ile başlatılırken geliştirilen yöntemde Cu^{2+} ile başlatılıp bir linoleik asit emülsiyon sisteminde üretilen malonaldehit miktarı ölçülmektedir. Kullanılan bileşikler içerisinde sentetik antioksidanlar hariç çoğu fenolik bileşik düşük konsantrasyonda pro-oksidan aktivite göstermiştir. Askorbik asit sekonder antioksidan gibi davranıp antioksidan

aktivite göstermediği gibi pro-oksidan aktivite göstermiştir. Yapısal benzerlik gösteren bileşiklerin antioksidan aktiviteleri de benzerlik göstermiştir. Bu yönteme göre antioksidan aktivite; hidroksil gruplarının sayısının artmasıyla artmış, glikozillenmeyle azalmıştır. Sonuç olarak flavonoidler fenolik asitlerden yüksek, flavanoller flavonoller ve antosiyanidinlerden daha düşük aktivite göstermişlerdir. Bunun sebebi flavanollerde C halkasının 2. ve 3. karbon atomları arasındaki çifte bağın bulunmaması dolayısıyla ortaklanmamış elektronun delokalizasyonunun daha az stabiliteye sahip olmasıdır. Flavonoller ve antosiyanidinler ise 3',4'-*o*-dihidroksi gruplara sahip olduklarında benzer aktivite göstermişlerdir.

Fukumoto ve Mazza'nın yapmış oldukları çalışmada fizyolojik pH'da linoleik asid emülsiyon sisteminin bakır(II) ile inkübasyonu sonunda BHT, HCl ve üre ilavesiyle 100°C'de 1 saat ısıtılmış ve ardından soğutularak HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Sonuçların değerlendirilmesinde % malonaldehit 100'den büyükse pro-oksidan, küçükse antioksidan aktivite gösterdiği kabul edilmiştir. Yöntemin avantajı, fizyolojik pH'da ve düşük hacimlerde çalışması iken dezavantajı olarak inkübasyon süresinin çok uzun olması (16 saat) söylenebilir [116].

2.7.9. Pirogallol Yöntemi

Bazı polifenolik bileşiklerin fonksiyonel gruplarının ve bu grupların yerlerinin değişiminin antioksidan özelliklerine olan etkileri pirogallol UV-Vis spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür. Yöntemde süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) üretilmektedir. Antioksidan ve pro-oksidan aktivite flavonların ortamdaki konsantrasyonlarına bağlıdır. Sonuçlar C halkasının 3. karbon atomunun hidroksilasyonunun metoksilasyonuna göre antioksidan aktiviteyi artırdığını göstermektedir. Benzer sonuçlar B halkasının 2' ve 4' karbon atomlarının hidroksillenmesinde de görülmüştür. Buna karşın A halkasının 7. karbon atomunun hidroksilasyon veya metoksilasyonu radikal süpürme aktivitesine olumsuz etkileri olduğu söylenebilmektedir.

Yöntemde, tris tamponlu ortamda antioksidan bileşik ve pirogallolün, 25°C'de inkübasyonu sonucunda referans ve antioksidanlı örneklerde meydana gelen absorbans değişimi 420 nm'de ölçülerek % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. Her bir % inhibisyon, SOD kalibrasyon doğrusu kullanılarak $mmol L^{-1}$ SOD eşdeğerine

çevrilmiştir. Pozitif sonuçlar antioksidan aktivite, negatif sonuçlar ise pro-oksidan aktivite olarak ifade edilmiştir. Her bileşiğin antioksidan aktivitesi SOD'nin pirogallele olan etkisi ile karşılaştırılmıştır. Kolay ve tekrarlanabilir bir yöntem olmasına karşın pirogallol yöntemi fizyolojik pH'da çalışmamakta, alkali ortamda çalışmaktadır [16].

2.7.10. Karbonil Tayini Yöntemi

Proteine bağlı karbonil bileşiklerinin tayini, proteinin oksidatif hasarının bir ölçüsü olarak kullanılmaktadır [91]. Bu yöntem, protein oksidasyonu sonucunda protein yapısında bulunan karbonil gruplarının 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile oluşturdukları dinitrofenilhidrazonların (DNP) absorpsiyon değerlerinin 370 nm dalga boyunda ölçülmesi esasına dayanır [14,142]. Kararlı DNP bileşiğinin UV ışığı absorplamasından faydalanılarak bir proteinin veya protein karışımının (plazma, doku homojenizati, selüler ekstrakt veya izole saf protein) toplam karbonil içeriği spektrofotometrik yöntemle tayin edilebilmektedir. Bu spektrofotometrik yöntem, HPLC ile birleştirilerek hassasiyeti artırılabilir [14]. Hassas ve ucuz bir yöntem olmakla birlikte 370 nm'de absorpsiyon yapan kromofor grupları ihtiva eden proteinlerin (hemoglobin, miyoglobin, retinoidler vb.) karbonil tayininde güvenilir değildir. Ayrıca proteinlerin oksidatif hasarının kapsamı hakkında ayrıntılı bilgi sağlamamaktadır [143].

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Bu çalışmada; kimyasal maddelerin ve gerçek örneklerin tartımı için RADWAG marka Was 220X model analitik terazi, Bandelin Sonorex model ultrasonik banyo, hazırlanan çözeltilerin karıştırılmasında Velp Scientifica girdap karıştırıcı, çözeltilerin pH'sının belirlenmesinde HI 221 Calibration Check Microprocessor pH-metre, inkübasyon işlemi için IKA HB4 basic su banyosu, çöktürme işlemi için Electromag M 4812 P model santrifüj, absorbans ölçümlerinde Perkin Elmer Lambda 35 UV-görünür alan spektrofotometresi ve Varian SpectrAA 220 model atomik absorpsiyon spektrometresi ve ölçüm yapmak için 1 çift 1 cm'lik Hellma (Müllheim, Almanya) kuartz küvet kullanılmıştır.

3.2. KİMYASAL MADDELER

Kullanılan kimyasal maddeler: neokuproin (Nc) (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin), (-)epigallokateşin gallat (EGCG), (-)epikateşin (EC), kuersetin (QR), gallik asid (GA), mutlak etil alkol (EtOH), hidroklorik asid (HCl), metanol (MeOH), sodyum dodesil sülfat (SDS) ve üre: Sigma (Steinheim, Almanya); naringin (NG), *p*-kumarik asid (*p*-COU), kafeik asid (CFA), troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asid) (TR), E vitamini (α -TOC) ve askorbik asid (AA): Aldrich (Steinheim, Almanya); bakır(II) klorür dihidrat ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), amonyum asetat (NH_4Ac), sodyum dihidrojen fosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ve tris (tris(hidroksimetil)aminometan): Merck (Darmstadt, Almanya); rosmarinik asid (ROS), (+)kateşin (CT): Fluka (Buchs, İsviçre); disodyum hidrojen fosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), bakır(II) sülfat (CuSO_4) ve trikloroasetik asid (TCA): Riedel-de Haën (Steinheim, Almanya). dinitrofenilhidrazin (DNPH) (2,4-dinitrophenylhydrazine) kullanılmıştır. Kullanılan kimyasallar analitik

safliktadır. Adaçayı (*Salvia officinalis*), yeşil çay (*Camellia sinensis*), mercanköşk (*Origanum majorana*) ve nane (*Mentha*) Malatya Pazarı A.Ş.'den temin edilmiştir.

3.3. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

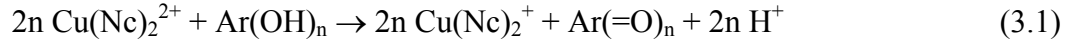
Bakır(II) klorür çözeltisi, 1.0×10^{-2} M olacak şekilde bakır(II) klorür dihidrat'tan ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.4262 g tartım alınıp su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Amonyum asetat (NH_4Ac) tamponu, 1 M ($\text{pH}=7.0$) olacak şekilde NH_4Ac 'dan 19.27 g tartım alınıp su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) (Nc) çözeltisi, 7.5×10^{-3} M olacak şekilde 0.078 g tartım alınıp mutlak etil alkolle çözülüp 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Bakır(II) sülfat çözeltisi, 10^{-3} M olacak şekilde bakır(II) sülfat'tan 0.0125 g tartım alınıp su ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Standart antioksidan bileşiklerin 10^{-3} M'lık çözeltileri mutlak EtOH içerisinde hazırlandı. Askorbik asidin 10^{-3} M'lık çözeltisi destile suda hazırlandı. Sodyum dihidrojen fosfat ve disodyum hidrojen fosfatın destile suda çözülmüş 0.2 M'lık çözeltileri ile $\text{pH}=7$ fosfat tamponu ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) hazırlandı. Trikloroasetik asid çözeltisi, % 10'luk olacak şekilde 10 g tartım alınıp destile suda çözülüp 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Dinitrofenilhidrazinin 10^{-2} M'lık çözeltisi 0.1981 g tartım alınıp 2N HCl'de ısıtılarak hazırlandı. Protein çözücü ($\text{pH}=6.8$) çözeltisi, 50 mM olacak şekilde 1.5142 g tris, 8 M olacak şekilde 120.12 g üre ve % 2'lik olacak şekilde 5 g SDS tartımları alınıp 250 mL destile suda çözülerek hazırlandı ve 2N HCl çözeltisi ile pH ayarı yapıldı. Yumurta akı çözeltisi, bir yumurtanın akı tartılarak destile su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Bitki ekstraktları, bitki örneklerinden 2 g tartım alınarak, MeOH/ H_2O (4:1, v/v) çözücü ortamında 10 dakika ultrasonik banyoda bekletilerek hazırlandı ve adi süzgeç kağıdında süzüldü. Analiz öncesinde 0.45 μm -gözenek çaplı selüloz asetat filtreden (FJ25AC4550/010402) geçirilerek ilgili analizlerde kullanıldı.

3.4. UYGULANAN YÖNTEMLER

3.4.1. Modifiye CUPRAC Yöntemi

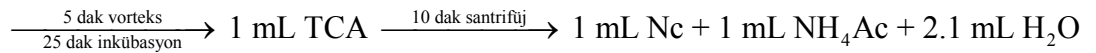
Çalışma grubumuz tarafından kromojenik oksidan olan Cu(II)-neokuproin reaktifi kullanılarak, plazma antioksidanları, flavonoidler, gıda polifenoller, C vitamini ve E vitamini için basit, geniş alanda uygulanabilen bir antioksidan kapasite tayin yöntemi

geliştirilmiştir. Bu reaktif, kararlı, ucuz, kolay ulaşılabilen, hidrofilik ve lipofilik antioksidanlara cevap verebilen bir reaktiftir. Toplam antioksidan kapasite tayininde kullanılan bu yöntem dünya literatürüne CUPRAC (bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite) adıyla kazandırılmıştır [118]. Bu yöntemde, 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuproin-Nc)'in Cu(II) ile oluşturduğu bakır(II)-neokuproin kompleksinin (Cu(II)-Nc) antioksidan bileşikler varlığında 450 nm'de maksimum absorbans veren bakır(I)-neokuproin [Cu(I)-Nc] kelatına indirgenme yeteneğinden yararlanılarak (Eşitlik 3.1) çeşitli örneklere başarıyla uygulanmış ve modifiye edilerek birçok antioksidan kapasite tayin yöntemi geliştirilmiştir [119-137].



Bir deney tüpü içerisine 0.2 M fosfat tamponu (NaH₂PO₄-Na₂HPO₄) çözeltisi, 1 mm Cu(II) çözeltisi, yumurta akı çözeltisinden sırasıyla 1'er mL eklendi. Üzerine 1 mL 1 mM standart antioksidan çözeltisi ilave edildi ve toplam hacmi 5 mL'ye destile suyla tamamlandı. Her deney tüpü 5'er dakika vorteks cihazında karıştırıldı ve oda koşullarında ağzı kapalı olarak 30 dakika boyunca bekletildi. Bu süre sonunda her tüpe 1'er mL %10'luk TCA çözeltisi eklenerek protein çöktürüldü. Santrifüj tüpüne alınan çözeltiler 10 dakika süresince 4000 rpm hızla santrifüj edildi. Bu işlem sonrasında sulu fazlar atılarak protein çökeltileri destile su ile 3'er kere yıkandı. Protein çökeltileri üzerine neokuproin çözeltisi ve amonyum asetat tamponundan 1'er mL ilave edildi ve toplam hacim destile suyla 4.1 mL'ye tamamlanarak iyice karıştırıldı. Adi süzgeç kağıdından süzülen çözeltilerde oluşan Cu(I)-Nc kelatının renginin karakteristik dalgaboyu olan 450 nm'de absorbans değerleri ölçüldü.

1 mL pH 7.4 Fosfat Tamponu + 1 mL Cu²⁺ + 1 mL AOx + 1 mL protein + 1 mL H₂O



$$V_{\text{toplam}} = 4.1 \text{ mL}$$

(3.2)

Modifiye CUPRAC yöntemiyle ölçülen absorbans değerleri ile konsantrasyon arasında çizilen kalibrasyon eğrilerinin doğru denklemleri, regresyon katsayıları, lineer çalışma aralıkları ve TPA (toplam pro-oksidan aktivite) değerleri hesaplandı (Eşitlik 3.3). QREPA katsayıları, her bir bileşiğin molar absorblama katsayılarının (ϵ) aynı deneysel

şartlarda referans bileşik olan kuersetinin ϵ değerine oranlanarak hesaplandı (Eşitlik 3.4).

$$\text{TPA değeri} = \frac{\text{Absorbans}}{\epsilon_{\text{QR}}} \times \frac{\text{Toplam hacim}}{\text{Alınan hacim}} \times 10^3 \quad (3.3)$$

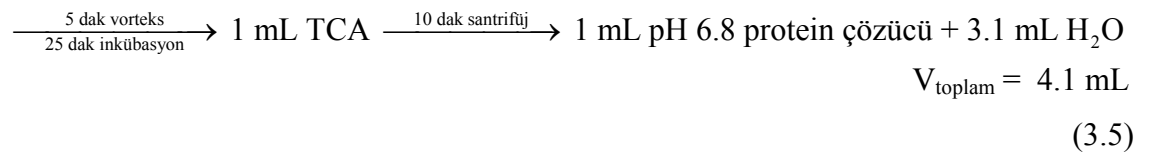
$$\text{QREPA katsayısı} = \frac{\epsilon_{\text{AOx}}}{\epsilon_{\text{QR}}} \quad (\text{QR: kuersetin}) \quad (3.4)$$

3.4.2. AAS Yöntemi

Tayin edilecek metalin atom halinde, buhar fazında absorpsiyonundan faydalanılarak yapılan bir analiz türü olan atomik absorpsiyon spektrometrisi kullanılarak çeşitli örneklerde bakır tayini yapılmıştır [74,138-141].

Bir deney tüpü içerisine 0.2 M fosfat tamponu ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$) çözeltisi, 1 mm Cu(II) çözeltisi, yumurta akı çözeltisinden sırasıyla 1'er mL eklendi. Üzerine 1 mL 1 mM standart antioksidan çözeltisi ilave edildi ve toplam hacmi 5 mL'ye destile suyla tamamlandı. Her deney tüpü 5'er dakika vorteks cihazında karıştırıldı ve oda koşullarında ağzı kapalı olarak 30 dakika boyunca bekletildi. Bu süre sonunda her tüpe 1'er mL %10'luk TCA çözeltisi eklenerek protein çöktürüldü. Santrifüj tüpüne alınan çözeltiler 10 dakika süresince 4000 rpm hızla santrifüj edildi. Bu işlem sonrasında sulu fazlar atılarak protein çökeltileri destile su ile 3'er kere yıkandı. Protein çökeltileri üzerine 1'er mL pH 6.8 protein çözücü çözeltisi ilave edildi ve toplam hacim destile suyla 4.1 mL'ye tamamlanarak iyice karıştırıldı. Adi süzgeç kağıdından süzülen çözeltilerde bulunan bakır miktarı atomik absorpsiyon spektrometre cihazında ölçüldü.

1 mL pH 7.4 Fosfat Tamponu + 1 mL Cu^{2+} + 1 mL AOx + 1 mL protein + 1 mL H_2O



AAS yöntemiyle ölçülen değerleri ile konsantrasyon arasında çizilen kalibrasyon eğrilerinin doğru denklemleri, regresyon katsayıları, lineer çalışma aralıkları ve TPA (toplam pro-oksidan aktivite) değerleri hesaplandı (Eşitlik 3.3). QREPA katsayıları,

her bir bileşimin molar absorblama katsayılarının (ϵ) aynı deneysel şartlarda referans bileşik olan kuersetinin ϵ değerine oranlanarak hesaplandı (Eşitlik 3.4).

3.4.3. Karbonil Tayini Yöntemi

Bu yöntem, protein oksidasyonu sonucunda protein yapısında bulunan karbonil gruplarının 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile oluşturdukları dinitrofenilhidrazonların (DNP) absorbans değerlerinin 370 nm dalga boyunda ölçülmesi esasına dayanır [14,142].

Bir deney tüpü içerisine 0.2 M fosfat tamponu ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$) çözeltisi, 1 mM Cu(II) çözeltisi, yumurta akı çözeltisinden sırasıyla 1'er mL eklendi. Üzerine 1 mL 1 mM standart antioksidan çözeltisi ilave edildi ve toplam hacmi 6 mL'ye destile suyla tamamlandıktan sonra iyice çalkalandı. Tüpler ağzı kapalı olarak 30 dakika boyunca 37°C 'lik su banyosunda bekletildi. Bu süre sonunda 1'er mL DNPH çözeltisi ilave edilerek oda koşullarında 30 dakika daha bekletildi. Toplam 1 saat inkübasyon süresinin ardından her tüpe 1'er mL %10'luk TCA çözeltisi ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Santrifüj tüplerine alınan çözeltiler 10 dakika süre ile 4000 rpm hızla santrifüj edildi. Bu işlem sonrasında sulu fazlar atılarak protein çökeltileri destile su ile 3'er kere yıkandı. Protein çökeltileri üzerine 1'er mL pH 6.8 protein çözücü çözeltisi ilave edildi ve toplam hacim destile suyla 4.1 mL'ye tamamlanarak iyice çalkalandı. Adi süzgeç kağıdından süzülen çözeltilerin 370 nm'de absorbans değerleri ölçüldü.

1 mL pH 7.4 Fosfat Tamponu + 1 mL Cu^{2+} + 1 mL AOx + 1 mL protein + 2 mL H_2O

$\xrightarrow[30 \text{ dak inkübasyon}]{37^\circ\text{C}}$ 1 mL DNPH $\xrightarrow[30 \text{ dak inkübasyon}]{\text{oda sıcaklığı}}$ 1 mL TCA $\xrightarrow{10 \text{ dak santrifüj}}$

1 mL pH 6.8 Protein çözücü + 3.1 mL H_2O

$V_{\text{toplam}} = 4.1 \text{ mL}$ (3.6)

Karbonil Tayini yöntemiyle ölçülen absorbans değerleri ile konsantrasyon arasında çizilen kalibrasyon eğrilerinin doğru denklemleri, regresyon katsayıları, lineer çalışma aralıkları ve TPA (toplam pro-oksidan aktivite) değerleri hesaplandı (Eşitlik 3.3). QREPA katsayıları, her bir bileşimin molar absorblama katsayılarının (ϵ) aynı deneysel

şartlarda referans bileşik olan kuersetinin ϵ değerine oranlanarak hesaplandı (Eşitlik 3.4).

3.4.4. Sentetik Karışımların Pro-oksidan Aktivitelerinin Tayini

Polifenolik bileşiklerin %100 etanolde hazırlanmış çözeltilerinden 1'er mL alınarak farklı kombinasyonlarda ikili karışımları hazırlandı. Bu sentetik karışımların beklenen ve deneysel ölçülen pro-oksidan aktiviteleri modifiye CUPRAC, AAS ve Karbonil Tayini yöntemleri uygulanarak mM kuersetin eşdeğeri cinsinden Eşitlik 3.7 ve 3.3'e göre hesaplandı.

$$\text{Beklenen Aktivite} = \frac{(A_{AOx_1} + A_{AOx_2})}{\epsilon_{QR}} \times \frac{\text{Toplam hacim}}{\text{Alınan hacim}} \times 10^3 \quad (3.7)$$

Beklenen aktivite eşitliğinde kullanılan absorbans değeri, karışımı oluşturan antioksidan bileşiklerin tek başlarına bu yöntemlerin uygulanması sonucunda sahip oldukları absorbans değerlerinin toplamıdır.

3.4.5. Bitki Örneklerine Rozmarinik Asid (ROS) ve Kafeik Asid (CFA) Standart Katkısı Yapılması

Bölüm 3.3'te belirtilen şekilde hazırlanan adaçayı, yeşil çay, mercanköşk ve nane ekstralarının 1 mL'si üzerine 1 mL 1 mM rozmarinik asid veya 1 mL 1 mM kafeik asid çözeltileri ilave edilerek Modifiye CUPRAC yöntemi uygulandı. Katkılı örneklerin beklenen ve deneysel olarak ölçülen pro-oksidan aktiviteleri mol QR g^{-1} cinsinden sırasıyla Eşitlik 3.8 ve Eşitlik 3.9'a göre hesaplanmıştır.

$$\text{Beklenen Aktivite} = \frac{(A_{AOx_1} + A_{AOx_2})}{\epsilon_{QR}} \times \frac{\text{Toplam hacim}}{\text{Alınan hacim}} \times \frac{\text{Ekstre hacmi}}{\text{g bitki}} \quad (3.8)$$

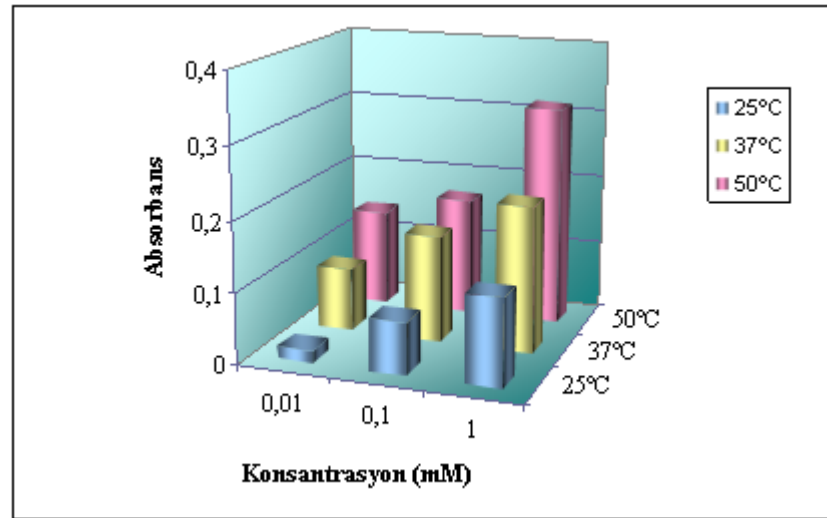
$$\text{Deneysel Ölçülen Aktivite} = \frac{\text{Absorbans}}{\epsilon_{QR}} \times \frac{\text{Toplam hacim}}{\text{Alınan hacim}} \times \frac{\text{Ekstre hacmi}}{\text{g bitki}} \quad (3.9)$$

4. BULGULAR

4.1. OPTİMUM DENEY KOŞULLARININ BELİRLENMESİ

4.1.1. Sıcaklık Çalışması

Kuersetin bileşiğinin 10^{-3} M, 10^{-4} M ve 10^{-5} M konsantrasyonlarında Modifiye CUPRAC yöntemine göre 25°C, 37°C ve 50°C sıcaklıklarda elde edilen sonuçları Şekil 4.1'de görülmektedir. Bu değerlere göre konsantrasyon ve sıcaklık artışı ile doğru orantılı olarak absorbans değerlerinde de belirgin artışlar olmuştur. Yüksek sıcaklıklarda proteinin yapısal bozunmaları dikkate alınarak, 25°C çalışma sıcaklığı olarak belirlenmiştir.

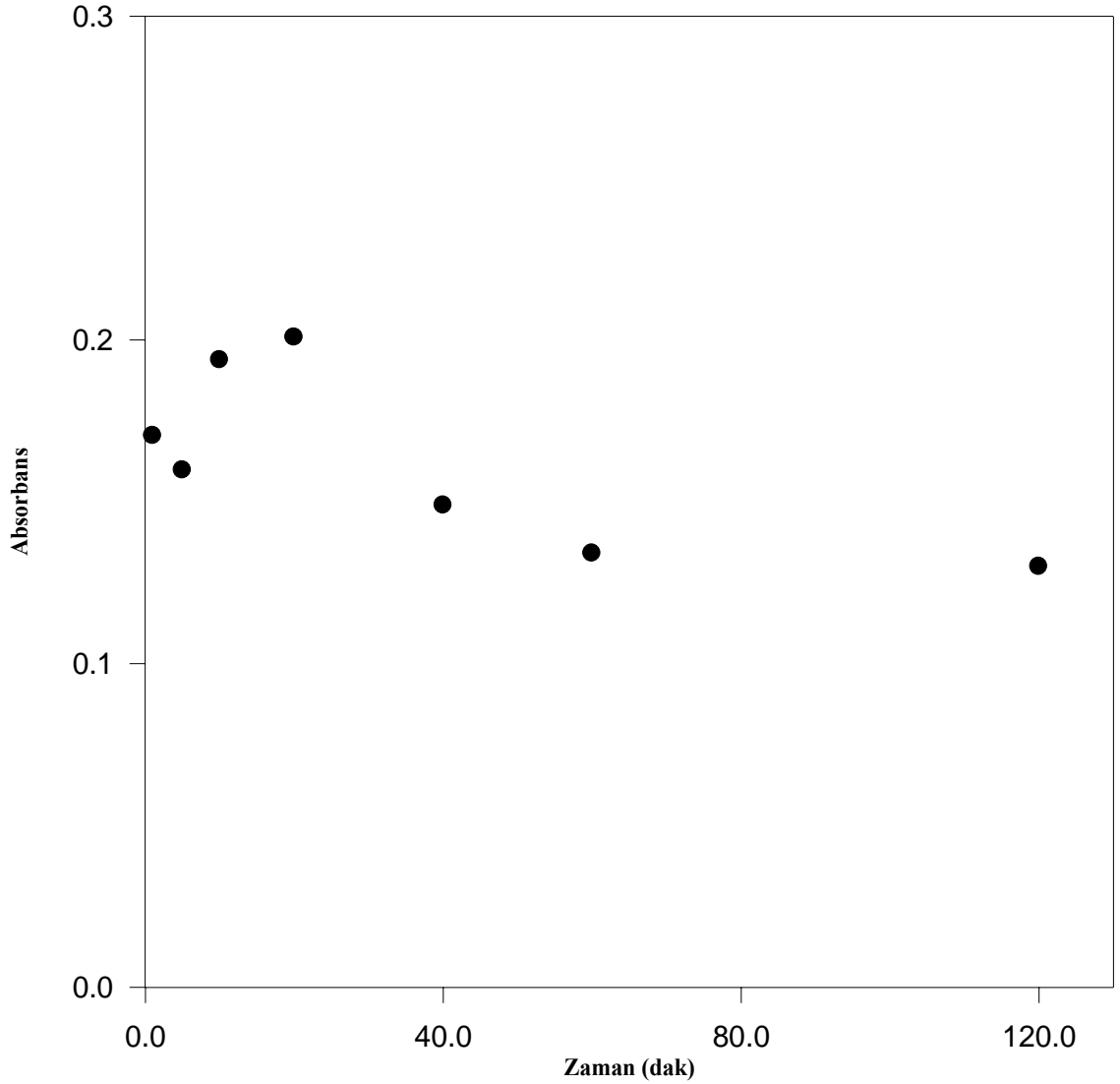


Şekil 4.1: Kuersetin bileşiği kullanılarak yapılan sıcaklık çalışması

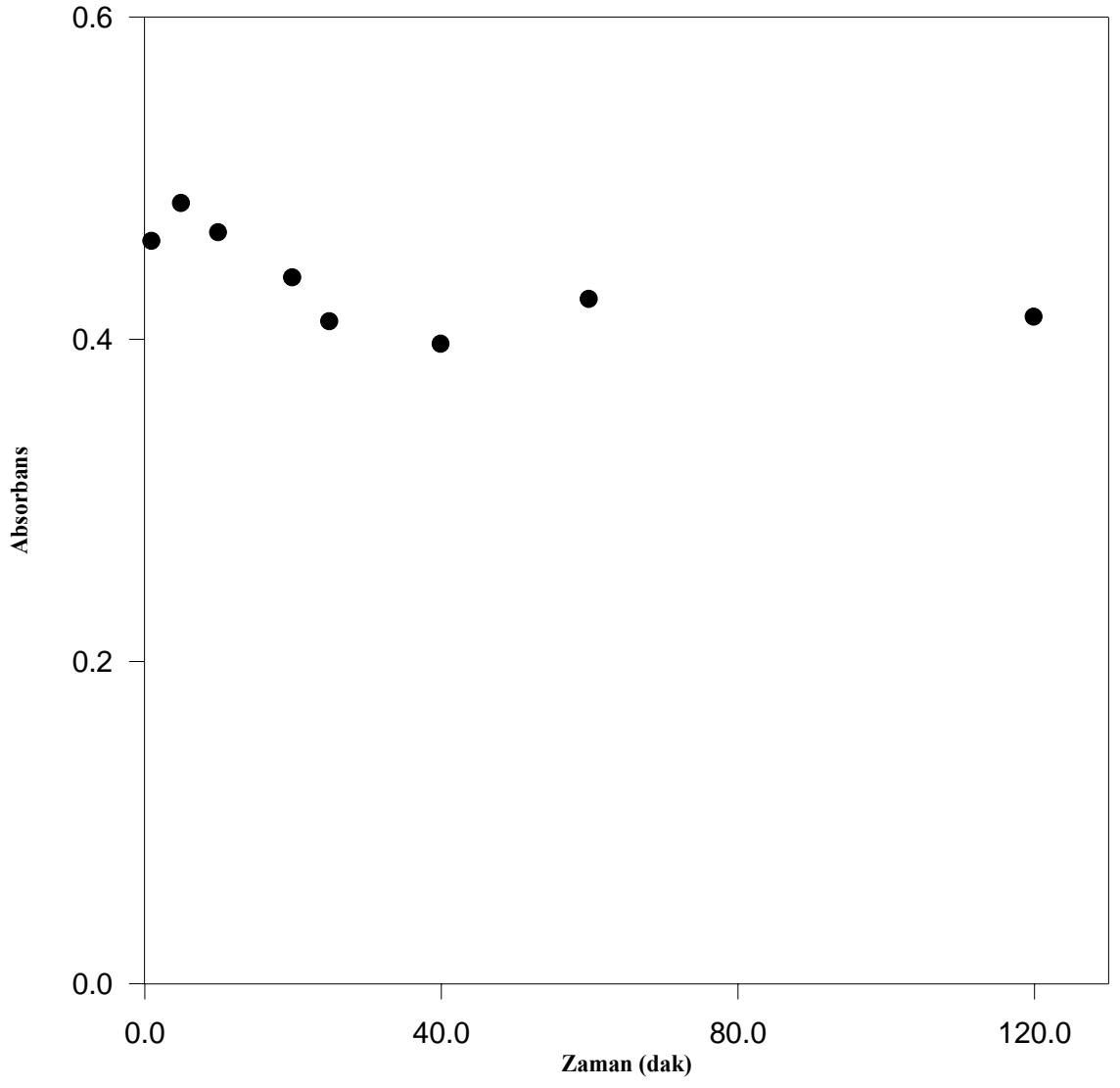
4.1.2. Zaman Çalışması

Kuersetin bileşiğinin 10^{-3} M konsantrasyonunda Modifiye CUPRAC yöntemine göre farklı inkübasyon süreleri sonucunda elde edilen sonuçlar Şekil 4.2'de görülmektedir. Bu değerlere göre, absorbans değeri belirli bir süre artmakta, maksimum absorpsiyondan sonra artan süre ile orantılı olarak azalmakta ve bir süre sonra

sabitlenmektedir. Bu çalışma sonucunda normal CUPRAC yönteminde olduğu gibi maksimum absorbans değerine 30 dakika sonra ulaşıldığından, bu değer optimum çalışma süresi olarak kabul edilmiştir. Gallik asid bileşiğinin kuersetin bileşiğinden farklı olarak hızlı reaksiyon verdiği, 5 dakika vortekste karıştırma işleminden sonra reaksiyonun tamamlandığı ve artan süre ile absorbans değerlerinde pek fazla bir değişim olmadığı Şekil 4.3'te görülmektedir. Yapılan zaman çalışması sonucunda kuersetin bileşiği için reaksiyon 30 dakikada tamamlanırken, gallik asid bileşiğinde reaksiyonun hızlı gerçekleşmesi sebebiyle inkübasyonun ilk dakikalarında maksimuma ulaşılmaktadır. Bu sonuçlara bakıldığında, yavaş reaksiyon veren antioksidan bileşikler göz önünde bulundurularak optimum inkübasyon süresi 30 dakika olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.2: Kuersetin bileşiği kullanılarak yapılan zaman çalışması



Şekil 4.3: Gallik asid bileşiği kullanılarak yapılan zaman çalışması

4.2. POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN PRO-OKSİDAN AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

4.2.1. Polifenolik Bileşiklerin Modifiye CUPRAC, AAS ve Karbonil Tayini Yöntemlerine Göre Molar Absorplama Katsayıları, Lineer Çalışma Aralıkları ve Korelasyon Katsayılarının Belirlenmesi

Mutlak EtOH çözücü ortamında, 10^{-3} M, $5,10^{-4}$ M, 10^{-4} M ve 10^{-5} M derişimlerdeki antioksidan bileşiklerin (gallik asid, rozmarinik asid, kafeik asid, kateşin, epikateşin, kuersetin, askorbik asid, α -tokoferol, troloks) Modifiye CUPRAC, AAS ve Karbonil Tayini yöntemlerine göre molar konsantrasyon-absorbans arasındaki kalibrasyon doğru denklemleri hesaplanarak korelasyon katsayıları (r), molar absorplama katsayıları (ϵ) ve lineer çalışma aralıkları tespit edilmiştir (Tablo 4.1, 4.2 ve 4.3). Naringin ve kumarik asid bileşikleri Modifiye CUPRAC, AAS ve Karbonil Tayini yöntemlerine cevap vermektedir. Ancak deneysel veriler tekrarlanabilir olmadığından lineer olarak tayin edilebildiği konsantrasyon aralığı belirlenememiştir. Epigallokateşin gallat bileşiğinin ise Karbonil Tayini yöntemine göre lineer olarak tayin edilebildiği konsantrasyon aralığı belirlenebilmesine karşın Modifiye CUPRAC ve AAS yöntemlerine göre lineer çalışma aralıkları tespit edilememiştir. Bu nedenle bu bileşiklerin molar absorplama katsayıları (ϵ) ile lineer çalışma aralıkları hesaplanamamıştır ve veriler tablolarda (Tablo 4.1, 4.2 ve 4.3) gösterilmemiştir.

Tablo 4.1: Mutlak EtOH çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin Modifiye CUPRAC yöntemi verileri

Polifenolik Bileşikler	Doğru Denklemi	ϵ	Lineer Aralık (M)
Basit Fenolik Asidler			
Gallik asid (GA)	$y = 447,12c + 0,1133$ $r = 0,9632$	447,12	$1,04 \times 10^{-4} - 2,30 \times 10^{-3}$
Hidroksisinnamik asidler			
Rozmarinik asid (ROS)	$y = 228,77c + 0,0766$ $r = 0,6862$	228,77	$3,64 \times 10^{-4} - 4,65 \times 10^{-3}$
Kafeik asid (CFA)	$y = 173,31c + 0,0849$ $r = 0,9181$	173,31	$4,33 \times 10^{-4} - 6,09 \times 10^{-3}$
<i>p</i> -Kumarik asid (COU)	-	-	-
Flavanoller			
(+)Kateşin (CT)	$y = 342,03c + 0,0782$ $r = 0,9446$	342,03	$2,39 \times 10^{-4} - 3,10 \times 10^{-3}$
(-)Epikateşin (EC)	$y = 388,26c + 0,0907$ $r = 0,9343$	388,26	$1,78 \times 10^{-4} - 2,70 \times 10^{-3}$
(-)Epigallokateşin gallat (EGCG)	-	-	-
Flavonoller			
Kuersetin (QR)	$y = 346,67c + 0,0716$ $r = 0,9582$	346,67	$2,55 \times 10^{-4} - 3,08 \times 10^{-3}$
Flavononlar			
Naringin (NG)	-	-	-
Diğerleri			
Askorbik asid (AA)	$y = 120,18c + 0,0456$ $r = 0,9884$	120,18	$9,52 \times 10^{-4} - 9,11 \times 10^{-3}$
α -Tokoferol (α -Toc)	$y = 276,77c + 0,0435$ $r = 0,9830$	276,77	$4,21 \times 10^{-4} - 3,96 \times 10^{-3}$
Troloks (TR)	$y = 204,83c + 0,0491$ $r = 0,9789$	204,83	$5,41 \times 10^{-4} - 5,33 \times 10^{-3}$

Tablo 4.2: Mutlak EtOH çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin AAS yöntemi verileri

Polifenolik Bileşikler	Doğru Denklemi	ϵ	Lineer Aralık (M)
Basit Fenolik Asidler			
Gallik asid	$y = 666,37c + 0,1400$ $r = 0,8919$	666,37	$3,00 \times 10^{-5} - 1,50 \times 10^{-3}$
Hidroksisinnamik asidler			
Rozmarinik asid	$y = 392,45c + 0,1495$ $r = 0,7781$	392,45	$2,67 \times 10^{-5} - 2,52 \times 10^{-3}$
Kafeik asid	$y = 286,62c + 0,0979$ $r = 0,9341$	286,62	$2,17 \times 10^{-4} - 3,64 \times 10^{-3}$
<i>p</i> -Kumarik asid	-	-	-
Flavanoller			
(+)Kateşin	$y = 424,05c + 0,1123$ $r = 0,9373$	424,05	$1,12 \times 10^{-4} - 2,42 \times 10^{-3}$
(-)Epikateşin	$y = 432,36c + 0,1578$ $r = 0,8982$	432,36	$5,09 \times 10^{-6} - 2,27 \times 10^{-3}$
(-)Epigallokateşin gallat	-	-	-
Flavonoller			
Kuersetin	$y = 530,13c + 0,0944$ $r = 0,9691$	530,13	$1,24 \times 10^{-4} - 1,97 \times 10^{-3}$
Flavononlar			
Naringin	-	-	-
Diğerleri			
Askorbik asid	$y = 200,26c + 0,0110$ $r = 0,9920$	200,26	$7,44 \times 10^{-4} - 5,64 \times 10^{-3}$
α -Tokoferol	$y = 314,12c + 0,0976$ $r = 0,9514$	314,12	$1,99 \times 10^{-4} - 3,32 \times 10^{-3}$
Troloks	$y = 227,33c + 0,0701$ $r = 0,9534$	227,33	$3,95 \times 10^{-4} - 4,71 \times 10^{-3}$

Tablo 4.3: Mutlak EtOH çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin Karbonil Tayini yöntemi verileri

Polifenolik Bileşikler	Doğru Denklemi	ϵ	Lineer Aralık (M)
Basit Fenolik Asidler			
Gallik asid	$y = 274,38c + 0,0876$ $r = 0,9891$	274,38	$2,64 \times 10^{-4} - 3,83 \times 10^{-3}$
Hidroksisinnamik asidler			
Rozmarinik asid	$y = 352,43c + 0,1374$ $r = 0,9866$	352,43	$6,41 \times 10^{-5} - 2,84 \times 10^{-3}$
Kafeik asid	$y = 135,60c + 0,0950$ $r = 0,7996$	135,60	$4,79 \times 10^{-4} - 7,71 \times 10^{-3}$
<i>p</i> -Kumarik asid	-	-	-
Flavanoller			
(+)Kateşin	$y = 248,01c + 0,0862$ $r = 0,9490$	248,01	$2,98 \times 10^{-4} - 4,25 \times 10^{-3}$
(-)Epikateşin	$y = 303,23c + 0,1318$ $r = 0,9356$	303,23	$9,30 \times 10^{-5} - 3,32 \times 10^{-3}$
(-)Epigallokateşin gallat	$y = 142,00c + 0,0836$ $r = 0,9918$	142,00	$5,38 \times 10^{-4} - 7,44 \times 10^{-3}$
Flavonoller			
Kuersetin	$y = 463,06c + 0,0904$ $r = 0,9921$	463,06	$1,50 \times 10^{-4} - 2,27 \times 10^{-3}$
Flavononlar			
Naringin	-	-	-
Diğerleri			
Askorbik asid	$y = 96,91c + 0,0109$ $r = 0,9935$	96,91	$1,54 \times 10^{-4} - 1,16 \times 10^{-2}$
α -Tokoferol	$y = 135,93c + 0,0781$ $r = 0,9970$	135,93	$6,02 \times 10^{-4} - 7,81 \times 10^{-3}$
Troloks	$y = 71,05c + 0,0870$ $r = 0,8553$	71,05	$1,03 \times 10^{-3} - 1,48 \times 10^{-2}$

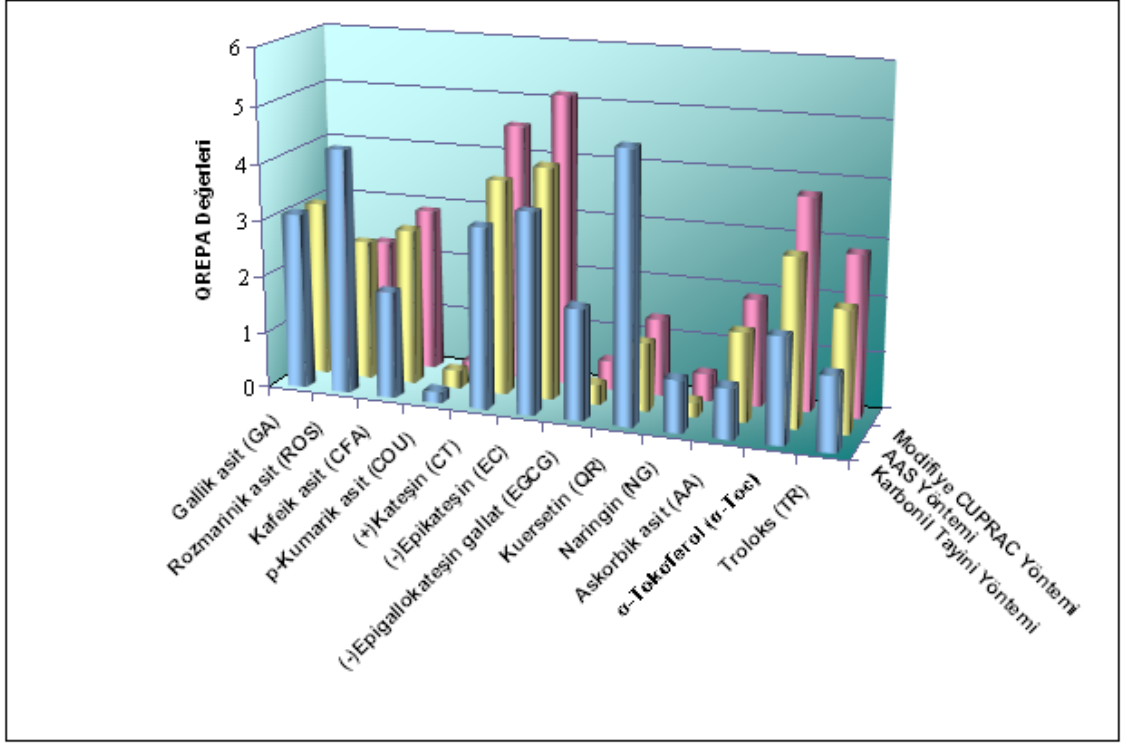
4.2.2. Polifenolik Bileşiklerin Modifiye CUPRAC, AAS ve Karbonil Tayini Yöntemlerine Göre TPA (Toplam Pro-oksidan Aktivite) Değerlerinin Belirlenmesi

Gallik asid, rozmarinik asid, kafeik asid, kumarik asid, kateşin, epikateşin, epigallokateşin gallat, kuersetin, naringin, askorbik asid, α -tokoferol ve troloksun 10^{-3} M, $5 \cdot 10^{-4}$ M, 10^{-4} M ve 10^{-5} M'lık çözeltilerine Modifiye CUPRAC, AAS ve Karbonil Tayini yöntemleri uygulanması sonucu elde edilen absorbans değerleri kullanılarak deneysel olarak ölçülen pro-oksidan aktivite değerleri Eşitlik 3.3'de belirtildiği şekilde hesaplandı.

Standart olarak belirlenen kuersetinin, mutlak etanolde hazırlanan çözeltilisine uygulanan Modifiye CUPRAC yöntemi verileri ile absorbans ve derişim arasında çizilen kalibrasyon grafiğinin eğiminden, molar absorplama katsayısı hesaplanmıştır (Tablo 4.1). Mutlak etanolde hazırlanan gallik asid, rozmarinik asid, kafeik asid, kateşin, epikateşin kuersetin, askorbik asid, α -tokoferol ve troloksun Modifiye CUPRAC, AAS ve Karbonil Tayini yöntemlerine göre molar absorplama katsayıları belirlenip, bu değerlerin kuersetinin molar absorplama katsayısına bölünmesiyle elde edilen (Eşitlik 3.4) kuersetin eşdeğeri pro-oksidan aktivite (QREPA) katsayıları hesaplanmıştır. Kumarik asid, epigallokateşin gallat ve naringin bileşiklerinin ise lineer doğru denklemleri oluşturulamadığından ϵ değerleri hesaplanamamıştır.

Tablo 4.4: İlgili polifenolik bileşiklerin 10^{-3} M konsantrasyonda TPA değerleri

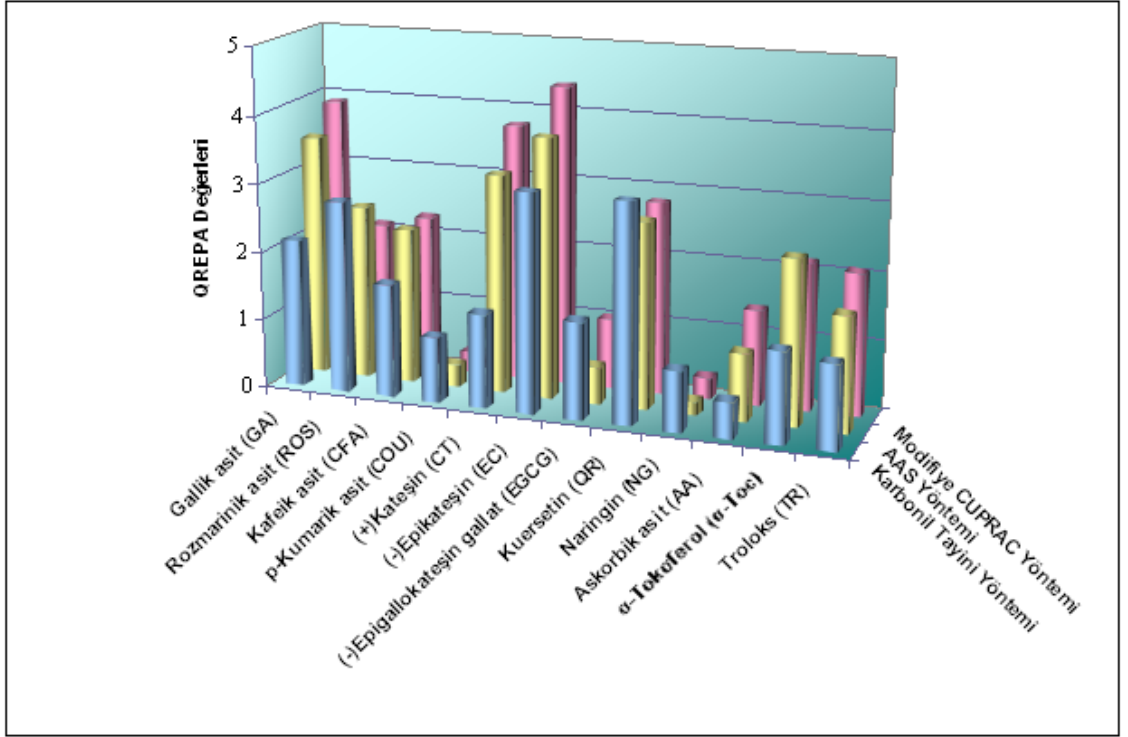
Polifenolik Bileşik	TPA_{Modifiye CUPRAC} (mM QR)	TPA_{AAS} (mM QR)	TPA_{Karbonil Tayini} (mM QR)
<i>Basit Fenolik Asidler</i>			
Gallik asid	3,41 ± 0,11	3,08 ± 0,22	3,11 ± 0,22
<i>Hidroksisinnamik asidler</i>			
Rozmarinik asid	2,24 ± 0,17	2,47 ± 0,14	4,30 ± 0,23
Kafeik asid	2,89 ± 0,19	2,75 ± 0,21	1,89 ± 0,01
<i>p</i> -Kumarik asid	0,22 ± 0,04	0,31 ± 0,08	0,21 ± 0,07
<i>Flavanoller</i>			
(+)Kateşin	4,55 ± 0,15	3,78 ± 0,06	3,19 ± 0,23
(-)Epikateşin	5,14 ± 0,13	4,09 ± 0,17	3,53 ± 0,01
(-)Epigallokateşin gallat	0,50 ± 0,05	0,36 ± 0,06	1,97 ± 0,14
<i>Flavonoller</i>			
Kuersetin	1,35 ± 0,01	1,19 ± 0,03	4,74 ± 0,04
<i>Flavononlar</i>			
Naringin	0,47 ± 0,04	0,25 ± 0,05	0,93 ± 0,02
<i>Diğerleri</i>			
Askorbik asid	1,89 ± 0,02	1,57 ± 0,16	0,90 ± 0,03
α -Tokoferol	3,76 ± 0,11	2,95 ± 0,27	1,87 ± 0,10
Troloks	2,85 ± 0,14	2,15 ± 0,02	1,31 ± 0,06



Şekil 4.4: İlgili polifenolik bileşiklerin 10⁻³ M konsantrasyonda Modifiye CUPRAC, AAS ve Karbonil Tayini yöntemlerine göre TPA değerleri

Tablo 4.5: İlgili polifenolik bileşiklerin $5,10^{-4}$ M konsantrasyonda TPA değerleri

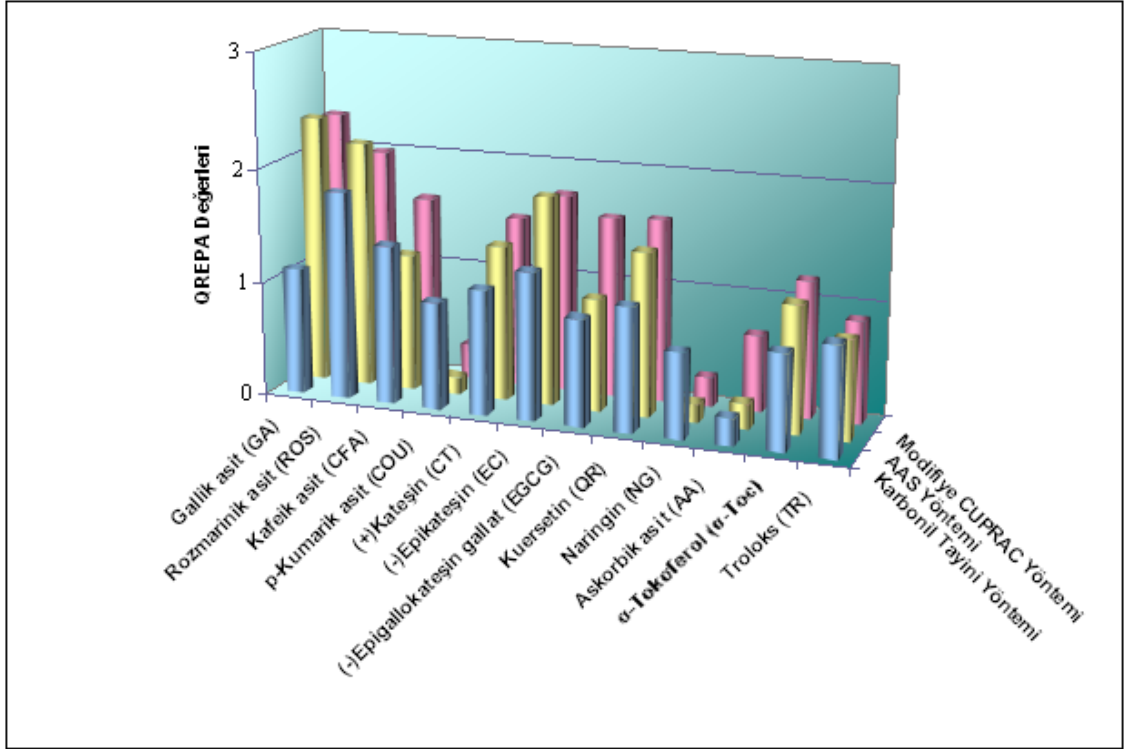
Polifenolik Bileşik	TPA_{Modifiye CUPRAC} (mM QR)	TPA_{AAS} (mM QR)	TPA_{Karbonil Tayini} (mM QR)
<i>Basit Fenolik Asitler</i>			
Gallik asit	3,91 ± 0,05	3,52 ± 0,01	2,17 ± 0,08
<i>Hidroksisinnamik asitler</i>			
Rozmarinik asit	2,11 ± 0,10	2,55 ± 0,003	2,80 ± 0,06
Kafeik asit	2,29 ± 0,17	2,28 ± 0,10	1,66 ± 0,17
<i>p</i> -Kumarik asit	0,30 ± 0,09	0,33 ± 0,001	0,96 ± 0,02
<i>Flavanoller</i>			
(+)Kateşin	3,77 ± 0,06	3,21 ± 0,02	1,37 ± 0,13
(-)Epikateşin	4,39 ± 0,11	3,80 ± 0,08	3,19 ± 0,17
(-)Epigallokateşin gallat	1,04 ± 0,02	0,54 ± 0,04	1,42 ± 0,16
<i>Flavonoller</i>			
Kuersetin	2,83 ± 0,002	2,73 ± 0,05	3,19 ± 0,07
<i>Flavononlar</i>			
Naringin	0,32 ± 0,05	0,21 ± 0,08	0,89 ± 0,09
<i>Diğerleri</i>			
Askorbik asit	1,39 ± 0,13	0,99 ± 0,06	0,53 ± 0,09
α -Tokoferol	2,14 ± 0,26	2,42 ± 0,23	1,33 ± 0,10
Troloks	2,08 ± 0,16	1,69 ± 0,08	1,24 ± 0,07



Şekil 4.5: İlgili polifenolik bileşiklerin $5,10^{-4}$ M konsantrasyonda Modifiye CUPRAC, AAS ve Karbonil Tayini yöntemlerine göre TPA değerleri

Tablo 4.6: İlgili polifenolik bileşiklerin 10^{-4} M konsantrasyonda TPA değerleri

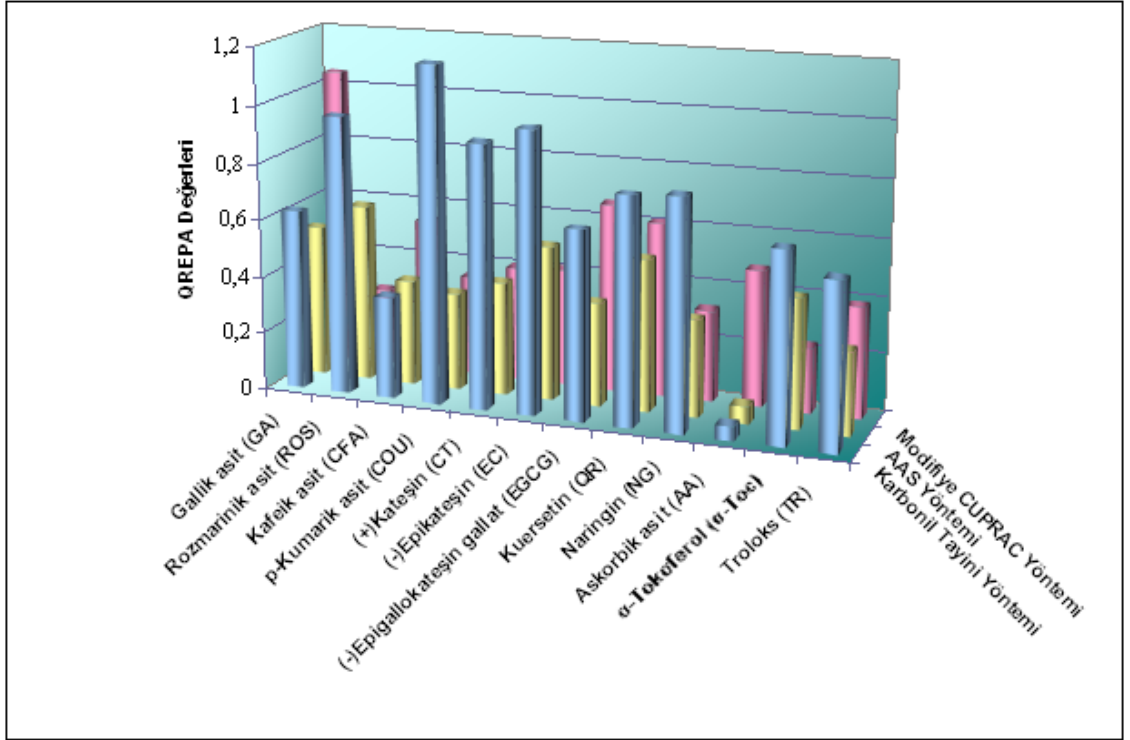
Polifenolik Bileşik	TPA_{Modifiye CUPRAC} (mM QR)	TPA_{AAS} (mM QR)	TPA_{Karbonil Tayini} (mM QR)
<i>Basit Fenolik Asitler</i>			
Gallik asit	2,29 ± 0,17	2,34 ± 0,10	1,11 ± 0,14
<i>Hidroksisinnamik asitler</i>			
Rozmarinik asit	1,99 ± 0,06	2,15 ± 0,03	1,82 ± 0,10
Kafeik asit	1,60 ± 0,07	1,20 ± 0,09	1,39 ± 0,10
<i>p</i> -Kumarik asit	0,31 ± 0,12	0,15 ± 0,02	0,94 ± 0,001
<i>Flavanoller</i>			
(+)Kateşin	1,50 ± 0,02	1,36 ± 0,14	1,10 ± 0,21
(-)Epikateşin	1,74 ± 0,20	1,83 ± 0,14	1,29 ± 0,01
(-)Epigallokateşin gallat	1,58 ± 0,04	0,98 ± 0,09	0,94 ± 0,11
<i>Flavonoller</i>			
Kuersetin	1,60 ± 0,02	1,44 ± 0,08	1,09 ± 0,04
<i>Flavononlar</i>			
Naringin	0,26 ± 0,10	0,17 ± 0,15	0,75 ± 0,005
<i>Diğerleri</i>			
Askorbik asit	0,68 ± 0,09	0,22 ± 0,01	0,24 ± 0,06
α -Tokoferol	1,20 ± 0,09	1,12 ± 0,02	0,84 ± 0,16
Troloks	0,90 ± 0,001	0,87 ± 0,14	0,96 ± 0,04



Şekil 4.6: İlgili polifenolik bileşiklerin 10^{-4} M konsantrasyonda Modifiye CUPRAC, AAS ve Karbonil Tayini yöntemlerine göre TPA değerleri

Tablo 4.7: İlgili polifenolik bileşiklerin 10^{-5} M konsantrasyonda TPA değerleri

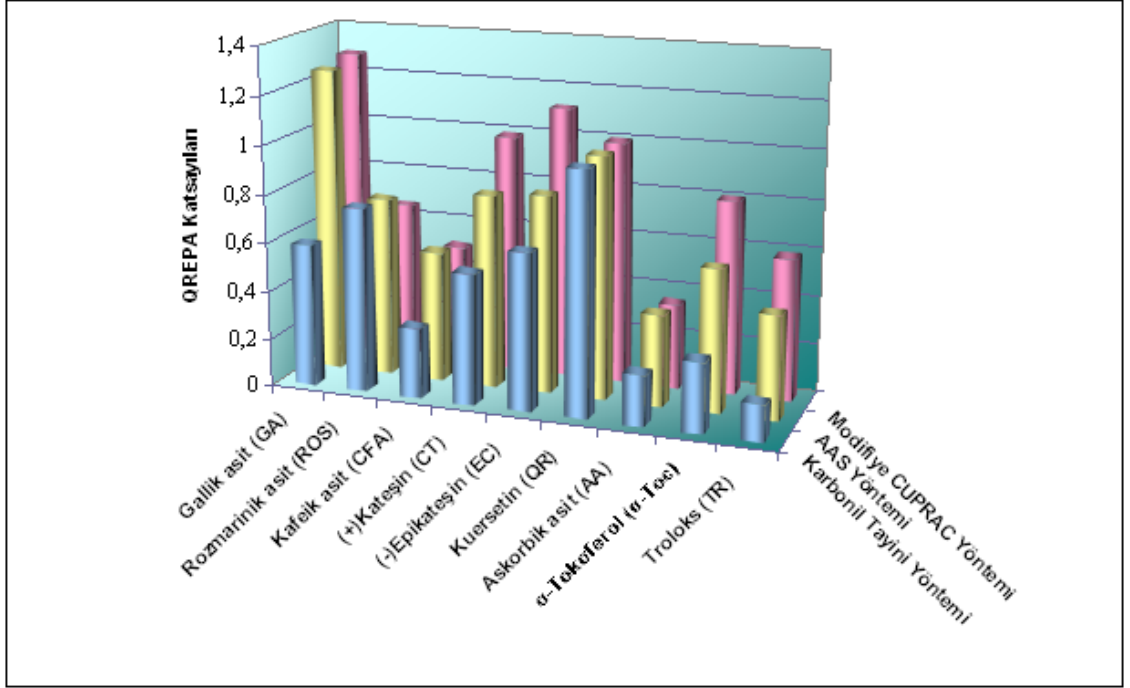
Polifenolik Bileşik	TPA_{Modifiye CUPRAC} (mM QR)	TPA_{AAS} (mM QR)	TPA_{Karbonil Tayini} (mM QR)
<i>Basit Fenolik Asidler</i>			
Gallik asid	1,05 ± 0,07	0,53 ± 0,04	0,63 ± 0,04
<i>Hidroksisinnamik asidler</i>			
Rozmarinik asid	0,27 ± 0,11	0,62 ± 0,05	0,97 ± 0,05
Kafeik asid	0,54 ± 0,01	0,37 ± 0,06	0,36 ± 0,21
<i>p</i> -Kumarik asid	0,35 ± 0,06	0,34 ± 0,06	1,17 ± 0,04
<i>Flavanoller</i>			
(+)Kateşin	0,40 ± 0,07	0,40 ± 0,05	0,92 ± 0,06
(-)Epikateşin	0,41 ± 0,35	0,54 ± 0,08	0,98 ± 0,08
(-)Epigallokateşin gallat	0,66 ± 0,03	0,36 ± 0,07	0,66 ± 0,05
<i>Flavonoller</i>			
Kuersetin	0,61 ± 0,06	0,53 ± 0,01	0,79 ± 0,07
<i>Flavononlar</i>			
Naringin	0,32 ± 0,08	0,34 ± 0,04	0,80 ± 0,07
<i>Diğerleri</i>			
Askorbik asid	0,48 ± 0,12	0,06 ± 0,04	0,05 ± 0,09
α -Tokoferol	0,23 ± 0,01	0,45 ± 0,08	0,66 ± 0,002
Troloks	0,39 ± 0,05	0,29 ± 0,01	0,58 ± 0,03



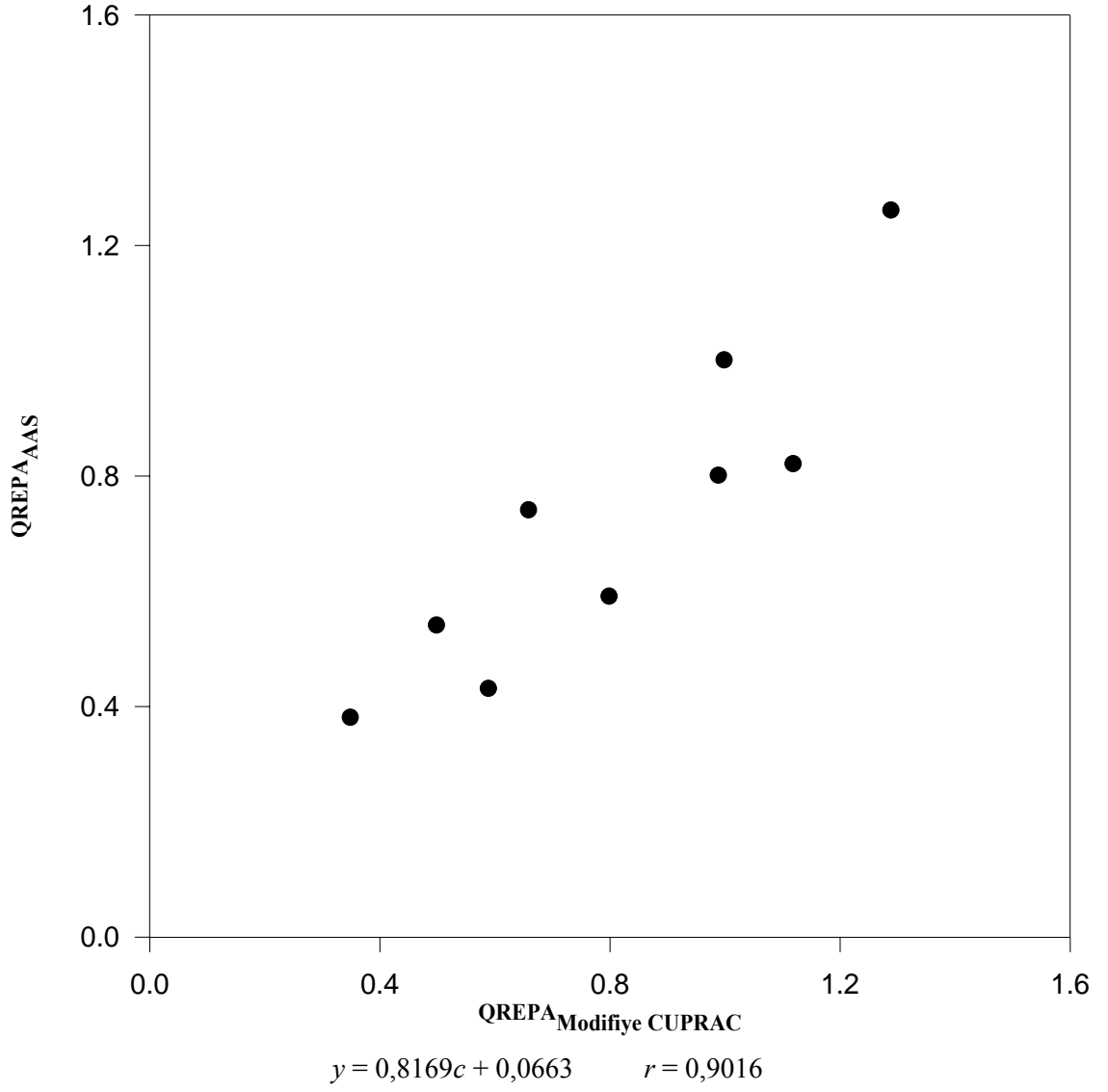
Şekil 4.7: İlgili polifenolik bileşiklerin 10^{-5} M konsantrasyonda Modifiye CUPRAC, AAS ve Karbonil Tayini yöntemlerine göre TPA değerleri

Tablo 4.8: İlgili polifenolik bileşiklerin QREPA (Kuersetin Eşdeğeri Pro-oksidan Aktivite) katsayıları

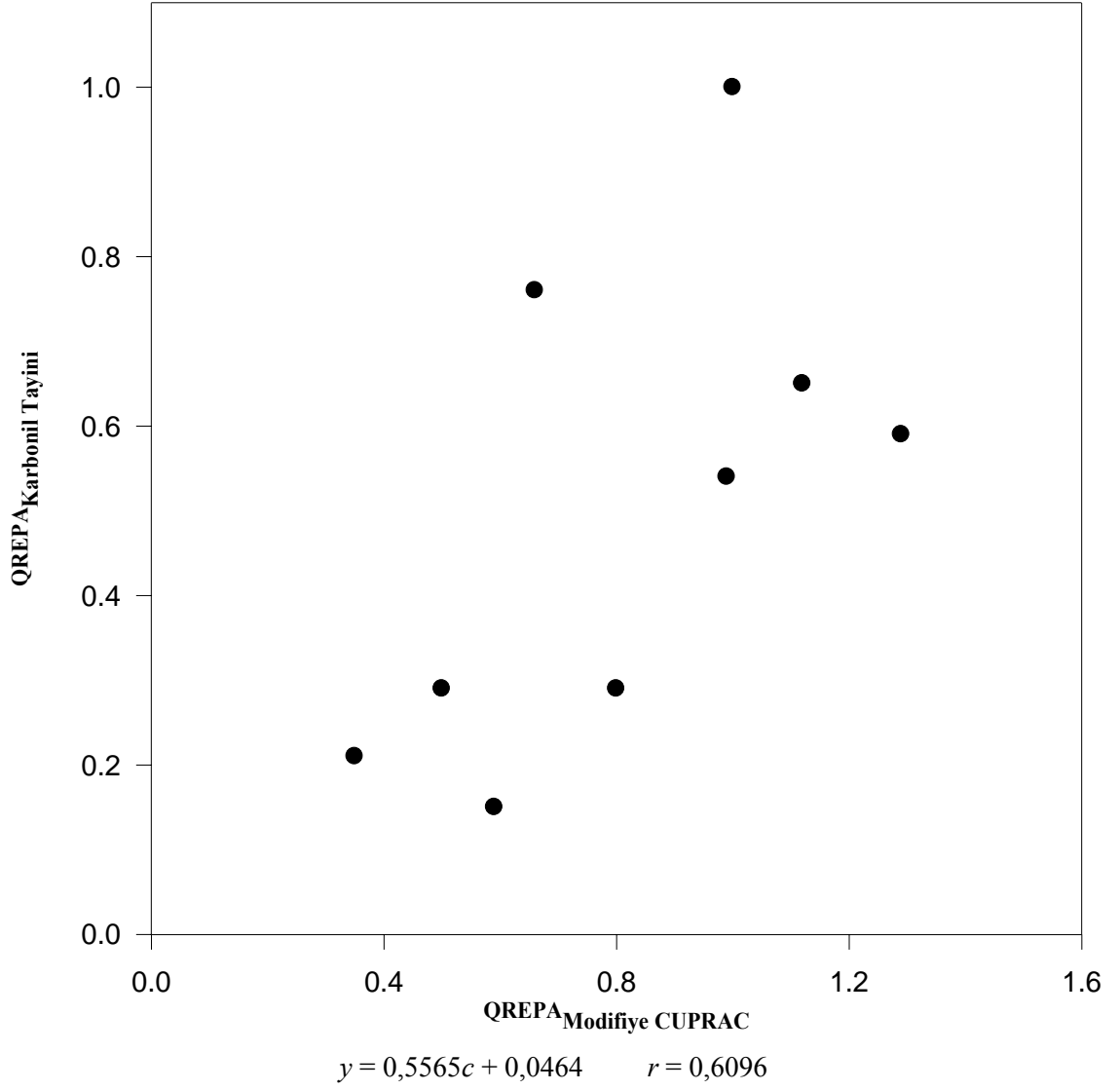
Polifenolik Bileşik	QREPA _{Modifiye CUPRAC}	QREPA _{AAS}	QREPA _{Karbonil Tayini}
<i>Basit Fenolik Asidler</i>			
Gallik asid	1,29	1,26	0,59
<i>Hidroksisinnamik asidler</i>			
Rozmarinik asid	0,66	0,74	0,76
Kafeik asid	0,50	0,54	0,29
<i>p</i> -Kumarik asid	-	-	-
<i>Flavanoller</i>			
(+)Kateşin	0,99	0,80	0,54
(-)Epikateşin	1,12	0,82	0,65
(-)Epigallokateşin gallat	-	-	0,31
<i>Flavonoller</i>			
Kuersetin	1,0	1,0	1,0
<i>Flavononlar</i>			
Naringin	-	-	-
<i>Diğerleri</i>			
Askorbik asid	0,35	0,38	0,21
α -Tokoferol	0,80	0,59	0,29
Troloks	0,59	0,43	0,15



Şekil 4.8: İlgili polifenolik bileşiklerin Modifiye CUPRAC, AAS ve Karbonil Tayini yöntemlerine göre QREPA katsayıları



Şekil 4.9: Polifenolik bileşiklerin QREPA katsayılarının Modifiye CUPRAC ile AAS yöntemleri korelasyonu



Şekil 4.10: Polifenolik bileşiklerin QREPA katsayılarının Modifiye CUPRAC ile Karbonil Tayini yöntemleri korelasyonu

4.2.3. Polifenolik Bileşiklerin İkili Sentetik Karışımlarının Beklenen ve Deneysel Olarak Ölçülen Pro-oksidan Aktiviteleri

Polifenolik bileşiklerin (gallik asid, rozmarinik asid, kafeik asid, kumarik asid, kateşin, epikateşin, kuersetin, askorbik asit, α -tokoferol, troloks) mutlak etanol çözücü ortamında 10^{-3} M, $5,10^{-4}$ M, 10^{-4} M ve 10^{-5} M derişimlerinde hazırlanmış çözeltilerinden 1'er mL alınarak farklı kombinasyonlarda ikili karışımları hazırlandı. Bu karışım çözeltilerine Modifiye CUPRAC, AAS ve Karbonil Tayini yöntemleri uygulanarak beklenen ve deneysel olarak ölçülen pro-oksidan aktiviteleri mM kuersetin ekivalenti cinsinden Eşitlik 3.7 ve 3.3'e göre hesaplandı. α -Tokoferol ile kumarik asid, kuersetin ile rozmarinik asid ve gallik asid ile epikateşin ikili karışımlarına Karbonil Tayini yöntemi uygulanması sonucu süzme ve filtreden geçirme işlemleriyle giderilemeyen bulanıklık oluştuğundan pro-oksidan aktiviteleri ölçülemedi. İkili sentetik karışımların Modifiye CUPRAC yöntemi ile bulunan TPA değerlerinin ayrı ayrı AAS ve Karbonil Tayini yöntemleriyle bulunan TPA değerleri ile karşılaştırıldığında, Modifiye CUPRAC yöntemi ile AAS yöntemi arasında daha uyumlu sonuçlar elde edildiği Tablo 4.11'de görülmektedir.

Tablo 4.9: İlgili polifenolik bileşiklerin ikili sentetik karışımlarının TPA değerleri

Polifenolik Bileşik	Konsantrasyon	Modifiye CUPRAC		AAS		Karbonil Tayini	
		Ölçülen (mM)	Beklenen (mM)	Ölçülen (mM)	Beklenen (mM)	Ölçülen (mM)	Beklenen (mM)
1 mL Kuersetin 1 mL Kateşin	10^{-3} M	2,42	2,95	1,78	2,49	1,47	3,97
	$5 \cdot 10^{-4}$ M	2,43	3,30	2,04	2,97	1,11	2,28
	10^{-4} M	2,28	1,55	1,68	1,40	1,79	1,10
	10^{-5} M	1,88	0,50	1,30	0,46	1,70	0,85
1 mL Gallik asid 1 mL Kafeik asid	10^{-3} M	2,72	3,15	1,95	2,92	2,04	2,50
	$5 \cdot 10^{-4}$ M	2,77	3,10	2,16	2,90	1,52	1,92
	10^{-4} M	2,36	1,94	1,98	1,77	1,27	1,25
	10^{-5} M	2,14	0,80	1,58	0,45	1,30	0,49
1 mL Epikateşin 1 mL Rozmarinik asid	10^{-3} M	2,99	3,69	1,27	3,28	0,76	3,91
	$5 \cdot 10^{-4}$ M	2,49	3,25	1,42	3,41	0,92	2,99
	10^{-4} M	2,09	1,86	1,11	1,99	1,07	1,56
	10^{-5} M	1,77	0,34	1,10	0,58	0,85	0,98
1 mL Trolöks 1 mL Askorbik asid	10^{-3} M	2,18	2,37	1,94	1,86	1,14	1,13
	$5 \cdot 10^{-4}$ M	2,16	1,73	1,45	1,34	0,90	0,89
	10^{-4} M	0,84	0,79	0,67	0,54	0,66	0,60
	10^{-5} M	0,29	0,44	0,25	0,17	0,57	0,31
1 mL α -Tokoferol 1 mL Kumarik asid	10^{-3} M	0,68	1,99	1,71	1,63	-	-
	$5 \cdot 10^{-4}$ M	2,27	1,22	1,74	1,37	-	-
	10^{-4} M	2,78	0,75	1,41	0,63	-	-
	10^{-5} M	2,27	0,29	1,49	0,39	-	-
1 mL Kuersetin 1 mL Rozmarinik asid	10^{-3} M	2,76	1,79	1,71	1,83	1,53	4,52
	$5 \cdot 10^{-4}$ M	2,65	2,47	1,96	2,64	1,13	3,00
	10^{-4} M	2,76	1,80	1,52	1,79	-	-
	10^{-5} M	2,67	0,44	1,40	0,58	-	-
1 mL Gallik asid 1 mL Epikateşin	10^{-3} M	2,69	4,27	1,85	3,59	2,10	3,32
	$5 \cdot 10^{-4}$ M	2,87	4,15	2,05	3,66	1,67	2,68
	10^{-4} M	2,82	2,01	1,97	2,08	-	-
	10^{-5} M	2,39	0,73	1,53	0,54	-	-

Tablo 4.10: İkili sentetik karışımların ölçülen ve beklenen TPA değerleri arasındaki lineer doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları

Polifenolik Bileşik	Modifiye CUPRAC	AAS	Karbonil Tayini
QR + CT	$y = 4,7030c - 8,5185$ $r = 0,9363$	$y = 3,5304c - 4,1718$ $r = 0,9628$	$y = -1,6020c + 4,7835$ $r = -0,3778$
GA + CFA	$y = 3,6709c - 6,9205$ $r = 0,9883$	$y = 4,2600c - 6,1586$ $r = 0,8856$	$y = 2,1086c - 1,6915$ $r = 0,8668$
EC + ROS	$y = 2,7309c - 4,0916$ $r = 0,9506$	$y = 7,4194c - 6,7738$ $r = 0,8503$	$y = -5,2802c + 7,1121$ $r = -0,5178$
TR + AA	$y = 0,8821c + 0,1263$ $r = 0,9553$	$y = 1,0053c - 0,1057$ $r = 0,9995$	$y = 1,3543c - 0,3746$ $r = 0,9762$
α -Toc + COU	$y = -0,6545c + 2,3716$ $r = -0,8229$	$y = 3,2640c - 4,1765$ $r = 0,9000$	-
QR + ROS	$y = 1,3431c - 2,0149$ $r = 0,0920$	$y = 3,1696c - 3,5119$ $r = 0,9121$	-
GA + EC	$y = 5,4669c - 11,9296$ $r = 0,6842$	$y = 5,1582c - 7,0751$ $r = 0,7982$	-

Tablo 4.11: İkili sentetik karışımların TPA değerleri kullanılarak Modifiye CUPRAC yönteminin ayrı ayrı AAS ve Karbonil Tayini yöntemleriyle karşılaştırılması sonucu elde edilen lineer doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları

Polifenolik Bileşik	CUPRAC-AAS	CUPRAC-Karbonil
QR + CT	$y = 1,1162c - 0,8142$ $r = 0,9371$	$y = -0,7071c + 3,1103$ $r = -0,6007$
GA + CFA	$y = 0,6854c + 0,2058$ $r = 0,8456$	$y = 0,8456c - 0,5795$ $r = 0,7128$
EC + ROS	$y = 0,1904c + 0,7803$ $r = 0,6619$	$y = -0,1225c + 1,1862$ $r = -0,4931$
TR + AA	$y = 0,7709c + 0,0233$ $r = 0,9670$	$y = 0,2483c + 0,4780$ $r = 0,9241$
α -Toc + COU	$y = -0,1143c + 1,8160$ $r = -0,6413$	-
QR + ROS	$y = -1,1863c + 4,8623$ $r = -0,2831$	-
GA + EC	$y = 1,0598c - 1,0034$ $r = 0,9988$	-

4.2.4. Bitki Örneklerine Rozmarinik Asid ve Kafeik Asid Standart Katkıları Yapılması

Bölüm 3.3'te belirtildiği şekilde %80 MeOH ortamında hazırlanan ada çayı, yeşil çay, mercanköşk ve nane ekstrelerinin 1 mL'si üzerine ayrı ayrı 1 mL 1 mM rozmarinik asid veya 1 mL 1 mM kafeik asid çözeltileri ilave edilerek Modifiye CUPRAC yöntemi uygulandı. Katkılı örneklerin beklenen ve deneysel ölçülen pro-oksidan aktiviteleri mol QR g⁻¹ cinsinden sırasıyla Eşitlik 3.8 ve Eşitlik 3.9'a göre hesaplandı. İlgili veriler Tablo 4.12'de görülmektedir.

Tablo 4.12: Bitki örneklerine Modifiye CUPRAC yöntemi uygulanması sonucunda ölçülen ve beklenen pro-oksidan aktivite değerleri

Bitki Örneklerine Standart Katkı	Beklenen Aktivite (mol QR g ⁻¹)	Ölçülen Aktivite (mol QR g ⁻¹)
Adaçayı + ROS	0,058 ^a + 0,056 ^b = 0,114	0,123 ± 0,04
Adaçayı + CFA	0,058 + 0,072 ^c = 0,130	0,102 ± 0,01
Yeşil çay + ROS	0,007 ^d + 0,056 = 0,063	0,070 ± 0,01
Yeşil çay + CFA	0,007 + 0,072 = 0,079	0,061 ± 0,01
Mercanköşk + ROS	0,018 ^e + 0,056 = 0,074	0,093 ± 0,01
Mercanköşk + CFA	0,018 + 0,072 = 0,090	0,095 ± 0,01
Nane + ROS	0,015 ^f + 0,056 = 0,071	0,103 ± 0,02
Nane + CFA	0,015 + 0,072 = 0,087	0,070 ± 0,01

a: Adaçayı örneğinin tek başına Modifiye CUPRAC yöntemine göre pro-oksidan aktivitesi

b: Rozmarinik asid örneğinin tek başına Modifiye CUPRAC yöntemine göre pro-oksidan aktivitesi

c: Kafeik asid örneğinin tek başına Modifiye CUPRAC yöntemine göre pro-oksidan aktivitesi

d: Yeşil çay örneğinin tek başına Modifiye CUPRAC yöntemine göre pro-oksidan aktivitesi

e: Mercanköşk örneğinin tek başına Modifiye CUPRAC yöntemine göre pro-oksidan aktivitesi

f: Nane örneğinin tek başına Modifiye CUPRAC yöntemine göre pro-oksidan aktivitesi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Pro-oksidadanlar lipidler, proteinler ve nükleik asitlerde oksidatif hasara sebep olan ve bunun sonucunda çeşitli patolojik olaylara veya hastalıklara yol açan toksik maddelerdir. Bu nedenle antioksidan aktiviteye sahip bileşiklerin belirli koşullar altındaki pro-oksidadan aktivitelerinin tayin edilmesi önem kazanmaktadır. Modifiye CUPRAC yöntemi uygulanarak tiyol grubu içeren proteinler varlığında polifenolik bileşiklerin ve bu bileşikleri içerebilecek gerçek örneklerin (şifalı bitkiler; adaçayı (*Salvia officinalis*), yeşil çay (*Camellia sinensis*), mercanköşk (*Origanum majorana*) ve nane (*Mentha*)) pro-oksidadan aktivitelerinin ölçülmesi bu çalışmanın temel amacını oluşturmaktadır. Polifenolik bileşiklerin tek başlarına, ikili sentetik karışımlarında ve bitki örneklerine standart katkıları sonucunda sahip oldukları mM kuersetin cinsinden TPA (Toplam Pro-oksidadan Aktivite) değerleri Eşitlik 3.3'te belirtildiği şekilde hesaplanmıştır. Modifiye CUPRAC, AAS ve Karbonil Tayini yöntemleri kullanılarak elde edilen bulgular karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan polifenolik antioksidanlar farklı sınıfları temsil edecek şekilde seçilmiştir. Bu bileşikler gallik asid (basit fenolik antioksidan), rozmarinik asid, kafeik asid, *p*-kumarik asid (hidroksisinnamik asidler), kateşin, epikateşin, epigallokateşin gallat (flavanol), kuersetin (flavonol), naringin (flavonon), askorbik asid, α -tokoferol ve troloktur (diğerleri).

Geliştirilen yöntemin prensibi; polifenolik bileşikler tarafından ortamdaki serbest bakır(II) iyonlarının bakır(I)'e indirgenerek proteine bağlanması ve inkübasyon ürününe neokuproin (Nc)-amonyum asetat (NH₄Ac) karışımı ilave edilerek Cu(I)-Nc kelatının oluşturulmasıdır. Oluşan Cu(I)-Nc kelatının 450 nm'de maksimum absorpsiyon yapmasından faydalanılarak polifenolik bileşiklerin pro-oksidadan aktiviteleri tayin edilmiştir. Başka bir ifadeyle, polifenolik bileşiklerin bakır(II) iyonlarını bakır(I)'e indirgerken bir yandan da ortamda bulunan oksijen ile bakır(I), Fenton tipi reaksiyon vererek serbest radikal oluşturur. Sonuçta açığa çıkan Cu(I) bir

yandan Fenton-tipi reaksiyonlara neden olurken diğer yandan kısmen hasar görmüş proteinlerin –SH gruplarına kuvvetli kovalent bağlarla bağlanır. Oluşan serbest radikaller protein gibi biyolojik makromoleküllere saldırarak, oksidatif hasara sebep olurlar. Bunun sonucunda, polifenolik bileşik miktarının artışıyla radikal oluşumu artacağından, pro-oksidan aktivite miktarında artış gözlenmesi beklenir. Elde edilen sonuçlar da bu açıklamayı destekler niteliktedir. AAS yöntemi, inkübasyon ürününe CUPRAC reaktifi yerine protein çözücü tamponu ilave edilerek oluşturulan çözeltide AAS ile bakır tayini yapılması esasına dayanmaktadır. Bundan dolayı geliştirilen yöntem ile AAS yöntemi arasında daha yüksek korelasyon olması beklenmektedir, çünkü her ikisi de proteinlere bağlanan Cu(I) miktarını ölçer. Nitekim yöntemler arası korelasyon incelendiğinde, Modifiye CUPRAC yöntemi ile AAS yöntemi arasındaki uyumun Modifiye CUPRAC yöntemi ile Karbonil Tayini yöntemi arasındakine oranla daha yüksek olduğu sırasıyla $r = 0,9016$ ve $r = 0,6096$ korelasyon katsayıları ile Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da görülmektedir. Modifiye CUPRAC ve AAS yöntemlerinden farklı olarak Karbonil Tayini yöntemi, proteinler üzerindeki ayrı bir oksidatif hasarı ölçmektedir.

1 mM derişiminde hazırlanan polifenolik bileşiklerin pro-oksidan aktiviteleri mM kuersetin eşdeğeri cinsinden değerlendirildiğinden, kuersetinin Modifiye CUPRAC, AAS ve Karbonil Tayini yöntemlerine göre sırasıyla Tablo 4.1, Tablo 4.2 ve Tablo 4.3'te bulunan verileri kullanılarak kalibrasyon denklemleri oluşturulmuştur. Pro-oksidan aktivitesi ölçülecek polifenolik bileşiğin 1 mM'lık çözeltisinin aktivitesine eşdeğer olan kuersetinin milimolar derişimi, QREPA (Kuersetin Eşdeğeri Pro-oksidan Aktivite) katsayısı olarak ifade edilmiştir. QREPA katsayıları antioksidan bileşiklerin molar absorplama katsayılarının (ϵ) kuersetinin ilgili koşullar altındaki ϵ değerine oranlanarak Eşitlik 3.4'te belirtildiği gibi hesaplanmıştır. İlgili katsayılar Tablo 4.8'de görülmektedir. Çalışılan polifenolik bileşiklere Modifiye CUPRAC yöntemi, AAS yöntemi ve Karbonil Tayini yöntemi uygulanarak belirlenen molar absorplama katsayıları (ϵ) ve lineer çalışma aralıkları, molar konsantrasyon-absorbans arasındaki kalibrasyon doğru denklemleri hesaplanarak elde edilmiştir. 10^{-3} M, $5,10^{-4}$ M, 10^{-4} M ve 10^{-5} M derişimlerde antioksidan maddelerin mM kuersetin cinsinden TPA değerleri Eşitlik 3.3'te belirtildiği şekilde hesaplanmıştır ve sırasıyla Tablo 4.4, Tablo 4.5, Tablo 4.6 ve Tablo 4.7'de görülmektedir.

Yapılan çalışmada Modifiye CUPRAC, AAS ve Karbonil Tayini yöntemleriyle elde edilen sonuçlar bazı bileşikler için değişiklik göstermiştir. Genel olarak geliştirilen Modifiye CUPRAC yönteminin AAS yöntemi uyumlu sonuçlar verirken, Karbonil Tayini yöntemi ile daha az uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. Örneğin; gallik asidin $QREPA_{\text{Modifiye-CUPRAC}}$ katsayısı 1,29 iken $QREPA_{\text{AAS}}$ 1,26, $QREPA_{\text{Karbonil Tayini}}$ 0,59 bulunmuştur. α -Tokoferolün Modifiye CUPRAC yöntemiyle $QREPA$ katsayısı 0,80, AAS yöntemiyle 0,59, Karbonil Tayini yöntemi ile 0,29 olarak hesaplanmıştır. Çalışılan antioksidanların üç yöntemle elde edilen $QREPA$ katsayıları Tablo 4.8'de verilmiş olmakla birlikte Şekil 4.5'te açık bir şekilde görülmektedir. Polifenolik bileşiklerin $QREPA_{\text{Modifiye-CUPRAC}}$ katsayılarına göre pro-oksidan aktivite sıralamaları gallik asid > epikateşin > kateşin > α -tokoferol > rozmarinik asid > troloks > kafeik asid > askorbik asid şeklindedir. $QREPA_{\text{AAS}}$ katsayılarına göre pro-oksidan aktivite sıralamaları gallik asid > epikateşin > kateşin > rozmarinik asid > α -tokoferol > kafeik asid > troloks > askorbik asid şeklindedir. Naringin, kumarik asid ve epigallokateşin gallat bileşiklerinin lineer olarak tayin edilebildiği konsantrasyon aralığı belirlenmemektedir. Bu nedenle doğru denklemleri hesaplanamadığından molar absorplama katsayıları belirlenmemiştir ve sıralamada yer almamaktadırlar. $QREPA_{\text{Karbonil Tayini}}$ katsayılarına göre pro-oksidan aktiviteleri ise sırasıyla rozmarinik asid > epikateşin > gallik asid > kateşin > epigallokateşin gallat > kafeik asid = α -tokoferol > askorbik asid > troloks şeklindedir.

Geliştirilen Modifiye CUPRAC yöntemine göre en yüksek pro-oksidan aktivite kateşin türlerinde görülmektedir. Bu bulgu, kateşinlerin flavonoidler arasında en yüksek pro-oksidan aktiviteyi gösterdiğini belirten literatür raporlarıyla uyumludur [100]. Örneğin; epikateşin bileşiği 10^{-3} M derişiminde 5,14 mM TPA değerine sahiptir. Bu değeri 4,55 mM TPA ile kateşin takip etmektedir. Naringin, kumarik asid ve epigallokateşin gallat bileşikleri ise zayıf pro-oksidan aktiviteye sahiptirler. Bunun nedeninin naringin bileşiğinin A halkasında glikozid yan grup içermesinden kaynaklandığı ve bu grubun naringinin aktivitesini azalttığı düşünülmektedir. Kumarik asid bileşiği ise *p* pozisyonunda monohidroksil grup içermesi nedeniyle düşük aktivite göstermektedir. Kafeik asid bileşiğinin dihidroksil grup içermesinden dolayı *p*-kumarik asid bileşiğinden daha yüksek pro-oksidan aktiviteye sahip olduğu Tablo 4.4'te görülmektedir. Gallik asid bileşiğinin ise trihidroksil grup içerdiğinden *p*-kumarik ve

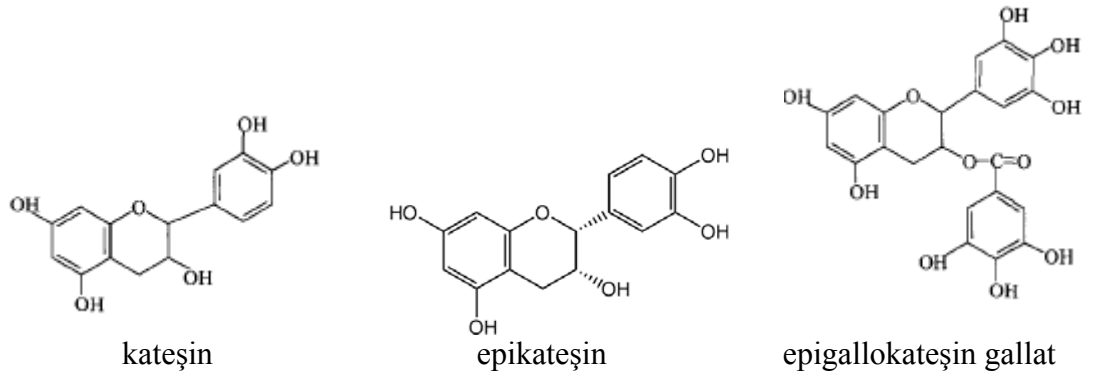
kafeik asid bileşiklerinden daha yüksek pro-oksidan aktiviteye sahiptir. Buradan yola çıkılarak hidroksil grup sayısının artışıyla pro-oksidan aktivitede artış olması dikkat çekmektedir. Bu bileşiklerin molekül yapıları Şekil 5.1’de görülmektedir.



Şekil 5.1: *p*-kumarik asid, kafeik asid ve gallik asid bileşiklerinin molekül yapıları

Rozmarinik asid ve kuersetin bileşiklerinde Modifiye CUPRAC ve AAS yöntemleri sonuçları birbirine yakın iken, Karbonil Tayini yöntemi sonuçları arasında iki ila üç kat fazla TPA değerleri elde edilmiştir. Buna karşın, bu derişimde gallik asidin pro-oksidan aktivitesinin ölçülmesinde uygulanan üç yöntemle de birbirine yakın sonuçlar bulunmuştur ve sırasıyla 3,41, 3,08 ve 3,11 mM TPA değerlerine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Kateşin türleri incelendiğinde; Modifiye CUPRAC yöntemine göre 10^{-3} M derişiminde elde edilen sonuçlar epikateşin 5,14, kateşin 4,55 ve epigallokateşin gallat 0,50 mM şeklindedir. Literatürde kateşin türlerinin pro-oksidan aktiviteleri incelendiğinde, galloil grup içeren kateşinlerin kateşol grup içerenlerden daha düşük aktivite gösterdikleri belirtilmiştir [100]. Epigallokateşin gallat bileşiği ise galloil grup içermesi nedeniyle diğer kateşin türlerinden daha düşük pro-oksidan aktiviteye sahiptir. Bununla birlikte kateşin ve epikateşin bileşikleri birbirine yakın yüksek pro-oksidan aktivite göstermişlerdir. Kateşin, epikateşin ve epigallokateşin gallat bileşiklerinin molekül yapıları Şekil 5.2’de görülmektedir.



Şekil 5.2: Kateşin, epikateşin ve epigallokateşin gallat bileşiklerinin molekül yapıları

Askorbik asid, α -tokoferol ve troloks bileşikleri için uygulanan üç yöntemi karşılaştıracak olursak, sırasıyla 1,89 mM, 3,76 mM ve 2,85 mM TPA değerleri ile üç bileşik için de en yüksek aktivite Modifiye CUPRAC yönteminde gözlenmiştir.

Polifenolik bileşiklerin ikili karışımlarının mM kuersetin cinsinden TPA değerleri incelendiğinde 10^{-3} M derişimindeki karışımların ölçülen pro-oksidan aktivitelerinin beklenen pro-oksidan aktivitelerinden daha düşük, 10^{-5} M derişimindeki karışımların ölçülen pro-oksidan aktivitelerinin ise beklenen pro-oksidan aktivitelerinden daha yüksek çıktığı görülmüştür. Genel olarak $5,10^{-4}$ M ile 10^{-4} M'lık karışım çözeltilerinin ölçülen ve beklenen pro-oksidan aktivitelerinin daha uyumlu olduğu söylenebilmektedir. Karışımların ölçülen ve beklenen absorbanslarına bakıldığında ise her derişimde toplamsal olmadığı görülmektedir. Bunun dışında Karbonil Tayini yöntemi ikili karışım çözeltilerinin tümüne cevap vermemektedir. Örneğin; ikili karışım çözeltilerinden α -tokoferol-kumarik asid, kuersetin-rozmarinik asid ve gallik asid-epikateşin karışımlarının Karbonil Tayini yöntemi uygulanması sonucunda bulanıklık oluşmuştur. Adi süzgeç kağıdından süzme ve filtreden geçirme işlemleriyle bu bulanıklık giderilemediğinden bu yöntemle pro-oksidan aktiviteleri ölçülememiştir. Buna karşın Modifiye CUPRAC ve AAS yöntemleriyle bu ikili karışımların pro-oksidan aktiviteleri tespit edilebilmiştir. İlgili veriler Tablo 4.9'da görülmektedir. İkili sentetik karışımların TPA değerleri kullanılarak Modifiye CUPRAC yönteminin ayrı ayrı AAS ve Karbonil tayini yöntemleri ile karşılaştırılması sonucunda elde edilen korelasyon katsayıları incelendiğinde, yine Modifiye CUPRAC ile AAS yönteminin Karbonil Tayini yöntemine oranla daha uyumlu olduğu Tablo 4.11'de görülmektedir.

Gerçek örnek olarak da ada çayı, yeşil çay, mercanköşk ve nane olmak üzere dört bitki ile çalışıldı. Bitki ekstralarının ve 1 mM rozmarinik asid veya 1 mM kafeik asid standart katkı çözeltilerinin tek başlarına Modifiye CUPRAC uygulandığında verdikleri absorbans değerleri toplanarak mol QR g⁻¹ cinsinden beklenen aktivite değerleri Eşitlik 3.8 kullanılarak hesaplanmıştır. Bitki örneklerine Modifiye CUPRAC yöntemi uygulanması sonucunda ölçülen ve beklenen pro-oksidan aktivite değerlerinin toplamsal olduğu ve birbirleriyle uyumlu sonuçlar elde edildiği Tablo 4.12’de açıkça görülmektedir. Ölçülen ve beklenen aktiviteler karşılaştırıldığında rozmarinik asid katkılı örneklerde $r = 0,8704$, kafeik asid katkılı örneklerde $r = 0,7950$ korelasyon katsayıları elde edilmiştir. Sonuç olarak ortamda bulunan antioksidan bileşiklerin miktarının artmasıyla pro-oksidan aktivitelerinde artış olduğu gözlemlenmiştir.

Geliştirilen Modifiye CUPRAC yönteminde 30 dakika daha kısa sürede sonuç alındığından referans yöntem olan Karbonil Tayini yönteminden daha hızlıdır. Aynı zamanda geliştirilen yöntemde daha az reaktif kullanılması ve kullanılan reaktiflerin ucuz ve kolay temin edilebilir olmaları bir diğer önemli avantajdır. Modifiye CUPRAC yönteminin görünür alanda (450 nm), Karbonil Tayini yönteminin ise UV alanda (370 nm) çalışması önemli bir farktır. Yöntemlerin ikili sentetik karışımlara uygulanması açısından değerlendirildiğinde referans yöntem tüm karışımlara cevap vermemektedir.

Fenolik bileşiklerin metal katalizli yükseltgenmesinin sonucunda reaktif oksijen türlerinin dışında farklı türler de meydana gelmektedir. Bunlar serbest tiyol içeren bileşiklerle etkileşebilen, yüksek elektrofilik türler olan semikinon radikalleridir [11,12]. Bunun dışında kateşol ve galloil yükseltgenmesi, metal indirgenmesi ile eş zamanlı gerçekleşen reaksiyonlardır (Örneğin; $Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$). Ayrıca geçiş metallerinin indirgenmiş formlarının, lipid hidroperoksid ile hidrojen peroksidin sırasıyla lipid alkoksil (LO·) ve hidroksil (·OH) radikallerine bozunmasını katalizledikleri bilinmektedir. Bu sonuçlar geçiş metallerinin, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda polifenolik bileşiklerin pro-oksidan aktiviteleri üzerine rolü olduğunu göstermektedir. Flavonoidlerin insanlarda sistematik pro-oksidan etkisinin hala ispatlanamamış olmasının yanı sıra, sadece antioksidan ya da sadece pro-oksidan olmadıkları bilinmelidir [2]. Aynı zamanda polifenoller, C ve E vitaminleri meyve ve sebzelerde

bulunan doğal antioksidanlardır. Bu bileşiklerin sağlığa yararlı etkileri antioksidan özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Ancak fazla miktarlarda bulunmaları veya bazı koşullar altında pro-oksidan gibi davranmaları sebebiyle de toksik etki gösterebilmektedirler [7].

Bu çalışma bulguları belirli bir “pro-oksidan aktivite” tanımı üzerine kurulu ve belirli koşullarda yapılan aktivite ölçümlerini içerdiğinden çok farklı ortamlara uyarlanabilirliği sınırlıdır. Antioksidan kapasite ölçüm yöntemlerinin aksine çok daha karmaşık bir reaksiyon ortamında birden farklı reaksiyon ürünleri ortaya çıktığından gerek konsantrasyon bağımlılığı gerekse sentetik karışımların toplamsal yanıt verme özelliği, antioksidan ölçüm yöntemleriyle bulunanların gerisinde kalmaktadır.

KAYNAKLAR

1. CHEDEA, V.S., BRAICU, C., SOCACIU, C., 2010, Antioxidant/prooxidant activity of a polyphenolic grape seed extract, *Food Chemistry*, 121, 132–139.
2. HALLIWELL, B., Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies?, 2008, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476, 107–112.
3. BANERJEE, A., KUNWAR, A., MISHRA, B., PRIYADARSINI, K.I., 2008, Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin Studies from AAPH induced hemolysis of RBCs, *Chemico-Biological Interactions*, 174, 134–139.
4. KONRATH, E.L., SANTIN, K., NASSIF, M., LATINI, A., HENRIQUES, A., SALBEGO, C., 2008, Antioxidant and pro-oxidant properties of boldine on hippocampal slices exposed to oxygen–glucose deprivation in vitro, *NeuroToxicology* 29, 1136–1140.
5. PAPETTI, A., DAGLIA, M., GRISOLI, P., DACARRO, C., GREGOTTI, C., GAZZANI, G., 2006, Anti- and pro-oxidant activity of Cichorium genus vegetables and effect of thermal treatment in biological systems, *Food Chemistry*, 97, 157–165.
6. GUTTERIDGE, J.M.C., HALLIWELL, B., 2000, Free radicals and antioxidants in the year 2000-a historical look to the future, *Annales of the New York Academy of Sciences*, 899, 136–147.
7. RIETJENS, I.M.C.M., BOERSMA, M.G., HAAN, L., SPENKEIINK, B., AWAD, H.M., CNUBBEN, N.H.P., ZANDEN, J.J., WOUDE, H., ALNK, G.M., KOEMAN, J.H., 2002, The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 11, 321–333.
8. HALLIWELL, B., 2007, Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for your health?, *Cardiovascular Research*, 73, 341–347.
9. HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., 1999, *Free radicals in Biology and medicine (3rd ed.)*, Oxford University Press.
10. CHILDS, A., JACOBS, C., KAMINSKI, T., HALLIWELL B., LEEUWENBURGH C., 2001, Supplementation with vitamin c and n-acetyl-

- cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise, *Free radical biology & medicine*, 31(6), 745–753.
11. SANG, S., LAMBERT, J.D., HONG, J., TIAN, S., LEE, M.J., STARK, R.E., HO C.T., YANG, C.S., 2005, Synthesis and structure identification of thiol conjugates of (-) epigallocatechin gallate and their urinary levels in mice, *Chem. Res. Toxicol.*, 18, 1762–1769.
 12. HAGERMAN, A.E., DEAN, R.T., DAVIES, M.J., 2003, Radical chemistry of epigallocatechin gallate and its relevance to protein damage, *Arch. Biochem. Biophys.*, 414, 115–120.
 13. HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., 1981, Formation of a thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts, *Febs Letters*, 128(2), 347-352.
 14. LEVINE, R.L., WILLIAMS, J.A., STADTMAN, E.R., SHACTER, E., 1994, Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins, *Methods Enzymol.*, 233, 346-357.
 15. YI, Z.C., LIU, Y.Z., LI, H.X., WANG, Z., 2009, Prooxidant action of chebulinic acid and tellimagrandin I: causing copper-dependent DNA strand breaks. *Toxicology in Vitro*, 23(3), 425-431.
 16. MAGNANI, L., GAYDOU, E.M., HUBAUD, J.C., 2000, Spectrophotometric measurement of antioxidant properties of flavones and flavonols against superoxide anion, *Analytica Chimica Acta*, 411, 209-216.
 17. CAO G., SOFIC, E., PRIOR, R.L., 1997, Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships, *Free Radical Biology & Medicine*, 22(5), 749-760.
 18. WAYNER, D.D.M., BURTON, G.W., INGOLD, K.U., LOCKE, S., 1985, Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins, *Febs Lett.*, 187, 33-37.
 19. BORS, W., MICHEL, C., SARAN, M., 1984, Inhibition of the bleaching of the carotenoid crocin. A rapid test for quantifying antioxidant activity, *Biochimica et Biophysica acta*, 796, 312-319.
 20. ALHO, H., LEINONEN, J., 1999, Total antioxidant activity measured by chemiluminescence methods, *Methods of Enzymology*, 299, 3-14.
 21. ZHENG, L.F., DAI, F., ZHOU, B., YANG, L., LIU, Z.L., 2008, Prooxidant activity of hydroxycinnamic acids on DNA damage in the presence of Cu(II) ions: mechanism and structure-activity relationship, *Food and Chemical Toxicology*, 46, 149-156.

22. GUTTERIDGE, J.M.C., HALLIWELL, B., 2010, Antioxidants: Molecules, medicines, and myths, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393, 561–564.
23. MILLER, D.M., BUETTNER, G.R., AUST, S.D., 1990, Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions, *Free Radic. Biol. Med.*, 8, 95-109.
24. KADE, I.J., 2008, *Interactions of organodiselenides with sülphydryl groups at the active sites of some thiol containing proteins – in vitro and in vivo mechanistic studies in mammalian models of diabetes*, Doctor of philosophy thesis, Universidade Federal de Santa Maria.
25. MERKEN, H.M., BEECHER, G.M., 2000, Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 577-599.
26. AITKEN, P., BREESE, G., DEDEK, F., EDWARDS, F., ESPANOL, M., LARKMAN, P., 1995, Preparative methods for brain slices: a discussion, *J. Neurosci Methods*, 59, 139–49.
27. RAO, Y.K., GEETHANGILI, M., FANG, S.H., TZENG, Y.M., 2007, Antioxidant and cytotoxic activities of naturally occurring phenolic and related compounds: A comparative study, *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1770–1776.
28. ARUOMA, O.I., CUPPET, S.L., 1997, *Antioxidant methodology in vivo and in vitro consepts*, AOCS Press, Champaign, Illinois, 241.
29. USMAR, V.D., WISEMAN, H., HALLIWELL, B., 1995, Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance, *FEBS Letters*, 369, 131-135.
30. HALLIWELL, B., AESCHBACH, R., LOLIGER, J., ARUOMA, O.I., 1995, The characterization of antioxidants, *Food and Chemical Toxicology*, 33, 601-617.
31. APAK, R., GÜÇLÜ, K., DEMİRATA, B., ÖZYÜREK, M., ÇELİK, S.E., BEKTASOĞLU, B., BERKER, K.I., OZYURT, D., 2007, Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay, *Molecules*, 12, 1496-1547.
32. WRIGHT, J.S., JOHNSON, E.R., DILABIO, G.A., 2001, Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants, *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 1173-1183.
33. MORAN, J.F., KLUCAS, R.V., GRAYER, R.J., ABIAN, J., BECANA, M., 1997, Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and

- other legume tissues: Prooxidant and antioxidant properties, *Free Radical Biol. Med.*, 22(5), 861-870.
34. MILLER, D.M., BUETTNER, G.R., AUST, S.D., 1990, Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions, *Free Radical Biol. Med.*, 8(1), 95-108.
 35. SANG, S., LAMBERT, J.D., HONG, J., TIAN, S., LEE, M.J., STARK, R.E., HO, C.T., YANG, C.S., 2005, Synthesis and structure identification of thiol conjugates of (-)-epigallocatechin gallate and their urinary levels in mice, *Chem. Res. Toxicol.*, 18(11), 1762-1769.
 36. RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., PAGANGA G., 1997, Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends in plant science*, 2, 152-159.
 37. LAGUERRE, M., LECOMTE, J., VILLENEUVE, P., 2007, Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges, *Progress in Lipid Research*, 46, 244-282.
 38. HUDSON, B.J.F., 1990, *Food Antioxidants*, Elsevier Science, USA.
 39. HALLIWELL, B., WASIL, M., GROOTVELS, M., 1987, Biologically significant scavenging of the myeloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid by ascorbic acid, *FEBS Lett.*, 213(1), 15-17.
 40. KESKİN, H., ERKMEN G., 1987, *Besin Kimyası*, Güryay Matbaacılık, Beşinci basım, İstanbul.
 41. KONTUSH, A., FINCKH, B., Katren, B., KOHLSCHUTTER, A., BEISIEGEL, U., 1996, Antioxidant and prooxidant activity of a-tocopherol in human plasma and low density lipoprotein, *Journal of Lipid Research*, 37, 1436-1448.
 42. FRANKEL, E.N., 1980, Lipid oxidation, A review, *Progress in Lipid Research*, 19, 1-22.
 43. MITCHEL, R.E.J., MCCANN, R., 1993, Vitamin E is a complete tumor promotor in mouse skin, *Carcinogenesis*, 14(4), 659-662.
 44. DEMING, D.M., BOILEAU, T.W.M., HEINTZ, K.H., ATKINSON, C.H., ERDMAN, J.W., 2002, Carotenoids: Linking chemistry, absorption, and metabolism to potential roles in human health and disease, *Process Biochemistry*, 41, 1773-1778.
 45. DUTHIE, G.G., DUTHIE, S.J., KYLE, J.A.M., 2000, Plant polyphenols in cancer and heart disease: Implications as nutritional antioxidants, *Nutr Res Rev.*, 13, 79-106.
 46. HALE, A.L., 2003, *Screening potato genotypes for antioxidant activity, identification of the responsible compounds, and differentiating russet norkotah*

strains using aflp and microsatellite marker analysis, Doctor of philosophy. Texas A&M University.

47. HANIF, S., SHAMIM, U., ULAH, M.F., AZMI, A.S., BHAT, S.H., HADIA, S.M., 2008, The anthocyanidin delphinidin mobilizes endogenous copper ions from human lymphocytes leading to oxidative degradation of cellular DNA, *Toxicology*, 249, 19–25.
48. WANG, T., CHEN, L.X., LONG, Y., WU, W.M., WANG, R., 2008, DNA damage induced by caffeic acid phenyl ester in the presence of Cu(II) ions: Potential mechanism of its anticancer properties, *Cancer Letters*, 263, 77–88.
49. MAKRIS, D.P., ROSSITER, J.T., 2002, Hydroxyl free radical-mediated oxidative degradation of quercetin and morin: A preliminary investigation, *Journal of Food Composition and Analysis*, 15, 103-113.
50. LEE, C.Y., SHARMA, A., UZARSKI, R.L., CHEONG, J.E., XU, H., HELD, R.A., UPADHAYA, S.K., NELSON, J.L., 2011, Potent antioxidant dendrimers lacking pro-oxidant activity, *Free Radical Biology and Medicine*, 50(8), 918-925.
51. AHMAD, A., SYED, F.A., SINGH, S., HADI, S.M., 2005, Prooxidant activity of resveratrol in the presence of copper ions: Mutagenicity in plasmid DNA, *Toxicology Letters*, 159, 1–12.
52. GRYSZCZYŃSKA, B., ISKRA, M., MALECKA, M., WIELKOSZYŃSKI, T., 2009, Raspberry seed extract effect on the ferroxidase activity of ceruloplasmin isolated from plasma, *Food Chemistry*, 112, 695–701.
53. HEIM, K.E., TAGLIAFERRO, R., BOBILYA, D.J., 2002, Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.
54. OHSHIMA, H., YOSHIE, Y., AURIOL, S., GILIBERT, I., 1998, Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: Effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitroxyl anion, *Free radical biology & medicine*, 25(9), 1057–1065.
55. ACKER, V.S.A.B.E., BAST, A., VIJGH, V.D.W.J.F., 1996, Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids, *Free Radical Biology and Medicine* 20(3), 331-342.
56. HARBORNE, J.B., WILLIAMS, C.A., 2000, Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry*, 55(6), 481-504.
57. RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., BOLWELL, P.G., BRAMLEY, P.M., PRIDHAM, J.B., 1995, The relative activities of plant-derived polyphenolic flavonoids, *Free Radical Research*, 22, 375-383.

58. MAZZA, G., MINIATI, E., 1993, *Anthocyanins in fruits, vegetables and grains*, CRC Press, Boca Raton, Tokyo.
59. CADENAS, E., PACKER, L., 2002, *Handbook of antioxidants*, Marcel Dekker, Second Edition, New York, 0-8247-0547-5.
60. LABIENIEC, M., GABRYELAK, T., FALCIONI, G., 2003, Antioxidant and pro-oxidant effects of tannins in digestive cells of the freshwater mussel *Unio tumidus*, *Mutation Research*, 539, 19–28.
61. PANNALA, A.S., RICE-EVANS, C.A., HALLIWELL, B., SINGH, S., 1997, Inhibition of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 232(1), 164–168.
62. PAYA, M., HALLIWELL, B., HOULT, J.R.S., 1992, Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species: Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals, *Biochem. Pharmacol.*, 44(2), 205–214.
63. RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., PAGANGA, G., 1996, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radic. Biol. Med.*, 20, 933–956.
64. BURDA, S., OLESZEK, W., 2001, Antioxidant and antiradical activities of flavonoids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2774-2779.
65. METODIEWA, D., JAISWAL, A.K., CENAS, N., DICKANCAITÉ, E., SEGURA-AGUILAR, J., 1999, Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product, *Free radical biology & medicine*, 26(1), 107–116.
66. WILLIAMS, R.J., SPENCER, J.P.E., RICE-EVANS, C., 2004, Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules?, *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 838-849.
67. MANN, L.B., FOLTS, J.D., 2004, Effects of ethanol and other constituents of alcoholic beverages on coronary heart disease: A review, *Pathophysiology*, 10, 105–112.
68. NAKAYAMA, T., 1994, Suppression of hydroperoxide-induced cytotoxicity by polyphenols, *Cancer Res. (Suppl.)*, 54, 1991–1993.
69. BHAT, R., HADI, S.M., 1994, DNA breakage by tannic acid and Cu(II): sequence specificity of the reaction and involvement of active oxygen species, *Mutat. Res.*, 313, 39–48.
70. LI, Y., TRUSH, M.A., YAGER, J.D., 1994, DNA damage caused by reactive oxygen species originating from a copper-dependent oxidation of the 2-hydroxycatechol of estradiol, *Carcinogenesis*, 15, 1421-1427.

71. LI, Y., TRUSH, M.A., 1994, Reactive oxygen-dependent DNA damage resulting from the oxidation of phenolic compounds by a copper-redox cycle mechanism, *Cancer Res. (Suppl.)*, 54, 1895-1898.
72. AHSAN, H., PARVEEN, N., KHAN, N.U., HADI, S.M., 1999, Pro-oxidant, anti-oxidant and cleavage activities on DNA of curcumin and its derivatives demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin, *Chemico-Biological Interactions*, 121, 161-175.
73. SAKIHAMA, Y., COHEN, M.F., GRACE, S.C., YAMASAKI, H., 2002, Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants, *Toxicology*, 177, 67-80.
74. TERRÉS-MARTOS, C., NAVARRO-ALARCON, M., MARTÍN-LAGOS, F., SERANA, H.L., LÓPEZ-MARTÍNEZ, M.C., 1997, Determination of copper levels in serum of healthy subjects by atomic absorption spectrometry, *The Science of the Total Environment*, 198, 97-103.
75. PROUDFOOT, J.M., CROFT, K.D., PUDDEY, I.B., BEILIN, L.J., 1997, The role of copper reduction by α -tocopherol in low-density lipoprotein oxidation, *Free Radic. Biol. Med.*, 23(5), 720–728.
76. TEIXEIRA, S., SIQUET, C., ALVES, C., BOAL, I., MARQUES, M.P., BORGES, F., LIMA, J.L.F.C., REIS, S., 2005, Structure–property studies on the antioxidant activity of flavonoids present in diet, *Free Radical Biology & Medicine*, 39, 1099–1108.
77. LAGUERRE, M., LECOMTE, J., VILLENEUVE, P., 2007, Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges, *Progress in Lipid Research*, 46, 244–282.
78. ISHII, T., MORI, T., ICHIKAWA, T., KAKU, M., KUSAKA, K., UEKUSA, Y., AKAGAWA, M., AIHARA, Y., FURUTA, T., WAKIMOTO, T., KAN, T., NAKAYAMA, T., 2010, Structural characteristics of green tea catechins for formation of protein carbonyl in human serum albumin, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 4892–4896.
79. YAMANAKA, N., ODA, O., NAGAO, S., 1997, Green tea catechins such as (-)-epicatechin and (-)- epigallocatechin accelerate Cu^{2+} -induced low density lipoprotein oxidation in propagation phase, *FEBS Lett.*, 401, 230–234.
80. SAHU, S.C., GRAY, G.C., 1993, Interactions of flavonoids, trace metals, and oxygen: nuclear DNA damage and lipid peroxidation induced by myricetin, *Cancer Lett.*, 70, 73–79.
81. HAJJI, H., NKHILI, E., TOMAO, V., DANGLES, O., 2006, Interactions of quercetin with iron and copper ions: Complexation and autoxidation, *Free Radical Research*, 40(3), 303–320.

82. WANG, L.S., SUN, X.D., CAO, Y., WANG, L., LI, F.-J., WANG, Y.F. 2010, Antioxidant and pro-oxidant properties of acylated pelargonidin derivatives extracted from red radish (*Raphanus sativus* var. *niger*, Brassicaceae), *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2712–2718.
83. SAKIHAMA, Y., COHEN, M.F., GRACE, S.C., YAMASAKI, H., 2002, Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants, *Toxicology*, 177, 67–80.
84. FUKUHARA, K., NAKANISHI, I., SHIMADA, T., OHKUBO, K., MIYAZAKI, K., HAKAMATA, W., URANO, S., OZAWA, T., OKUDA, H., MIYATA, N., IKOTA, N., FUKUZUMI, S., 2003, A planar catechin analogue as a promising antioxidant with reduced prooxidant activity, *Chem. Res. Toxicol.*, 16, 81-86.
85. ALANKO, J., RIUTTA, A., HOLM, P., MUCHA, I., VAPAATALO, H., METSÄ-KETELÄ, T., 1999, Modulation of arachidonic acid metabolism by phenols: Relation to their structure and antioxidant/prooxidant properties, *Free Radical Biology & Medicine*, 26(1/2), 193–201.
86. STADTMAN, E.R., 1993, Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions, *Annu. Rev. Biochem.*, 62, 797-821.
87. GARRISON, W.M., 1987, Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins, *Chem. Rev.*, 87, 381-398.
88. DAVIES, M.J., DEAN, R.T., 1997, *Radical-mediated protein oxidation: from chemistry to medicine*. Oxford: Oxford Univ. Pres.
89. HEADLAM, H.A., MORTIMER, A., EASTON, C.J., DAVIES, M.J., 2000, β -Scission of C-3 (β -carbon) alkoxy radicals on peptides and proteins: a novel pathway which results in the formation of α -carbon radicals and the loss of amino acid side chains, *Chem. Res. Toxicol.*, 13, 1087-1095.
90. HEADLAM, H.A., DAVIES, M.J., 2002, Beta-scission of side-chain alkoxy radicals on peptides and proteins results in the loss of side chains as aldehydes and ketones, *Free Radic. Biol. Med.*, 32, 1171-1184.
91. HEADLAM, H.A., DAVIES, M.J., 2004, Markers of protein oxidation: different oxidants give rise to variable yields of bound and released carbonyl products, *Free radical biology & medicine*, 36(9), 1175-1184.
92. GIOTI, E.M., FIAMEGOS, Y.C., SKALKOS, D.C., STALIKAS, C.D., 2009, Antioxidant activity and bioactive components of the aerial parts of *Hypericum perforatum* L. from Epirus, Greece, *Food Chemistry*, 117, 398–404.

93. NORDBERG, J., ARNÉR, E.S.J., 2001, Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system, *Free Radical Biol. Med.*, 31, 1287-1312.
94. NETTO, L.E.S., KOWALTOWSKI, A.J., CASTILHO, R.F., VERCESI, A.E., 2002, Thiol enzymes protecting mitochondria against oxidative damage, *Methods Enzymol.*, 348, 260-270.
95. BRANTLEY, R.E., 1993, The mechanism of autoxidation of myoglobin, *J. Biol. Chem.*, 268, 6995–7010.
96. SHACTER, E., 2000, Protein Oxidative Damage, *Methods Enzymol.*, 319, 428-436.
97. SHACTER E., 2000, Quantification and significance of protein oxidation in biological samples, *Drug Metab. Rev.*, 32, 307-326.
98. STADTMAN, E.R., LEVINE R.L., 2003, Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins, *Amino acids.*, 25, 207-218.
99. SHAN, X.Q., AW T.Y., JONES D.P., 1990, Glutathione-dependent protection against oxidative injury, *Pharmac Ther.*, 47(1), 61-71.
100. GALATI, G., O'BRIEN, P.J., 2004, Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties, *Free Radical Biology and Medicine*, 37(3), 287-303.
101. AWAD, H.M., BOERSMA, M.G., BOEREN, S., BLADEREN, P.J., VERVOORT, J., RIETJENS, I.M., 2002, The regioselectivity of glutathione adduct formation with flavonoid quinone/quinone methides is pH-dependent, *Chem Res Toxicol.*, 15(3), 343-51.
102. BUEGE, J.A., AUST, S.D., 1978, Microsomal lipid peroxidation, *Methods Enzymol*, 52, 302-310.
103. HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., ARUOMA, O.I., 1987, The deoxyribose method: A simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals, *Analytical Biochemistry*, 165(1), 215-219.
104. GUTTERIDGE, J.M.C., 1981, Thiobarbituric acid-reactivity following iron-dependent free-radical damage to amino acids and carbohydrates, *Febs Letters*, 128(2), 343-346.
105. GROTTO, D., SANTA MARIA, L.D., BOEIRA, S., VALENTINI, J., CHARÃO, M.F., MORO, A.M., NASCIMENTO, P.C., POMBLUM, V.J., GARCIA, S.C., 2007, Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by

- high performance liquid chromatography–visible detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43, 619–624.
106. ZHENG, L.F., DAI, F., ZHOU, B., YANG, L., LIU, Z.L., 2006, DNA damage induced by resveratrol and its synthetic analogues in the presence of Cu(II) ions: Mechanism and structure-activity relationship, *Free Radical Biology & Medicine*, 41, 1807–1816.
 107. LYNCH, S.M., FREI, B., 1995, Reduction of copper, but not iron, by human low density lipoprotein (LDL), *The Journal of Biological Chemistry*, 270(10), 5158-5163.
 108. TUBARO, F., MICOSSI, E., URSINI, F., 1996, The antioxidant capacity of complex mixtures by kinetic analysis of crocin bleaching inhibition, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73(2), 173-179.
 109. TUBARO, F., GHISELLI, A., PAPUZZI, P., MAIORINO, M., URSINI, F., 1998, Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics, *Free Radical Biology & Medicine*, 24, 1228-1234.
 110. CAO, G., PRIOR, R.L., 1999, In vivo antioxidant capacity: comparison of different analytical methods, *Free Radical Biology & Medicine*, 27, 1173-1181.
 111. FINOTTI, E., MAJO, D.D., 2003, Influence of solvents on the antioxidant property of flavonoids, *Nahrung/Food*, 47(3), 186-187.
 112. MAJO, D.D., GUARDIA, M., GIAMMANCO, S., NEVE, L., GIAMMANCO, M., 2008, The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents, *Food Chemistry*, 111, 45–49.
 113. LÓPEZ-GALILEA, I., ANDUEZA, S., LEONARDO, I., PEÑA, M.P., CID, C., 2006, Influence of torrefacto roast on antioxidant and pro-oxidant activity of coffee, *Food Chemistry*, 94, 75–80.
 114. METSÄ-KETELÄ, T., Luminescent assay for total peroxy radicaltrapping capability of plasma, In: Stanley, P.E.; Kricka, L.J., eds. 1991, *Bioluminescence and chemiluminescence. Current status*. Chichester, UK: John Wiley & Sons; 15(4), 389-392.
 115. OSAWA, T., SHIBAMOTO, T., 1992, Analysis of free malonaldehyde formed in lipid peroxidation systems via a pyrimidine derivative, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69, 466-468.
 116. FUKUMOTO, L.R., MAZZA, G., 2000, Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3597-3604.

117. MAGNANI, L., GAYDOU, E.M., HUBAUD, J.C., 2000, Spectrophotometric measurement of antioxidant properties of flavones and flavonols against superoxide anion, *Analytica Chimica Acta*, 411, 209-216.
118. APAK, R., GÜÇLÜ, K., ÖZYÜREK, M., KARADEMİR, S.E., 2004, Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins c and e, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981.
119. APAK, R., GÜÇLÜ, K., ÖZYÜREK, M., KARADEMİR, S.E., ERÇAĞ, E., 2006, The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas, *International Journal of Food Science and Nutrition*, 57, 292-304.
120. ÇELİK, S.E., ÖZYÜREK, M., BEKTAŞOĞLU, B., GÜÇLÜ, K.I., BERKER, K., ÖZGÖKÇE, F., APAK, R., 2008, Antioxidant capacities of herbal plants used in the manufacture of Van herby cheese: 'Otlı peynir', *International Journal of Food Properties*, 11, 747-761.
121. ALPINAR, K., ÖZYÜREK, M., KOLAK, U., GÜÇLÜ, K., ARAS, Ç., ALTUN, M., ÇELİK, S.E., BERKER, K.I., BEKTAŞOĞLU, B., APAK, R., 2009, Antioxidant capacities of some food plants wildy grown in Ayvalik of Turkey, *Food Science and Technology Research*, 15, 59-64.
122. GÜÇLÜ, K., ALTUN, M., ÖZYÜREK, M., KARADEMİR, S.E., APAK, R., 2006, Antioxidant capacity of fresh, sun- and sulfited-dried malatya apricot (*Prunus Armeniaca*) assayed by CUPRAC, ABTS/TEAC and folin methods, *International Journal of Food Science & Technology*, 41, 76-85.
123. APAK, R., GÜÇLÜ, K., ÖZYÜREK, M., KARADEMİR, S.E., ALTUN, M., 2005, Total antioxidant capacity assay of human serum using copper(II)-neocuproine as chromogenic oxidant: The CUPRAC method, *Free Radical Research*, 39, 949-961.
124. APAK, R., GÜÇLÜ, K., ÖZYÜREK, M., ÇELİK, S.E., 2006, A novel total antioxidant capacity measurement for food and plasma antioxidants: CUPRAC method. (meeting abstract indexed in SCI), *FEBS Journal*, 273, 72.
125. BEKTAŞOĞLU, B., ÇELİK, S.E., ÖZYÜREK, M., GÜÇLÜ, K., APAK, R., 2006, Novel hydroxyl radical scavenging antioxidant activity assay for water-soluble antioxidants using a modified CUPRAC method, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345, 1194-1200.
126. BEKTAŞOĞLU, B., ÇELİK, S.E., ÖZYÜREK, M., GÜÇLÜ, K., APAK, R., 2006, Hydroxyl radical antioxidant activity assay using a modified CUPRAC method (meeting abstract indexed in SCI)", *FEBS Journal*, 273, 301.

127. ÖZYÜREK, M., GÜÇLÜ, K., BEKTAŞOĞLU, B., APAK, R., 2007, Spectrophotometric determination of ascorbic acid by the modified CUPRAC method with extractive separation of flavonoids-La(III) complexes, *Analytica Chimica Acta*, 588, 88-95.
128. APAK, R., GÜÇLÜ, K., ÖZYÜREK, M., ÇELİK, S.E., 2008, Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (Cupric ion reducing antioxidant capacity) assay, *Microchimica Acta*, 160, 413-419.
129. ÖZYÜREK, M., ÇELİK, S.E., BERKER, K.I., GÜÇLÜ, K., TOR, İ., APAK, R., 2007, Sensitivity enhancement of CUPRAC and iron(III)-phenanthroline antioxidant assays by preconcentration of colored reaction products on a weakly acidic cation exchanger. *Reactive and Functional Polymers*, 67, 1478-1486.
130. ÇELİK, S.E., ÖZYÜREK, M., GÜÇLÜ, K., APAK, R., 2007, CUPRAC Total antioxidant capacity assay of lipophilic antioxidants in combination with hydrophilic antioxidants using the macrocyclic oligosaccharide methyl B-cyclodextrine as the solubility enhancer, *Reactive and Functional Polymers*, 67, 1548-1560.
131. ÖZYÜREK, M., BEKTAŞOĞLU, B., GÜÇLÜ, K., GÜNGÖR, N., APAK, R., 2008, Simultaneous total antioxidant capacity assay of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the same acetone-water solution containing 2% methyl-beta-cyclodextrin using the cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method, *Analytica Chimica Acta*, 630, 28-39.
132. ÖZYÜREK, M., BEKTAŞOĞLU, B., GÜÇLÜ, K., APAK, R., 2008, Hydroxyl radical scavenging assay of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method using catalase for hydrogen peroxide degradation, *Analytica Chimica Acta*, 616, 196-206.
133. ÖZYÜREK, M., BEKTAŞOĞLU, B., GÜÇLÜ, K., APAK, R., 2009, Measurement of xanthine oxidase inhibition activity of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method, *Analytica Chimica Acta*, 636, 42-50.
134. BEKTAŞOĞLU, B., ÖZYÜREK, M., GÜÇLÜ, K., APAK, R., 2008, Hydroxyl radical detection with a salicylate probe using modified CUPRAC spectrophotometry and HPLC, *Talanta*, 77, 90-97.
135. ÖZYÜREK, M., BENER, M., GÜÇLÜ, K., APAK, R., 2010, Polyphenolic contents of natural dyes produced from industrial plants assayed by HPLC and novel spectrophotometric methods, *Industrial Crops & Products*, 32, 499-506.
136. ÖZYÜREK, M., BEKTAŞOĞLU, B., GÜÇLÜ, K., GÜNGÖR, N., APAK, R., 2010, A novel hydrogen peroxide scavenging assay of phenolics and flavonoids using cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) methodology, *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 689-698.

137. BENER, M., ÖZYÜREK, M., GÜÇLÜ, K., APAK, R., 2010, Development of a low-cost optical sensor for cupric reducing antioxidant capacity measurement of food extracts, *Analytical Chemistry*, 82, 4252-4258.
138. SOYLAK, M., TUZEN, M., SOUZA, A.S., KORN, M.G.A., FERREIRA, S.L.C., 2007, Optimization of microwave assisted digestion procedure for the determination of zinc, copper and nickel in tea samples employing flame atomic absorption spectrometry, *Journal of Hazardous Materials*, 149, 264–268.
139. CAMPILLO, N., VIÑAS, P., LÓPEZ-GARCIA I., HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M., 1998, Direct determination of copper and zinc in cow milk, human milk and infant formula samples using electrothermal atomization atomic absorption spectrometry, *Talanta*, 46, 615–622.
140. REDDY, S.A., REDDY, K.J., NARAYANA, S.L., REDDY, A.V., 2008, Analytical applications of 2,6-diacetylpyridine bis-4-phenyl-3-thiosemicarbazone and determination of Cu(II) in food samples, *Food Chemistry*, 109, 654–659.
141. ANZANO, J.M., GÓNZALEZ, P., 2000, Determination of iron and copper in peanuts by flame atomic absorption spectrometry using acid digestion, *Microchemical Journal*, 64, 141-145.
142. REZNICK, A.Z., PACKER, L., 1994, Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay, *Methods Enzymol*, 233, 357-63.
143. DALLE-DONNE, I., ROSSI, R., GIUSTARINI, D., MILZANI, A., COLOMBO, R., 2003, Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress, *Clinica Chimica Acta*, 329, 23-38.

ÖZGEÇMİŞ

12.11.1984 tarihinde İstanbul'da doğdu. 1998/99 öğretim yılında Ali Ülker İlköğretim Okulunu bitirdi. 2002/03 öğretim yılında Bahçelievler (Y.D.A.) Lisesi'nden mezun oldu. 2004/05 öğretim yılında İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümünde öğrenimine başladı, 2007/08 öğretim yılında mezun oldu. Ekim 2008 tarihinde İ.Ü. Müh. Fak. Kimya Bölümüne bağlı Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda master eğitimine başladı.