



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SPEKTROFLORİMETRİK ANALİZ YÖNTEMLERİNİN
TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİNLERİNE
UYGULANMASI**

SEFA BAKİ
Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı

Danışman
Prof.Dr. Reşat APAK

Haziran, 2009

İSTANBUL

Bu çalışma 19/06/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



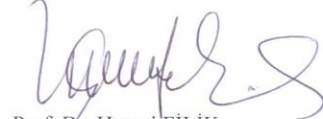
Prof. Dr. Reşat APAK (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Esma TÜTEM
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. İzzet Tor
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Hayati FİLİK
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Birsen DEMİRATA ÖZTÜRK
İstanbul Teknik Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin T-2342 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca desteğini esirgemeyen tez danışmanım çok değerli hocam Prof. Dr. Reşat APAK'a, aynı süre boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Kubilay GÜÇLÜ'ye, ve birçok çalışmayı beraber yürüttüğümüz grup arkadaşlarım Ar. Gör. Mustafa ÖZYÜREK, Ar. Gör. Burcu BEKTAŞOĞLU, Ar. Gör. Mustafa BENER, Nilay GÜNGÖR ve Fatih ÖZTÜRK'e, en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca yanımda olup desteklerini benden esirgemeyen sevgili aileme, çalışmalarım süresince hertürlü laboratuvar imkanı sağlayan Analitik Kimya Anabilim Dalı'na ve bu bölümdeki tüm hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tezimle aynı adı taşıyan T-2342 sayılı projeme maddi destek sağlayan İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

HAZİRAN, 2009

Sefa BAKİ

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİL LİSTESİ.....	VI
TABLO LİSTESİ.....	X
SEMBOL LİSTESİ	XIII
ÖZET.....	1
SUMMARY	3
1. GİRİŞ	5
2. GENEL KISIMLAR	7
2.1 ANTİOKSİDANLAR	7
2.2. FLAVONOİDLER.....	10
2.2.1. Analizi Yapılan Bazı Flavonollerin Tıp Alanındaki Kullanımları	15
2.3. LUMİNESANS SPEKTROSKOPİSİ	16
2.3.1. Floresans ve Fosforesans Özelliklerinin İncelenmesinde Kullanılan Temel Birimler	17
2.3.2. Floresans.....	18
2.3.3. Floresans Spektroskopisi.....	20
2.3.4. Florometrik Yöntemle Kantitatif Analiz	22
2.3.5. Floresan Bileşikler	23
2.4. FLAVONOİD TAYİNİNDE KULLANILAN SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMLER	23
2.4.1. AlCl ₃ /Potasyum Asetat Spektrofotometrik Yöntemi	23
2.4.2. CUPRAC (Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi.....	24
2.5. LİTERATÜRDE VAROLAN SPEKTROFLOROMETRİK TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTE (TAC) TAYİNİ YÖNTEMLERİ.....	25
2.5.1. ORAC (Oksijen Radikali Absorbans Kapasitesi) Yöntemi	25
2.5.2. Florometrik TRAP (Toplam Radikal Tutma Parametresi) Yöntemi.....	26
2.5.3. HORAC (Hidroksil Radikalini Önleme Kapasitesi) Yöntemi	27

3. MALZEME VE YÖNTEM	29
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR.....	29
3.2. KİMYASAL MADDELER	29
3.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması	29
3.3. UYGULANAN YÖNTEMLER	30
3.3.1. Geliştirilen $AlCl_3$ /Potasyum Asetat Spektroflorometrik Yöntemi.....	30
3.3.2. Geliştirilen $AlCl_3$ /Potasyum Asetat Spektroflorometrik Yöntemin Aseton-M- β -CD Ortamında Uygulanması.....	31
3.3.3. $AlCl_3$ /Potasyum Asetat Spektrofotometrik Yöntemi	31
3.3.4. CUPRAC (Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi.....	32
4. BULGULAR.....	33
4.1. $AlCl_3$/POTASYUM ASETAT SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMİNİN SPEKTROFLOROMETRİK OLARAK UYGULANABİLİRLİĞİ.....	33
4.1.1. $AlCl_3$ /Potasyum Asetat Spektroflorometrik Yönteminin Geliştirilmesi ve Optimum Deney Koşullarının Belirlenmesi	33
4.1.2. Bazı Fenoliklerin $AlCl_3$ /Potasyum Asetat Spektroflorometrik Yöntemi ile Elde Edilen Doğru Denklemleri ve Kalibrasyon Grafikleri.....	37
4.1.2.1. <i>Kuersetin</i>	37
4.1.2.2. <i>Mirisetin</i>	38
4.1.2.3. <i>Fisetin</i>	39
4.1.2.4. <i>Kaempferol</i>	40
4.1.2.5. <i>Morin</i>	41
4.1.2.6. <i>Rutin</i>	42
4.1.2.7. <i>Luteolin</i>	43
4.1.2.8. <i>Galangin</i>	44
4.1.2.9. <i>Kuersitrin</i>	45
4.1.3. Fenolik Bileşiklerin $AlCl_3$ /Potasyum Asetat Spektroflorometrik Yöntemi ile Elde Edilen Doğru Denklemleri, Molar Floresans Katsayıları, Eksitasyon ve Emisyon Dalgaboyları.....	46
4.1.4. Fenolik Bileşiklerin $AlCl_3$ /Potasyum Asetat Spektroflorometrik Yöntemi ile Elde Edilen Emisyon Spektrumları	47
4.1.5. İkili Sentetik Karışımların $AlCl_3$ /Potasyum Asetat Spektroflorometrik Yöntemi ile Elde Edilen Emisyon Spektrumları.....	51
4.1.6. Üçlü Sentetik Karışımların Oluşturulması ve $AlCl_3$ /Potasyum Asetat Spektroflorometrik Yöntemi ile Emisyon Spektrumlarının Elde Edilmesi	55
4.1.7. Üçlü Sentetik Karışımların Elde Edilmesi ve $AlCl_3$ /Potasyum Asetat Spektroflorometrik Yöntemi Uygulanması ile Beklenen ve Ölçülen Floresans İntensitesi Değerleri	58

4.2. GELİŞTİRİLEN $AlCl_3$/POTASYUM ASETAT SPEKTROFLOROMETRİK YÖNTEMİNİN FARKLI ÇÖZÜCÜ ORTAMLARINA UYGULANABİLİRLİĞİ	62
4.2.1. $AlCl_3$ /Potasyum Asetat Spektroflorometrik Yönteminin Aseton-M- β -CD Ortamında Uygulanması.....	62
4.2.2. Bazı Fenolik Bileşiklerin $AlCl_3$ /Potasyum Asetat Spektroflorometrik Yönteminin Aseton-M- β -CD Ortamında Uygulanması ile Elde Edilen Doğru Denklemleri ve Kalibrasyon Grafikleri.....	64
4.2.2.1. Kuersetin	64
4.2.2.2. Mirisetin	65
4.2.2.3. Fisetin.....	66
4.2.2.4. Kaemferol.....	67
4.2.2.5. Morin.....	68
4.2.2.6. Rutin	69
4.2.2.7. Luteolin	70
4.2.2.8. Galangin.....	71
4.2.2.9. Kuersitrin.....	72
4.2.3. Fenolik Bileşiklerin Aseton-M- β -CD Ortamında $AlCl_3$ /Potasyum Asetat Spektroflorometrik Yöntemi ile Elde Edilen Doğru Denklemleri, Molar Floresans Katsayıları, Eksitasyon ve Emisyon Dalgaboyları	73
4.2.4. Fenolik Bileşiklerin Aseton-M- β -CD Ortamında $AlCl_3$ /Potasyum Asetat Spektroflorometrik Yöntemi ile Elde Edilen Emisyon Spektrumları	74
4.2.5. İkili Sentetik Karışımların Aseton-M- β -CD Ortamında $AlCl_3$ /Potasyum Asetat Spektroflorometrik Yöntemi ile Elde Edilen Emisyon Spektrumları	76
4.2.6. Üçlü Sentetik Karışımların Oluşturulması ve Aseton-M- β -CD Ortamında $AlCl_3$ /Potasyum Asetat Spektroflorometrik Yöntemi ile Emisyon Spektrumlarının Elde Edilmesi	79
4.2.7. Üçlü Sentetik Karışımların Elde Edilmesi ve Aseton-M- β -CD Ortamında $AlCl_3$ /Potasyum Asetat Spektroflorometrik Yöntemi Uygulanması ile Beklenen ve Ölçülen Floresans İntensitesi Değerleri.....	82
4.3. BAZI FENOLİK BİLEŞİKLERE $AlCl_3$/POTASYUM ASETAT SPEKTROFOTOMETRİK VE CUPRAC YÖNTEMLERİNİN UYGULANMASI	86
4.3.1. Galangin ve Kuersitrinin $AlCl_3$ /Potasyum Asetat Spektrofotometrik Yöntemi ile Elde Edilen Doğru Denklemleri ve Kalibrasyon Grafikleri.....	88
4.3.1.1. Galangin.....	88
4.3.1.2 Kuersitrin.....	89
4.3.2. Galangin ve Kuersitrinin CUPRAC Yöntemi ile Elde Edilen Doğru Denklemleri ve Kalibrasyon Grafikleri	90

4.3.2.1. <i>Galangin</i>	90
4.3.2.2. <i>Kuersitrin</i>	91
4.4. FENOLİK BİLEŞİKLERİN UYGULANAN YÖNTEMLERLE ELDE EDİLEN KUERSETİN EŞDEĞERİ FLAVONOİD KONSANTRASYONU (QREFC) KATSAYISI DEĞERLERİ.....	92
4.5. GERÇEK ÖRNEKLERDE YÖNTEMLERİN UYGULANMASI	94
4.5.1. Gerçek Örneklerin Hazırlanması ve Yöntemlerin Optimizasyonu	94
4.5.2. Gerçek Örneklerle AlCl ₃ /Potasyum Asetat Spektroflorometrik, Aseton-M-β-CD Ortamında AlCl ₃ /Potasyum Asetat Spektroflorometrik, AlCl ₃ /Potasyum Asetat Spektrofotometrik ve CUPRAC Yöntemlerinin Uygulanması	98
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	100
KAYNAKLAR	107
ÖZGEÇMİŞ.....	111

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 : Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı	11
Şekil 2.2 : Antoksanin gruplarının temel kimyasal yapıları	12
Şekil 2.3 : Antosiyanidin temel kimyasal yapısı	12
Şekil 2.4 : Apigenin, krisin ve luteolin kimyasal yapıları	13
Şekil 2.5 : Kuersetin, mirisetin, fisetin, kaemferol, rutin ve morinin kimyasal yapıları.....	14
Şekil 2.6 : Absorpsiyon, Floresans ve Fosforesans'ın gösterimi	18
Şekil 2.7 : Spektrofluorometre cihazının basit gösterimi	20
Şekil 2.8 : Floresans şiddeti ve konsantrasyon ilişkisi.....	22
Şekil 2.9 : Al(III)'un kuersetin ve morin ile oluşturduğu komplekslerin kimyasal yapısı	24
Şekil 2.10: CUPRAC yönteminin kromoforunu oluşturan Bis(2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) bakır(I) kelatının 'Cu(I)-Nc' kimyasal yapısı	24
Şekil 4.1 : 2×10^{-7} M kuersetin (QR) varlığında oluşan Al(III)-kuersetin kompleksinin floresans spektrumu.....	34
Şekil 4.2 : Spektrofluorometrik-AlCl ₃ yöntemine göre kuersetinin emisyon spektrumu.....	34
Şekil 4.3 : 1×10^{-7} M kuersetin çözeltisine değişik inkübasyon sürelerinde uygulanan AlCl ₃ /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin sonuçları	36
Şekil 4.4 : 2×10^{-7} M kuersetin çözeltisine değişik pH'larda uygulanan AlCl ₃ /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin sonuçları	36
Şekil 4.5 : Kuersetinin kalibrasyon eğrisi	37
Şekil 4.6 : Mirisetinin kalibrasyon eğrisi	38
Şekil 4.7 : Fisetinin kalibrasyon eğrisi.....	39
Şekil 4.8 : Kaemferolün kalibrasyon eğrisi	40
Şekil 4.9 : Morinin kalibrasyon eğrisi	41
Şekil 4.10: Rutinin kalibrasyon eğrisi.....	42

Şekil 4.11: Luteolinin kalibrasyon eğrisi	43
Şekil 4.12: Galanginin kalibrasyon eğrisi	44
Şekil 4.13: Kuersitrinin kalibrasyon eğrisi	45
Şekil 4.14: Spektroflorometrik- AlCl_3 yöntemine göre mirisetinin emisyon spektrumu	47
Şekil 4.15: Spektroflorometrik- AlCl_3 yöntemine göre fisetinin emisyon spektrumu.....	48
Şekil 4.16: Spektroflorometrik- AlCl_3 yöntemine göre kaemferolun emisyon spektrumu	48
Şekil 4.17: Spektroflorometrik- AlCl_3 yöntemine göre morinin emisyon spektrumu	49
Şekil 4.18: Spektroflorometrik- AlCl_3 yöntemine göre rutinın emisyon spektrumu	49
Şekil 4.19: Spektroflorometrik- AlCl_3 yöntemine göre luteolinin emisyon spektrumu ..	50
Şekil 4.20: Spektroflorometrik- AlCl_3 yöntemine göre galanginin emisyon spektrumu.	50
Şekil 4.21: Spektroflorometrik- AlCl_3 yöntemine göre kuersitrinin emisyon spektrumu	51
Şekil 4.22: Kuersetin-Fisetin karışım çözeltisinin emisyon spektrumu.....	52
Şekil 4.23: Kuersetin-Kaemferol karışım çözeltisinin emisyon spektrumu	52
Şekil 4.24: Mirisetin-Fisetin karışım çözeltisinin emisyon spektrumu	53
Şekil 4.25: Fisetin-Kaemferol karışım çözeltisinin emisyon spektrumu	53
Şekil 4.26: Morin-Fisetin karışım çözeltisinin emisyon spektrumu	54
Şekil 4.27: Mirisetin-Morin karışım çözeltisinin emisyon spektrumu	54
Şekil 4.28: Kuersetin-Fisetin-Kaemferol karışım çözeltisinin emisyon spektrumu	55
Şekil 4.29: Kuersetin-Mirisetin-Morin karışım çözeltisinin emisyon spektrumu	56
Şekil 4.30: Fisetin-Mirisetin-Morin karışım çözeltisinin emisyon spektrumu	56
Şekil 4.31: Kuersetin-Mirisetin-Kaemferol karışım çözeltisinin emisyon spektrumu .	57
Şekil 4.32: Aseton-M- β -CD ortamında kuersetinin emisyon spektrumu	63
Şekil 4.33: Kuersetinin kalibrasyon eğrisi	64
Şekil 4.34: Mirisetinin kalibrasyon eğrisi	65
Şekil 4.35: Fisetinin kalibrasyon eğrisi.....	66
Şekil 4.36: Kaemferolun kalibrasyon eğrisi	67
Şekil 4.37: Morinin kalibrasyon eğrisi	68
Şekil 4.38: Rutinin kalibrasyon eğrisi.....	69
Şekil 4.39: Luteolinin kalibrasyon eğrisi	70
Şekil 4.40: Galanginin kalibrasyon eğrisi	71

Şekil 4.41: Kuersitrinin kalibrasyon eğrisi	72
Şekil 4.42: Aseton-M- β -CD ortamında spektrofotometrik-AlCl ₃ yöntemine göre Fisetinin emisyon spektrumu	74
Şekil 4.43: Aseton-M- β -CD ortamında spektrofotometrik-AlCl ₃ yöntemine göre Mirisetinin emisyon spektrumu	75
Şekil 4.44: Aseton-M- β -CD ortamında spektrofotometrik-AlCl ₃ yöntemine göre Morinin emisyon spektrumu	75
Şekil 4.45: Aseton-M- β -CD ortamında Fisetin-Morin karışım çözeltisinin emisyon spektrumu	76
Şekil 4.46: Aseton-M- β -CD ortamında Kuersetin-Mirisetin karışım çözeltisinin emisyon spektrumu	77
Şekil 4.47: Aseton-M- β -CD ortamında Kuersetin-Morin karışım çözeltisinin emisyon spektrumu	77
Şekil 4.48: Aseton-M- β -CD ortamında Mirisetin-Kaemferol karışım çözeltisinin emisyon spektrumu	78
Şekil 4.49: Aseton-M- β -CD ortamında Mirisetin-Rutin karışım çözeltisinin emisyon spektrumu	78
Şekil 4.50: Aseton-M- β -CD ortamında Morin-Fisetin-Kaemferol karışım çözeltisinin emisyon spektrumu	79
Şekil 4.51: Aseton-M- β -CD ortamında Morin-Mirisetin-Kaemferol karışım çözeltisinin emisyon spektrumu	80
Şekil 4.52: Aseton-M- β -CD ortamında Kuersetin-Mirisetin-Fisetin karışım çözeltisinin emisyon spektrumu	80
Şekil 4.53: Aseton-M- β -CD ortamında Kuersetin-Morin-Fisetin karışım çözeltisinin emisyon spektrumu	81
Şekil 4.54: Galanginin kalibrasyon eğrisi	88
Şekil 4.55: Kuersitrinin kalibrasyon eğrisi	89
Şekil 4.56: Galanginin kalibrasyon eğrisi	90
Şekil 4.57: Kuersitrinin kalibrasyon eğrisi	91
Şekil 4.58: Soğan özütüne AlCl ₃ /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin uygulanması ile elde edilen floresans spektrumu.....	94
Şekil 4.59: Spektrofotometrik-AlCl ₃ yöntemine göre soğanın emisyon spektrumu	95
Şekil 4.60: Aseton-M- β -CD ortamında soğanın emisyon spektrumu.....	96

Şekil 4.61: Spektrofluorometrik- AlCl_3 yöntemine göre kırmızı şarabın emisyon spektrumu	97
Şekil 4.62: Spektrofluorometrik- AlCl_3 yöntemine göre elma suyunun emisyon spektrumu	97

TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1 : Kuersetinin konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemleri	37
Tablo 4.2 : Mirisetinin konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemleri	38
Tablo 4.3 : Fisetinin konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemleri	39
Tablo 4.4 : Kaemferolun konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemleri	40
Tablo 4.5 : Morinin konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemleri	41
Tablo 4.6 : Rutinin konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemleri	42
Tablo 4.7 : Luteolinin konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemleri	43
Tablo 4.8 : Galanginin konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemleri	44
Tablo 4.9 : Kuersitrinin konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemleri	45
Tablo 4.10 : Bazı fenolik bileşiklerin spektrofotometrik- AlCl_3 yöntemine göre elde edilen doğru denklemleri, molar floresans katsayıları, eksitasyon ve emisyon dalgaboyları	46
Tablo 4.11 : Sentetik karışım çözeltilerinin spektrofotometrik- AlCl_3 yöntemine göre beklenen ve ölçülen floresans intensite değerlerinin karşılaştırılması	58
Tablo 4.12 : Kuersetinin konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemleri	64
Tablo 4.13 : Mirisetinin konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemleri	65

Tablo 4.14: Fisetinin konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemleri	66
Tablo 4.15: Kaempferolun konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemleri	67
Tablo 4.16: Morinin konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemleri	68
Tablo 4.17: Rutinin konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemleri	69
Tablo 4.18: Luteolinin konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemleri	70
Tablo 4.19: Galanginin konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemleri	71
Tablo 4.20: Kuersitrinin konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemleri	72
Tablo 4.21: Bazı fenolik bileşiklerin spektrofotometrik-AlCl ₃ yönteminin aseton-M-β- CD ortamında uygulanması ile elde edilen doğru denklemleri, molar floresans katsayıları, eksitasyon ve emisyon dalga boyları	73
Tablo 4.22: Sentetik karışım çözeltilerinin aseton-M-β-CD ortamında spektrofotometrik-AlCl ₃ yöntemine göre beklenen ve ölçülen floresans intensite değerlerinin karşılaştırılması	82
Tablo 4.23: Çeşitli flavonoidlerin AlCl ₃ /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi ve CUPRAC yöntemine göre doğru denklemleri ve molar absorptivite katsayıları	87
Tablo 4.24: Galanginin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemleri	88
Tablo 4.25: Kuersitrinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemleri	89
Tablo 4.26: Galanginin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemleri	90
Tablo 4.27: Kuersitrinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemleri	91

Tablo 4.28: Fenolik bileşiklerin AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi, aseton-M- β -CD ortamında AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi, AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi ve CUPRAC yöntemleri belirlenen QREFC (Kueretin Eşdeğeri Flavonoid Konsantrasyonu) katsayı değerleri	93
Tablo 4.29: Gerçek örneklerin belirlenen Kueretin Eşdeğeri Flavonoid Konsantrasyon (QREFC) değerleri	99

SEMBOL LİSTESİ

CUPRAC	: bakır(II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi
Cu(II)-Nc	: bakır(II)-neokuproin
Cu(I)-Nc	: bakır(I)-neokuproin
QREFC	: kuersetin eşdeğeri flavonoid konsantrasyonu
ROS	: reaktif oksijen türleri
QR	: kuersetin
RUT	: rutin
MOR	: morin
FIS	: fisetin
MRC	: mirisetin
KAM	: kaemferol
ϵ'	: molar floresans katsayısı
ϵ	: molar absorplama katsayısı
M-β-CD	: metil- β -siklodekstrin
λ	: dalgaboyu
AUC	: eğri altında kalan alan
TAC	: toplam antioksidan kapasite
MO	: molekül orbital
A	: antioksidan
Ex	: eksitasyon
Em	: emisyon
PE	: fikoeritrin
FL	: fluoresssein
ORAC	: oksijen radikali absorbans kapasitesi
AAPH	: 2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorür
HORAC	: hidroksil radikalini önleme kapasitesi
TRAP	: toplam radikal tutma parametresi
v:v	: hacim/hacim
w/v	: ağırlık/hacim

ÖZET

SPEKTROFLORİMETRİK ANALİZ YÖNTEMLERİNİN TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİNLERİNE UYGULANMASI

Flavonoidler antioksidan, antiviral, antikanserojen ve antienflamatuvar (iltihapla savaşı) aktiviteleri dolayısıyla insan sağlığı için yararlıdır ve bu nedenle analizleri önemlidir. Flavonoidlerin bitkilerde en yaygın olarak bulunan sınıfı flavonoller olup bunların en önemlileri kuersetin, mirisetin, fisetin ve kaempferoldur. Toplam flavonoid tayini için en yaygın yöntem AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi olup bu çalışmada mevcut yöntemle (aynı reaktif kullanılarak) florometrik bir seçenek önerilmiştir. Bu amaçla geliştirilen AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi, etanol ve (daha önce lipofilik antioksidanlar için geliştirilmiş olan) aseton/ $\text{M}-\beta$ -CD (metil- β -siklodekstrin) çözücü ortamlarına uygulanmış ve sonuçlar, gerek AlCl_3/KAc , gerekse CUPRAC (bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite) spektrofotometrik yöntemlerinkiyle kıyaslanmıştır. Spektrofotometrik yöntemde çoğu flavonoidler için, aynı reaktifi kullanan spektrofotometrik yöntemde rastlanan 10^{-7} M dolayındaki belirtme sınırları (LOD değerleri) 10^{-8} M düzeyine indirilmiştir, ancak rutin, galangin, luteolin ve kuersitrin için kalibrasyon eğrisi doğrusallığı ve duyarlılık, spektrofotometriye göre daha yetersiz bulunmuştur. Bazı flavonoidler için florometride doğrusallığın düşük oluşu, spektrofotometride belirgin olarak oluşan tek bir kromofordan farklı olarak çeşitli stökiyometrilere sahip Al-flavonol komplekslerinin floresans sönüm ömürlerinin farklı oluşundan kaynaklanabilir. AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin kromoforu, alüminyum katyonunun flavon ve flavonollerin C-4 keto grubu ve C-3 veya C-5 hidroksil gruplarından biriyle oluşturduğu kararlı kelat kompleksidir ve flavonoidlerden flavon, flavonol ve isoflavon grupları bu tayine yanıt verir. Spektrofotometrik yöntemde flavonoidlerin Al-kelatlarının floresans intensiteleri ortaklaşa 470 nm eksitasyon dalga boyu ve 525 nm emisyon dalga boyunda ölçülmüştür. Spektrofotometrik yöntem, spektrofotometrik olana nazaran pH değişimlerine fazlaca duyarlı olup optimal pH 7 bulunmuştur. Aşırı pH duyarlılığının olası nedeni, floresans olayında kelat bağı yapmamış flavonoid $-\text{OH}$ gruplarının uyarılmış konumda pK_a değerlerindeki şiddetli değişime paralel olarak floresans özelliklerinin değişmesidir. Spektrofotometrik yöntemde etanol ve aseton/ $\text{M}-\beta$ -CD çözücü ortamlarında flavonoid bileşiklerin kalibrasyon doğruları oluşturularak QREFC (Kuersetin Eşdeğeri Flavonoid Konsantrasyonu) katsayıları bulunmuştur. Her iki çözücü ortamında da flavonollerin ikili ve üçlü kombinasyonlarından oluşan sentetik karışımları hazırlanarak, karışımı oluşturan flavonoid bileşenlerin floresans intensitelerinin (yaklaşıkla) toplamsal karakterde olduğu gözlemlenmiştir. Bu toplamsallık özelliği, antioksidan veya flavonoid kapasitesi ölçümlerinin presizyonunda önemlidir. Flavonolce zengin gerçek örneklerin (kırmızı şarap, soğan, yeşil çay vb.) toplam QREFC flavonoid içerikleri, gerek her iki çözücü ortamında uygulanan AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik ve spektrofotometrik yöntemleri, gerekse CUPRAC yöntemi ile belirlenmiştir. Spektrofotometrik yöntemde bazı flavonoidler

(özellikle kötü lineer kalibrasyon eğrisi verenler) için elde edilen, spektrofotometrik sonuçlara göre aşırı düşük QREFC değerleri, karışımların gözlenen toplam flavonoid kapasiteleri içinde bunların temsil katkı paylarının görece düşük kalmasına yol açmıştır. Uygulanan dört yöntem yardımıyla gerçek örnekler arasında QREFC flavonoid kapasiteleri cinsinden sıralama yapıldığında, hepsinde en yüksek QREFC değerinin kırmızı şaraba ait olduğu ve sıralamaların birbiriyle uyumlu olduğu gözlenmiştir.

SUMMARY

APPLICATION OF SPECTROFLUOROMETRIC ANALYSIS METHODS TO TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY ASSAYS

Flavonoids are health beneficial compounds in regard to their antioxidant, anticancer and anti-inflammatory activity, and therefore their analysis is important. Flavonols are the most widely found flavonoid class in the plant kingdom, and their leading representatives are quercetin, myricetin, fisetin, and kaempferol. The most frequently used method in literature for total flavonoid assay is the spectrophotometric aluminium chloride/potassium acetate (AlCl_3/KAc) method, and this work proposes an alternative spectrofluorometric method for flavonoid assay using the same reagent. For this purpose, the developed AlCl_3/KAc method was applied to flavonoids dissolved in ethanol and in acetone-methyl- β -cyclodextrin ($\text{M-}\beta\text{-CD}$) solution (previously developed for the assay of lipophilic antioxidants), and the results were compared to those of both the AlCl_3/KAc the CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity) spectrophotometric assays. Compared to the 10^{-7} M detection limits (LOD values) of the AlCl_3/KAc spectrophotometric method, the LOD of the spectrofluorometric method was reduced down to 10^{-8} M levels for most flavonoids, except for rutin, galangin, luteolin, and quercitrin, which gave poorer linear calibration curves. The lower linear correlation coefficients for the latter flavonoids in spectrofluorometry may arise from the fact that spectrophotometry measures the color of a unique chromophore while a number of complexes with different stoichiometries may emerge in spectrofluorometry each having different fluorescence decay lifetimes. The major chromophore in AlCl_3/KAc spectrophotometry is the stable Al-chelate formed with the C-4 keto and either C-3 or C-5 hydroxyl groups of flavons and flavonols, and the flavon, flavonol, and isoflavon sub-classes of flavonoids respond to this spectrophotometric method. As mutual analytical wavelengths of flavonoids in the developed fluorometric method, fluorescence intensities with excitation at 470 nm and emission at 525 nm were measured. Spectrofluorometry was more dependent on pH than spectrophotometry, and the optimal pH of fluorescence measurement was 7. The strong dependence on pH of spectrofluorometry may be attributed to changes in fluorescence properties of Al-chelates of flavonoids arising from intense changes in the excited-state pK_a values of certain $-\text{OH}$ groups that have not chelate-bonded to Al(III) . The quercetin-equivalent flavonoid concentrations (QREFC values) of individual flavonoids were found from the calibration curves drawn in ethanol and in acetone/ $\text{M-}\beta\text{-CD}$ media. In both solvent media, binary and ternary mixtures of flavonols were prepared, and the fluorescence intensities of mixture constituents were found to have additive property (*i.e.*, signal obtained from the mixture was approximately equal to the sum of the signals due to individual mixture constituents). This additive property is essential for precise capacity measurements of antioxidants and flavonoids. The total QREFC flavonoid capacities of a number of real samples such as red wine, onion, and green tea were measured with both the developed spectrofluorometric and the two spectrophotometric (*i.e.*,

AlCl₃/KAc and CUPRAC) methods carried out in two different solvent media. In spectrofluorometry, the QREFC coefficients of certain flavonoids (which gave relatively poor calibration curve linearities) were quite lower than found in spectrophotometry, which may pose a problem in the representative weights of these flavonoids in the observed total flavonoid capacities of mixtures. The order of QREFC flavonoid capacities of real samples measured with four different methods were generally in accordance, with red wine showing the highest QREFC value in each method.

1. GİRİŞ

Peroksidasyon, serbest radikallerle oluşan bir zincir reaksiyonudur. Kanseri, kalp hastalıkları ve romatizmal kireçlenmeler gibi hastalıklar üzerindeki olası rolleriyle ilgili olarak oksiradikaller ve peroksidatif hasar üzerinde büyük bir ilgi vardır. Zincirleme reaksiyon teorisine göre, oksijen ile otokside olabilen madde, oksijenle birleşmekte ve bu şekilde meydana gelen etkinleşmiş peroksil radikal ve molekülleri, enerjilerini maddenin yükseltgenebilen diğer moleküllerine aktarmakta ve bu suretle besinlerdeki otoksidasyon devam etmektedir [1]. Antioksidanlar bu zincir reaksiyonunu kırıcı rol oynarlar. Yani bu bileşikler aktivasyon enerjisini kabul ederler, ancak bu enerjiyi başka moleküllere aktaramazlar. Bu şekilde, bir antioksidan molekülünün araya girmesiyle otokside olabilen maddenin birçok molekülü yükseltgenmekten kurtulur [2].

Flavonoidler meyve, sebze ve bitkilerde, ayrıca bunlardan üretilen çay ve kırmızı şarap gibi ürünlerde en çok bulunan polifenolik bileşiklerdir. Flavonoidler, fenolik ve furan halkalarından oluşan benzo- γ -furan türevleridir ve substituentlerine göre sınıflandırılırlar. Besinsel flavonoidler, hidroksil, metoksi ve glikozid yan gruplarının düzenleri ve A ile B halkaları arasındaki konjugasyona göre farklılık gösterirler. Flavonoller, flavonoidlerin bitkilerde en yaygın olarak bulunan sınıfıdır. Kuersetin, flavonoidlerin en önemli bileşiği ve bitkilerin temel fenolik bileşenidir [3].

Fotoluminesans, bir maddenin absorpladığı bir ışımayı aynı veya daha uzun dalga boyunda bir ışımaya geri vermesi özelliğidir. Bu özellik floresans ve fosforesans olmak üzere iki kısma ayrılır. Bir maddenin floresans özelliği, üzerine uygun dalga boyunda bir ışımaya düşürülür düşürülmez başlar ve ışımaya kesilir kesilmez de kaybolur [4]. Floresansın diğer optik yöntemlere göre başlıca avantajı fazlaca duyarlı olmasıdır. Floresansın birçok uygulaması, dedeksiyon için örneğin çok küçük miktarlarının yeterli olmasına dayanılarak gerçekleştirilmektedir. Çoğunlukla nanomolar seviyedeki çözeltilerin kantitatif olarak belirlenebilmesini mümkün kılar [5].

Bu nedenle spektrofotometrik analiz yöntemlerinin toplam antioksidan kapasite tayin yöntemlerine uyarlanabilmesi önemlidir. Bu amaçla literatürde toplam flavonoid tayininde geniş kullanım alanına sahip AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin [6] spektrofotometrik olarak uygulanmasına çalışılmıştır. Spektrofotometrik yöntemde oluşan Al-flavonoid komplekslerinin floresans yapıları incelenerek, yöntemin spektrofotometrik olarak uygulanabilmesini sağlayacak seyreltme işlemleri yapılmıştır. Denemeler sonucunda flavonollerin ve flavon yapıdaki luteolinle oluşan Al komplekslerinin floresans özellik gösterdikleri tespit edilmiş, bu bileşiklerin uygun eksitasyon ve emisyon dalgaboyları belirlenmiştir. Bu dalgaboylarındaki floresans intensiteleri ölçülerek, doğru denklemleri elde edilmiştir. Sentetik bileşiklerin karışımlarının toplamsallıktan sapma gösterip göstermediği araştırılmıştır. Geliştirilen AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin, değişik çözücü ortamlarına uyarlanabilmesi amacıyla, aseton-M- β -CD ortamında uygulaması gerçekleştirilmiştir.

Geliştirilen AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi ve aseton-M- β -CD ortamındaki uygulaması kullanılarak flavonol olarak zengin bazı gerçek örneklerin toplam flavonoid miktarı tayini yapılmıştır. Karşılaştırma yöntemi olarak AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik [6] yöntemi ve CUPRAC (Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite) yöntemi [7] kullanılmıştır.

Elde edilen kapasite değerleri Kuersetin Eşdeğeri Flavonoid Konsantrasyonu (QREFC) cinsinden verilmiştir.

2. GENEL KISIMLAR

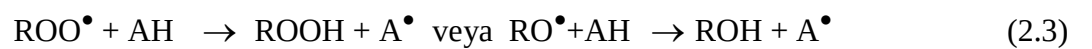
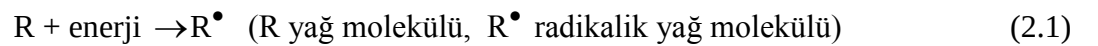
2.1 ANTİOKSİDANLAR

Peroksidasyon, serbest radikallerle oluşan bir zincir reaksiyonudur. Kanseri, kalp hastalıkları ve romatizmal kireçlenmeler gibi hastalıklar üzerindeki olası rolleriyle ilgili olarak oksiradikaller ve peroksidatif hasar üzerinde büyük bir ilgi vardır. C vitamini, E vitamini, ürik asit, glutatyon peroksidaz, katalaz ve süperoksit dismutaz gibi yalnız biyolojik antioksidanların hareket tarzlarını tanımlama ve anlama konusunda büyük gelişme olsa da, bu koruyucuların biyolojik meyveler ve dokulardaki ortak etkilerini belirlemek için çok fazla deneme yapılmamıştır.

Zincirleme reaksiyon teorisine göre, oksijen ile otokside olabilen madde, oksijenle birleşmekte ve bu şekilde meydana gelen etkinleşmiş peroksil radikal ve molekülleri, enerjilerini maddenin yükseltgenen diğer moleküllerine aktarmakta ve bu suretle besinlerdeki otoksidasyon devam etmektedir [1].

Antioksidanlar bu zincir reaksiyonunu kırıcı rol oynarlar. Yani bu bileşikler aktivasyon enerjisini kabul ederler, ancak bu enerjiyi başka moleküllere aktaramazlar. Bu şekilde, bir antioksidan molekülünün araya girmesiyle otokside olabilen maddenin birçok molekülü yükseltgenmekten kurtulur.

Antioksidanların etki mekanizmasını şematik olarak göstermek gerekirse;



(AH: Antioksidan molekülü, $A^{\bullet}$: Antioksidan radikali)

Antioksidanlar yükseltgenebilen maddeler olduğundan, radikalik reaksiyon zincirini kırmaları sırasında kendileri yükseltgenerek bozunurlar. Bu nedenle antioksidanlar yalnız sınırlı bir zaman için yükseltgenebilen maddeyi koruyabilir ve belli bir noktadan sonra madde ortamda hiç antioksidan yokmuş gibi yükseltgenmeye devam eder [2].

Antioksidanlar iki grupta sınıflandırılırlar. Birincil antioksidanlar, yeni oksidasyon zincirleri başlatan yeni radikal üretiminin hızını düşürürler. Hidroperoksitleri indirgeyerek (glutatyon, peroksidaz, katalaz gibi) veya transisyon metal iyon katalizörlerini ayırarak (transferrin) etki edebilirler. İkincil antioksidanlar radikalleri doğrudan tutarlar, böylece oksidasyonun zincir uzunluklarını azaltarak peroksidatif hasarın büyümesini sınırlarlar (E vitamini, süperoksit dismutaz gibi). Bazı metal kelatlayıcıları da radikalik zincir reaksiyonlarını katalizleyen geçiş metallerini çekerek ikincil antioksidan gibi davranırlar [1].

Antioksidanların kimyasal aktiviteleri, diğer bir deyişle hidrojen veya elektron donör araçları olarak indirgeme potansiyelleri onların serbest radikal yutucu olarak göstermiş oldukları potansiyel ile ifade edilir. Bir antioksidanın aktivitesi şu esaslara bağlıdır [8].

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

Reaktif oksijen türleri (ROS) ve oksidatif hasarın bir çok iltihabik ve dejeneratif hastalıklarda bulunduğu dair kanıtlar, son zamanlarda daha çok ilgi görmelerine yol açmıştır. Oksidatif hasar, serbest radikal üretimindeki artıştan yani eksojen radikallerinden (radyasyon, kirlilik, sigara içmek) veya iltihap ve solunum bozukluğu gibi endojen kaynaklarından dolayı meydana gelir.

Memeliler oksijenden yararlanmak ve onun kısmi indirgenmiş türlerinin zararlı etkilerini minimize etmek için karışık antioksidan stratejiler geliştirmişlerdir. Hücreler, hücre membranları ve ekstraselüler akışkanlardaki antioksidanlar aşırı ve uygunsuz ROS oluşumlarını dengelerler. Oksidan koşullarına karşı redoks dengesini sürdürmek için kanın önemli bir rolü vardır, çünkü antioksidanları vücudun her tarafına taşır ve yeniden dağıtır. Mesela plazma, hidrojen peroksit ve süperoksit anyon gibi uzun ömürlü ROS'ları süpürür. Böylece katalitik metal iyonlarıyla oluşan daha zararlı türlerin oluşum reaksiyonlarını engeller. Ayrıca yükseltgenmiş askorbik asidi de tekrar askorbata indirgeyebilir. Böylece plazmanın antioksidan durumu birçok farklı bileşiğin etkileşimi ve sistemik metabolik etkileşimler sonucu ortaya çıkar.

Farklı antioksidanlar arasındaki işbirliği ROS etkilerine karşı tek bir bileşiğinkinden daha büyük koruma sağlar. Antioksidanlar arasındaki tipik bir sinerjizm örneği olarak, glutatyonun askorbatı ve askorbatın α -tokoferölü etkilemesi gösterilebilir. Böylece toplam antioksidan kapasite (TAC), tek bir örneğin farklı konsantrasyonlarıyla yapılan ölçümlerden daha fazla biyolojik bilgiler verecektir.

Antioksidan kapasite ölçümünün uygulamalarında bazı hususlara dikkat edilmelidir.

Antioksidan kapasite ve antioksidan aktivite terimleri çoğu zaman birbirleri yerine kullanılmasına rağmen gerçek anlamları birbirlerinden oldukça farklıdır. Antioksidan aktivite verilen bir serbest radikale karşılık gelen tek bir antioksidanın hız sabitine karşılık gelir. Antioksidan kapasitesi ise test çözeltisi tarafından süpürülen, verilen bir serbest radikalin molünün ölçümüdür.

Belirli bir antioksidan, oksidasyon reaksiyonunu başlatmak için kullanılan türe bağlı olarak farklı aktivitelere sahip olabilir. Süperoksit anyon, hidroksil radikal ve hidrojen peroksit *in vivo* olarak meydana geldikleri bilindikleri için en sık kullanılan bileşiklerdir. Fakat suda çözünen peroksil radikalleri, azo başlatıcıların termal bozunmaları boyunca oluşurlar. Peroksil radikal kaynağı olarak çoğunlukla 2,2'-diazobis (2-amidinopropane) hidroklorür (ABAP) ve 2,2'-diazobis (2-amidinopropane) dihidroklorür (AAPH) geniş ölçüde kullanılır. Katalitik geçiş metal iyonları da oksidatif reaksiyonların güçlü başlatıcılarıdır. Bunlar geniş bir aralıkta oksidan türleri üretirler ve *in vivo* ortamdaki katalitik formları sakıncalıdır. Geçiş metalleri tarafından başlatılan

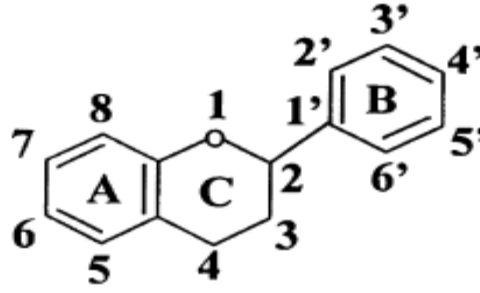
oksidatif reaksiyonlar kelat oluşturucular tarafından engellenirken, zincir-kırıcı antioksidanlar tarafından engellenmezler. Tek başına bulunan antioksidanlar gibi genelde farklı ROS'lara karşı farklı aktivitelere sahip olurlar, kompleks karışımın antioksidan kapasitesi süpürülecek radikale bağlıdır. Bu nedenle oksidasyon reaksiyonunu başlatan radikal her zaman belirlenmiş olmalı ve dikkatlice seçilmelidir.

Plazmanın toplam antioksidan kapasitesi, proteinlerin, bilirubin ve ürik asidin tiyol gruplarını içeren zincir kırıcı antioksidanların hepsinin etkisinin bir kombinasyonudur. Bunların toplam kapasiteye katkı payları çok farklı olabilir. Örnek olarak, plazmadaki ürik asidin konsantrasyonu çok fazla olduğundan, plazmanın TAC'sine büyük katkı sağlar [9].

2.2. FLAVONOİDLER

Flavonoidler insan beslenmesinde yer alan meyveler, sebzeler ve bitkilerde, ayrıca bunlardan üretilen çay ve kırmızı şarap gibi ürünlerde en çok bulunan polifenolik bileşiklerdir. Flavonoidler, fenolik ve furan halkalarından oluşan benzo-γ-furan türevleridir ve substituentlerine göre sınıflandırılırlar. Besinsel flavonoidler, hidroksil, metoksi ve glikozid yan gruplarının düzenleri ve A ile B halkaları arasındaki konjugasyona göre farklılık gösterirler. 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.

Metabolizmada flavonoidlere hidroksil grupları eklenebilir, metillenebilir veya sülfatlanabilir. Besinlerde flavonoidler en çok 3-O-glikozidleri ve polimerleri şeklinde bulunur. Birçok çeşit daha yüksek yapı mevcuttur ve besinsel flavonoid alımının önemli bir kısmını oluştururlar. Metal kelatlama, lipid peroksidasyonunu engelleme, reaktif oksijen türlerini içeren diğer prosesleri azaltma özellikleri vardır. Glikozid birimi genellikle glukozdur ancak glukoramnoz, galaktoz, arabinoz ve ramnoz da bulunabilmektedir [3]. Flavonoidler, antioksidan aktivitelerini belirleyen ve aromatik halkalara bağlı olan birçok fenolik hidroksil grupları içerirler [8].



Şekil 2.1: Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı

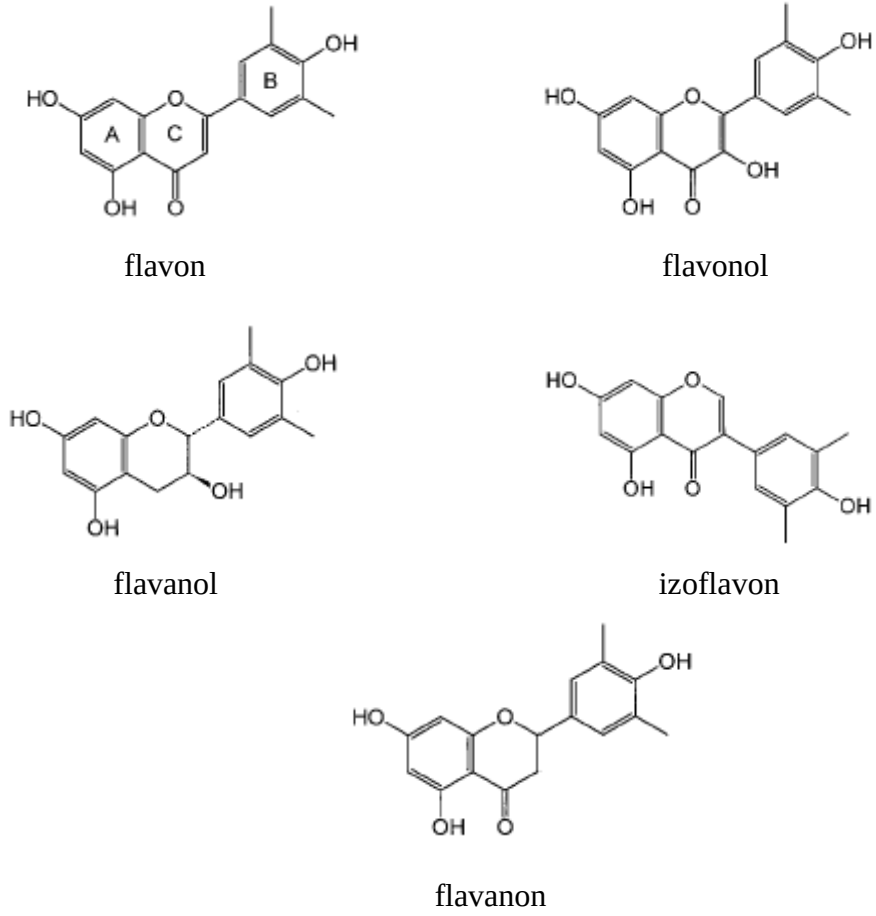
Harborne [10] doğal olarak bulunan 4000'den fazla flavonoid tanımlamıştır. Flavonoid içeren belli bitkiler ve baharatlar yaygın olarak kullanılan Ginkgo biloba gibi geleneksel doğu ilaçlarında kendini gösterir ve flavonoidler bugünlerde besinsel katkının önemli bir halkasıdır. Kuhnau [11], bütün flavonoidlerin Amerika'daki beslenme ortalama günlük alımının glikozidleri şeklinde ifade edilirse 1 g olduğu ve besinsel katkı alındığı zaman bunun daha yüksek olabileceğini tahmin etmiştir. Middleton ve diğ. [12], flavonoidleri antioksidan, antiviral, antikanserojen ve anti iltihabik aktiviteler gibi çeşitli biyokimyasal ve farmakolojik özelliklerle ilişkilendirmiş ve insan sağlığı için faydalı olduğunu belirtmişlerdir [13].

Flavonoidler; A, B ve C halkalarından oluşan halka yapısında çeşitli hidroksil, metoksi ve glikozid yan grupları içerirler. Halkalar arasındaki yapısal değişiklikler flavonoidleri çeşitli sınıflara ayırmaktadır [14].

Bu sınıflardan biri antoksanterinler, diğeri antosiyaninlerdir. Antoksanterinler kendi arasında 5 farklı sınıfa ayrılmaktadır.

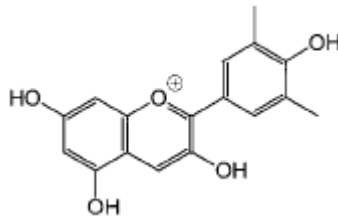
1. Antoksanterinler

- Flavanoller
- Flavonlar
- Flavonoller
- Flavanonlar
- İzoflavonlar



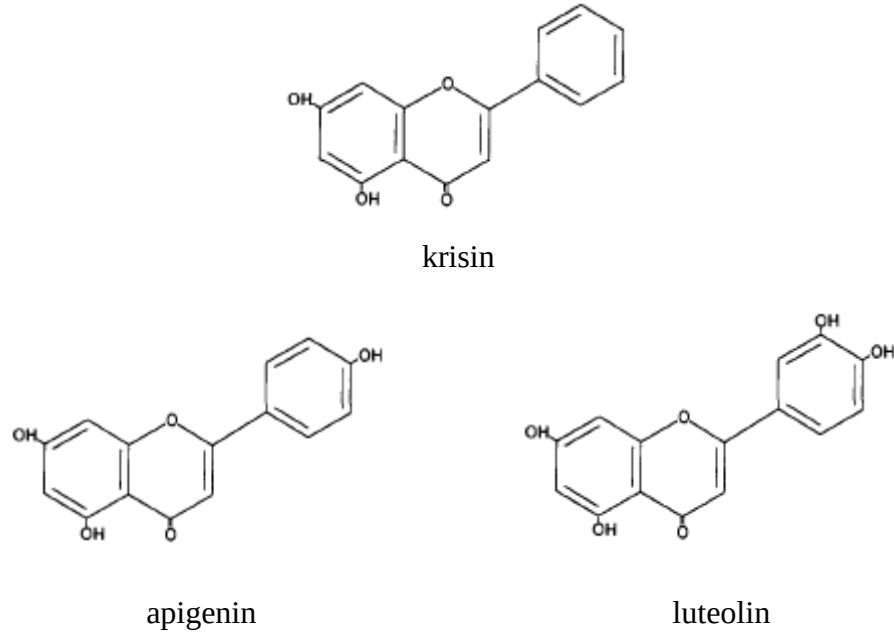
Şekil 2.2: Antoksanin gruplarının temel kimyasal yapıları

2. Antosiyanin ve antosiyanidinler



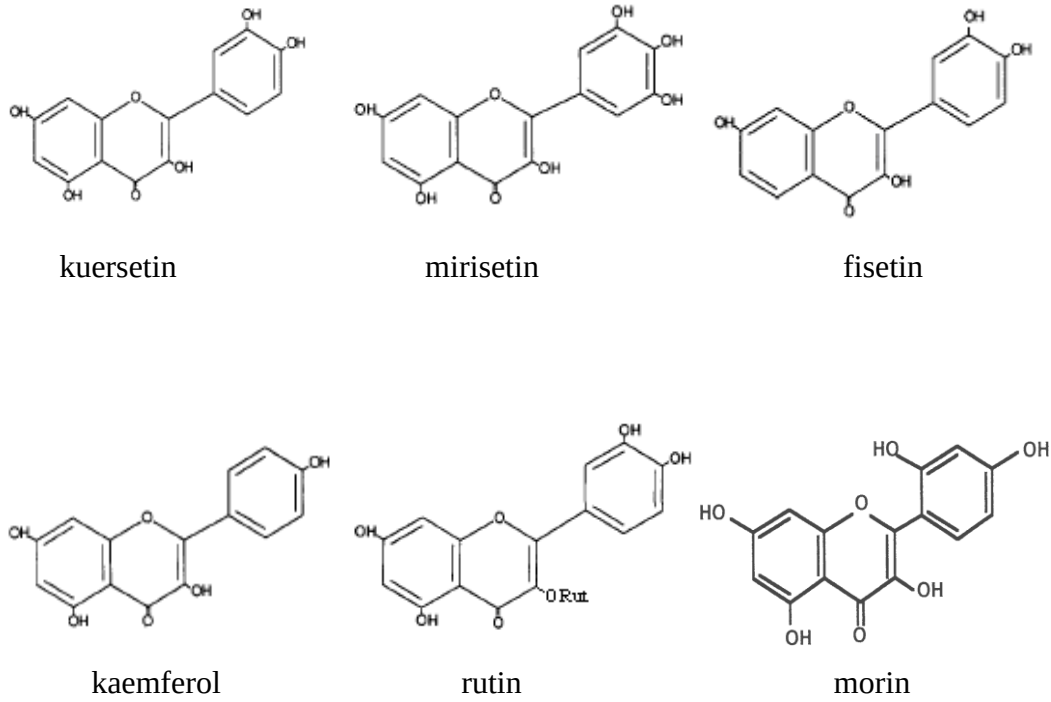
Şekil 2.3: Antosiyanidin'in temel kimyasal yapısı

Flavonoidler sınıfının temel maddesi *2-fenil kromon* olan *flavon*'dur. En önemli flavonlar; apigenin, krisin ve luteolin'dir (Şekil 2.4). Apigenin; maydonoz ve kereviz sapında, krisin; meyve kabuğunda, luteolin ise limon, zeytin, kereviz ve kırmızı biberde bulunur [3,8].



Şekil 2.4: Apigenin, kresin ve luteolinin kimyasal yapıları

Tez çalışmasında ağırlıklı olarak flavonoller üzerinde çalışıldığından, flavonoller hakkında daha çok bilgi toplanmıştır. Flavonoller (3-hidroksiflavon), flavonun 3. karbon atomuna bağlı bir hidroksil grubu taşırlar. Flavonoidlerin bitkilerde en yaygın olarak bulunan sınıfıdır [8]. En önemli flavonoller kuersetin, rutin, mirisetin, fisetin, morin ve kaemferoldur. Kuersetin flavonoidlerin en önemli bileşiği ve bitkilerin temel fenolik bileşenidir. Soğan, salatalık, brokoli, domates, çay, kırmızı şarap, yemişler, zeytin yağı ve elma kabuğunda bol miktarda bulunur. Mirisetin kıvılcık, üzüm ve kırmızı şarapta mevcuttur. Kaemferol ise pırasa, brokoli, marul, greyfurt ve siyah çayda bulunur [3]. Rutin kuersetinin glikozidi olup soğan, elma kabuğı, yemişler, siyah üzüm, çay ve brokolide bulunur. Morin ise kırmızı şarapta bulunur [8]. Fisetin çilek, elma, hurma, üzüm, soğan ve salatalık gibi bazı meyve ve sebzelerde 2-160 µg/g konsantrasyonu aralığında bulunan bir flavonoldur [15].



Şekil 2.5: Kuersetin, mirisetin, fisetin, kaemferol, rutin ve morinin kimyasal yapıları

Flavonun dihidroksi türevi *flavanon*'dur. En önemlileri naringenin, naringin, hesperidin ve hesperetin'dir. 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 izoflavonlardır. Flavonollerin C halkasında bulunan çifte bağlı oksijen atomunun yerine $-CH_2$ grubu geldiğinde *flavanol* oluşur. Flavanoller, flavonların indirgenmiş türevleridir. En önemlileri kateşin ve epikateşin'dir [16].

Antosiyaninler, flavanollerin B aromatik halkasına bir hidroksil grubunun bağlanmasıyla meydana gelir. Aglikonları *antosiyanidinler*'dir. En önemlileri; apigenidin, siyanidin, malvidin ve delfinidin'dir [17].



Flavonoidlerin yapılarına bağlı olarak antioksidan aktivitelerinin yüksek olmasını belirleyen birkaç özellik vardır.

- Radikal formun yüksek kararlılığını sağlayan ve elektron delokalizasyonuna katılan, B halkasındaki orto 3',4'-dihidroksi yapısı (kateşin, luteolin ve kuersetin gibi)
- A halkasındaki meta 5,7-dihidroksi yapısı (kaemferol, apigenin ve krisin gibi)
- C halkasında 4. karbon atomunda keto grubu oluşturan ve radikalın B halkasından elektron delokalizasyonunu arttıran, 2. ve 3. karbon atomları arasındaki çifte bağ (Kuersetin gibi)
- C ve A halkalarındaki 3. ve 5. pozisyonundaki hidroksil grupları (maksimum radikal-süpürme potansiyeli için gerekli olan)

2.2.1. Analizi Yapılan Bazı Flavonollerin Tıp Alanındaki Kullanımları

Geliştirilen spektrofotometrik yöntemle tayini gerçekleştirilen flavonollerin bazıları, tıpta geniş ölçüde kullanım alanına sahiptirler. İnsan beslenmesinde kantitatif olarak en fazla bulunan flavonoid olan kuersetin, meme kanserine yol açan 7,12-dimetilbenz[*a*]antrasen (DMBA)- ve *N*-nitrosometilüre, kolon kanserine yol açan azometan, karaciğer kanserine yol açan *N*-nitrosodietilamin/fenobarbital, ağız bölgesi kanserine yol açan DMBA, deri kanserine yol açan DMBA ve kemirgenlerde akciğer tümörlerine yol açan benzo[*a*]pirenin etki alanını azaltır [19].

Ramanathan ve diğ. ile Hanasaki ve diğ. tarafından morinin antioksidan özellik gibi bazı biyolojik aktivitelere sahip olduğu belirlenmiştir [20,21]. Bauman ve diğ. ile Nakadate ve diğ. tarafından arakidonik asit kademesinde lipoksigenaz (LOX) ve sikloksigenaz (COX) üzerinde düzenleyici etkileri olduğu tespit edilmiştir [22,23]. Tanaka ve diğ. tarafından arakidonik asit kademesini düzenleyen sentetik bileşiklerin dil kanserine yol açan 4-nitrokinolin-1-oksidi (4-NQO) inhibe ettiği bulunmuştur [24]. Francis ve diğ. tarafından, morinin ayrıca anti-mutajen olarak davrandığı belirlenmiştir [25]. Bu özelliklerinden dolayı morinin kimyasal kanserler üzerinde düzenleyici (inhibe edici) etkileri vardır [26].

Mirisetin, çok tüketilen gıdalarda kantitatif olarak fazla bulunması ve ispatlanmış biyolojik aktivitesi yüzünden ilgi çeken bir flavonoiddir. İnsan vücudunda LDL oksidasyonunu inhibe etmekteki yüksek aktifliği bilindiğinden beri kuvvetli bir antioksidandır. Lipogenesisi uyarmakta insülini taklit eder ve fare yağ dokusu

hücrelerinde glukoz transferinde bulunur. Mirisetin *p*-formu fenolsülfotransferazın kuvvetli bir inhibitörüdür ve bu yüzden klinik kullanımlarda süfolama kaynaklı kanserlerde kullanımı önerilmektedir. Bu nedenle mirisetin güçlü bir antikanserojen ve antimutajendir [27].

Fisetin kanser hücreleriyle olan mücadelede sıklıkla kullanılan bir flavonoldur. Fisetinin çeşitli tümör hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiği ve apoptosise sebep olduğu rapor edilmiştir. Kolon kanserine yol açan HT 29 hücre büyümesinin fisetinle inhibisyonu gerçekleştirilmiştir [15].

2.3. LUMİNESANS SPEKTROSKOPİSİ

Uyarılmış atom veya molekülün temel enerji düzeyine dönerken fazla enerjisinin tümünü veya bir kısmını ışıma enerjisi halinde geri vermesi yani sistemin ışıma yaymasına (emisyonuna) genel olarak lüminesans denir. Atom veya molekülün uyarılma enerjisini sağlama yolu, lüminesansın türünü belirler. Uyarılma enerjisinin bir kimyasal tepkimeden sağlanması halinde gözlenen lüminesans kemilüminesans, foton absorplanmasından sağlanması halinde fotolüminesans olarak adlandırılır. Biyolojik sistemlerde gözlenen lüminesansa ise biyolüminesans denir.

Fotolüminesans, bir maddenin absorpladığı bir ışımayı aynı veya daha uzun dalga boyunda bir ışıma olarak geri vermesi özelliğidir. Bu özellik floresans ve fosforesans olmak üzere iki kısma ayrılır. Bir maddenin floresans özelliği, üzerine uygun dalga boyunda bir ışıma düşürülür düşürülmez başlar ve ışıma kesilir kesilmez de kaybolur. Buna karşın fosforesans özelliği madde üzerinde uygun dalga boylu ışıma düşürülür düşürülmez başlar ve ışın kesildikten sonra bir süre daha devam eder.

Maddenin floresans özelliği üzerine kurulmuş olan ve tanımından anlaşılacağı üzere emisyonu dayanan analiz yöntemine florometri veya floresans spektroskopisi adı verilir. Bu yöntem absorpsiyon spektroskopisine göre daha hassastır, seçiciliği de daha yüksektir. Fakat floresans özelliği gösteren maddelerin sayısı az olduğundan uygulama alanı daha dardır.

Floresans, maddenin gaz, sıvı ve katı halinde görülen bir özelliktir. En basit floresans, seyreltik atom buharları tarafından meydana getirilir. Örneğin, buhar halinde bir sodyum atomu dalga boyları 5890 ve 5895 Å olan ışınları absorplar ve 3s orbitalinde bulunan bir elektron 3p orbitaline geçer. Orada 10^{-8} s gibi çok kısa bir süre kaldıktan sonra tekrar 3s orbitaline döner, bu sırada absorplamış olduğu sarı ışınları aynen geri verir. Bu şekilde absorplanan bir veya iki ışının aynen enerji kaybı olmaksızın geri verilmesi olayına rezonans floresansı veya rezonans ışıması denir.

2.3.1. Floresans ve Fosforesans Özelliklerinin İncelenmesinde Kullanılan Temel Birimler

Singlet, Triplet ve Dublet haller: Elektronları çiftleşmiş halde bulunan atom ve moleküllerin spektrumları magnetik alan içinde ve dışında aynıdır. Böyle atom ve moleküllere singlet denir. İçinde ortaklanmamış bir elektron içeren maddelere de dublet denir. Böyle maddelerin spektrumları magnetik alana konulduklarında değişir. Bu değişim elektron spininin alan yönünde ve alana zıt yönde olmasından ileri gelir.

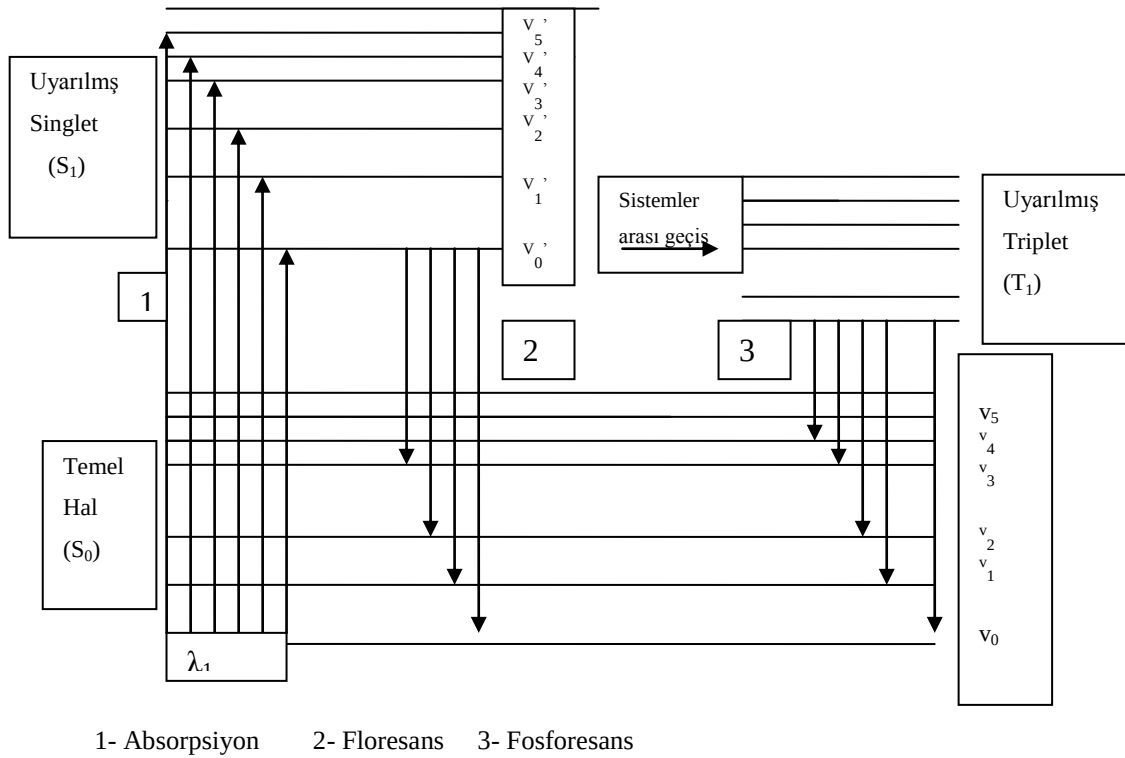
Temel hali singlet olan bir molekül uyarıldığı zaman bağ MO'dan antibağ MO'ya geçen elektronun spinini değişmediği için molekül uyarılmış singlet olur.

	↓	↑
	—	—
↓↑	↑	↑
Bağ MO —	—	—
temel hal	singlet uyarılmış hal	triplet uyarılmış hal
(singlet)		
$n = \text{Toplam spin} = +1/2 - 1/2 = 0$	$\text{Toplam spin} = 0$	$\text{Toplam spin} = 1/2 + 1/2 = 1$
$\text{Çok katlılık} = 2n + 1 = 1$	$\text{Çok katlılık} = 2 \times 0 + 1 = 1$	$\text{Çok katlılık} = 2 \times 1 + 1 = 3$

Uyarılmış singlet hale geçen bazı moleküllerde, molekülün yapısı gereği uyarılmış e^- spin değiştirir. Böylece molekülün içinde spinleri paralel iki e^- (yani eşleşmemiş $2e^-$) olur ve böyle moleküller paramanyetik özellik gösterir. Bu şekilde içinde eşleşmemiş iki e^- içeren atom ve molekül haline triplet denir. Temel singlet halde bulunan bir molekül ışıma absorplayarak doğrudan doğruya triplet hale geçemez. Önce uyarılmış

singlet haline oradan da triplet hale geçer. Çünkü elektronik geçişler çok katlılığı aynı olan haller arasında daha kolaydır. Temel halde bulunan maddenin çok katlılığıyla uyarılmış singlet halinin çok katlılığı aynıdır.

Uyarılmış tripletin enerjisi kendisini meydana getiren uyarılmış singletinkinden daha düşüktür. Yapısı gereği, uyarılmış singlet hali triplet haline dönüşebilen moleküllerde, her uyarılmış singletin bir uyarılmış tripleti vardır. Bir molekülün bir uyarılmış hali; bir uyarılmış singlet demek olduğundan ve molekülde de birçok uyarılma seviyeleri bulunduğundan, birçok uyarılmış singlet ve dolayısıyla birçok uyarılmış triplet bulunur. Uyarılmış bir singletin ömrü 10^{-8} s kadar olduğu halde, uyarılmış bir tripletinki birkaç saniyeye kadar çıkabilmektedir.



Şekil 2.6: Absorpsiyon, Floresans ve Fosforesans'ın gösterimi

2.3.2. Floresans

Elektronik olarak uyarılmış bazı moleküller temel hallerine dönerken, floresans ışını yayarlar. Floresans ışınının enerjisi kendini meydana getiren ışının enerjisinden daha azdır. Bir molekülün λ_1 ışın demetinden, uygun λ' 'nda olan birini absorplayıp elektronik olarak uyarılmış S₁ halinin 5. titreşim seviyesine çıktığını farzederseniz, bir molekülün

titreşim seviyesindeki ömrü elektronik seviyesindekinden çok daha kısa (10^{-13} s gibi, diğeri 10^{-8} s idi) olduğundan, titreşim enerjisini çarpıştığı çözücü moleküllerine aktarır. Örneğin bir çarpışma sonucu 4. titreşim seviyesine veya elektronikçe uyarılmanın en alt seviyesine gelir. Buradan temel hale geçmek içinde elektronik geçiş yolunu takip eder. Elektron temel halin titreşim seviyelerinden herhangi birine iner. Böylece çok çeşitli λ 'nda ışınlar yayınlanır. Madde tarafından absorplanan kısa λ 'lu ışınlar, madde tarafından daha uzun λ 'lu ışınlara dönüştürülmüş olur.

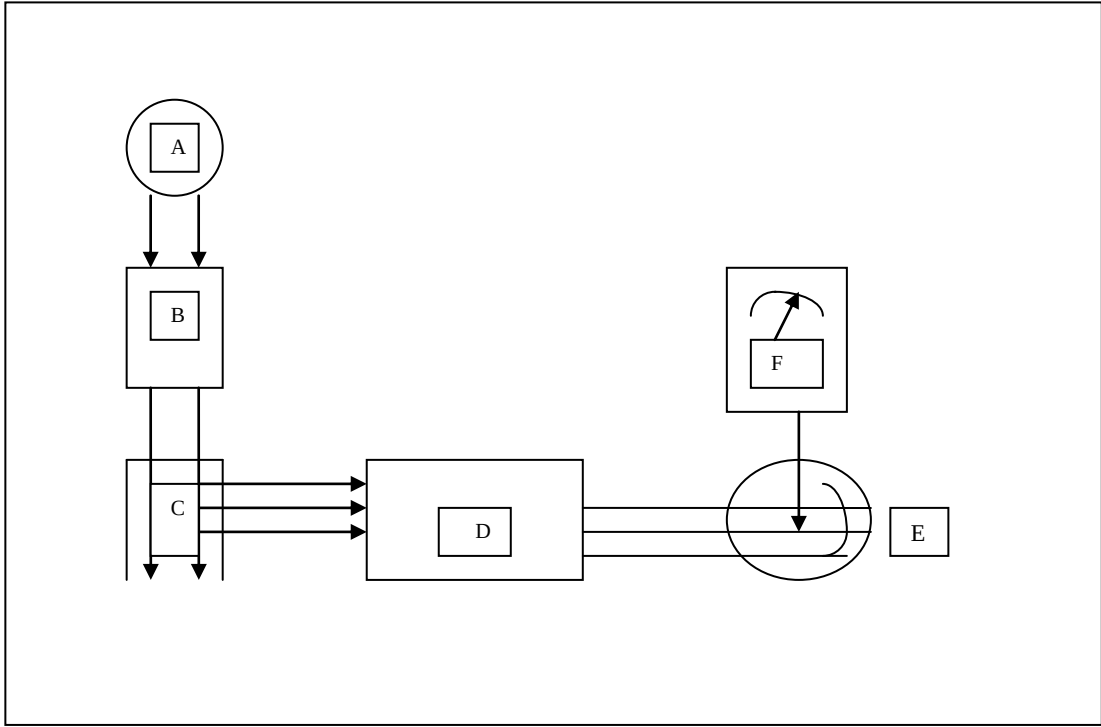
Bir maddenin yaydığı floresans ışınlarının uyarıcı kaynağa bağımlı olmadığı söylenebilir. Yani madde belirli bir λ 'nın üstünde enerjiye sahip ise hangi grup ışınla uyarılırsa uyarılsın (yani $S_0 \rightarrow S_1$ geçişinden daha enerjik $S_0 \rightarrow S_2$, $S_0 \rightarrow S_3$ gibi geçişlere yol açabilecek hangi grup ışınla uyarılırsa uyarılsın) S_1 elektronik seviyesinin, V_0 titreşim seviyesinin üzerindeki enerjiyi titreşim reaksiyonu olarak adlandırılan işlemle molekülün titreşim yapan kısımlarına, çözelti halinde çözücü moleküllerine aktarır. Elektronik geçiş daima S_1 elektronik seviyesinin V_0 titreşim seviyesinden, S_0 elektronik seviyesinin titreşim seviyelerine olur.

Bir maddenin absorpsiyon spektrumuyla floresans emisyon spektrumu birbirlerinin ayna resmi gibidirler. Bu iki spektrumun kesişme noktası temel halin en alt seviyesiyle, 1. uyarılmış halin en alt seviyesi arasındaki λ 'na rastlar. Buna rezonans floresans da denilebilir. Rezonans frekansının en belirgin ve en çok bilinen örneği, Na atomunun sarı çizgisidir [4].

Floresansın diğer optik yöntemlere göre başlıca avantajı fazlaca duyarlı olmasıdır. Floresansın birçok uygulaması, dedeksiyon için örneğin çok küçük miktarlarının yeterli olmasına dayanılarak gerçekleştirilmektedir. Çoğunlukla nanomolar seviyedeki çözeltilerin kantitatif olarak belirlenebilmesini mümkün kılar. Protein, triptofan gibi birçok floroforun floresansı, onları çevreleyen ortam şartlarına karşı oldukça hassastır. Bundan dolayı diğer spektroskopik yöntemlere göre floresansın, birçok biyolojik sistemde analiz edilecek örneğin çok küçük bir kısmını kullanarak hassas bir yapısal prob olarak kullanılmasına imkan sağlar [5].

2.3.3. Floresans Spektroskopisi

Floresans ölçmek için kullanılan aletlere florometre denir. Florometreler, bazı bakımlardan kolorimetrelere ve spektrofotometrelere benzerler. A ışın kaynağından çıkan ışınlar, B monokromatörlerine veya filtresine gelirler. Monokromatör veya filtreden floresans meydana getirecek uygun λ 'lu ışın süzülür ve C kabındaki çözeltiden geçirilir. Çözelti içindeki floresan tanecikler her yönde olmak üzere floresans ışınları yaymaya başlarlar. Ancak bunlardan sadece floresans meydana getiren ışınların geliş yönünde dik olanlar D monokromatörüne veya filtresine gönderilirler. Floresan ışın böylece E dedektörüne gelir. Dedektörde floresan ışın enerjisi elektrik akımına çevrilir. Bu elektrik akımını F şiddetlendiricisi şiddetlendirir ve gözetleme sistemine gönderir. Bu basit gösterge bir yazıcı olabilir.



Şekil 2.7: Spektrofluorometre cihazının basit gösterimi

Spektrofluorometreler iki tiptir: Birinci tip florometrelerde ışın kaynağından çıkan ışınlar uygun bir filtreden, buna karşın, çözeltiden gelen floresan ışın da bir prizma monokromatörden veya gratingden geçirilir. Birçok spektrofotometre çeşitli adaptörler takılarak florometre olarak kullanılacak şekilde yapılmıştır. Bu adaptörler; 1-Işın kaynağı, 2-Filtre kabı, 3-Çözelti koyma kabı, 4-Floresan ışını monokromatörün giriş slitine düşüren bir cihazdan oluşurlar.

İkinci tip florometreler, spektroflorometre olarak adlandırılan monokromatörle donatılmış cihazlardır. Bunlarla yapılan çalışmalar daha iyi sonuçlar verir. Ancak günlük işler sözkonusu olduğu zaman birinci tip florometreler de ikinci tipler kadar iyi sonuçlar verebilirler [4].

Floresans karakteristiklerini belirlemek için bir takım bilgilere dayanan parametrelere gereksinim vardır. En çok kullanılan basit floresans denemeleri, absorpsiyon maksimum değerinde veya yakın yerlerde örneği ışınla uyararak, belli bir emisyon dalga boyundaki floresansını veya emisyon dalga boyunun bir fonksiyonunu (emisyon spektrumu) ölçmekle gerçekleştirilir. Emisyon spektrumu çoğunlukla eksitasyon dalga boyunun fonksiyonu olarak tek bir dalga boyunda ölçülen floresansın olduğu eksitasyon spektrumuyla beraber gösterilir. Bazı floresans prosesleri, floresan ışığın intensitesinin uyarıcı ışığa oranını gösteren kuantum verimiyle karakterize edilir. Bu genellikle çalışılan örneği, bir dalga boyunda bilinen bir kuantum verimine sahip olan bileşikle karşılaştırmakla ölçülür. Yaygın olarak bulunan spektroflorometreleri kullanan bu basit floresans ölçümleri, çoğunlukla kararlı durum floresans ölçümleri olarak bilinir.

Floresans ömrü, floroforun uyarılmış halde kaldığı sürenin ortalama zamanıdır. Bu ömürler genellikle 10^{-8} s (10 ns) civarındadır ve bunları ölçmek için özel ekipmanlar gerekir. Biyolojik sistemlerde meydana gelen fonksiyonca önemli dalgalanmalar ile floresans ömürleri benzer bir zaman skalasında meydana geldiğinden, ömürlerinin ölçümü bu sistemlerin dinamikleri için yararlı bir araçtır. Floresans kuvvetleri, standart 1 cm'lik absorpsiyon kuvvetlerine benzer. Fakat gelen ışına dik olan floresansı ölçebilmek için bütün kenarları optik yüzeylidir.

Floresansı ölçerken doğru verilerin elde edilebilmesi için spektroflorometre ayarlanmalıdır. Özellikle slit veya bant genişlikleri, ölçüm süresi ve eksitasyon ile emisyon dalgaboyları seçilmek zorundadır. Bütün bunlar örneğe ve istenen sinyala bağlıdır. Slitler genellikle intensiteyi kontrol etmek için kullanılır, bazı spektroflorometrelerde ise bu fonksiyon için iris aralığı ekipmanı mevcuttur. Düşük intensitelerde eksitasyon ve emisyon slitleri fazla açılmayarak çakışmalarını garanti altına alınır [5].

2.3.4. Florometrik Yöntemle Kantitatif Analiz

Floresan madde tarafından yayınlanan ışın şiddetinin, floresans yada fosforesansa uğrayan madde miktarıyla orantılı oluşu kantitatif analizin temelidir. Bu yöntemde çözeltinin çok seyreltik olması, uyartıcı ışığın ancak çok ufak bir bölümünü absorplaması (yani $A < 0.05$ olması) gerekir. Bu koşullarda floresansın şiddeti

$$I_f = k I_0 \varepsilon' C \varnothing \quad (l = 1\text{cm}) \quad (2.6)$$

I_f = floresans şiddeti

I_0 = uyartıcı ışığın şiddeti

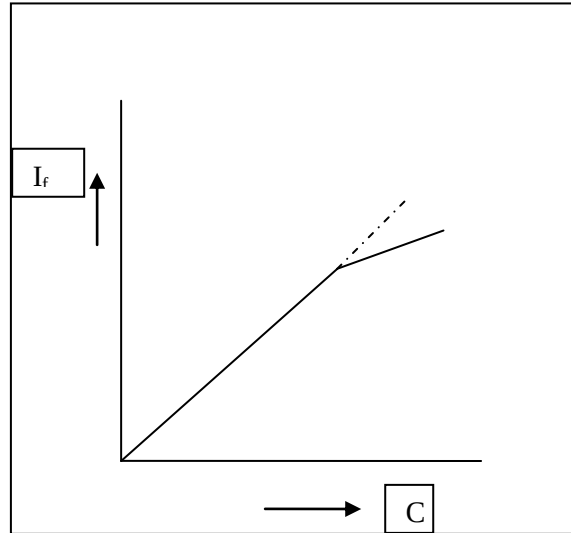
ε' = molar floresans katsayısı

C = floresant madde konsantrasyonu

k = sabit

$\varnothing$ = kuantum verimi (absorplanan birim ışık kuantum başına yayınlanan ışık kuantumu sayısı).

I_0 sabit tutulduğunda ε' , k ve $\varnothing$ de sabit olduğundan yeterince seyreltik çözeltiler için I_f , floresans gösteren türün konsantrasyonu ile orantılıdır. Uyartıcı ışığın daha büyükçe bir bölümü absorplanırsa “konsantrasyon söndürmesi” denilen etkiyle “floresans şiddeti- konsantrasyon” ilişkisinin lineerliği ortadan kalkar [4].



Şekil 2.8: Floresans şiddeti ve konsantrasyon ilişkisi

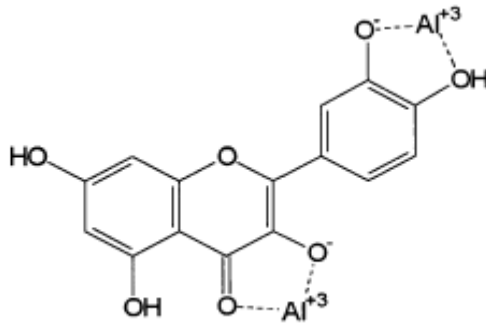
2.3.5. Floresan Bileşikler

Normalde floresans özellik gösteren maddeler, yapılarının konjuge çifte bağlarında delokalize elektronlara sahiptirler. Biyokimya ve moleküler biyolojide ilgilenilen floresan bileşikler, içsel ve dışsal floroforlar olarak ikiye ayrılabilir. İçsel veya doğal olarak bulunan floroforlar olarak triptofan, tirozin, NADH gibi kofaktörler ve nükleik asitlerde bazı az bulunan kısımlar gösterilebilir. Dışsal floroforlar ise geniş bir çeşitlilikteki bileşiklerdir. Fluorescein gibi proteinler, 1,6-difenilheksatrien gibi membran problemleri ve etidyum brom gibi DNA bağlama bileşikler örnek olarak verilebilir [5].

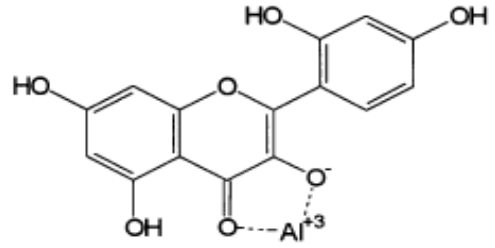
2.4. FLAVONOİD TAYİNİNDE KULLANILAN SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMLER

2.4.1. $AlCl_3$ /Potasyum Asetat Spektrofotometrik Yöntemi

$AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminde alüminyum klorür, flavon ve flavonol grubu bileşiklerin C-4 keto grubu ve C-3 veya C-5 hidroksil gruplarından biriyle stabil bir kelat oluşturmaktadır (Al-Flavon veya Al-Flavonol kompleksi). Bununla birlikte alüminyum flavonoid grubu bileşiklerin A ve B halkalarındaki *orto*-dihidroksi gruplarıyla da kararsız kompleksler oluşturmaktadır. Şekil 2.9'da Al(III)'ün kuersetin ve morin ile oluşturduğu komplekslerin kimyasal yapıları verilmiştir. Toplam flavonoid tayininde kullanılan bu spektrofotometrik yöntem, etanol, alüminyum(III) klorür çözeltisi ve potasyum asetat çözeltilerinin karıştırılması, üzerine flavonoid çözeltisinin (flavon, flavonol veya isoflavon bileşikler) ilave edilmesi ve bunu takip eden 30 dakika sonunda referansa karşı 415 nm'de absorban değerlerinin ölçülmesinden ibarettir [6].



Al(III)-Kuersetin



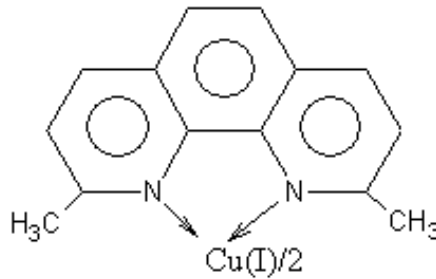
Al(III)-Morin

Şekil 2.9: Al(III)'un kuersetin ve morin ile oluşturduğu komplekslerin kimyasal yapısı

2.4.2. CUPRAC (Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi

Besin yoluyla alınan polifenoller, C ve E vitaminleri, flavonoidler ve glikozidleri ile insan serumu antioksidanları için geçerli olabilecek, hem hidrofilik hem de lipofilik maddeler için elverişli, basit, ucuz, pratik, seçici ve duyarlı bir antioksidan kapasite tayin yöntemi olan CUPRAC yönteminde reaktif, amonyum asetat tampon ortamında iyi bir yükseltgen olan bakır(II)-neokuproin çözeltisidir. Reaktifin indirgenmesiyle oluşan Cu(I)-neokuproin kelatının (Şekil 2.10) 450 nm dalgaboyundaki absorbansı okunmaktadır. Bu yöntemde, toplam antioksidan kapasite, bakır(II) iyonu indirgeme kapasitesi cinsinden ölçüldüğünden dünya literatürüne CUPRAC adıyla kazandırılmıştır.

Toplam antioksidan kapasite/aktivite tayininde kullanılan bu spektrofotometrik yöntem; bakır(II) klorür çözeltisi, neokuproin çözeltisi ve amonyum asetat (pH=7 tamponu) çözeltilerinin karıştırılmasından sonra, üzerine tayin edilecek herhangi bir antioksidan çözeltisi ilave edilmesi ve bunu takip eden 30 dakika sonunda referansa karşı 450 nm'de absorbans değerlerinin ölçülmesinden ibarettir [7].



Şekil 2.10: CUPRAC yönteminin kromoforu oluşturan Bis(2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) bakır(I) kelatının 'Cu(I)-Nc' kimyasal yapısı

2.5. LİTERATÜRDE VAROLAN SPEKTROFLOROMETRİK TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTE (TAC) TAYİNİ YÖNTEMLERİ

Toplam antioksidan kapasite (TAC) tayinini spektrofotometrik yollarla uygulayan literatürde birçok çalışma mevcuttur. Bunların bazıları kısaca şöyledir

2.5.1. ORAC (Oksijen Radikali Absorbans Kapasitesi) Yöntemi

Cao ve diğ. [28] tarafından oksidasyona sebep olan peroksil radikallerinin, antioksidanlar tarafından inhibe edilmesinin ölçümüne dayanılarak uygulanmıştır. Yani klasik zincirleme radikal reaksiyonu, hidrojen atom transferi ile kırılır, bu da antioksidan aktivitesinin bir göstergesidir. Ana yöntem, peroksil radikalının floresans özellikteki bir prob ile reaksiyonu ve bunun sonucunda floresans özelliği olmayan bir ürün meydana gelmesine dayanır, bu da floresans spektrofotometresiyle ölçülebilir. Antioksidan kapasitesi, oluşan ürün miktarı ve floresanstaki azalma hızı ile tayin edilir. Bu yöntemde, β -fikoeritrin (β -PE) indikatör proteini olarak, 2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorür (AAPH) peroksil radikal oluşturucusu ve 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit (troloks, suda çözünen E vitamini benzeri) de kontrol standardı olarak kullanılmıştır. Floresans intensitesi, 540 nm eksitasyon dalga boyu ve 565 nm emisyon dalga boyu seçilerek floresans spektrofotometresi ile 0 floresans elde edilene kadar 37°C'lik inkübasyonda her 5 dakikada bir ölçülür.

Prior ve diğ. [29] tarafından ORAC yönteminde daha kararlı ve daha az reaktif bir floresan probu olan Fluoressein (FL) (3',6'-dihydroxy-spiro[isobenzofuran-1[3H],9'[9H]-ksanten]-3-one) kullanılmaya başlanmıştır. Peroksil radikalleri tarafından oluşturulan FL'nin yükseltgenme ürünleri LC-MS ile tanımlanarak, reaksiyon mekanizmasının klasik bir HAT (Hidrojen Atom Transferi) mekanizmasına sahip olduğu görülmüştür. Geliştirilen bu yöntemle peroksil radikallerine karşı, hidrofilik zincir-kırma antioksidan kapasitesinin direkt olarak ölçümü sağlanmıştır. Floresans intensitesi, 493 nm eksitasyon dalga boyu ve 515 nm emisyon dalga boyu seçilerek floresans spektrofotometresi ile 35 dakika boyunca her dakikada bir ölçülür.

ORAC sistemi, antioksidan aktivitesinin tayininde, floresans bozulma eğrisinin altında kalan alanın (AUC) hesaplanmasına dayanan tekniği kullanır. Böylece ORAC yönteminde inhibisyon zamanı ve inhibisyon derecesi tek bir parametreye inmiştir.

Diğer benzer yöntemler sonuçlarında, inhibe etme yüzdesini sabit tutarak, inhibisyon zamanını ya da inhibisyon zamanını sabit tutarak inhibe etme yüzdesini verebilecek bir temele dayanırlar. İkinci olarak ise, ORAC yönteminde farklı serbest radikal üreticiler veya oksidanlar kullanılabilir. Bu, bir analiz yönteminde antioksidan aktivitelerinin ölçümü, o yöntemin hangi serbest radikalleri veya oksidanları kullandığına bağlı olması açısından önemlidir. ORAC yöntemi kontrol edilebilir bir peroksil radikal kaynağı sağlar.

2.5.2. Florometrik TRAP (Toplam Radikal Tutma Parametresi) Yöntemi

Wayner ve diğ. [1] tarafından geliştirilen orjinal (TRAP) yöntemi plazma AC'sini belirlemek için en geniş ölçüde kullanılan yöntemdir. Peroksil radikallerinin lipid substratından hidrojen koparmaya yeterli enerjileri vardır. Böylece bir lipid peroksidasyon zinciri başlatırlar. Wayner yönteminde çözünmüş oksijenin tüketimi lipid peroksidasyon hızının göstergesidir ve böylece bu plazmanın reaksiyonu engelleme yeteneğinin dolaylı bir ölçümü olur. Plazma tarafından uyarılan oksijen tüketimindeki gecikme fazı, belli miktarda bilinen troloksun (α -tokoferolun suda çözünen benzeri) uyarılmış gecikme fazıyla karşılaştırılır. Bu yöntemde TRAP, plazmanın bir litresiyle süpürülmüş peroksil radikallerinin mikromolleri cinsinden ifade edilir. Bu yöntem her örnek başına 2 saat harcamasıyla oldukça zaman alıcıdır.

Birkaç yıl sonra DeLange ve diğ. [30] tarafından antioksidan kapasiteyi ölçmek için R-PE (R-fikoeritrin) isimli bir dış kaynaklı prob kullanmayı önermişlerdir. Bu *Corallina Officinalis*'den ekstrakte edilen bir proteindir. ROS, R-PE floresansında düşüş sağlar, bu da antioksidanlar tarafından yavaşlatılır, oksidatif reaksiyonların görüntülenmesine imkan sağlanır. Bu yöntem, peroksil radikalının hedef molekül üzerindeki saldırısını direkt olarak ölçer. Bu yeni bakış açısı yöntemi daha hızlı, güvenilir ve hassas yapmasına rağmen araştırmacılar sadece R-PE oksidasyonu üzerinde yalnız antioksidanların etkilerini ölçebilmişlerdir.

Ghiselli ve diğ. [9] tarafından geliştirilen yöntem azo-başlatıcıların bozunarak sabit sıcaklık ve belli hızda peroksil radikali üretme özelliğine dayanır. Wayner ve DeLange'nin yöntemleri birleştirilmiş, R-PE'den bir dış prob olarak yararlanılmış ve plazma tarafından üretilen gecikme fazı, troloks tarafından üretilen gecikme fazıyla

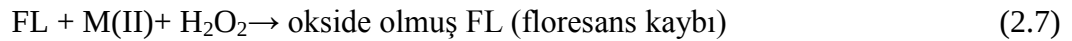
karşılaştırılmış ve giderilen peroksil radikallerinin konsantrasyonları hesaplanmıştır. Plazmanın suda çözülen peroksil radikallerini tutma yeteneğine dayanan bir yöntem geliştirilmiştir. Peroksil radikalleri AAPH'nin termal bozunması boyunca sabit bir hızda üretilir. AAPH'nin eklenmesiyle floresans özellikteki R-PE'nin floresansında, lineer bir azalma sağlanır. Plazma ve yalnız antioksidanların eklenmesiyle de antioksidan miktarıyla orantılı olarak bir gecikme meydana getirirler. Plazmanın antioksidan kapasite değeri, plazmanın gecikme fazını troloksun meydana getirdiği gecikme fazıyla karşılaştırmakla elde edilir.

2.5.3. HORAC (Hidroksil Radikalini Önleme Kapasitesi) Yöntemi

Ou ve diğ. [31] tarafından prob olarak Fluoressein (FL) kullanarak hidroksil radikalini önleme kapasitesini belirlemek için bir florometrik yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemde, hidroksil radikali hidrojen peroksit ve kobalt (II) tuzundan üretilmiştir.

Hidroksil radikali oluşumu, Co(II) aracılığıyla Fenton-tipi bir reaksiyonla meydana gelir. Bazı besinler metal kelatlayıcı içerirler ve bunlar hidroksil radikallerinin oluşumuna karşı önleyici antioksidan gibi davranırlar. Hidroksil oluşumunu *in vitro* olarak engellemede fitokimyasalların aktivitesini belirlemek, antioksidan klinik araştırmaları için önem arzeder. HORAC yöntemi, polifenolik bileşikler ve besinsel alanda metal kelatlama kapasitesi için kullanılan florometri bazlı bir yöntemdir.

Metal iyonunun başlattığı hidroksil radikal oluşumu (2.7) numaralı reaksiyona bağlı olarak FL'nin floresans kaybıyla uygun bir şekilde görüntülenebilir. Önleyici antioksidan varlığında hidroksil radikali oluşumu engellenebilir, çünkü metal antioksidanla koordinasyon sonucu inaktif duruma gelir.



M(II)L ürünü, hidroksil radikallerini başlatmak için kullanılan H₂O₂'ye karşı reaktif değildir. Bunun gibi, reaksiyon (2.7)'nin inhibisyonunun derecesi, önleyici antioksidan kapasitesinin göstergesidir, bu da floresans bozulma eğrilerinden belirlenebilir.

FL'nin floresans sönümlenme eğrisi, antioksidan yokluğunda ve varlığında kaydedilir, floresans bozulma eğrisinin altında kalan alan (AUC) integre edilir ve hidroksil radikalini önleme kapasitesi göstergesi olan net AUC, antioksidanından görün AUC'si çıkarılarak hesaplanır. Gallik asit, referans standardı olarak seçilmiştir ve örneğin aktivitesi gallik asit ekivalenti (GAE) cinsinden ifade edilir. Geniş bir aralıkta fenolik antioksidanlar analiz edilmiş ve hidroksil radikalini önleme kapasitesinin, esasen bileşiklerin metal-kelatlama özelliğine bağlı olduğu görülmüştür.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Kimyasal maddelerin tartılmasında RADWAG WAS220X marka analitik terazi, hazırlanan çözeltilerin karşılaştırılmasında girdap karıştırıcı, çözeltilerin pH'sının belirlenmesinde E512 Metrohm Herisau pH-metre, Varian Cary Bio 100 model UV-görünür alan spektrofotometresi ve ölçüm yapmak için HELIMA marka 10 mm ışık yollu bir çift kuartz küvet, Perkin-Elmer LS-55 lüminesans spektrometresi ve ölçüm yapmak için HELIMA marka 10 mm ışık yollu bir çift floresans kuartz küvet.

3.2. KİMYASAL MADDELER

Kullanılan kimyasal maddeler; bakır(II) klorür dihidrat, neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin), metil- β -siklodekstrin (M- β -CD), amonyum asetat, %96'lık etil alkol (EtOH), %99'luk aseton, alüminyum klorür heksahidrat, potasyum asetat (KAc), metil alkol (MeOH), kuersetin (QR), mirisetin (MRC), fisetin (FIS), kaemferol (KAM), morin (MOR), rutin (RUT), luteolin (LUT), galangin (GAL) ve kuersitrin (QRS).

3.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması

Geliştirilen AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin uygulanması için, AlCl_3 çözeltisi, %1'lik olacak şekilde alüminyum klorür heksahidrat'tan ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.904 g tartım alınıp su ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Potasyum asetat tamponu, 1 M olacak şekilde KAc'tan 4.90 g tartım alınıp su ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Kuersetin, mirisetin, fisetin, kaemferol, morin, rutin, galangin ve kuersitrin stok çözeltileri etanolde, luteolin stok çözeltisi etanol ve metanol karışımında hazırlandı.

Geliştirilen AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin, aseton-M- β -CD ortamındaki uygulamasında, %2'lik (w/v) metil- β -siklodekstrin çözeltisi, 2 g tartım alınıp, aseton-su (v:v, 9:1) karışımı ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Geliştirilen AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin, aseton-M- β -CD ortamında uygulamasında, kuersetin, mirisetin, fisetin, kaemferol, morin, rutin, luteolin, galangin ve kuersitrin stok çözeltileri aseton-su (v:v, 9:1) ortamında çözülerek hazırlanmış olan %2'lik (w/v) M- β -CD çözeltisi içinde hazırlandı.

AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminde ise AlCl_3 çözeltisi, %10'luk olacak şekilde alüminyum klorür heksahidrat'tan ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 9.04 g tartım alınıp su ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Cu(II) klorür çözeltisi, 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 (pH=7) olacak şekilde NH_4Ac 'dan 19.27 g tartım alınıp su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Neokuproin çözeltisi, 7.5×10^{-3} M olacak şekilde (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin)'den 0.039 g tartım alınıp %96'lık etil alkolle 25 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

3.3. UYGULANAN YÖNTEMLER

3.3.1. Geliştirilen AlCl_3 /Potasyum Asetat Spektrofotometrik Yöntemi

Literatürde toplam flavonoid tayininde geniş kullanım alanına sahip AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin, spektrofotometrik olarak uygulanması sağlanmıştır. Al-Flavon veya Al-Flavonol komplekslerinin floresans özellikleri incelenmiştir. Bu amaçla literatürdeki orijinal çalışmaya göre çeşitli seyreltme işlemleri başta olmak üzere, optimum çalışma şartlarını belirlemek amacıyla bir dizi uygulama yapılmış ve yapılan denemeler sonucunda referans olarak seçilen kuersetin bileşiği öncelikli olmak üzere flavonollerin ve bir flavon olan luteolinin AlCl_3 ile oluşturdukları komplekslerin floresans özellikte oldukları tespit edilmiştir. Geliştirilen AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemine göre; bir cam tüp içerisine sırasıyla 1.5 mL etanol çözeltisi, x mL örnek çözeltisi, 0.1 mL %1'lik AlCl_3 çözeltisi, 0.1 mL 1 M KAc çözeltisi ilave edilip çalkalandıktan sonra son hacim 5 mL olacak şekilde (3.3-x) mL su

eklenip tekrardan çalkalandı. Tüpler oda koşullarında ağzı kapalı olarak 30 dakika boyunca bekletildi. Bu süre sonunda örnek içermeyen referansa karşı 470 nm eksitasyon dalga boyu ve 525 nm emisyon dalga boyunda floresans intensite değerleri ölçüldü. Floresans intensitesi ile referans olarak alınan bir flavonoid bileşiğinin konsantrasyonu arasındaki kalibrasyon doğrusundan yararlanılarak bilinmeyen örnek konsantrasyonları hesaplandı.

$$1.5 \text{ mL EtOH} + x \text{ mL örnek} + 0.1 \text{ mL } \%1 \text{ AlCl}_3 + 0.1 \text{ mL KAc} + (3.3-x) \text{ mL su} \quad (3.1)$$

$$V_{\text{toplam}}: 5 \text{ mL}$$

3.3.2. Geliştirilen AlCl₃/Potasyum Asetat Spektroflorometrik Yöntemin Aseton-M-β-CD Ortamında Uygulanması

Geliştirilen AlCl₃/potasyum asetat spektroflorometrik yönteminin, Aseton-M-β-CD ortamında uygulaması gerçekleştirildi. Flavonoid bileşikleri, aseton-su (v:v, 9:1) ortamında çözülerek hazırlanmış olan %2'lik (w/v) M-β-CD çözeltisi içinde hazırlandı. Bunun için, bir cam tüp içerisine sırasıyla 1.5 mL aseton-su (v:v, 9:1) çözeltisi, x mL örnek çözeltisi, 0.1 mL %1'lik AlCl₃ çözeltisi, 0.1 mL 1 M KAc çözeltisi ilave edilip çalkalandıktan sonra son hacim 5 mL olacak şekilde (3.3-x) mL su eklenip tekrar çalkalandı. Tüpler oda koşullarında ağzı kapalı olarak 30 dakika boyunca bekletildi. Bu süre sonunda örnek içermeyen referansa karşı 470 nm eksitasyon dalga boyu ve 525 nm emisyon dalga boyunda floresans intensitesi değerleri ölçüldü. Floresans intensitesi ile referans olarak alınan bir flavonoid bileşiğinin konsantrasyonu arasındaki kalibrasyon doğrusundan yararlanılarak bilinmeyen örnek konsantrasyonları hesaplandı.

$$1.5 \text{ mL } \%90\text{Ac} + x \text{ mL örnek} + 0.1 \text{ mL } \%1 \text{ AlCl}_3 + 0.1 \text{ mL KAc} + (3.3-x) \text{ mL su} \quad (3.2)$$

$$V_{\text{toplam}}: 5 \text{ mL}$$

3.3.3. AlCl₃/Potasyum Asetat Spektrofotometrik Yöntemi

AlCl₃/potasyum asetat spektrofotometrik yöntemine göre; bir cam tüp içerisine sırasıyla 1.5 mL etanol çözeltisi, x mL örnek çözeltisi, 0.1 mL %10'luk AlCl₃ çözeltisi, 0.1 mL 1 M KAc çözeltisi ilave edilip çalkalandı ve son hacim 5 mL olacak şekilde (3.3-x) mL su

eklendikten sonra tekrar iyice çalkalandı. Tüpler oda koşullarında ağzı kapalı olarak 30 dakika boyunca bekletildi. Bu süre sonunda örnek içermeyen referansa karşı 427 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü [32]. Absorbans ile referans olarak alınan bir flavonoid bileşiğinin konsantrasyonu arasındaki kalibrasyon doğrusundan yararlanılarak bilinmeyen örnek konsantrasyonları hesaplandı.

$$1.5 \text{ mL EtOH} + x \text{ mL örnek} + 0.1 \text{ mL \%10 AlCl}_3 + 0.1 \text{ mL KAc} + (3.3-x) \text{ mL su} \quad (3.3)$$

$$V_{\text{toplam}}: 5 \text{ mL}$$

3.3.4. CUPRAC (Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi

CUPRAC yöntemine göre; bir cam tüp içerisine sırasıyla bakır (II) çözeltisi, neokuproin çözeltisi ve amonyum asetat tamponundan 1'er mL eklendi. Üzerine x mL örnek ilave edilip çalkalandı ve son hacim 4.1 mL olacak şekilde (1.1-x) mL su eklendikten sonra tekrar iyice çalkalandı. Tüpler oda koşullarında ağzı kapalı olarak 30 dakika boyunca bekletildi. Bu süre sonunda örnek içermeyen referansa karşı 450 nm dalgaboyunda absorbans değerleri ölçüldü. Absorbans ile referans olarak alınan bir flavonoid bileşiğinin konsantrasyonu arasındaki kalibrasyon doğrusundan yararlanılarak bilinmeyen örnek konsantrasyonları hesaplandı.

$$1 \text{ mL Cu(II)} + 1 \text{ mL Nc} + 1 \text{ mL NH}_4\text{Ac} + x \text{ mL örnek} + (1.1-x) \text{ mL su} \quad (3.4)$$

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

4. BULGULAR

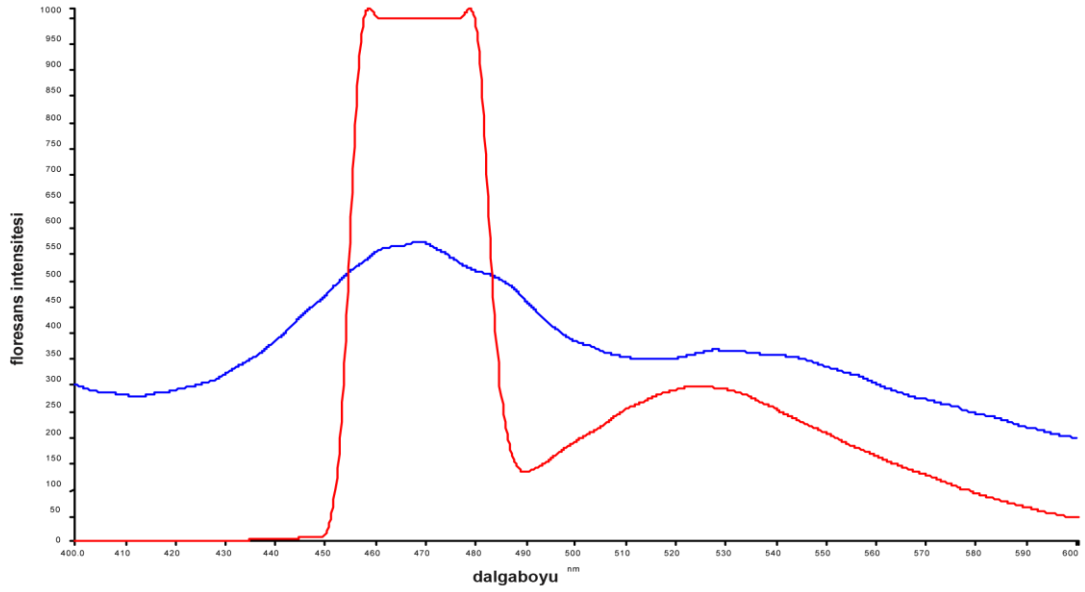
4.1. AlCl_3 /POTASYUM ASETAT SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMİNİN SPEKTROFLOROMETRİK OLARAK UYGULANABİLİRLİĞİ

4.1.1. AlCl_3 /Potasyum Asetat Spektroflorometrik Yönteminin Geliştirilmesi ve Optimum Deney Koşullarının Belirlenmesi

Deneysel çalışmaların ilk adımında kullanılacak olan AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin, spektroflorometrik olarak uygulanabilmesinin sağlanabilmesi için optimum çalışma şartlarını belirlemek amacıyla bir dizi uygulama yapıldı. Bunlar sırasıyla eksitasyon ve emisyon dalga boylarının belirlenmesi, pH çalışması ve inkübasyon süresinin tespit edilmesi olarak belirlendi.

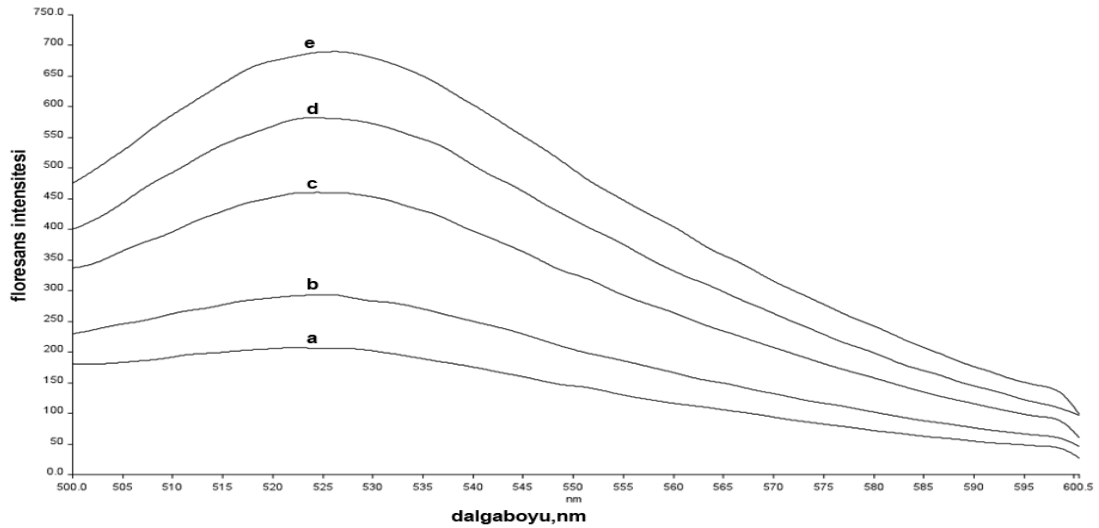
Yöntemde Al-kuersetin kompleksinin floresans özellik gösterip göstermediği öncelikle tespit edildi. Yüksek floresans değerlerinden kaçınmak için %1'lik AlCl_3 çözeltisi ve son konsantrasyonu 10^{-7} M mertebelerinde olan flavonoid çözeltilerinin oluşturdukları stabil kelatın spektroflorometre cihazının tayin sınırları arasında floresans özellik gösterdiği belirlendi.

Gerçekleştirilecek yöntemde öncelikli olarak eksitasyon ve emisyon dalga boylarının belirlenmesi amacıyla, sonuçlar kuersetin referans alınarak inceleneceği düşünüldüğünden son konsantrasyonu 2×10^{-7} M olan kuersetin ile yapılan deneme sonucunda floresans spektrumunda görüldüğü gibi eksitasyon dalga boyu 470 nm, emisyon dalga boyu ise 525 nm olarak belirlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: 2×10^{-7} M kuersetin (QR) varlığında oluşan Al(III)-kuersetin kompleksinin floresans spektrumu (Mavi renkli spektrum eksitasyon, kırmızı renkli spektrum emisyon spektrumu)

Yöntemde, eksitasyon 470 nm dalgaboyunda sabit tutulup, kuersetinin değişik konsantrasyonlarında hazırlanmış çözeltilerinden alınarak yapılan deneme sonucunda Şekil 4.2’de gösterildiği gibi kuersetinin emisyon spektrumu oluşturuldu. Spektrumda görüldüğü gibi artan madde konsantrasyonuyla beraber 525 nm’de lineer bir şekilde artan floresans intensitesi belirlendi.



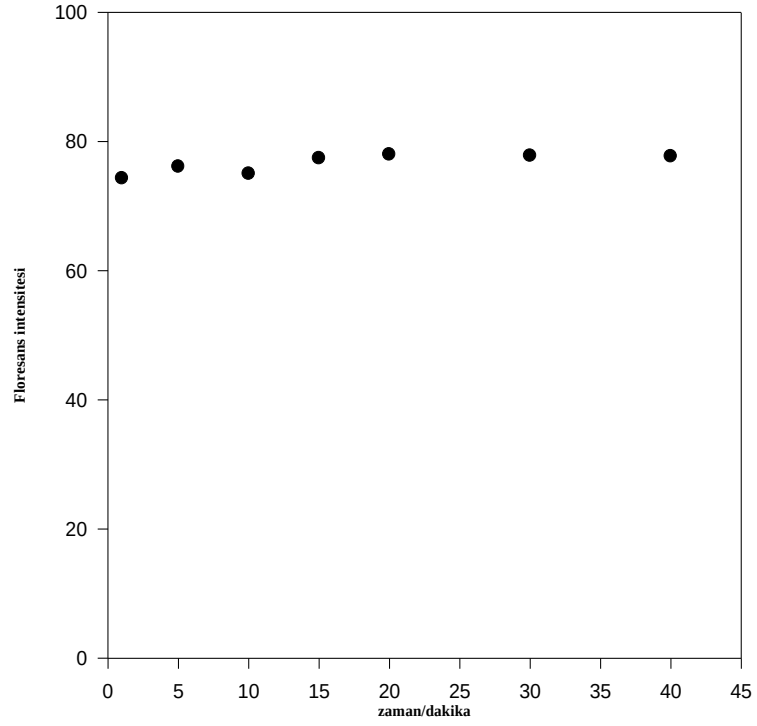
Şekil 4.2: Spektrofotometrik- AlCl_3 yöntemine göre kuersetinin emisyon spektrumu (Uyarılma dalgaboyu 470 nm). 10 μM Kuersetin çözeltisinden sırasıyla (a) 50 μL (b) 100 μL (c) 150 μL (d) 200 μL (e) 250 μL ilave edilmiştir.

Yöntemin uygulaması şu şekilde yapıldı; x mL örnek üzerine sırasıyla 1.5 mL EtOH, 0.1 mL %1'lik AlCl_3 çözeltisi, 0.1 mL 1 M KAc ve (3.3-x) mL su eklenerek toplam hacim 5 mL olacak şekilde tamamlandı ve 30 dakika oda şartlarında inkübasyon sonrasında, örnek içermeyen referansa karşı okuma yapıldı. Yöntem, yukarıda anlatıldığı gibi kuersetinin maksimum floresans intensitesi gösterdiği 470 nm eksitasyon dalgaboyu ve 525 nm emisyon dalgaboyunda uygulandı.

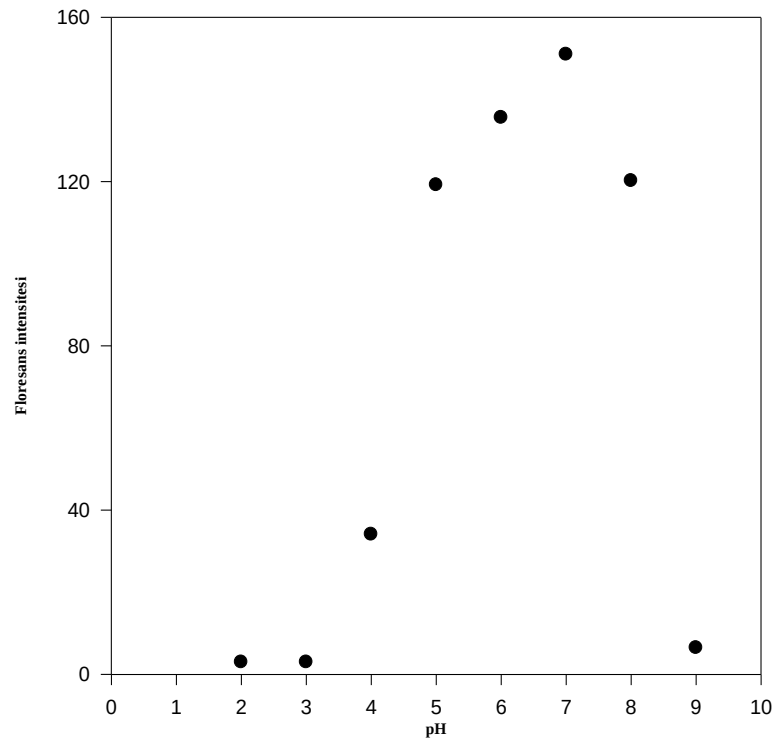
Yöntemde emisyon spektrumları elde edilirken eksitasyon ve emisyon slitleri 10 olarak, floresans intensiteleri ölçülmesinde ise eksitasyon ve emisyon slitleri 5 olarak belirlendi.

Optimum çalışma şartlarının belirlenmesinde inkübasyon süresinin tespit edilmesi amacıyla 10^{-5} M kuersetin çözeltisinden 50 μL alınarak AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi uygulandı ve değişik inkübasyon sürelerinde oda şartlarında bekletilen çözeltilerin floresans intensitesi ölçümleri yapıldı (Şekil 4.3). Sonuçlar incelendiğinde 20 dakikalık süreden sonra intensitenin hemen hemen aynı kaldığı görülmüştür. Sonuçta inkübasyon süresinin, AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminde olduğu gibi 30 dakika olması uygun görüldü.

Optimum çalışma pH'sının belirlenmesi için yapılan denemelerde geliştirilen yöntemde kullanılan potasyum asetat tamponu yerine değişik pH tamponları kullanıldı. 10^{-5} M kuersetin çözeltisinden tüplere 0.1'er mL eklendikten sonra yöntem uygulandı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.4'te gösterilmiştir ve en yüksek floresans intensitesi nötral pH aralığında görülmüştür. Yöntem flavonoid ile Al(III) arasında kelat kompleksi oluşumuna dayandığından bağ oluşumu öncesi flavonoid bileşiğinin uygun fenolik protonunun verilmesi nötral pH'da güvenceye alınır. Bu nedenle yöntemin nötral pH'da uygulanması uygun görüldü.



Şekil 4.3: 1×10^{-7} M kuersetin çözeltisine değişik inkübasyon sürelerinde uygulanan AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin sonuçları



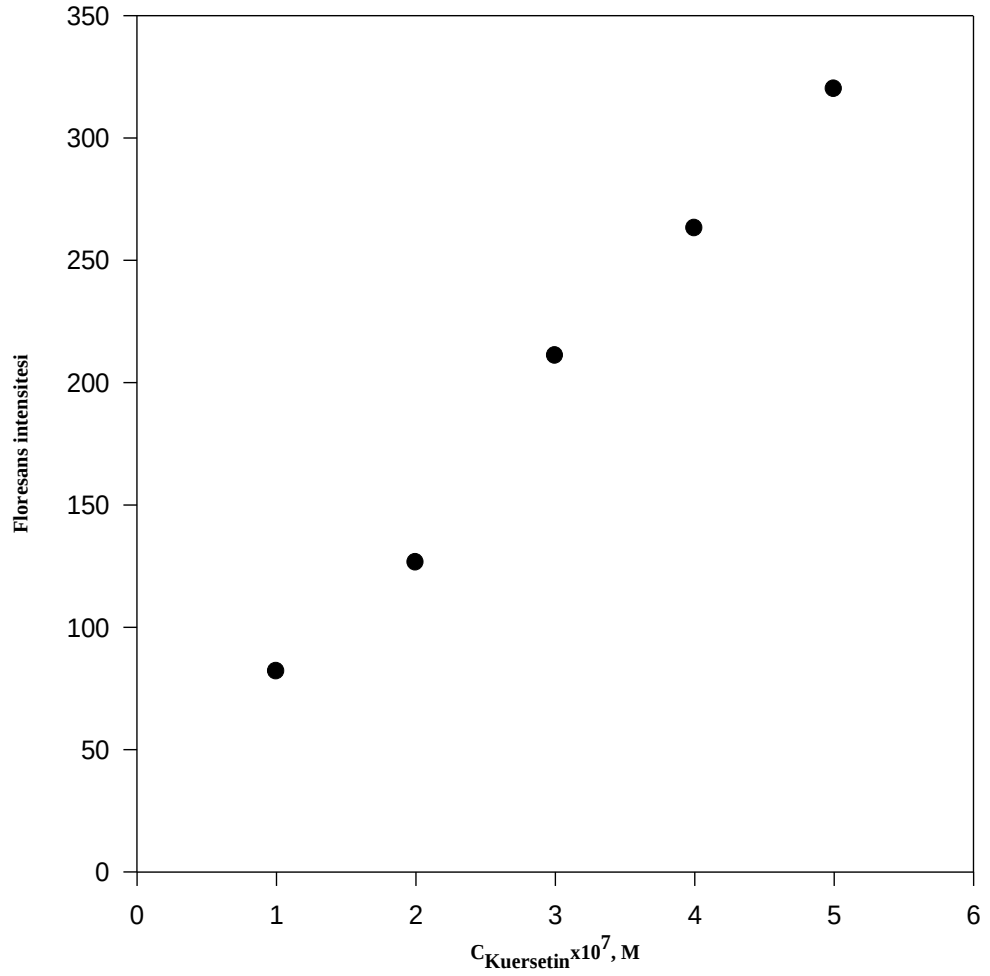
Şekil 4.4: 2×10^{-7} M kuersetin çözeltisine değişik pH'larda uygulanan AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin sonuçları

4.1.2. Bazı Fenoliklerin AlCl_3 /Potasyum Asetat Spektroflorometrik Yöntemi ile Elde Edilen Doğru Denklemleri ve Kalibrasyon Grafikleri

4.1.2.1. Kuersetin

Tablo 4.1: Kuersetinin konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemi (x: molar konsantrasyon ve y: floresans intensitesi)

Konsantrasyon (M)	Floresans İntensitesi
1×10^{-7}	81.9
2×10^{-7}	126.4
3×10^{-7}	210.9
4×10^{-7}	263.0
5×10^{-7}	320.0
Doğru Denklemi: $y = 6.128 \times 10^8 x + 16.6$ $r = 0.996$	

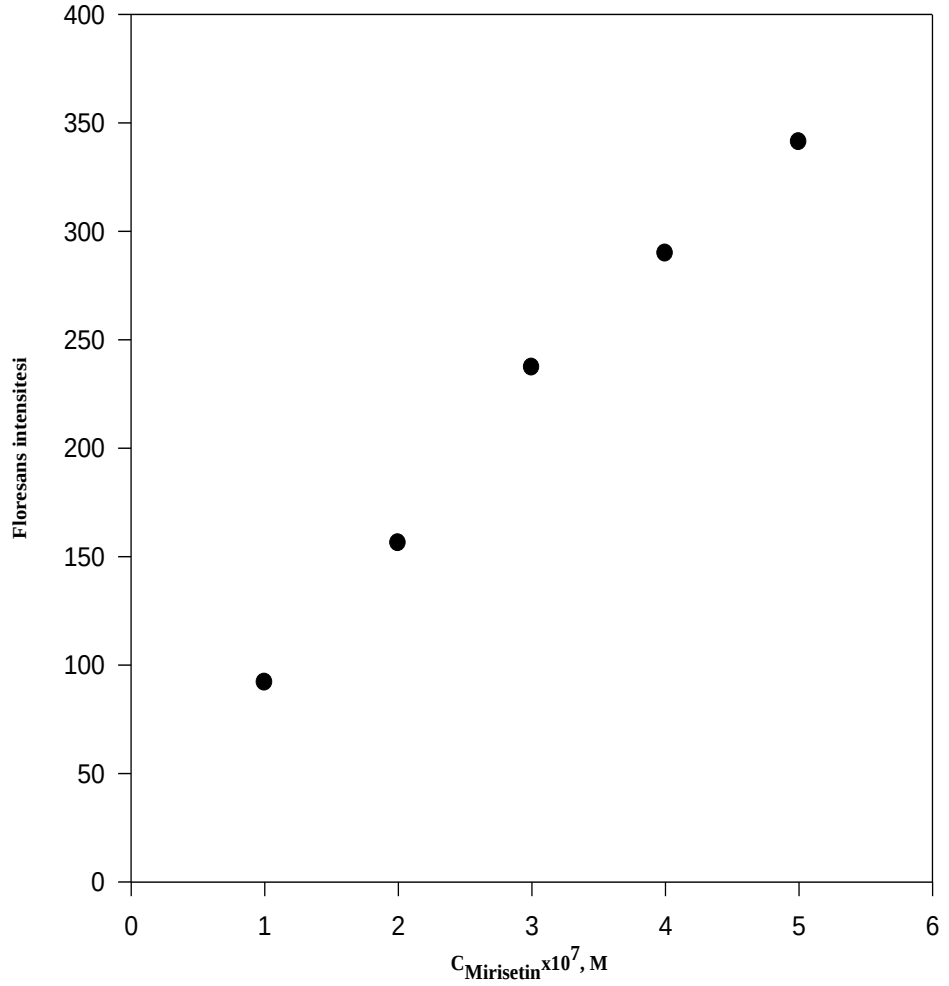


Şekil 4.5: Kuersetinin kalibrasyon eğrisi

4.1.2.2. Mirisetin

Tablo 4.2: Mirisetinin konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemi (x: molar konsantrasyon ve y: floresans intensitesi)

Konsantrasyon (M)	Floresans İntensitesi
1×10^{-7}	91.9
2×10^{-7}	156.2
3×10^{-7}	237.2
4×10^{-7}	289.8
5×10^{-7}	341.2
Doğru Denklemi: $y = 6.232 \times 10^8 x + 34.5$ $r = 0.996$	

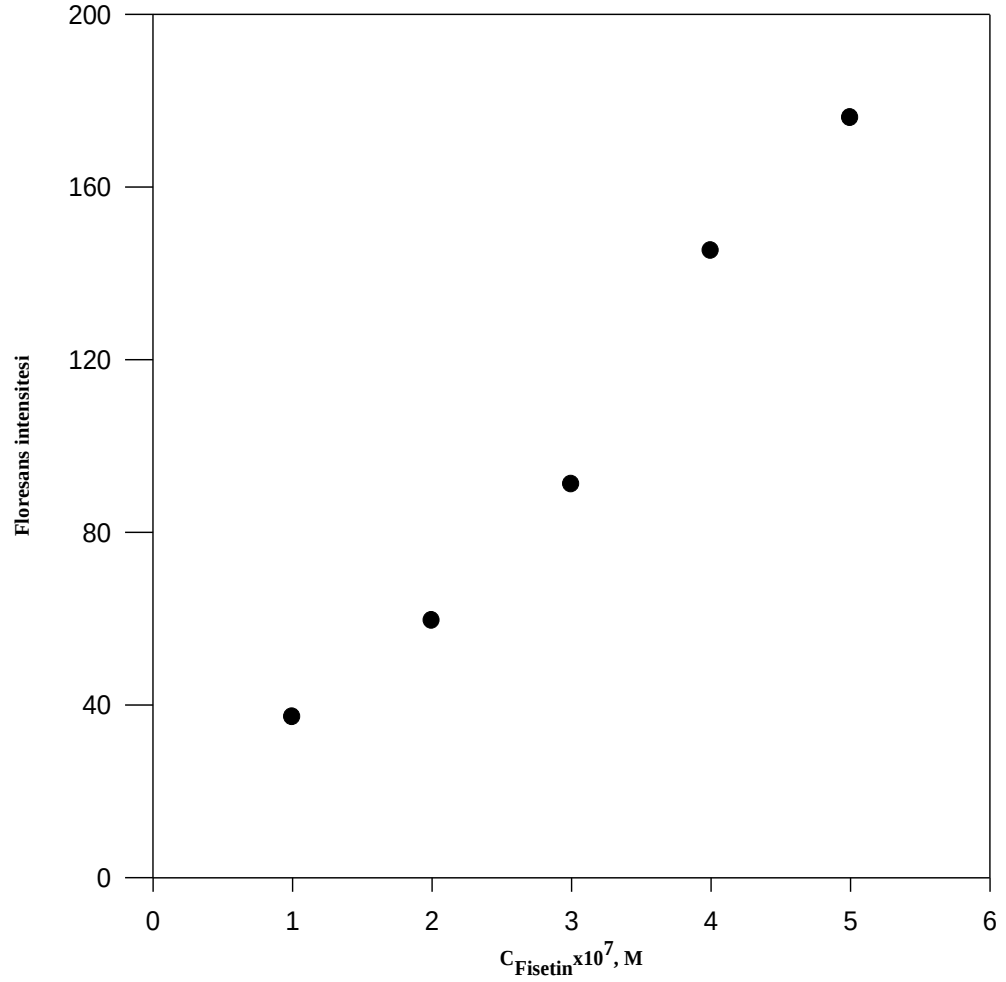


Şekil 4.6: Mirisetinin kalibrasyon eğrisi

4.1.2.3. Fisetin

Tablo 4.3: Fisetinin konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemi (x: molar konsantrasyon ve y: floresans intensitesi)

Konsantrasyon (M)	Floresans İntensitesi
1×10^{-7}	37.2
2×10^{-7}	59.5
3×10^{-7}	91.1
4×10^{-7}	145.2
5×10^{-7}	176.0
Doğru Denklemi: $y = 3.633 \times 10^8 x - 7.19$ $r = 0.990$	

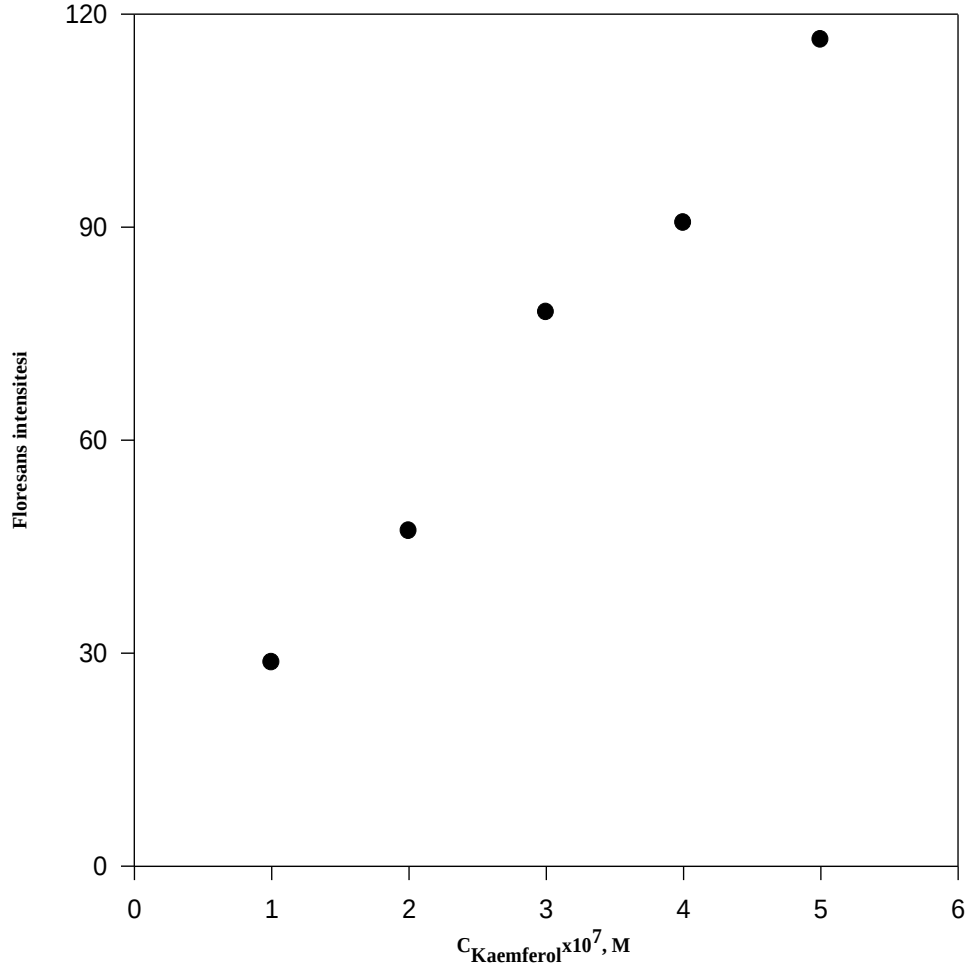


Şekil 4.7: Fisetinin kalibrasyon eğrisi

4.1.2.4. Kaemferol

Tablo 4.4: Kaemferolun konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemi (x: molar konsantrasyon ve y: floresans intensitesi)

Konsantrasyon (M)	Floresans İntensitesi
1×10^{-7}	28.7
2×10^{-7}	47.2
3×10^{-7}	78.0
4×10^{-7}	90.6
5×10^{-7}	116.4
Doğru Denklemi: $y = 2.188 \times 10^8 x + 6.54$ $r = 0.994$	

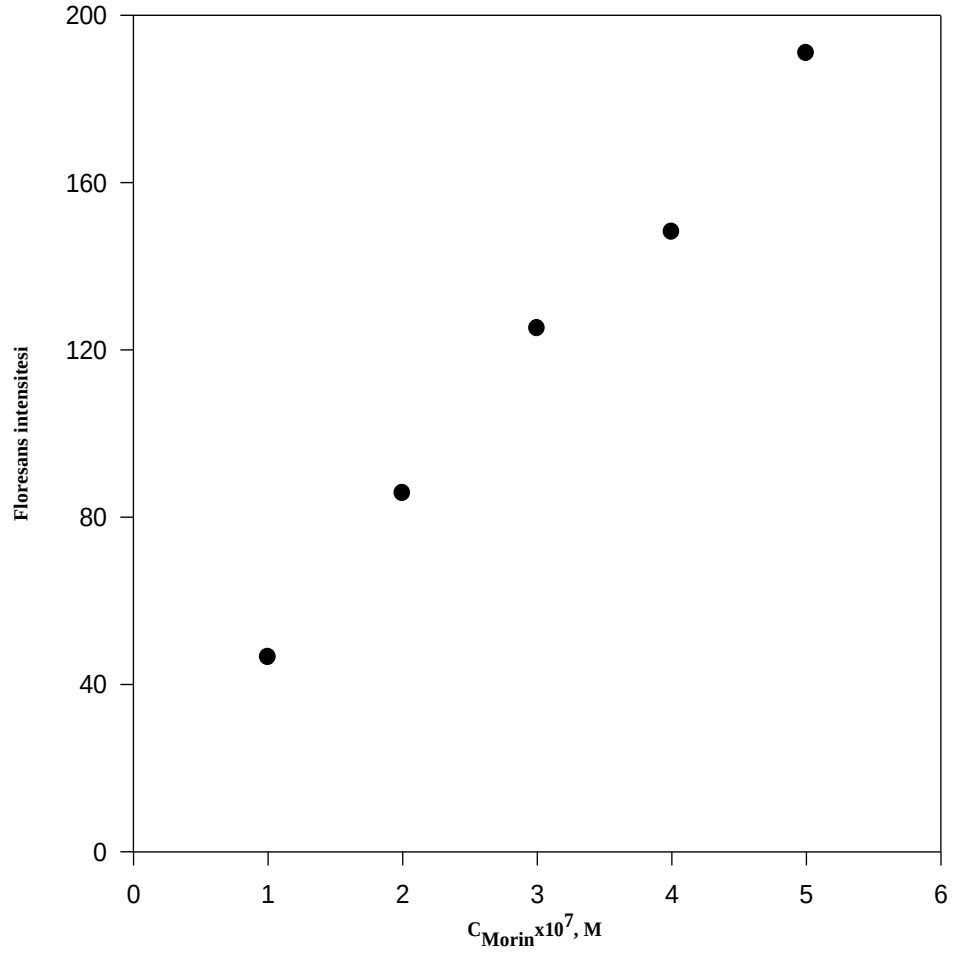


Şekil 4.8: Kaemferolun kalibrasyon eğrisi

4.1.2.5. Morin

Tablo 4.5: Morinin konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemi (x: molar konsantrasyon ve y: floresans intensitesi)

Konsantrasyon (M)	Floresans İntensitesi
1×10^{-7}	46.5
2×10^{-7}	85.7
3×10^{-7}	125.1
4×10^{-7}	148.2
5×10^{-7}	190.9
Doğru Denklemi: $y = 3.517 \times 10^8 x + 13.69$ $r=0.996$	

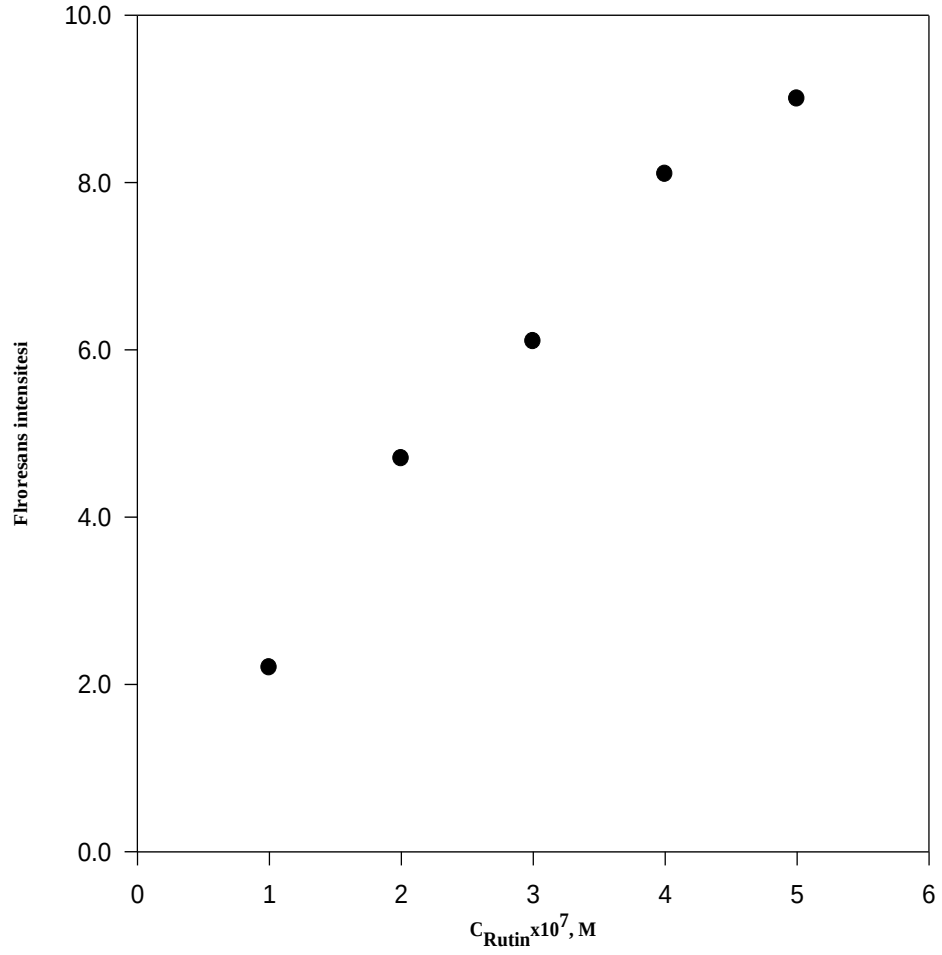


Şekil 4.9: Morinin kalibrasyon eğrisi

4.1.2.6. Rutin

Tablo 4.6: Rutinin konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemi (x: molar konsantrasyon ve y: floresans intensitesi)

Konsantrasyon (M)	Floresans İntensitesi
1×10^{-7}	2.2
2×10^{-7}	4.7
3×10^{-7}	6.1
4×10^{-7}	8.1
5×10^{-7}	9.0
Doğru Denklemi: $y= 1.7 \times 10^7 x + 0.92$ $r=0.989$	

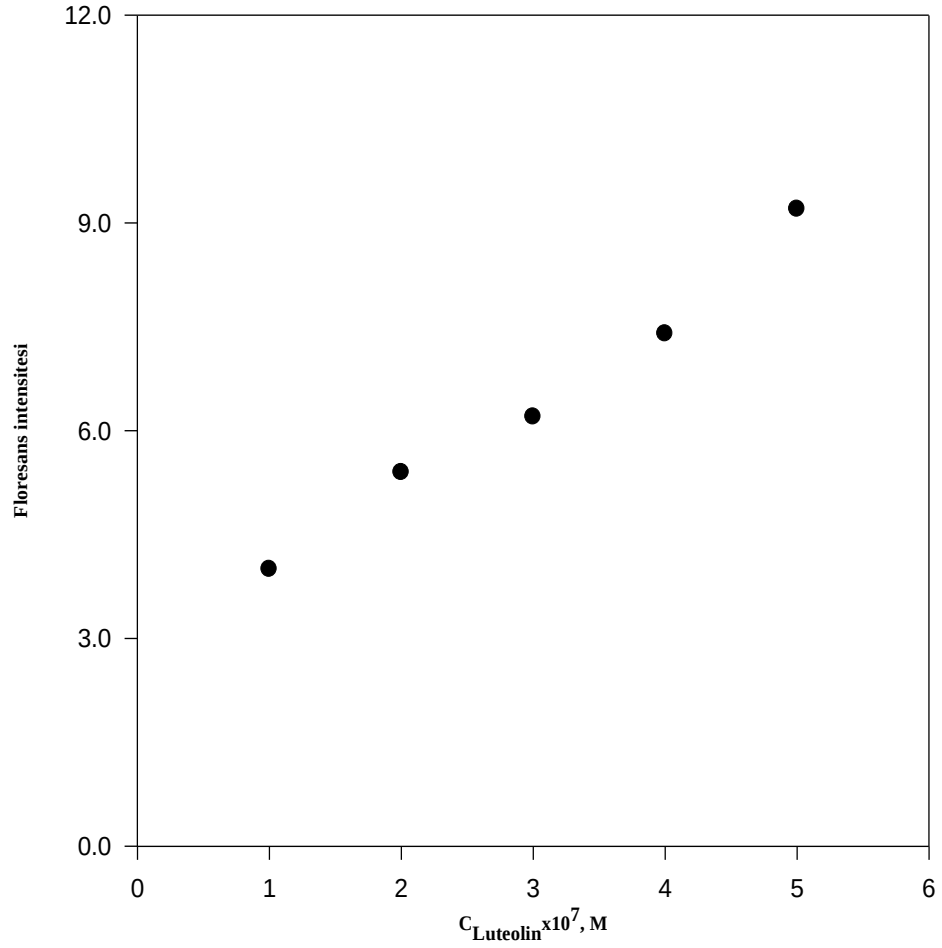


Şekil 4.10: Rutinin kalibrasyon eğrisi

4.1.2.7. Luteolin

Tablo 4.7: Luteolinin konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemi (x: molar konsantrasyon ve y: floresans intensitesi)

Konsantrasyon (M)	Floresans İntensitesi
1×10^{-7}	4.0
2×10^{-7}	5.4
3×10^{-7}	6.2
4×10^{-7}	7.4
5×10^{-7}	9.2
Doğru Denklemi:	$y = 1.24 \times 10^7 x + 2.72$ $r=0.992$

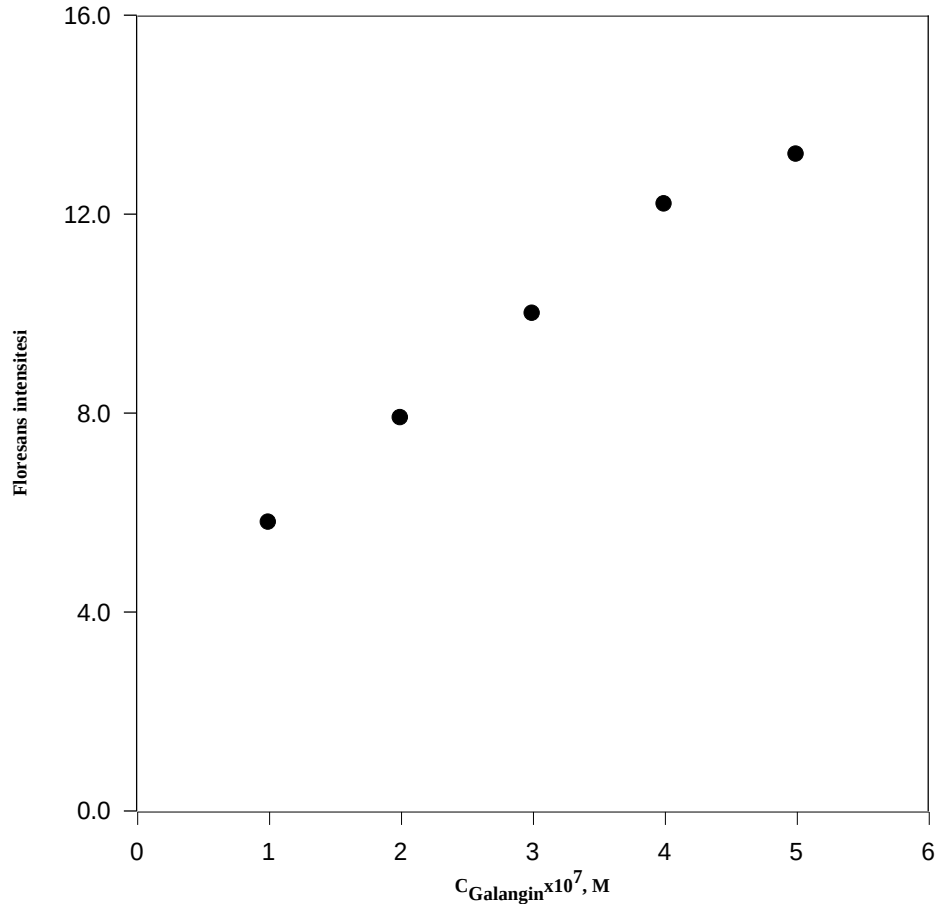


Şekil 4.11: Luteolinin kalibrasyon eğrisi

4.1.2.8. Galangin

Tablo 4.8: Galanginin konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemi (x: molar konsantrasyon ve y: floresans intensitesi)

Konsantrasyon (M)	Floresans İntensitesi
1×10^{-7}	5.8
2×10^{-7}	7.9
3×10^{-7}	10.0
4×10^{-7}	12.2
5×10^{-7}	13.2
Doğru Denklemi: $y = 1.91 \times 10^7 x + 4.09$ $r = 0.993$	

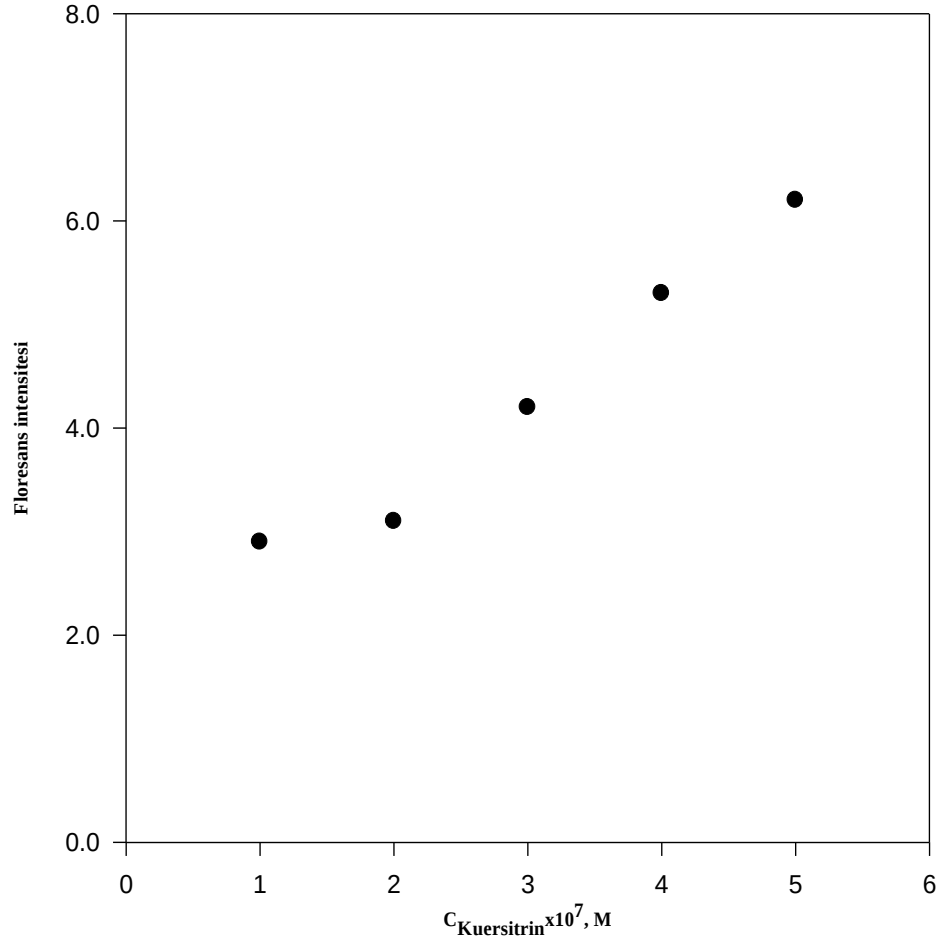


Şekil 4.12: Galanginin kalibrasyon eğrisi

4.1.2.9. Kuersitrin

Tablo 4.9: Kuersitrinin konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemi (x: molar konsantrasyon ve y: floresans intensitesi)

Konsantrasyon (M)	Floresans İntensitesi
1×10^{-7}	2.9
2×10^{-7}	3.1
3×10^{-7}	4.2
4×10^{-7}	5.3
5×10^{-7}	6.2
Doğru Denklemi: $y = 8.8 \times 10^6 x + 1.7$ $r=0.983$	



Şekil 4.13: Kuersitrinin kalibrasyon eğrisi

4.1.3. Fenolik Bileşiklerin AlCl₃/Potasyum Asetat Spektroflorometrik Yöntemi ile Elde Edilen Doğru Denklemleri, Molar Floresans Katsayıları, Eksitasyon ve Emisyon Dalgaboyları

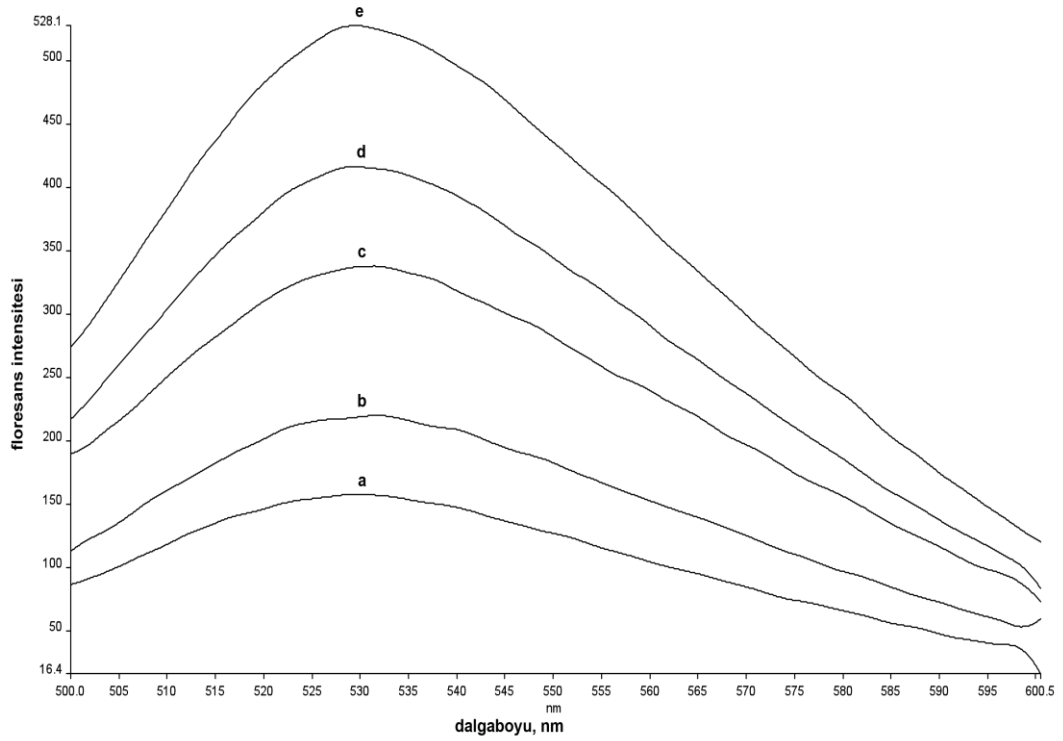
Fenolik bileşiklerin molar floresans katsayıları (ϵ'), AlCl₃/potasyum asetat spektrofotometrik yöntemine göre molar konsantrasyon-floresans intensitesi arasındaki kalibrasyon eğrilerinin eğimleri hesaplanarak elde edildi. Her maddenin ayrı ayrı eksitasyon ve emisyon dalgaboyları belirlendi.

Tablo 4.10: Bazı fenolik bileşiklerin spektrofotometrik-AlCl₃ yöntemine göre elde edilen doğru denklemleri, molar floresans katsayıları, eksitasyon ve emisyon dalgaboyları

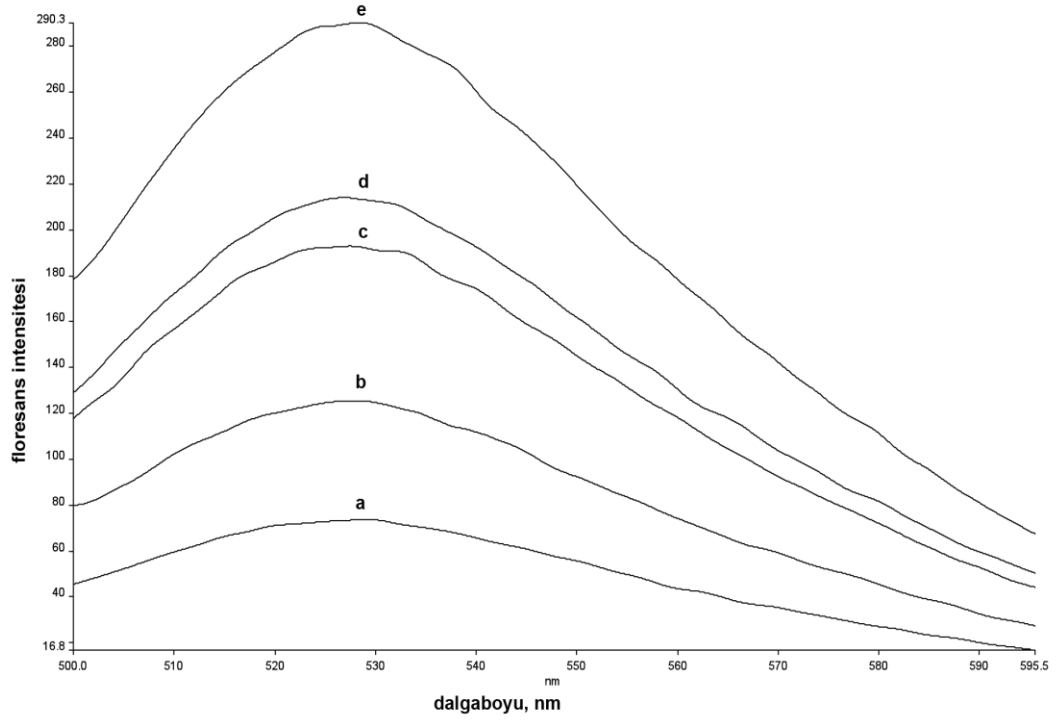
Fenolik Bileşikler	Doğru denklemi ve korelasyon katsayıları	ϵ' (Lmol ⁻¹ cm ⁻¹)	Eksitasyon ve Emisyon dalgaboyları (nm)
Kuersetin	y= 6.13 x 10 ⁸ C+ 16.6 r=0.996	6.13x 10 ⁸	Ex. 470 Em. 525
Mirisetin	y= 6.23 x 10 ⁸ C + 34.5 r=0.996	6.23x 10 ⁸	Ex. 471 Em. 529
Fisetin	y= 3.63 x 10 ⁸ C- 7.19 r=0.990	3.63x10 ⁸	Ex. 473 Em. 526
Kaemferol	y= 2.19 x 10 ⁸ C+ 6.54 r=0.994	2.19 x10 ⁸	Ex. 472 Em. 515
Morin	y= 3.52 x 10 ⁸ C+ 13.69 r=0.996	3.52x 10 ⁸	Ex. 470 Em. 515
Rutin	y= 1.7 x 10 ⁷ C+ 0.92 r=0.989	1.70x10 ⁷	Ex. 473 Em. 525
Luteolin	y= 1.17 x 10 ⁷ C+ 2.79 r=0.965	1.17x10 ⁷	Ex. 471 Em. 425
Galangin	y= 1.91 x 10 ⁷ C+ 4.09 r=0.993	1.91x10 ⁷	Ex. 470 Em. 515
Kuersitrin	y= 8.8 x 10 ⁶ C+ 1.7 r=0.983	8.88x10 ⁶	Ex. 467 Em.530

4.1.4. Fenolik Bileşiklerin $AlCl_3$ /Potasyum Asetat Spektroflorometrik Yöntemi ile Elde Edilen Emisyon Spektrumları

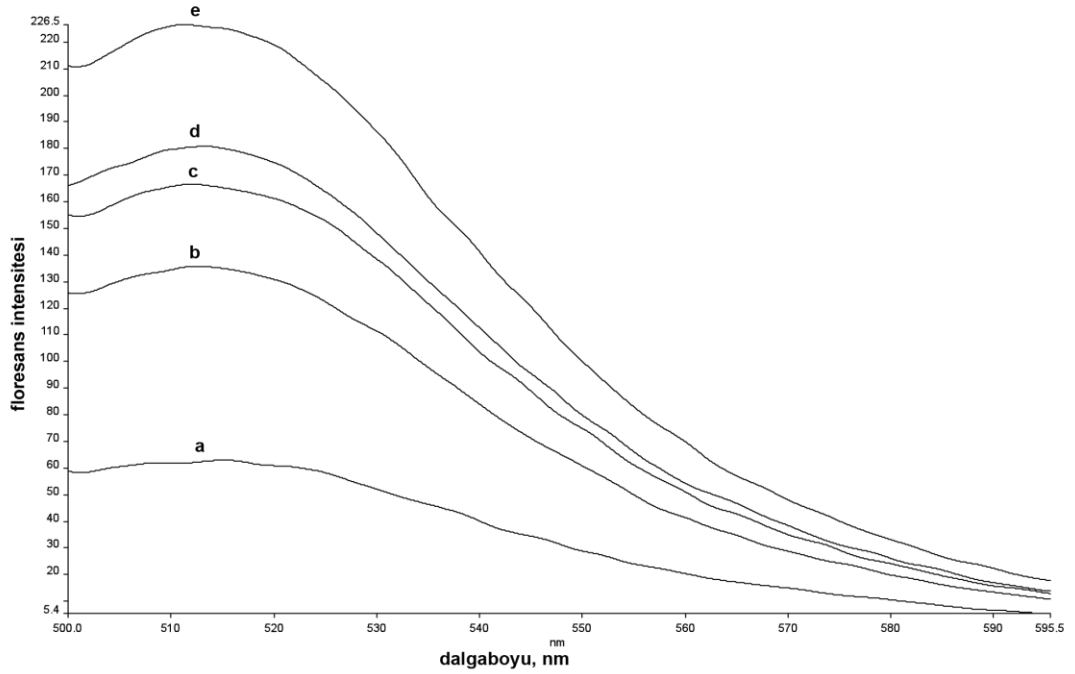
Flavonol bileşiklerin ve luteolinin, floresans spektroskopisi cihazının prescan (öntarama; eksitasyon ve emisyon spektrumlarının arka arkaya alınması) özelliğinden yararlanarak her bileşiğe ait eksitasyon (uyarılma) dalga boyları öncelikli olarak belirlendi. Bileşiklerin kendine özgü bu eksitasyon dalga boyları sabit tutulup, çeşitli konsantrasyonlarda belirli dalga boyları arasında bileşiklerin emisyon spektrumları elde edildi.



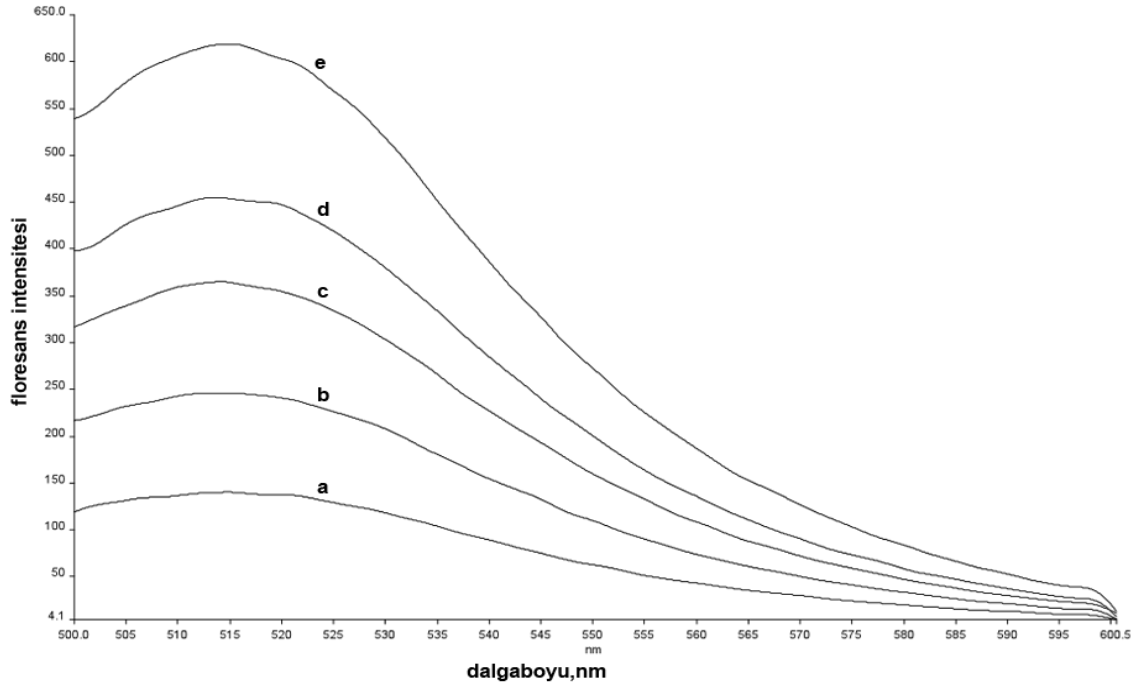
Şekil 4.14: Spektroflorometrik- $AlCl_3$ yöntemine göre mirisetinin emisyon spektrumu (Uyarılma dalga boyu 471 nm). 10 μ M mirisetin çözeltisinden sırasıyla (a) 50 μ L (b) 100 μ L (c) 150 μ L (d) 200 μ L (e) 250 μ L ilave edilmiştir.



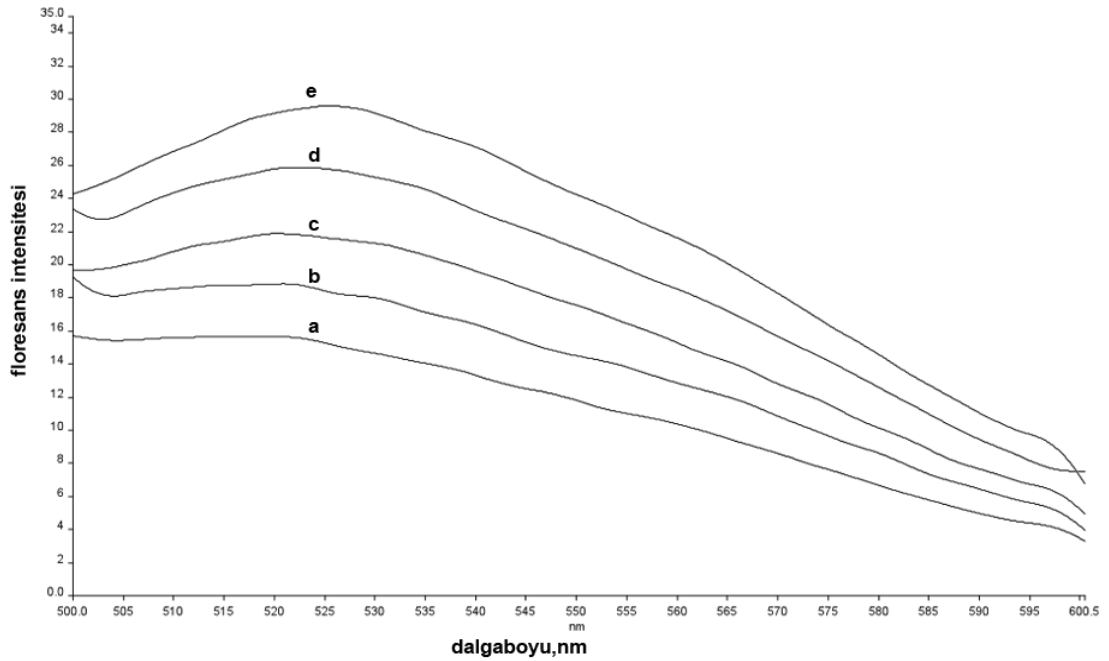
Şekil 4.15: Spektroflorometrik- AlCl_3 yöntemine göre fisetinin emisyon spektrumu (Uyarılma dalgaboyu 473 nm). 10 μM fisetin çözeltisinden sırasıyla (a) 50 μL (b) 100 μL (c) 150 μL (d) 200 μL (e) 250 μL ilave edilmiştir.



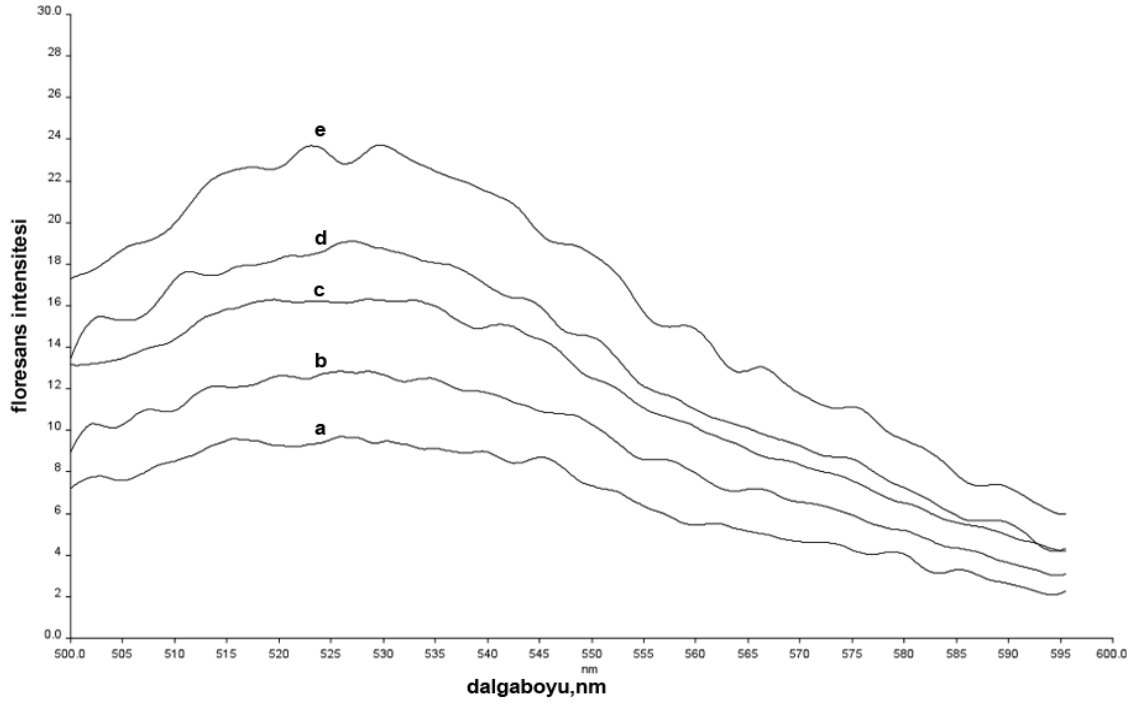
Şekil 4.16: Spektroflorometrik- AlCl_3 yöntemine göre kaempferolun emisyon spektrumu (Uyarılma dalgaboyu 472 nm). 10 μM kaempferol çözeltisinden sırasıyla (a) 50 μL (b) 100 μL (c) 150 μL (d) 200 μL (e) 250 μL ilave edilmiştir.



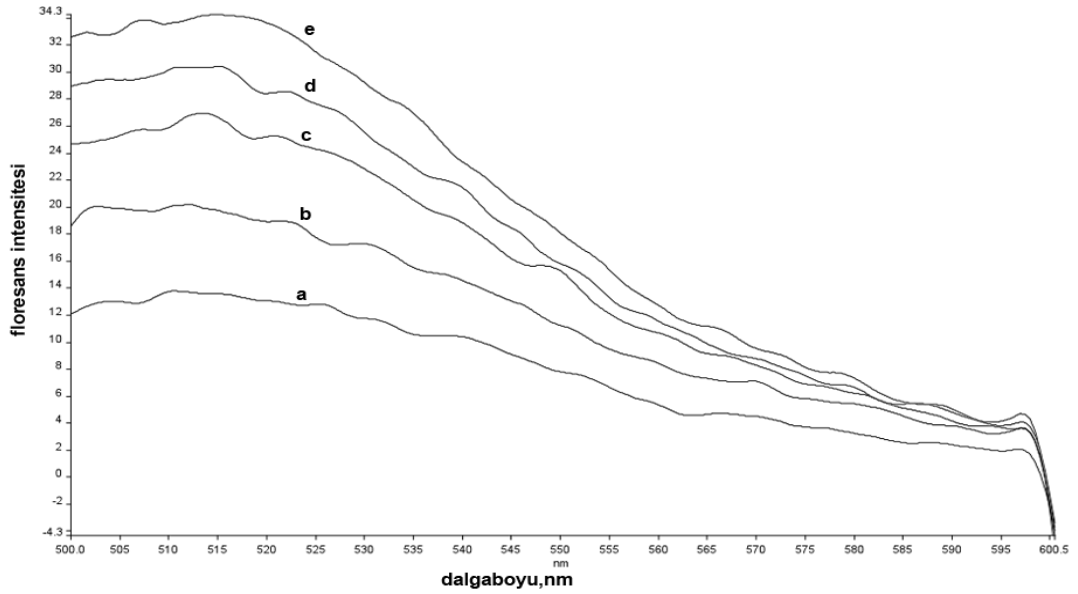
Şekil 4.17: Spektroflorometrik- AlCl_3 yöntemine göre morinin emisyon spektrumu (Uyarılma dalgaboyu 470 nm). 10 μM morin çözeltisinden sırasıyla (a) 50 μL (b) 100 μL (c) 150 μL (d) 200 μL (e) 250 μL ilave edilmiştir.



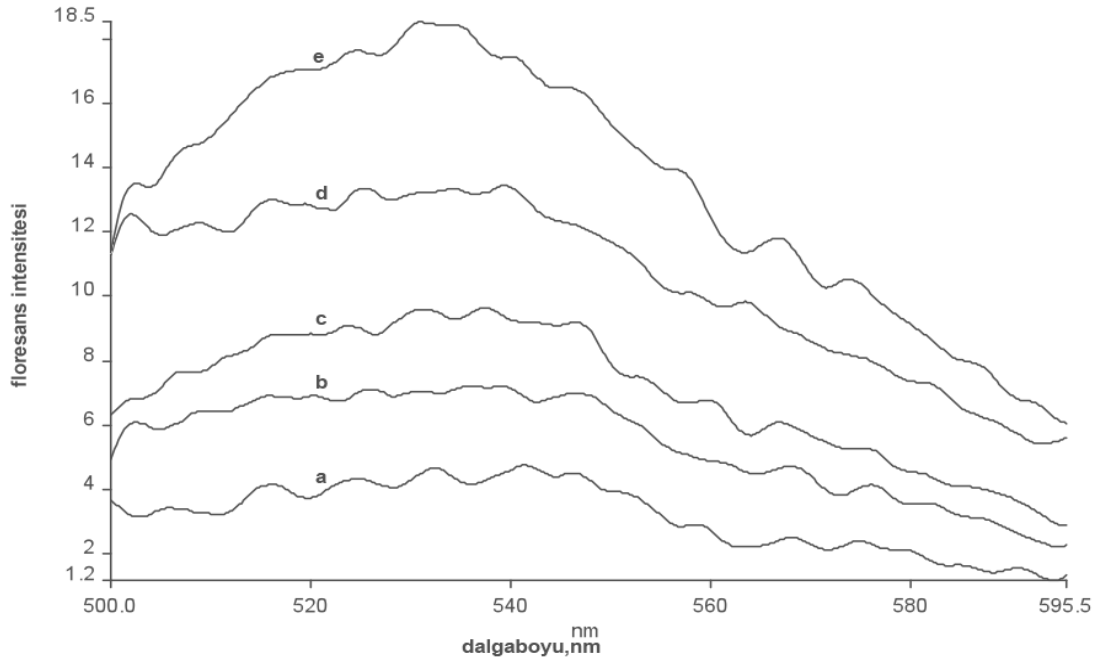
Şekil 4.18: Spektroflorometrik- AlCl_3 yöntemine göre rutin emisyon spektrumu (Uyarılma dalgaboyu 473 nm). 10 μM rutin çözeltisinden sırasıyla (a) 50 μL (b) 100 μL (c) 150 μL (d) 200 μL (e) 250 μL ilave edilmiştir.



Şekil 4.19: Spektroflorometrik- AlCl_3 yöntemine göre luteolinin emisyon spektrumu (Uyarılma dalgaboyu 471 nm). 10 μM luteolin çözeltisinden sırasıyla (a) 50 μL (b) 100 μL (c) 150 μL (d) 200 μL (e) 250 μL ilave edilmiştir.



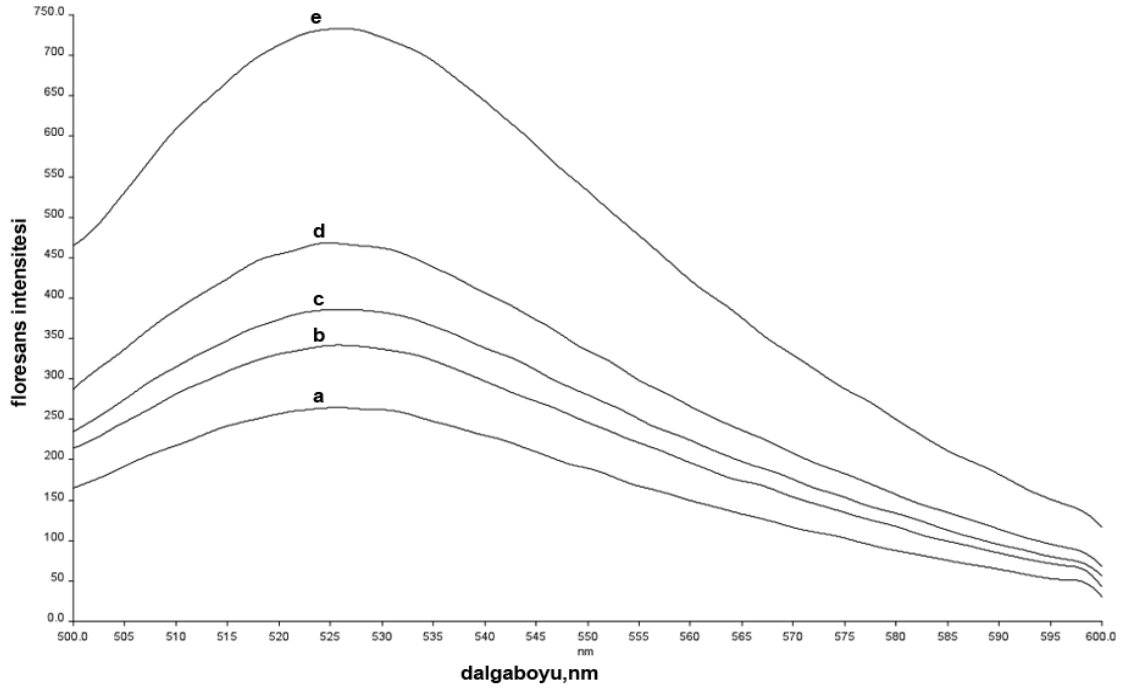
Şekil 4.20: Spektroflorometrik- AlCl_3 yöntemine göre galanginin emisyon spektrumu (Uyarılma dalgaboyu 470 nm). 10 μM galanginin çözeltisinden sırasıyla (a) 50 μL (b) 100 μL (c) 150 μL (d) 200 μL (e) 250 μL ilave edilmiştir.



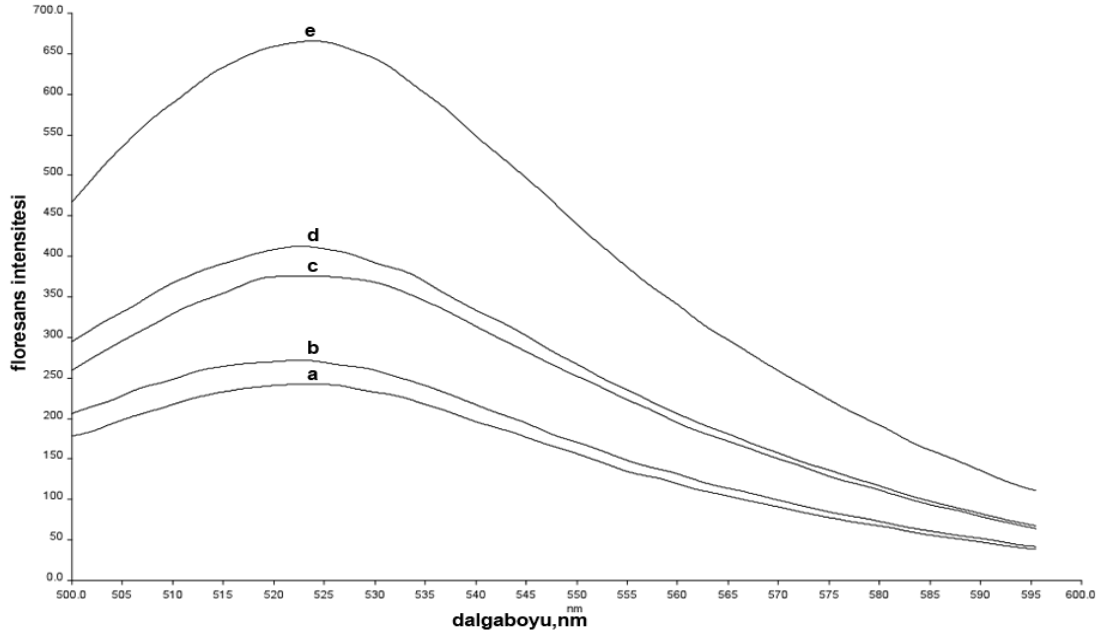
Şekil 4.21: Spektroflorometrik- AlCl_3 yöntemine göre kuersitrinin emisyon spektrumu (Uyarılma dalgaboyu 467 nm). 10 μM kuersitrin çözeltisinden sırasıyla (a) 50 μL (b) 100 μL (c) 150 μL (d) 200 μL (e) 250 μL ilave edilmiştir.

4.1.5. İkili Sentetik Karışımların AlCl_3 /Potasyum Asetat Spektroflorometrik Yöntemi ile Elde Edilen Emisyon Spektrumları

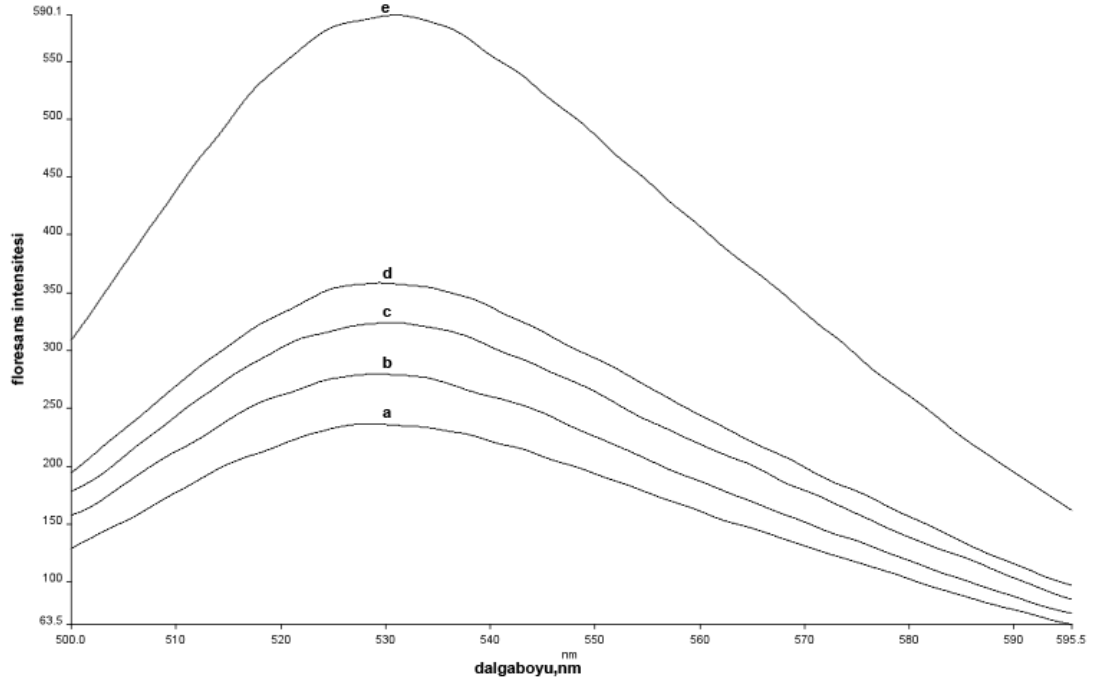
AlCl_3 /potasyum asetat spektroflorometrik yöntemine göre sonuçlar kuersetin referans alınarak incelendiğinden karışımlardan tespit edilen eksitasyon dalgaboylarının da yaklaşık olarak bu dalgaboyunda maksimum floresans intensitesi gösterdiği eksitasyon dalgaboyunda (470 nm) sabit tutulup, belirli konsantrasyonlarda hazırlanan fenolik bileşikler için farklı kombinasyonlarda ikili karışımlar oluşturulup emisyon spektrumları elde edildi.



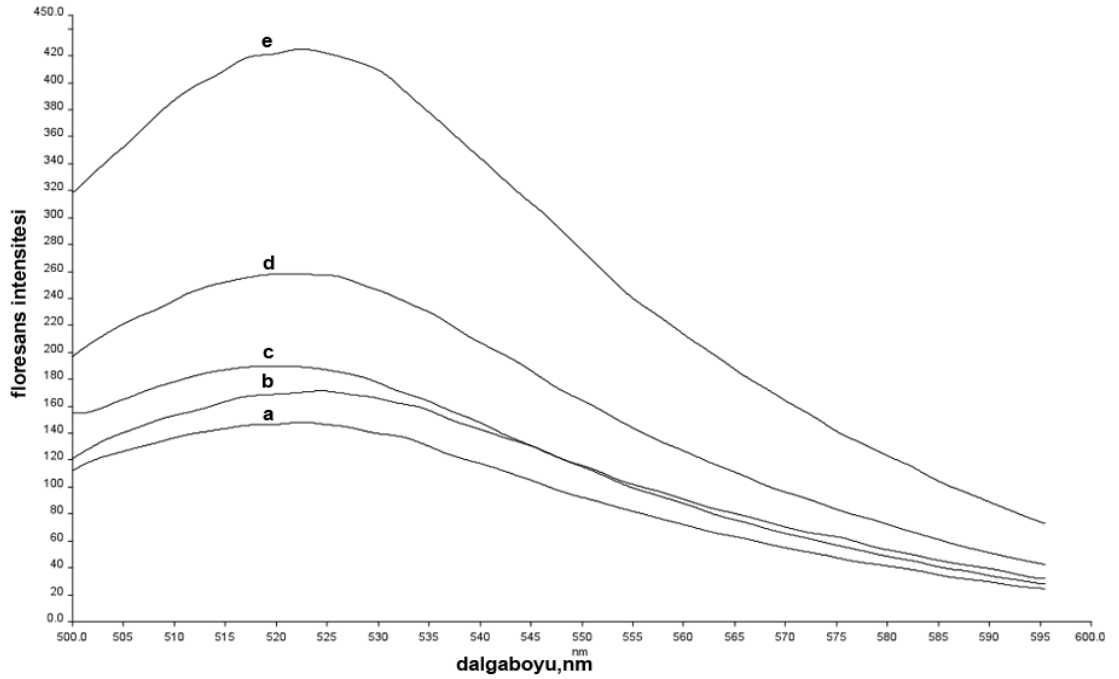
Şekil 4.22: Kuersetin-Fisetin karışım çözeltisinin emisyon spektrumu (Uyarılma dalgaboyu 470 nm). Her iki maddenin konsantrasyonu da 10 μ M olmak üzere **(a)** 50 μ L QR + 50 μ L FIS **(b)** 50 μ L QR + 100 μ L FIS **(c)** 100 μ L QR + 50 μ L FIS **(d)** 100 μ L QR + 100 μ L FIS **(e)** 150 μ L QR + 150 μ L FIS ilave edilerek spektrum elde edildi.



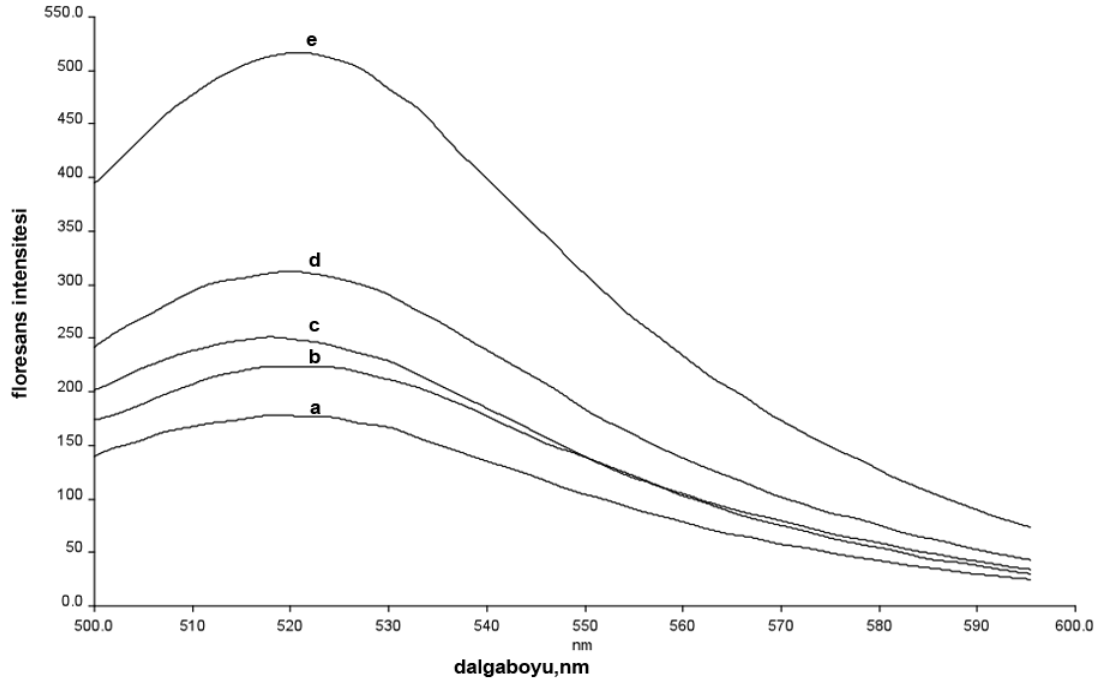
Şekil 4.23: Kuersetin-Kaemferol karışım çözeltisinin emisyon spektrumu (Uyarılma dalgaboyu 470 nm). Her iki maddenin konsantrasyonu da 10 μ M olmak üzere **(a)** 50 μ L QR + 50 μ L KAM **(b)** 50 μ L QR + 100 μ L KAM **(c)** 100 μ L QR + 50 μ L KAM **(d)** 100 μ L QR + 100 μ L KAM **(e)** 150 μ L QR + 150 μ L KAM eklenerek elde edildi.



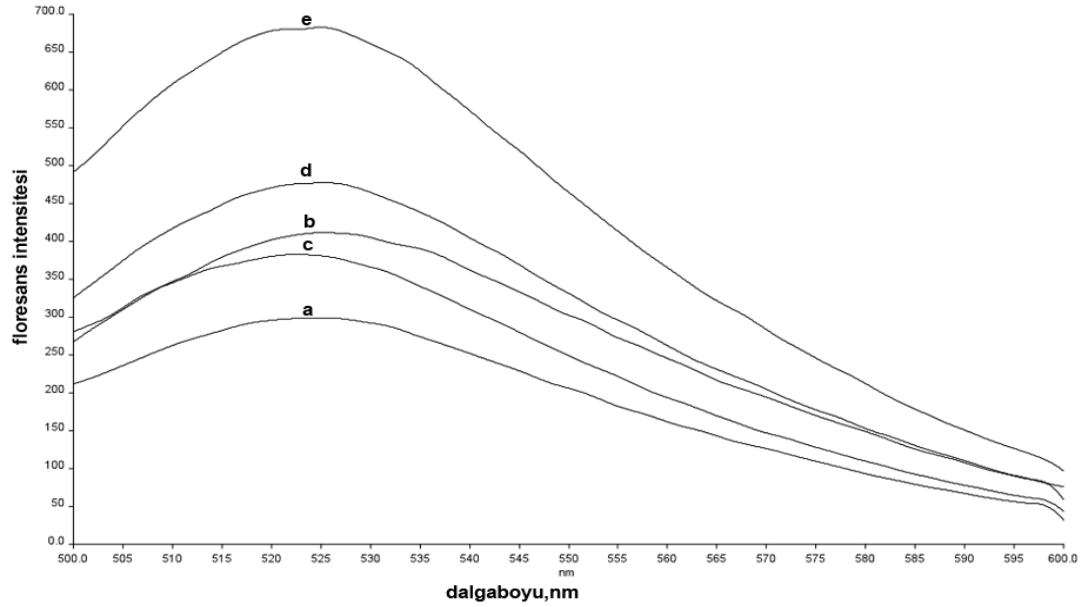
Şekil 4.24: Mirisetin-Fisetin karışım çözeltisinin emisyon spektrumu (Uyarılma dalgaboyu 470 nm). Her iki maddenin konsantrasyonu da $10 \mu\text{M}$ olmak üzere **(a)** $50 \mu\text{L}$ MRC + $50 \mu\text{L}$ FIS **(b)** $50 \mu\text{L}$ MRC + $100 \mu\text{L}$ FIS **(c)** $100 \mu\text{L}$ MRC + $50 \mu\text{L}$ FIS **(d)** $100 \mu\text{L}$ MRC + $100 \mu\text{L}$ FIS **(e)** $150 \mu\text{L}$ MRC + $150 \mu\text{L}$ FIS ilave edilerek spektrum elde edildi.



Şekil 4.25: Fisetin-Kaemferol karışım çözeltisinin emisyon spektrumu (Uyarılma dalgaboyu 470 nm). Her iki maddenin konsantrasyonu da $10 \mu\text{M}$ olmak üzere **(a)** $50 \mu\text{L}$ FIS + $50 \mu\text{L}$ KAM **(b)** $50 \mu\text{L}$ FIS + $100 \mu\text{L}$ KAM **(c)** $100 \mu\text{L}$ FIS + $50 \mu\text{L}$ KAM **(d)** $100 \mu\text{L}$ FIS + $100 \mu\text{L}$ KAM **(e)** $150 \mu\text{L}$ FIS + $150 \mu\text{L}$ KAM ilave edilerek spektrum elde edildi.



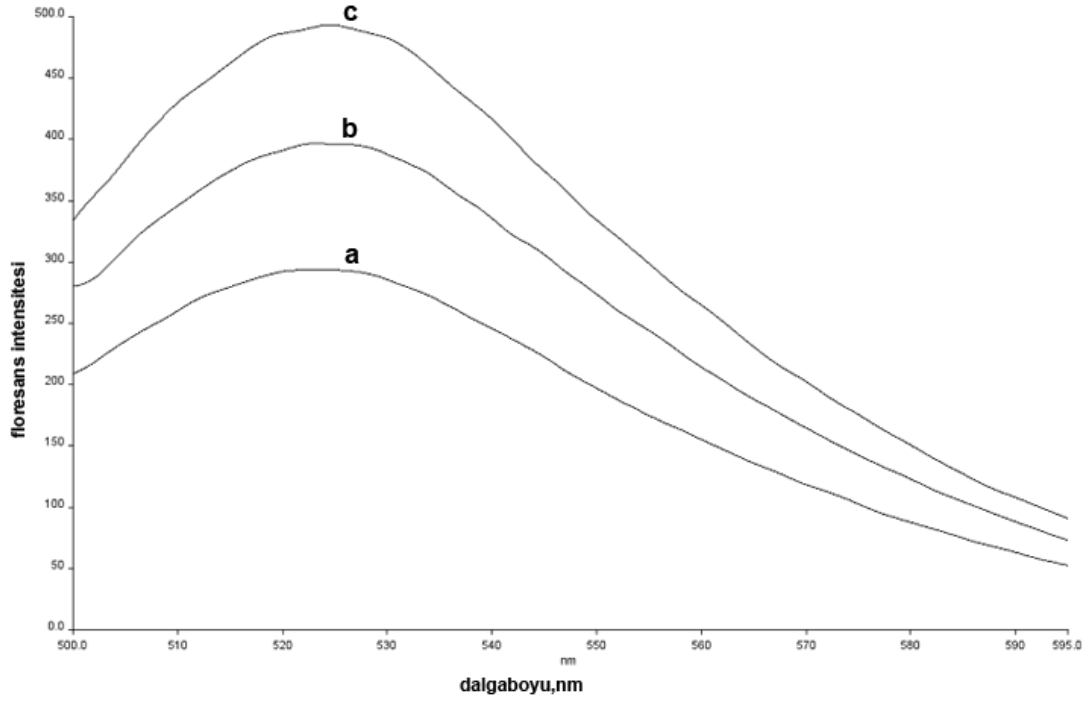
Şekil 4.26: Morin-Fisetin karışım çözeltisinin emisyon spektrumu (Uyarılma dalgalıboyu 470 nm). Her iki maddenin konsantrasyonu da 10 μM olmak üzere **(a)** 50 μL MOR + 50 μL FIS **(b)** 50 μL MOR + 100 μL FIS **(c)** 100 μL MOR + 50 μL FIS **(d)** 100 μL MOR + 100 μL FIS **(e)** 150 μL MOR + 150 μL FIS ilave edilerek spektrum elde edildi.



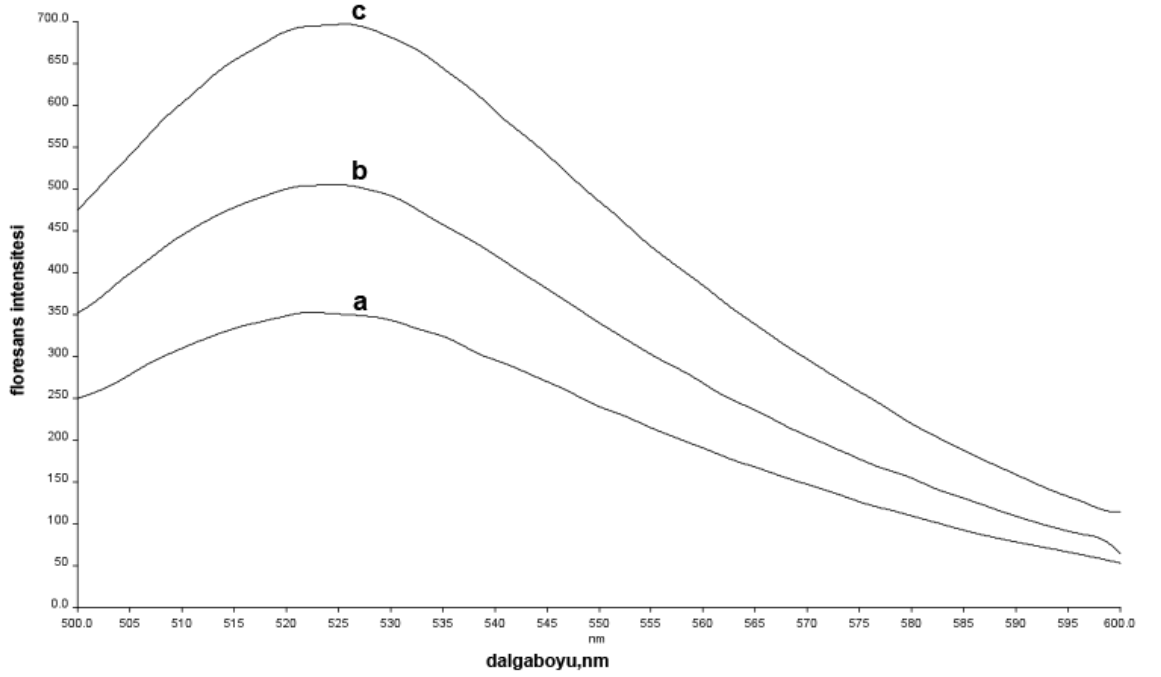
Şekil 4.27: Mirisetin-Morin karışım çözeltisinin emisyon spektrumu (Uyarılma dalgalıboyu 470 nm). Her iki maddenin konsantrasyonu da 10 μM olmak üzere **(a)** 50 μL MRC + 50 μL MOR **(b)** 100 μL MRC + 50 μL MOR **(c)** 50 μL MRC + 100 μL MOR **(d)** 100 μL MRC + 100 μL MOR **(e)** 150 μL MRC + 150 μL MOR ilave edilerek spektrum elde edildi.

4.1.6. Üçlü Sentetik Karışımların Oluşturulması ve AlCl_3 /Potasyum Asetat Spektroflorometrik Yöntemi ile Emisyon Spektrumlarının Elde Edilmesi

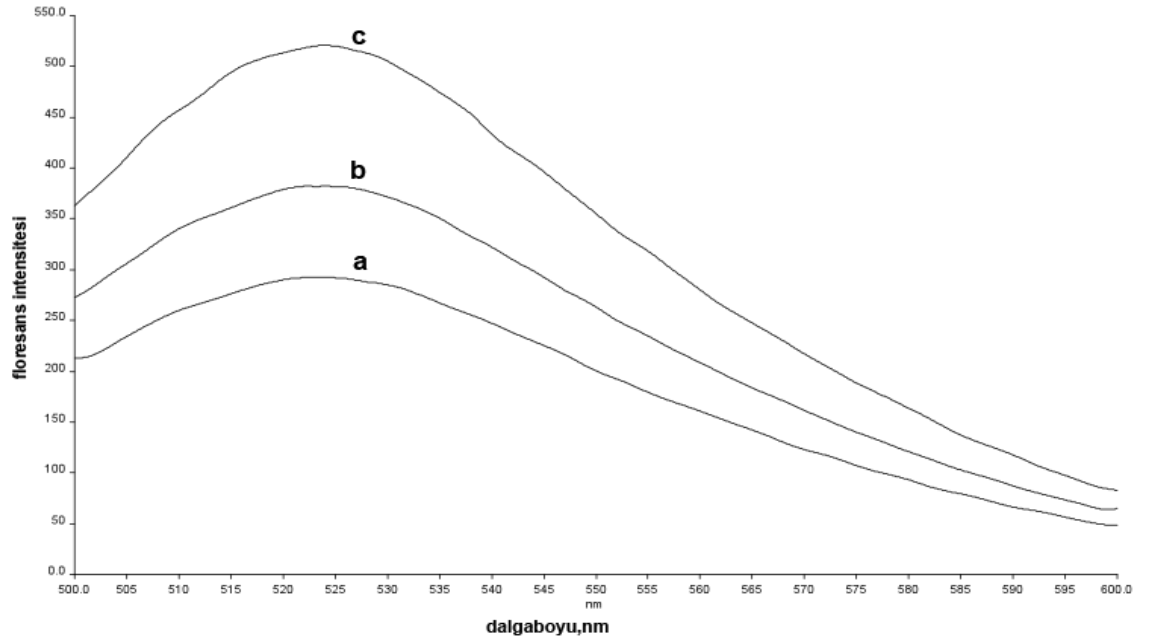
AlCl_3 /potasyum asetat spektroflorometrik yöntemine göre sonuçlar kuersetin referans alınarak incelendiğinden ve karışımlardan tespit edilen eksitasyon dalgaboylarının da yaklaşık olarak bu dalgaboyunda maksimum floresans intensitesi gösterdiği eksitasyon dalgaboyunda (470 nm) sabit tutulup, belirli konsantrasyonlarda hazırlanan flavonol bileşikler için farklı kombinasyonlarda üçlü karışımlar oluşturulup emisyon spektrumları elde edildi.



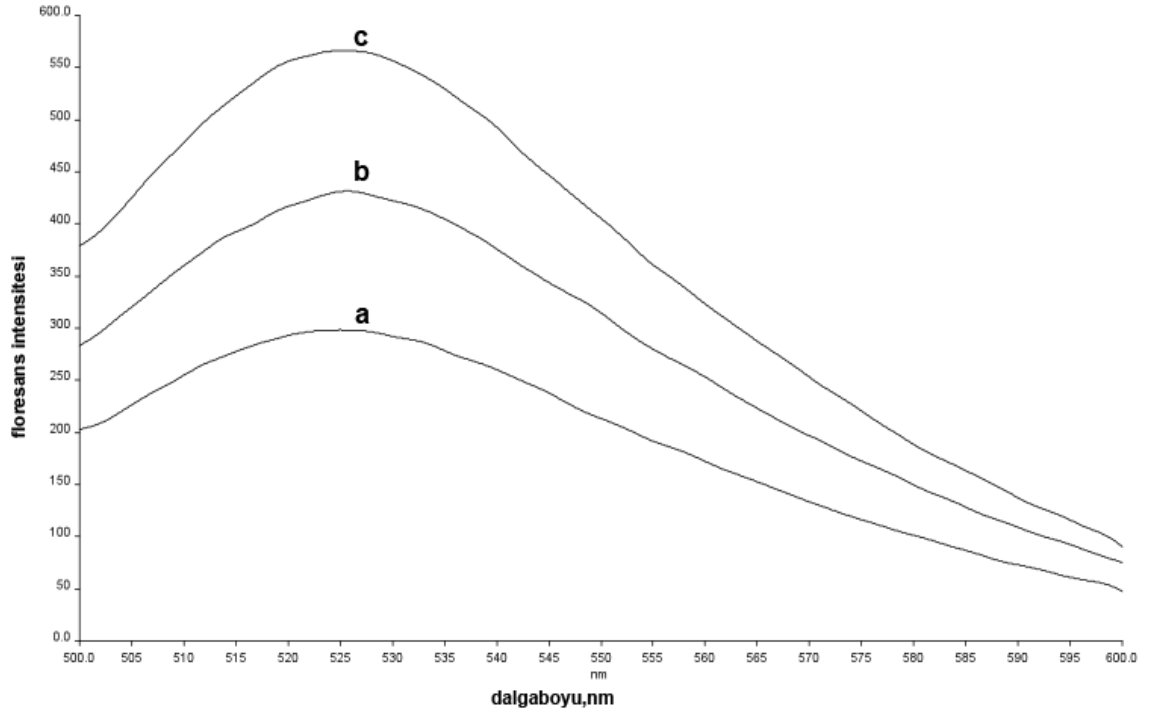
Şekil 4.28: Kuersetin-Fisetin-Kaemferol karışım çözeltisinin emisyon spektrumu (Uyarılma dalgaboyu 470 nm). Her üç maddenin konsantrasyonu da 10 μM olmak üzere **(a)** 40 μL QR + 40 μL FIS + 40 μL KAM **(b)** 60 μL QR + 60 μL FIS + 60 μL KAM **(c)** 80 μL QR + 80 μL FIS + 80 μL KAM ilave edilerek spektrum elde edildi.



Şekil 4.29: Kuersetin-Mirisetin-Morin karışım çözeltisinin emisyon spektrumu (Uyarılma dalgaboyu 470 nm). Her üç maddenin konsantrasyonu da 10 μ M olmak üzere **(a)** 40 μ L QR + 40 μ L MRC + 40 μ L MOR **(b)** 60 μ L QR + 60 μ L MRC + 60 μ L MOR **(c)** 80 μ L QR + 80 μ L MRC + 80 μ L MOR ilave edilerek spektrum elde edildi.



Şekil 4.30: Fisetin-Mirisetin-Morin karışım çözeltisinin emisyon spektrumu (Uyarılma dalgaboyu 470 nm). Her üç maddenin konsantrasyonu da 10 μ M olmak üzere **(a)** 40 μ L FIS + 40 μ L MRC + 40 μ L MOR **(b)** 60 μ L FIS + 60 μ L MRC + 60 μ L MOR **(c)** 80 μ L FIS + 80 μ L MRC + 80 μ L MOR ilave edilerek spektrum elde edildi.



Şekil 4.31: Kuersetin-Mirisetin-Kaemferol karışım çözeltisinin emisyon spektrumu (Uyarılma dalgaboyu 470 nm). Her üç maddenin konsantrasyonu da 10 μ M olmak üzere **(a)** 40 μ L QR + 40 μ L MRC + 40 μ L KAM **(b)** 60 μ L QR + 60 μ L MRC + 60 μ L KAM **(c)** 80 μ L QR + 80 μ L MRC + 80 μ L KAM ilave edilerek spektrum elde edildi.

4.1.7. Üçlü Sentetik Karışımların Elde Edilmesi ve AlCl_3 /Potasyum Asetat Spektroflorometrik Yöntemi Uygulanması ile Beklenen ve Ölçülen Floresans İntensitesi Değerleri

Flavonol grubu bileşikler için farklı kombinasyonlarda üçlü karışımlar oluşturulup spektroflorometrik- AlCl_3 yöntemine göre beklenen ve ölçülen floresans intensitesi değerleri birbiriyle karşılaştırıldı. AlCl_3 /potasyum asetat spektroflorometrik yöntemine göre elde edilen bu üçlü sentetik karışımların floresans intensiteleri, 470 nm eksitasyon ve 525 nm emisyon dalgaboyu kullanılarak ölçüldü. Beklenen floresans intensitesi değerleri, her bir sentetik madde için yöntemden bulunan denklemler (Tablo 4.10) yardımıyla, karışımdaki son konsantrasyonlarından floresans intensite değerlerinin hesaplanması ve son olarak da bunların birbirleriyle toplanması sonucu elde edildi.

Konsantrasyonları 10 μM olan çeşitli flavonol grubu bileşikler için farklı kombinasyonlarda üçlü karışımlar oluşturulup, beklenen ve deneysel olarak bulunan floresans intensite değerleri karşılaştırıldı (Tablo 4.11).

Tablo 4.11: Sentetik karışım çözeltilerinin spektroflorometrik- AlCl_3 yöntemine göre beklenen ve ölçülen floresans intensite değerlerinin karşılaştırılması

Karışımın İçeriği	Beklenen floresans intensite	Deneysel olarak bulunan floresans intensite
40 μL 10 μM QR	191.8	187.3
40 μL 10 μM MRC		
40 μL 10 μM MOR		
60 μL 10 μM QR	255.0	265.3
60 μL 10 μM MRC		
60 μL 10 μM MOR		
80 μL 10 μM QR	318.4	317.1
80 μL 10 μM MRC		
80 μL 10 μM MOR		

Karışımın İçeriği	Beklenen floresans intensite	Deneysel olarak bulunan floresans intensite
40 µL 10 µM MRC	150.2	150.9
40 µL 10 µM MOR		
40 µL 10 µM KAM		
60 µL 10 µM MRC	198.0	181.2
60 µL 10 µM MOR		
60 µL 10 µM KAM		
80 µL 10 µM MRC	245.8	229.0
80 µL 10 µM MOR		
80 µL 10 µM KAM		
40 µL 10 µM QR	171.8	170.4
40 µL 10 µM MRC		
40 µL 10 µM FIS		
60 µL 10 µM QR	235.5	228.9
60 µL 10 µM MRC		
60 µL 10 µM FIS		
80 µL 10 µM QR	299.3	296.9
80 µL 10 µM MRC		
80 µL 10 µM FIS		
40 µL 10 µM QR	173.9	165.4
40 µL 10 µM MRC		
40 µL 10 µM KAM		
60 µL 10 µM QR	231.9	207.6
60 µL 10 µM MRC		
60 µL 10 µM KAM		
80 µL 10 µM QR	290.0	262.1
80 µL 10 µM MRC		
80 µL 10 µM KAM		

Karışımın İçeriği	Beklenen floresans intensite	Deneyssel olarak bulunan floresans intensite
40 µL 10 µM MRC	148.1	141.8
40 µL 10 µM MOR		
40 µL 10 µM FIS		
60 µL 10 µM MRC	201.6	172.4
60 µL 10 µM MOR		
60 µL 10 µM FIS		
80 µL 10 µM MRC	255.1	225.9
80 µL 10 µM MOR		
80 µL 10 µM FIS		
40 µL 10 µM QR	129.4	147.2
40 µL 10 µM MOR		
40 µL 10 µM FIS		
60 µL 10 µM QR	182.1	207.9
60 µL 10 µM MOR		
60 µL 10 µM FIS		
80 µL 10 µM QR	235.1	248.4
80 µL 10 µM MOR		
80 µL 10 µM FIS		
40 µL 10 µM QR	131.5	145.8
40 µL 10 µM MOR		
40 µL 10 µM KAM		
60 µL 10 µM QR	178.5	176.4
60 µL 10 µM MOR		
60 µL 10 µM KAM		
80 µL 10 µM QR	225.8	213.6
80 µL 10 µM MOR		
80 µL 10 µM KAM		

Karışımın İçeriği	Beklenen floresans intensite	Deneysel olarak bulunan floresans intensite
40 µL 10 µM MRC	130.2	126.6
40 µL 10 µM FIS		
40 µL 10 µM KAM		
60 µL 10 µM MRC	178.5	181.4
60 µL 10 µM FIS		
60 µL 10 µM KAM		
80 µL 10 µM MRC	226.7	215.3
80 µL 10 µM FIS		
80 µL 10 µM KAM		
40 µL 10 µM MOR	94.8	95.1
40 µL 10 µM FIS		
40 µL 10 µM KAM		
60 µL 10 µM MOR	125.1	126.9
60 µL 10 µM FIS		
60 µL 10 µM KAM		
80 µL 10 µM MOR	162.5	162.2
80 µL 10 µM FIS		
80 µL 10 µM KAM		
40 µL 10 µM QR	111.5	130.5
40 µL 10 µM FIS		
40 µL 10 µM KAM		
60 µL 10 µM QR	159.0	153.3
60 µL 10 µM FIS		
60 µL 10 µM KAM		
80 µL 10 µM QR	206.7	207.7
80 µL 10 µM FIS		
80 µL 10 µM KAM		

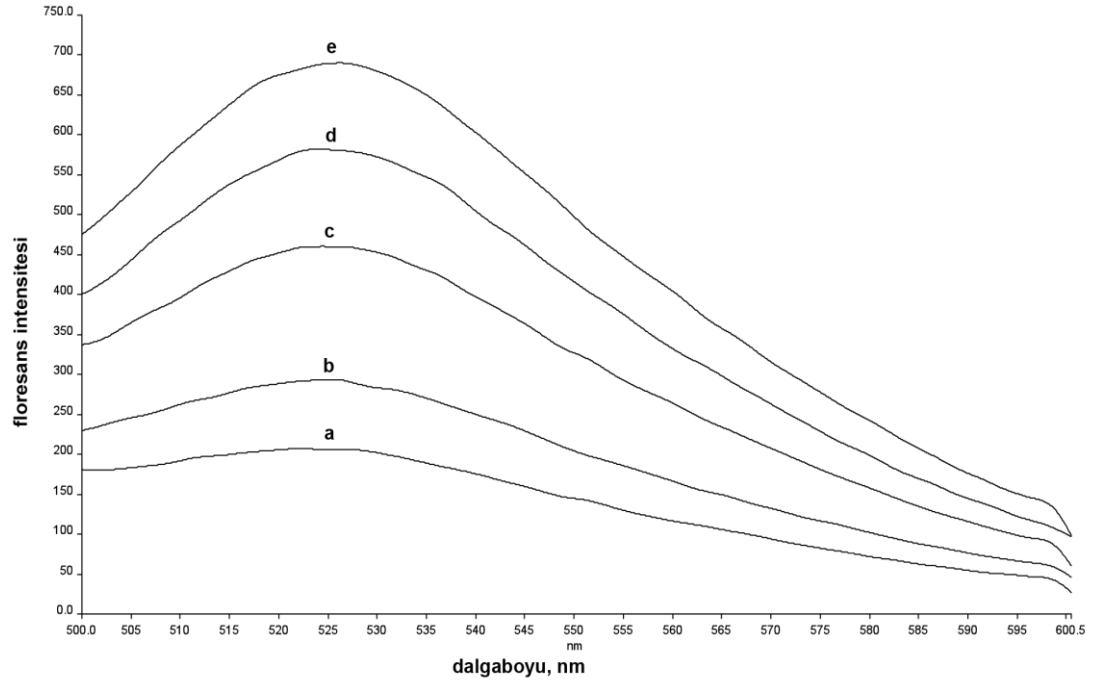
4.2. GELİŞTİRİLEN AlCl_3 /POTASYUM ASETAT SPEKTROFLOROMETRİK YÖNTEMİNİN FARKLI ÇÖZÜCÜ ORTAMLARINA UYGULANABİLİRLİĞİ

4.2.1. AlCl_3 /Potasyum Asetat Spektrofluorometrik Yönteminin Aseton-M- β -CD Ortamında Uygulanması

Geliştirilen AlCl_3 /potasyum asetat spektrofluorometrik yönteminin, değişik çözücü ortamlarına uyarlanabilmesi amacıyla, aseton-M- β -CD ortamında uygulanması gerçekleştirildi. Bu amaçla yapılan denemelerde, flavonoid bileşikler aseton-su (v:v, 9:1) ortamında çözülerek hazırlanmış olan %2'lik (w/v) M- β -CD çözeltisi içinde hazırlandı.

Öncelikli olarak eksitasyon ve emisyon dalgaboylarının, etanollu ortama göre farklılık gösterip göstermeyeceğine bakıldı. Kuersetinin, yöntem uygulanarak elde edilen eksitasyon ve emisyon spektrumlarının benzer şekilde olduğu görüldükten sonra, yöntemde sonuçlar kuersetin referans alınarak incelendiğinden, eksitasyon 470 nm dalgaboyunda sabit tutulup, kuersetinin değişik konsantrasyonlarında hazırlanmış çözeltilerinden alınarak yapılan deneme sonucunda Şekil 4.32'de gösterildiği gibi kuersetinin emisyon spektrumu oluşturuldu. Spektrumda görüldüğü gibi artan madde konsantrasyonu ile beraber 525 nm'de lineer bir şekilde artan floresans intensitesi belirlendi.

Uygulama şu şekilde yapıldı; x mL alınan örnek üzerine sırasıyla 1.5 mL %90 Aseton, 0.1 mL %1'lik AlCl_3 çözeltisi, 0.1 mL 1 M KAc ve (3.3-x) mL su ekleme işlemiyle toplam hacim 5 mL olacak şekilde tamamlandı ve 30 dakika oda şartlarında inkübasyon sonrasında örnek içermeyen referansa karşı okuma yapıldı. Yöntem yukarıda anlatıldığı gibi kuersetinin maksimum floresans intensitesi gösterdiği 470 nm eksitasyon dalgaboyu ve 525 nm emisyon dalgaboyunda uygulandı.



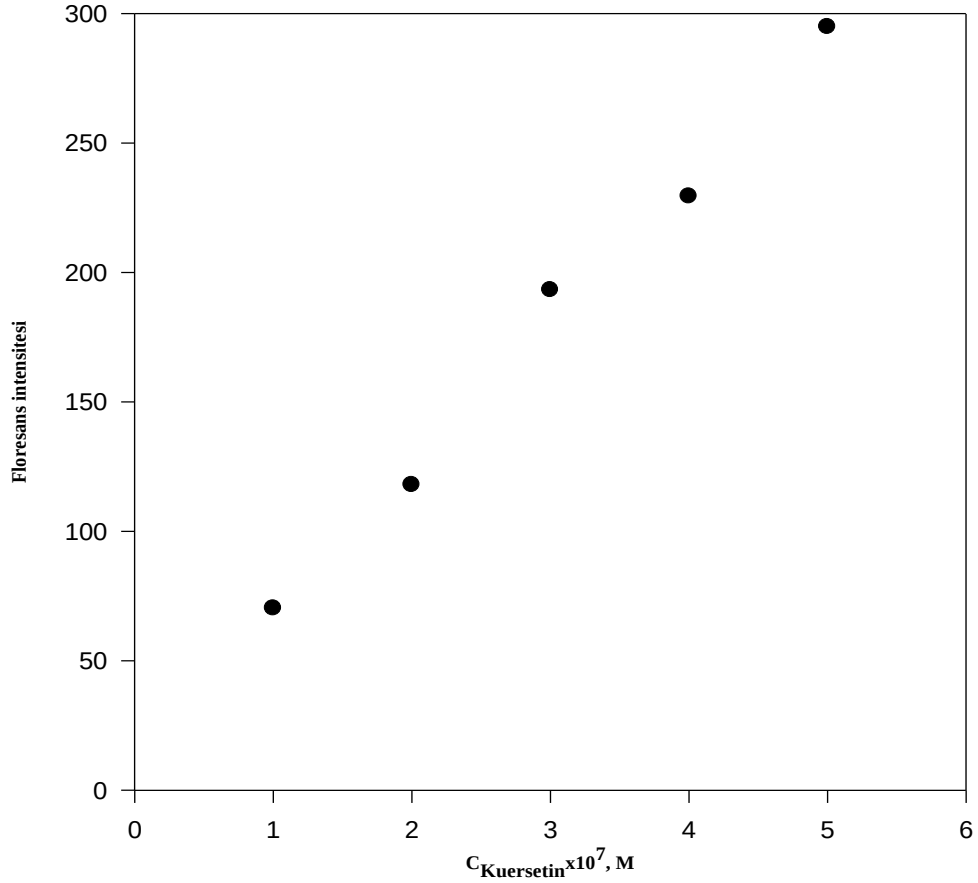
Şekil 4.32: Aseton-M- β -CD ortamında kuersetinin emisyon spektrumu (Uyarılma dalga boyu 470 nm). Kuersetin çözeltisinin konsantrasyonu 10 μ M olmak üzere sırasıyla **(a)** 50 μ L **(b)** 100 μ L **(c)** 150 μ L **(d)** 200 μ L **(e)** 250 μ L ilave edilerek spektrum elde edildi.

4.2.2. Bazı Fenolik Bileşiklerin AlCl_3 /Potasyum Asetat Spektroflorometrik Yönteminin Aseton-M- β -CD Ortamında Uygulanması ile Elde Edilen Doğru Denklemleri ve Kalibrasyon Grafikleri

4.2.2.1. Kuersetin

Tablo 4.12: Kuersetinin konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemi (x: molar konsantrasyon ve y: floresans intensitesi)

Konsantrasyon (M)	Floresans İntensitesi
1×10^{-7}	70.3
2×10^{-7}	118.0
3×10^{-7}	193.3
4×10^{-7}	229.5
5×10^{-7}	294.9
Doğru Denklemi: $y = 5.61 \times 10^8 x + 12.99$ $r=0.996$	

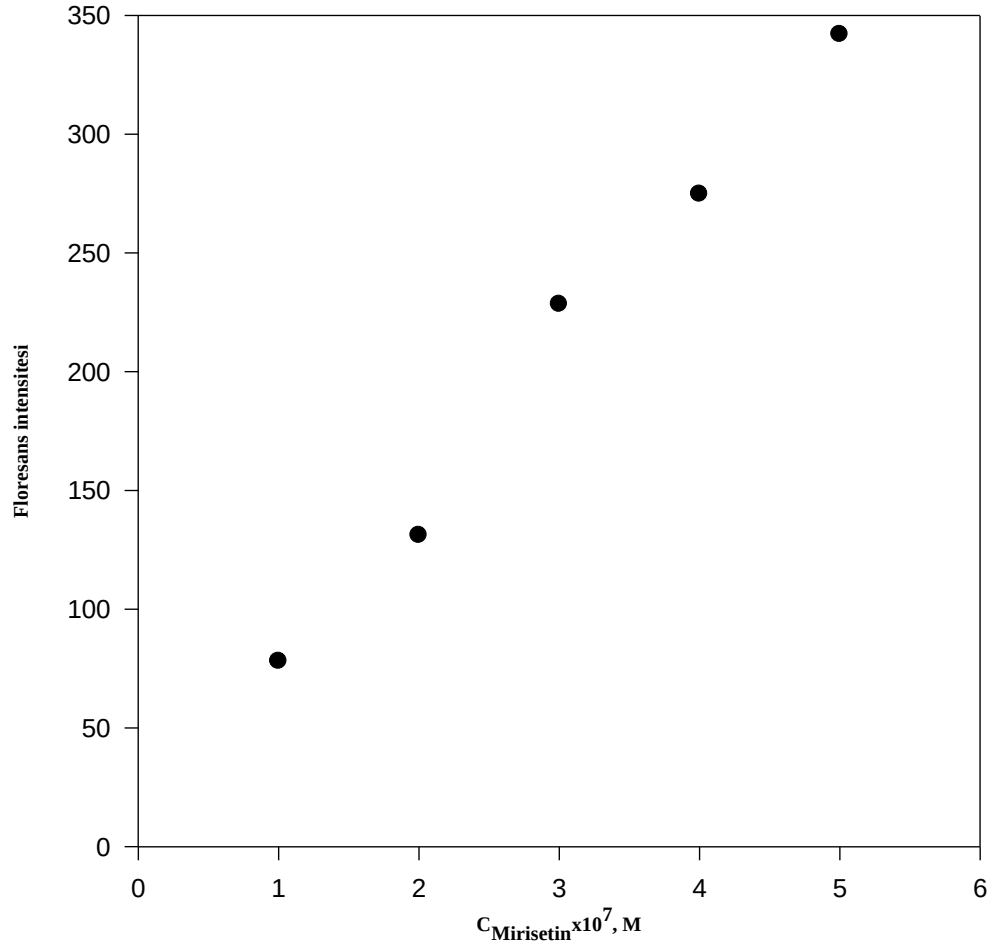


Şekil 4.33: Kuersetinin kalibrasyon eğrisi

4.2.2.2. Mirisetin

Tablo 4.13: Mirisetinin konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemi (x: molar konsantrasyon ve y: floresans intensitesi)

Konsantrasyon (M)	Floresans İntensitesi
1×10^{-7}	78.1
2×10^{-7}	131.1
3×10^{-7}	228.4
4×10^{-7}	274.8
5×10^{-7}	342.1
Doğru Denklemi: $y = 6.72 \times 10^8 x + 9.31$ $r=0.994$	

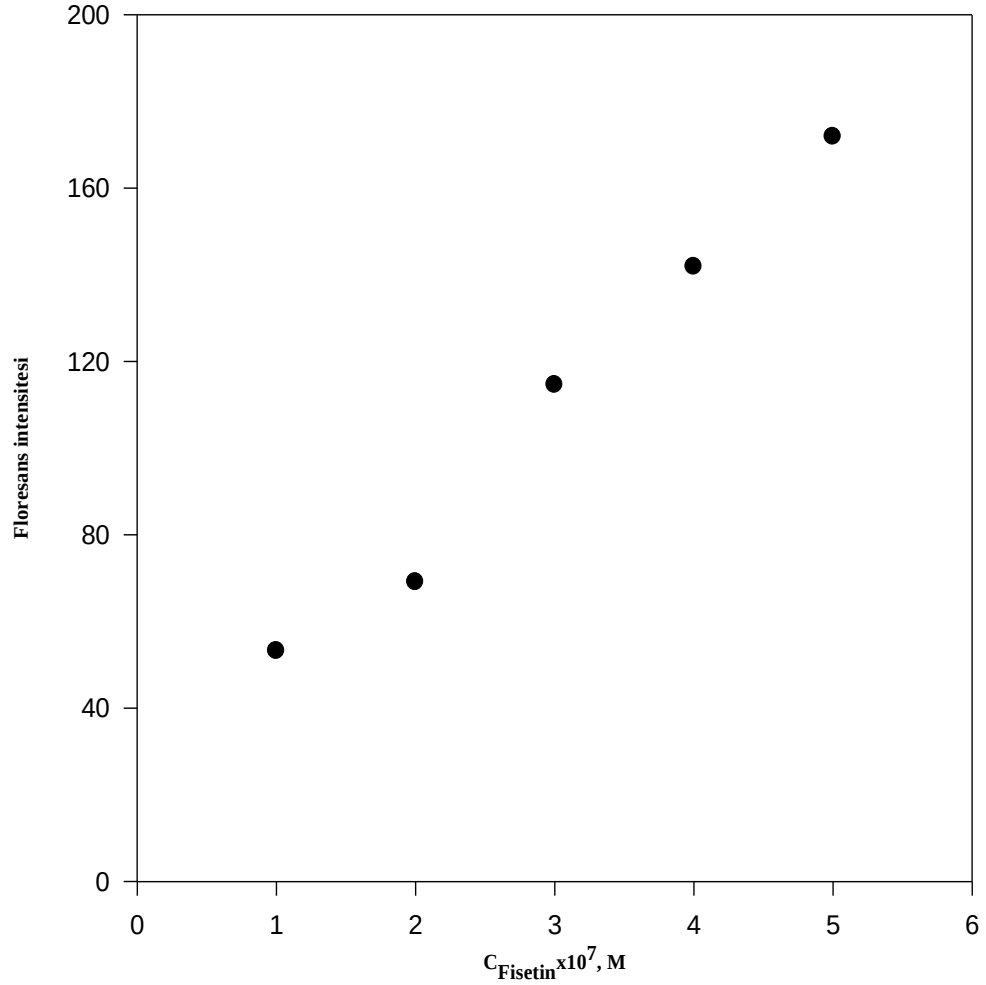


Şekil 4.34: Mirisetinin kalibrasyon eğrisi

4.2.2.3. Fisetin

Tablo 4.14: Fisetinin konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemi (x: molar konsantrasyon ve y: floresans intensitesi)

Konsantrasyon (M)	Floresans İntensitesi
1×10^{-7}	53.2
2×10^{-7}	69.1
3×10^{-7}	114.6
4×10^{-7}	141.9
5×10^{-7}	171.9
Doğru Denklemi: $y = 3.10 \times 10^8 x + 17.08$ $r = 0.992$	

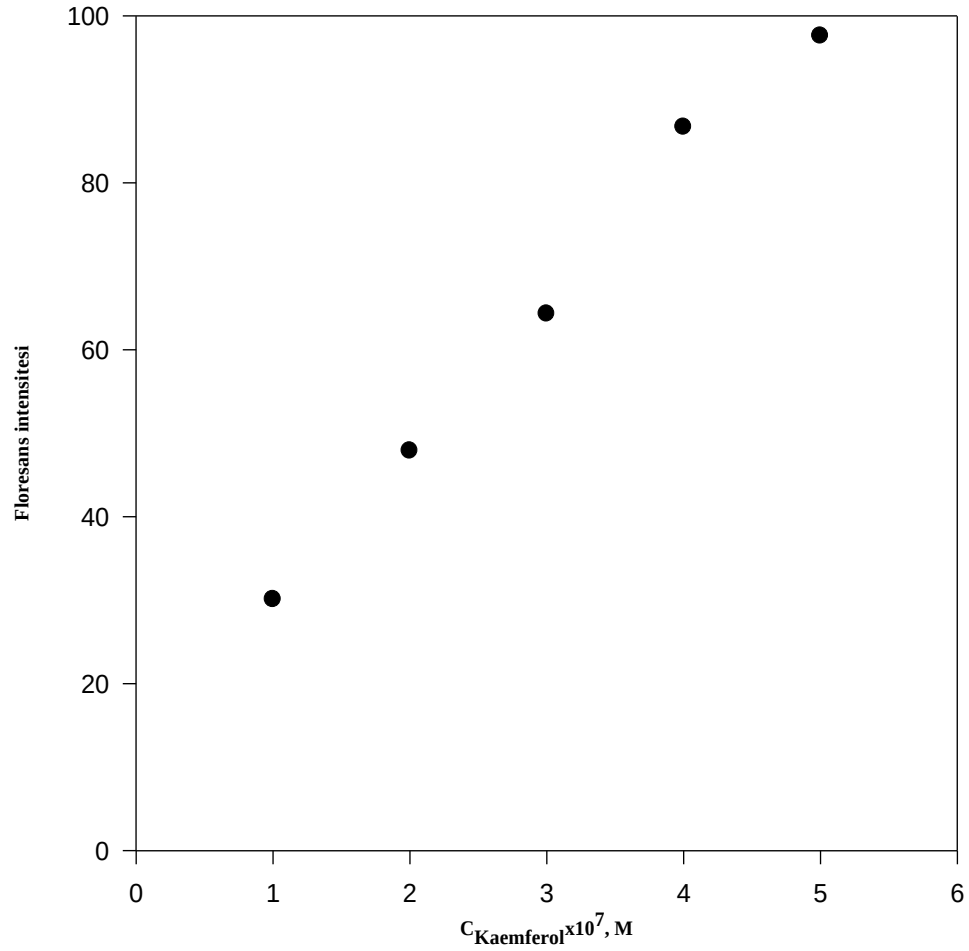


Şekil 4.35: Fisetinin kalibrasyon eğrisi

4.2.2.4. Kaemferol

Tablo 4.15: Kaemferolün konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemi (x: molar konsantrasyon ve y: floresans intensitesi)

Konsantrasyon (M)	Floresans İntensitesi
1×10^{-7}	30.1
2×10^{-7}	47.9
3×10^{-7}	64.3
4×10^{-7}	86.7
5×10^{-7}	97.6
Doğru Denklemi: $y = 1.74 \times 10^8 x + 13.18$ $r = 0.996$	

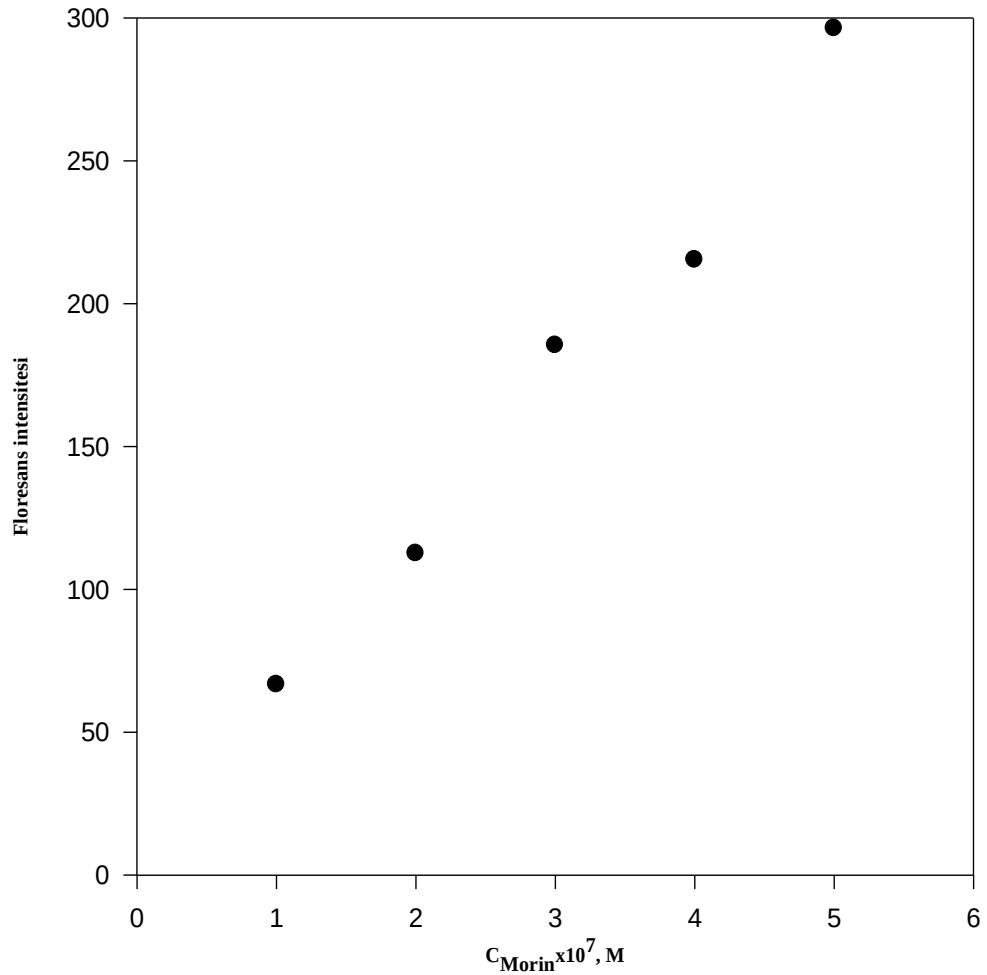


Şekil 4.36: Kaemferolün kalibrasyon eğrisi

4.2.2.5. Morin

Tablo 4.16: Morinin konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemi (x: molar konsantrasyon ve y: floresans intensitesi)

Konsantrasyon (M)	Floresans İntensitesi
1×10^{-7}	66.7
2×10^{-7}	112.6
3×10^{-7}	185.5
4×10^{-7}	215.4
5×10^{-7}	296.4
Doğru Denklemi: $y = 5.42 \times 10^8 x + 10.66$ $r = 0.993$	

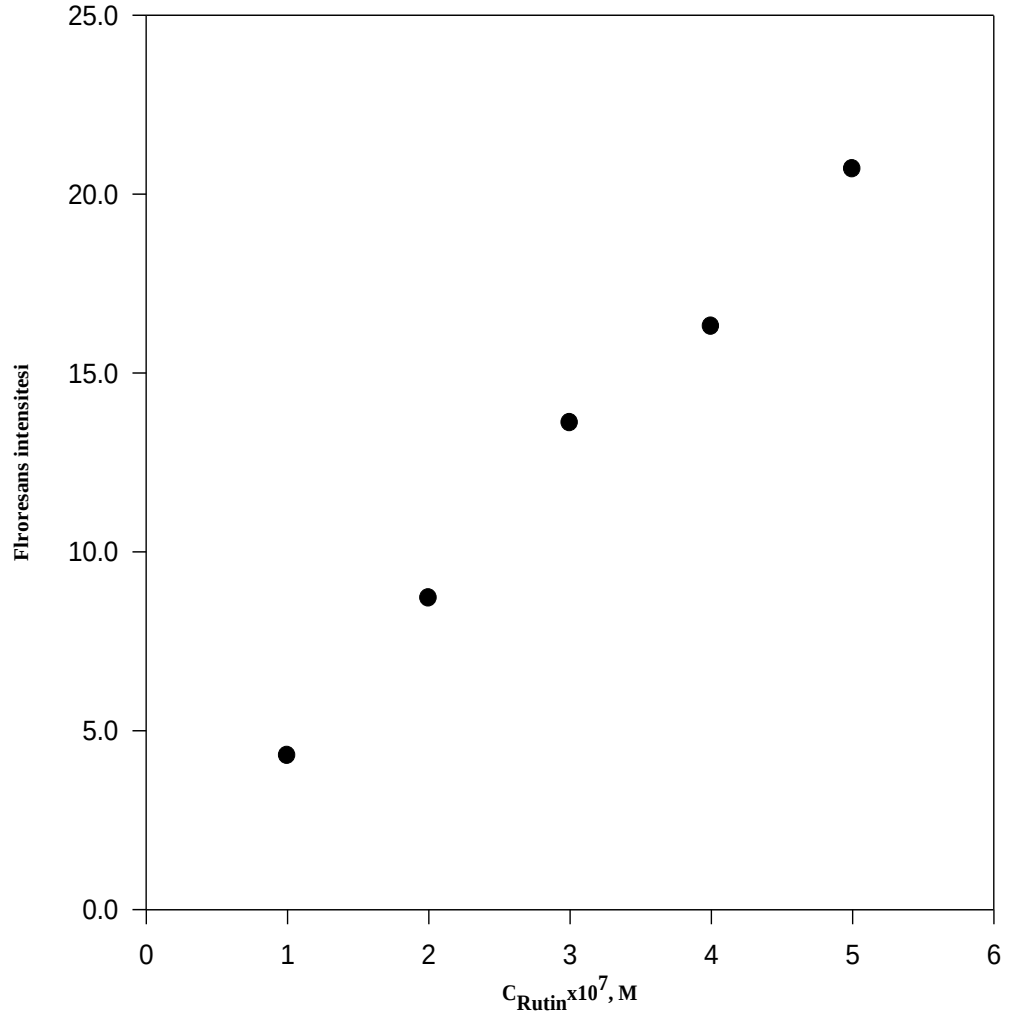


Şekil 4.37: Morinin kalibrasyon eğrisi

4.2.2.6. Rutin

Tablo 4.17: Rutinin konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemi (x: molar konsantrasyon ve y: floresans intensitesi)

Konsantrasyon (M)	Floresans İntensitesi
1×10^{-7}	4.3
2×10^{-7}	8.7
3×10^{-7}	13.6
4×10^{-7}	16.3
5×10^{-7}	20.7
Doğru Denklemi: $y = 4.04 \times 10^7 x + 0.15$ $r = 0.996$	

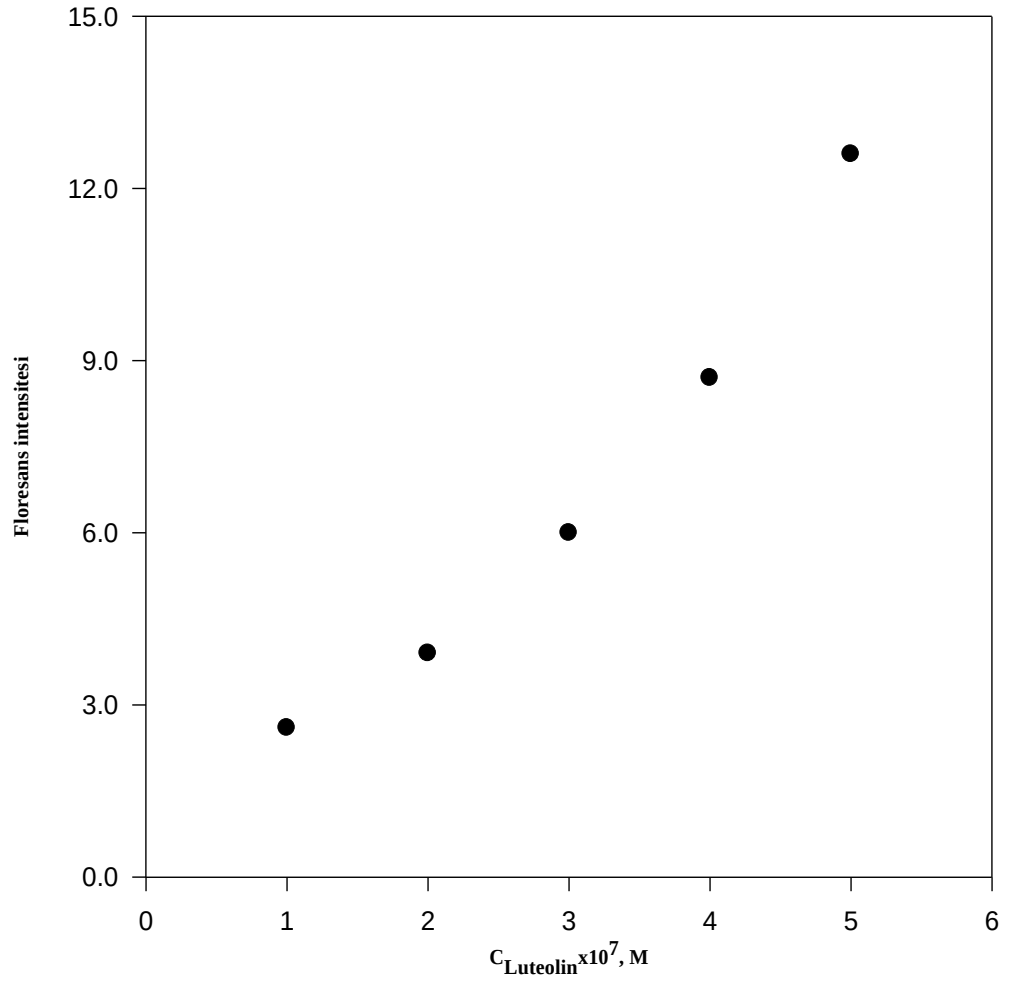


Şekil 4.38: Rutinin kalibrasyon eğrisi

4.2.2.7. Luteolin

Tablo 4.18: Luteolinin konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemi (x: molar konsantrasyon ve y: floresans intensitesi)

Konsantrasyon (M)	Floresans İntensitesi
1×10^{-7}	2.6
2×10^{-7}	3.9
3×10^{-7}	6.0
4×10^{-7}	8.7
5×10^{-7}	12.6
Doğru Denklemi: $y = 2.48 \times 10^7 x - 0.68$ $r = 0.981$	

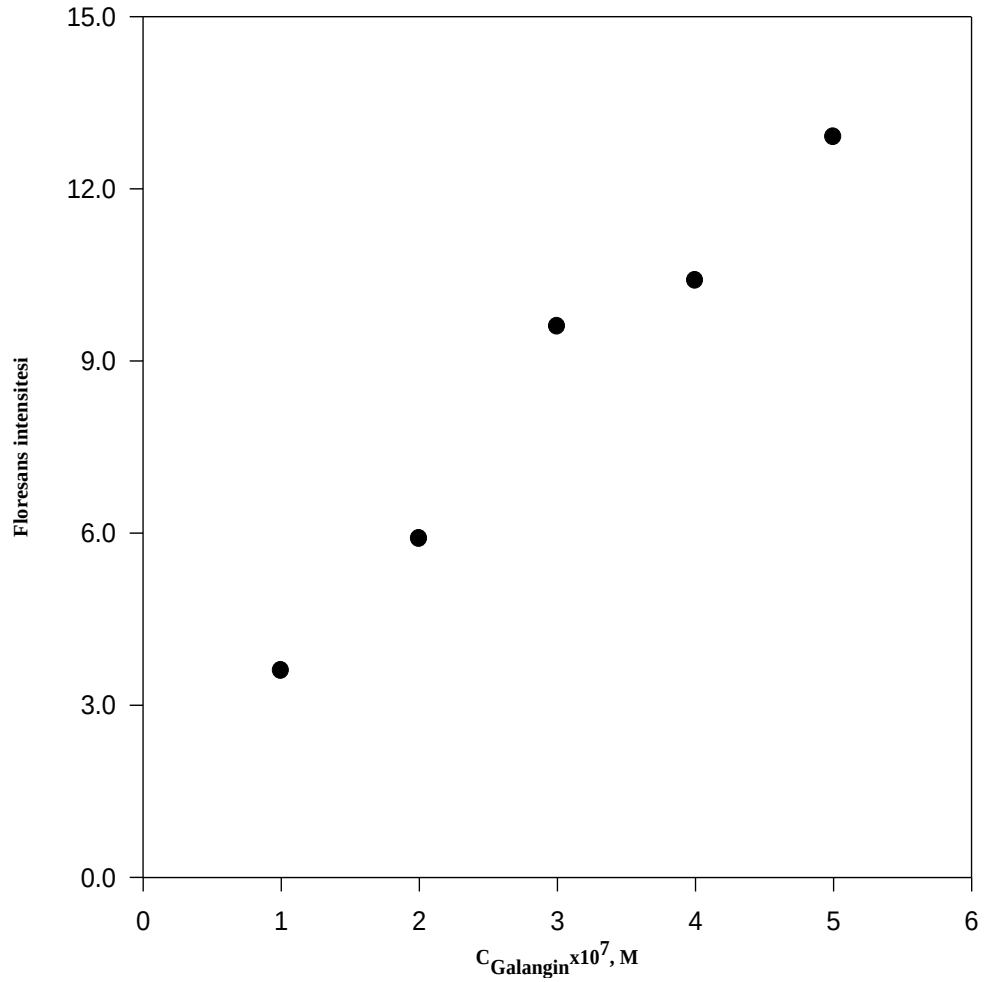


Şekil 4.39: Luteolinin kalibrasyon eğrisi

4.2.2.8. Galangin

Tablo 4.19: Galanginin konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemi (x: molar konsantrasyon ve y: floresans intensitesi)

Konsantrasyon (M)	Floresans İntensitesi
1×10^{-7}	3.6
2×10^{-7}	5.9
3×10^{-7}	9.6
4×10^{-7}	10.4
5×10^{-7}	12.9
Doğru Denklemi: $y = 2.31 \times 10^7 x + 1.55$ $r = 0.985$	

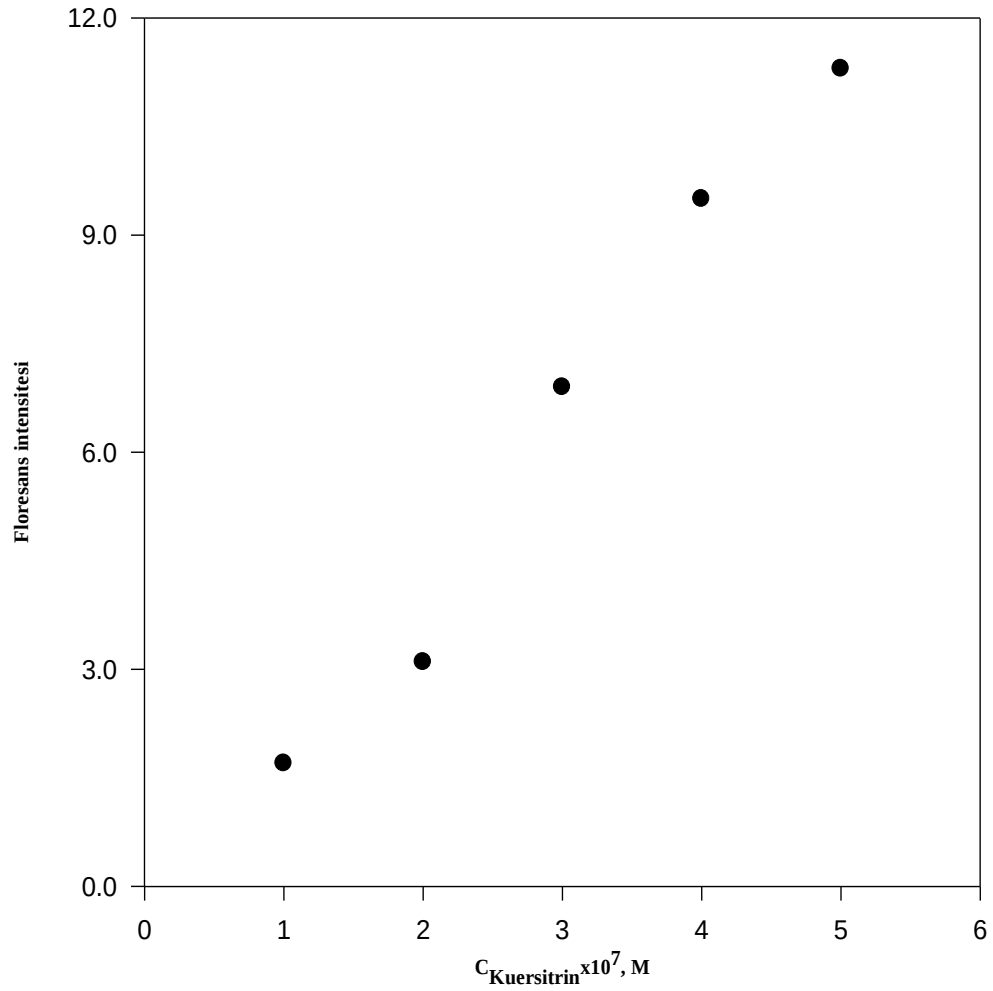


Şekil 4.40: Galanginin kalibrasyon eğrisi

4.2.2.9. Kuersitrin

Tablo 4.20: Kuersitrinin konsantrasyon-floresans intensitesi değerleri ve doğru denklemi (x: molar konsantrasyon ve y: floresans intensitesi)

Konsantrasyon (M)	Floresans İntensitesi
1×10^{-7}	1.7
2×10^{-7}	3.1
3×10^{-7}	6.9
4×10^{-7}	9.5
5×10^{-7}	11.3
Doğru Denklemi: $y = 2.56 \times 10^7 x - 1.18$ $r = 0.990$	



Şekil 4.41: Kuersitrinin kalibrasyon eğrisi

4.2.3. Fenolik Bileşiklerin Aseton-M- β -CD Ortamında $AlCl_3$ /Potasyum Asetat Spektroflorometrik Yöntemi ile Elde Edilen Doğru Denklemleri, Molar Floresans Katsayıları, Eksitasyon ve Emisyon Dalgaboyları

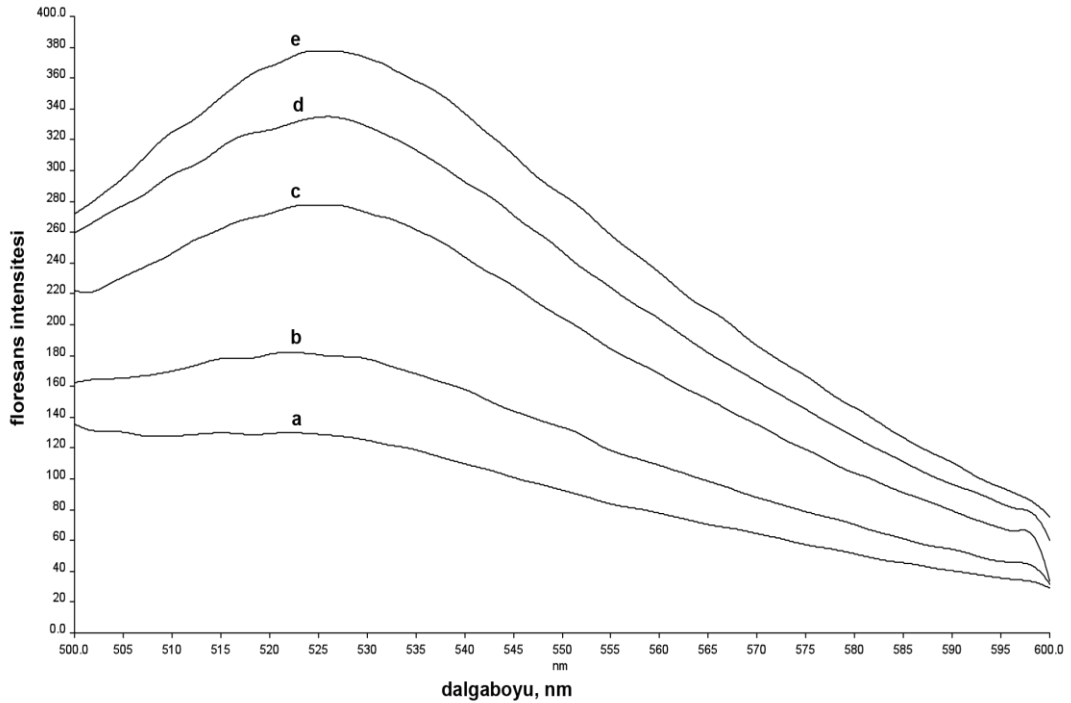
Fenolik bileşiklerin molar floresans katsayıları (ϵ'), $AlCl_3$ /potasyum asetat spektroflorometrik yönteminin aseton-M- β -CD ortamına uyarlanması ile molar konsantrasyon-floresans intensitesi arasındaki kalibrasyon eğrilerinin eğimleri hesaplanarak elde edildi. Her maddenin ayrı ayrı eksitasyon ve emisyon dalgaboylarının belirlenmesi sonucu, etanolle uygulanan yönteme göre dalgaboylarının değişmediği görüldü.

Tablo 4.21: Bazı fenolik bileşiklerin spektroflorometrik- $AlCl_3$ yönteminin aseton-M- β -CD ortamında uygulanması ile elde edilen doğru denklemleri, molar floresans katsayıları, eksitasyon ve emisyon dalgaboyları

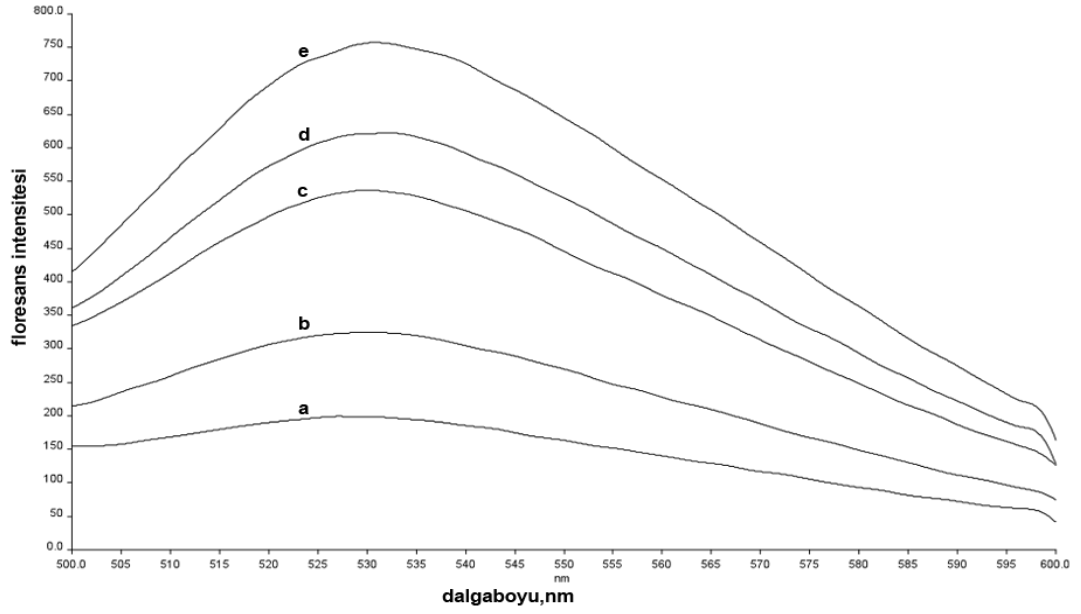
Fenolik Bileşikler	Doğru denklemi ve korelasyon katsayıları	ϵ' (Lmol ⁻¹ cm ⁻¹)	Eksitasyon ve Emisyon dalgaboyları (nm)
Kuersetin	y= 5.61x10 ⁸ C + 6.99 r= 0.996	5.61x10 ⁸	Ex. 470 Em. 525
Mirisetin	y= 6.72x10 ⁸ C + 9.31 r= 0.994	6.72x10 ⁸	Ex. 471 Em. 529
Fisetin	y= 3.10x10 ⁸ C + 17.08 r= 0.992	3.10x10 ⁸	Ex. 473 Em. 526
Kaemferol	y= 1.74x10 ⁸ C + 13.18 r= 0.996	1.74x10 ⁸	Ex. 472 Em. 515
Morin	y= 5.42x10 ⁸ C + 10.66 r= 0.993	5.42x10 ⁸	Ex. 470 Em. 515
Rutin	y= 4.04x10 ⁷ C + 0.15 r= 0.996	4.04x10 ⁷	Ex. 473 Em. 525
Luteolin	y= 2.48x10 ⁷ C - 0.68 r= 0.981	2.48x10 ⁷	Ex. 471 Em. 425
Galangin	y= 2.31x10 ⁷ C + 1.55 r= 0.985	2.31x10 ⁷	Ex. 470 Em. 515
Kuersitrin	y= 2.56x10 ⁷ C - 1.18 r= 0.990	2.56x10 ⁷	Ex. 467 Em. 530

4.2.4. Fenolik Bileşiklerin Aseton-M- β -CD Ortamında $AlCl_3$ /Potasyum Asetat Spektroflorometrik Yöntemi ile Elde Edilen Emisyon Spektrumları

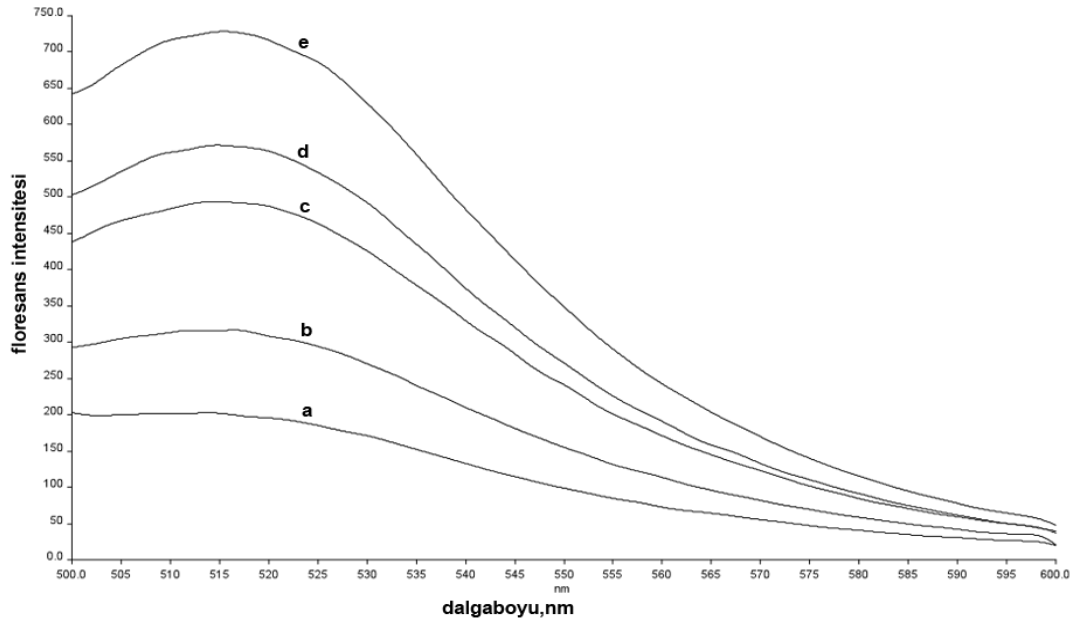
Fenolik bileşiklerin aseton-M- β -CD ortamda, floresans spektroskopisi cihazının prescan (öntarama; eksitasyon ve emisyon spektrumlarının arka arkaya alınması) özelliğinden yararlanarak her bileşiğe ait eksitasyon (uyarılma) dalga boyları öncelikli olarak belirlendi. Bileşiklerin kendine özgü bu eksitasyon dalga boyları sabit tutulup, çeşitli konsantrasyonlarda belirli dalga boyları arasında bileşiklerin emisyon spektrumları elde edildi. Bunlardan bazılarının emisyon spektrumları gösterildi.



Şekil 4.42: Aseton-M- β -CD ortamında spektroflorometrik- $AlCl_3$ yöntemine göre Fisetinin emisyon spektrumu (Uyarılma dalga boyu 473 nm). Fisetin çözeltisinin konsantrasyonu 10 μ M olmak üzere sırasıyla **(a)** 50 μ L **(b)** 100 μ L **(c)** 150 μ L **(d)** 200 μ L **(e)** 250 μ L ilave edilerek spektrum elde edildi.



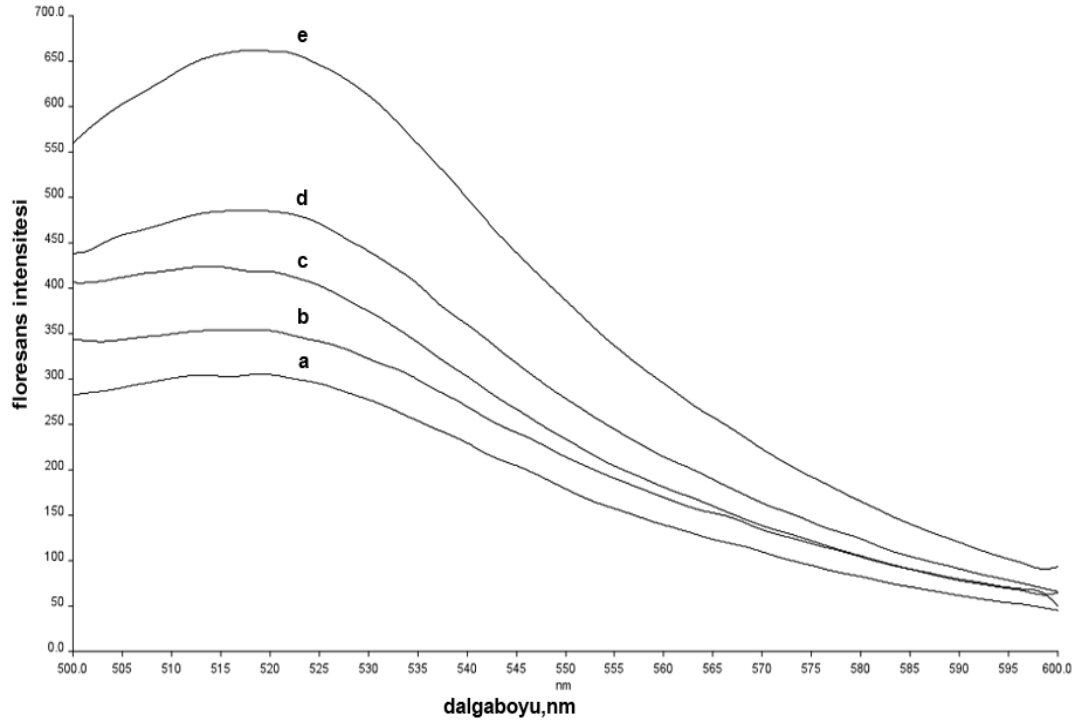
Şekil 4.43: Aseton-M-β-CD ortamında spektrofotometrik-AlCl₃ yöntemine göre Mirisetinin emisyon spektrumu (Uyarılma dalga boyu 471 nm). Mirisetin çözeltisinin konsantrasyonu 10 μM olmak üzere sırasıyla (a) 50 μL (b) 100 μL (c) 150 μL (d) 200 μL (e) 250 μL ilave edilerek spektrum elde edildi.



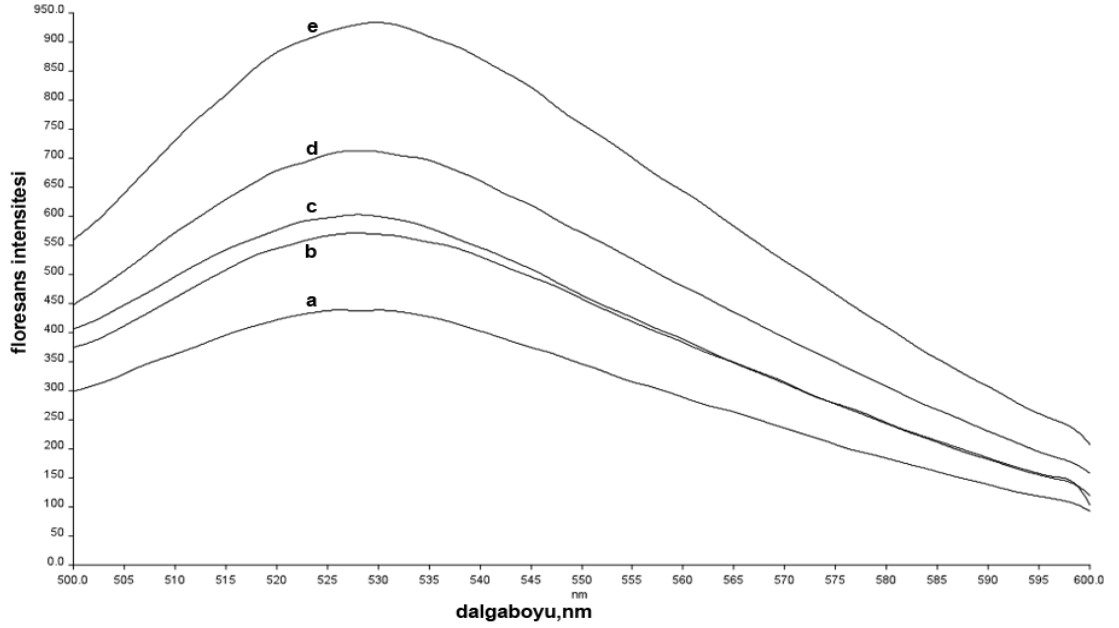
Şekil 4.44: Aseton-M-β-CD ortamında spektrofotometrik-AlCl₃ yöntemine göre Morinin emisyon spektrumu (Uyarılma dalga boyu 470 nm). Morin çözeltisinin konsantrasyonu 10 μM olmak üzere sırasıyla (a) 50 μL (b) 100 μL (c) 150 μL (d) 200 μL (e) 250 μL ilave edilerek spektrum elde edildi.

4.2.5. İkili Sentetik Karışımların Aseton-M- β -CD Ortamında $AlCl_3$ /Potasyum Asetat Spektroflorometrik Yöntemi ile Elde Edilen Emisyon Spektrumları

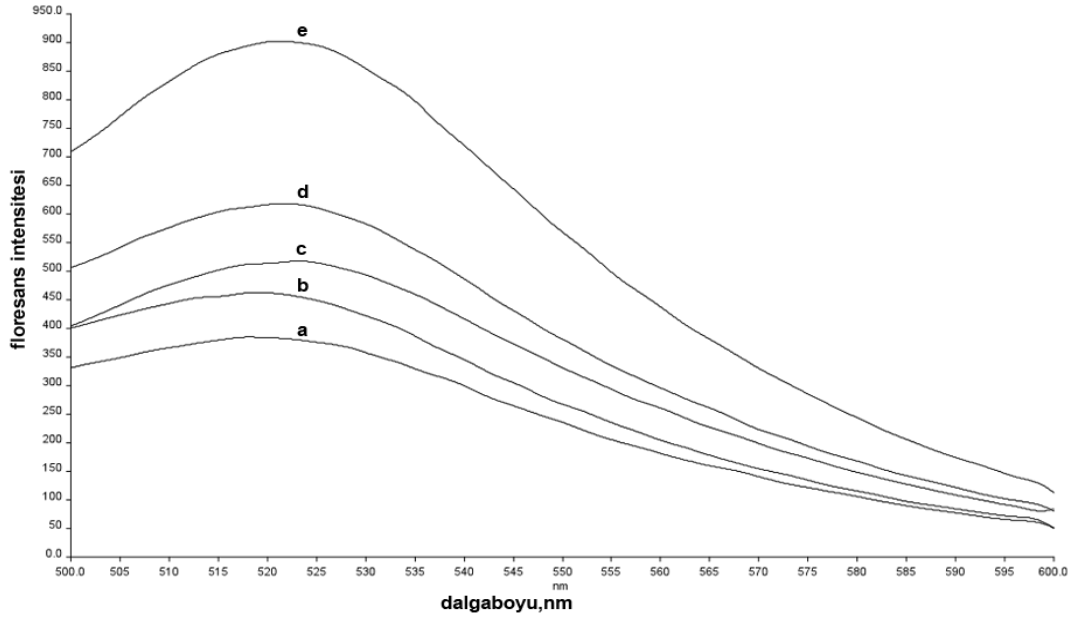
$AlCl_3$ /potasyum asetat spektroflorometrik yöntemine göre sonuçlar kuersetin referans alınarak incelendiğinden karışımlardan tespit edilen eksitasyon dalgaboylarında yaklaşık olarak bu dalgaboyunda maksimum floresans intensitesi gösterdiği eksitasyon dalgaboyunda (470 nm) sabit tutulup, belirli konsantrasyonlarda hazırlanan fenolik bileşikler için farklı kombinasyonlarda ikili karışımlar oluşturulup emisyon spektrumları elde edildi.



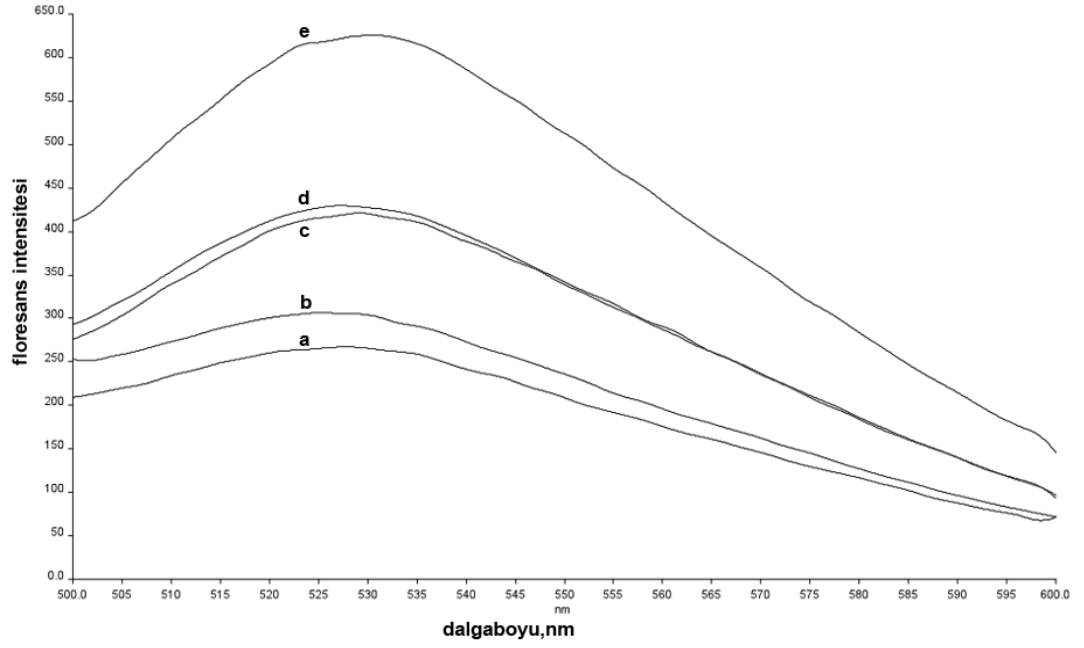
Şekil 4.45: Aseton – M- β -CD ortamında Fisetin-Morin karışım çözeltisinin emisyon spektrumu (Uyarılma dalgaboyu 470 nm). Her iki maddenin konsantrasyonu da 10 μ M olmak üzere **(a)** 50 μ L FIS + 50 μ L MOR **(b)** 100 μ L FIS + 50 μ L MOR **(c)** 50 μ L FIS + 100 μ L MOR **(d)** 100 μ L FIS + 100 μ L MOR **(e)** 150 μ L FIS + 150 μ L MOR ilave edilerek spektrum elde edildi.



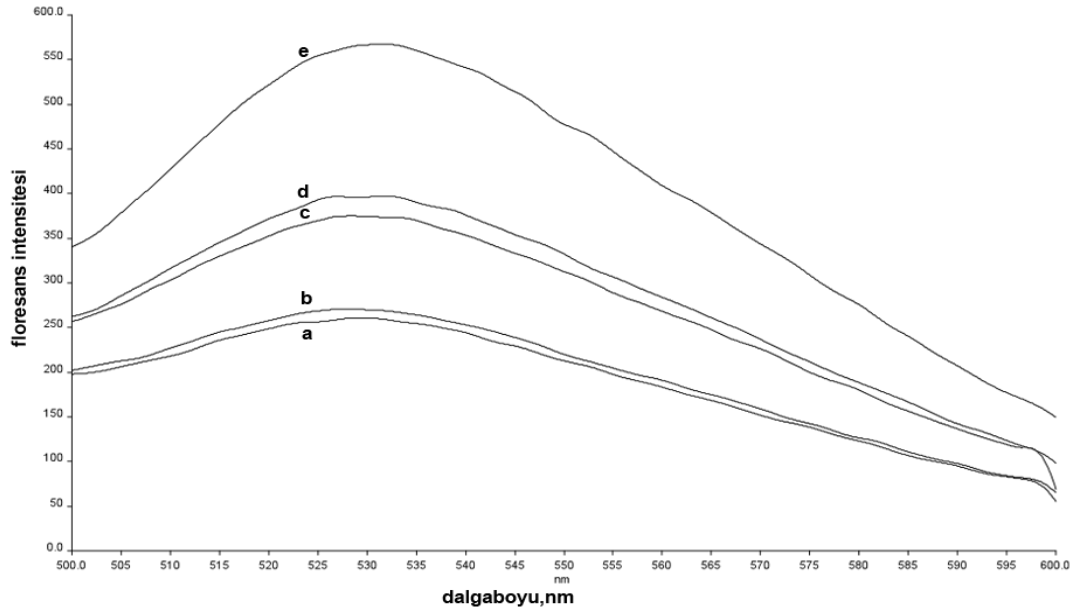
Şekil 4.46: Aseton-M- β -CD ortamında Kuersetin-Mirisetin karışım çözeltisinin emisyon spektrumu (Uyarılma dalga boyu 470 nm). Her iki maddenin konsantrasyonu da 10 μ M olmak üzere **(a)** 50 μ L QR + 50 μ L MRC **(b)** 100 μ L QR + 50 μ L MRC **(c)** 50 μ L QR + 100 μ L MRC **(d)** 100 μ L QR + 100 μ L MRC **(e)** 150 μ L QR + 150 μ L MRC ilave edilerek spektrum elde edildi.



Şekil 4.47: Aseton-M- β -CD ortamında Kuersetin-Morin karışım çözeltisinin emisyon spektrumu (Uyarılma dalga boyu 470 nm). Her iki maddenin konsantrasyonu da 10 μ M olmak üzere **(a)** 50 μ L QR + 50 μ L MOR **(b)** 50 μ L QR + 100 μ L MOR **(c)** 100 μ L QR + 50 μ L MOR **(d)** 100 μ L QR + 100 μ L MOR **(e)** 150 μ L QR + 150 μ L MOR ilave edilerek spektrum elde edildi.



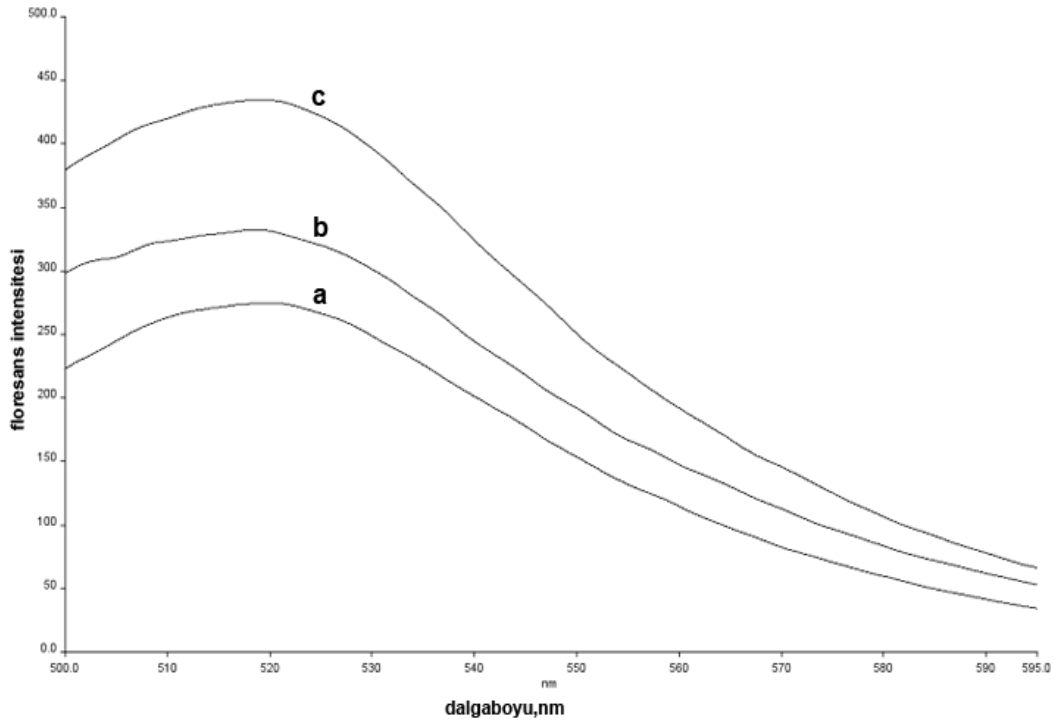
Şekil 4.48: Aseton-M- β -CD ortamında Mirisetin-Kaemferol karışım çözeltisinin emisyon spektrumu (Uyarılma dalgaboyu 470 nm). Her iki maddenin konsantrasyonu da 10 μ M olmak üzere **(a)** 50 μ L MRC + 50 μ L KAM **(b)** 50 μ L MRC + 100 μ L KAM **(c)** 100 μ L MRC + 50 μ L KAM **(d)** 100 μ L MRC + 100 μ L KAM **(e)** 150 μ L MRC + 150 μ L KAM ilave edilerek spektrum elde edildi.



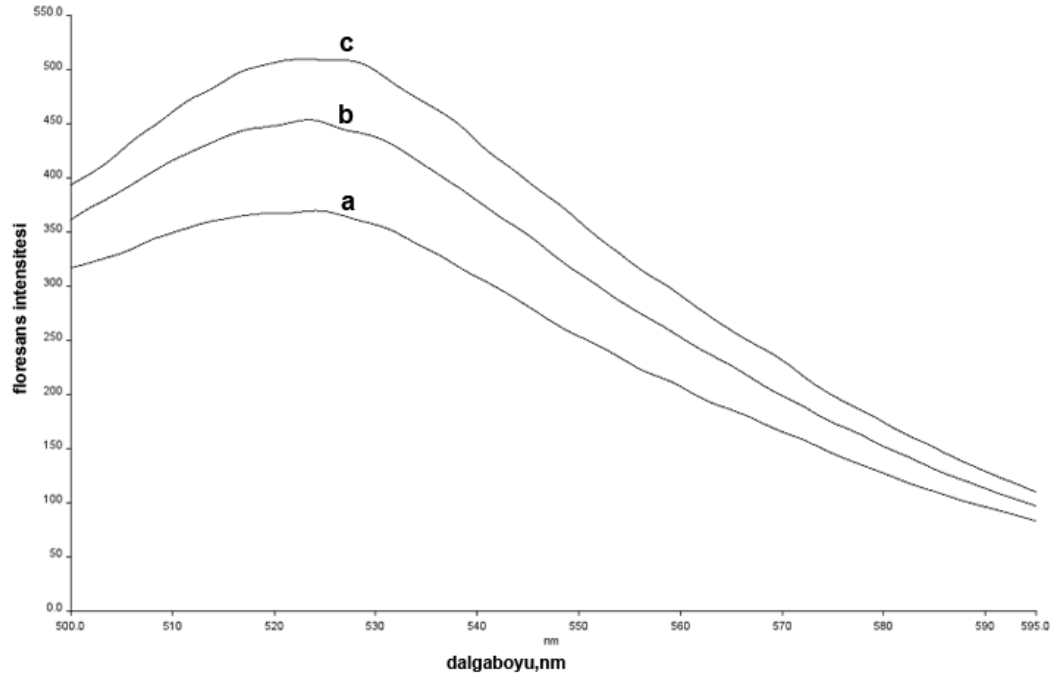
Şekil 4.49: Aseton-M- β -CD ortamında Mirisetin-Rutin karışım çözeltisinin emisyon spektrumu (Uyarılma dalgaboyu 470 nm). Her iki maddenin konsantrasyonu da 10 μ M olmak üzere **(a)** 50 μ L MRC + 50 μ L RUT **(b)** 50 μ L MRC + 100 μ L RUT **(c)** 100 μ L MRC + 50 μ L RUT **(d)** 100 μ L MRC + 100 μ L RUT **(e)** 150 μ L MRC + 150 μ L RUT ilave edilerek spektrum elde edildi.

4.2.6. Üçlü Sentetik Karışımların Oluşturulması ve Aseton-M- β -CD Ortamında $AlCl_3$ /Potasyum Asetat Spektroflorometrik Yöntemi ile Emisyon Spektrumlarının Elde Edilmesi

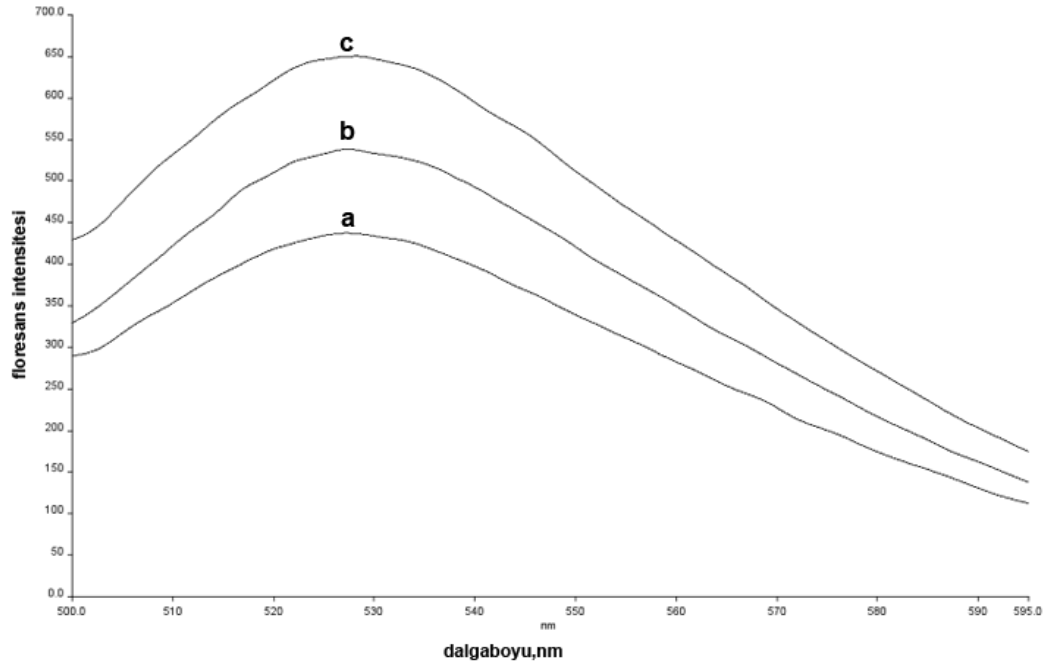
$AlCl_3$ /potasyum asetat spektroflorometrik yönteminin aseton-M- β -CD ortamında olan uygulanmasında da sonuçlar kuersetin referans alınarak incelendiğinden ve karışımlardan tespit edilen eksitasyon dalgaboylarının da yaklaşık olarak bu dalgaboyunda maksimum floresans intensitesi gösterdiği eksitasyon dalgaboyunda (470 nm) sabit tutulup, belirli konsantrasyonlarda hazırlanan flavonol bileşikler için farklı kombinasyonlarda üçlü karışımlar oluşturulup emisyon spektrumları elde edildi.



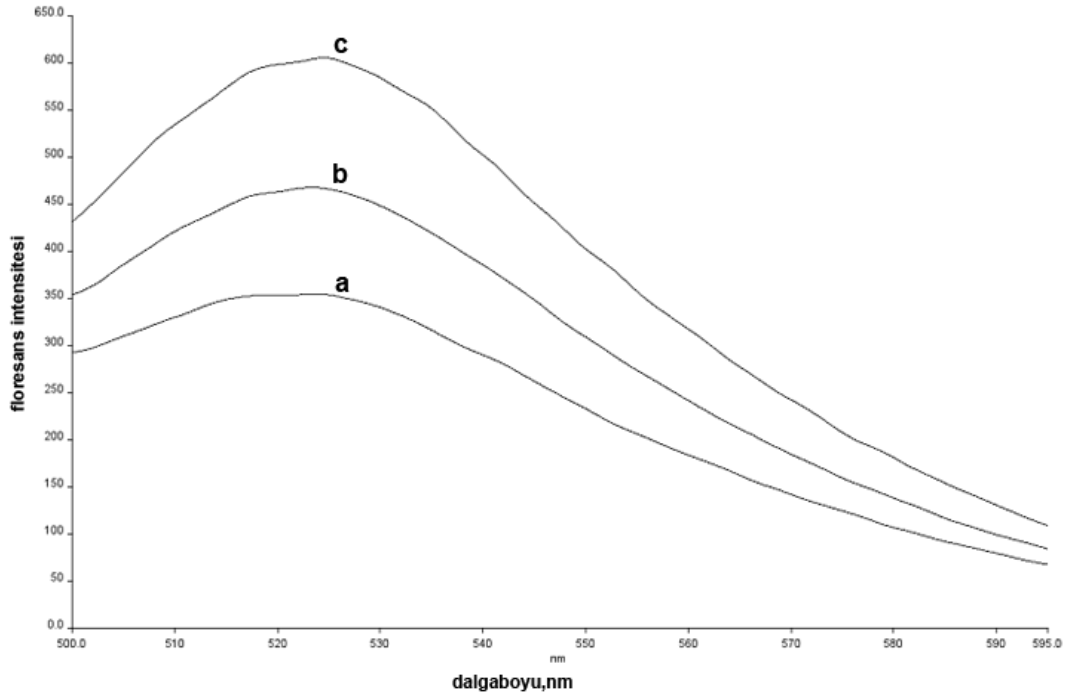
Şekil 4.50: Aseton-M- β -CD ortamında Morin-Fisetin-Kaemferol karışım çözeltisinin emisyon spektrumu (Uyarılma dalgaboyu 470 nm). Her üç maddenin konsantrasyonu da 10 μ M olmak üzere **(a)** 40 μ L MOR + 40 μ L FIS + 40 μ L KAM **(b)** 60 μ L MOR + 60 μ L FIS + 60 μ L KAM **(c)** 80 μ L MOR + 80 μ L FIS + 80 μ L KAM ilave edilerek spektrum elde edildi.



Şekil 4.51: Aseton-M-β-CD ortamında Morin-Mirisetin-Kaemferol karışım çözeltisinin emisyon spektrumu (Uyarılma dalgalıboyu 470 nm). Her üç maddenin konsantrasyonu da 10 μ M olmak üzere **(a)** 40 μ L MOR + 40 μ L MRC + 40 μ L KAM **(b)** 60 μ L MOR + 60 μ L MRC + 60 μ L KAM **(c)** 80 μ L MOR + 80 μ L MRC + 80 μ L KAM ilave edilerek spektrum elde edildi.



Şekil 4.52: Aseton-M-β-CD ortamında Kuersetin-Mirisetin-Fisetin karışım çözeltisinin emisyon spektrumu (Uyarılma dalgalıboyu 470 nm). Her üç maddenin konsantrasyonu da 10 μ M olmak üzere **(a)** 40 μ L QR + 40 μ L MRC + 40 μ L FIS **(b)** 60 μ L QR + 60 μ L MRC + 60 μ L FIS **(c)** 80 μ L QR + 80 μ L MRC + 80 μ L FIS ilave edilerek spektrum elde edildi.



Şekil 4.53: Aseton-M- β -CD ortamında Kuersetin-Morin-Fisetin karışım çözeltisinin emisyon spektrumu (Uyarılma dalga boyu 470 nm). Her üç maddenin konsantrasyonu da 10 μ M olmak üzere **(a)** 40 μ L QR + 40 μ L MOR + 40 μ L FIS **(b)** 60 μ L QR + 60 μ L MOR + 60 μ L FIS **(c)** 80 μ L QR + 80 μ L MOR + 80 μ L FIS ilave edilerek spektrum elde edildi.

4.2.7. Üçlü Sentetik Karışımların Elde Edilmesi ve Aseton-M- β -CD Ortamında $AlCl_3$ /Potasyum Asetat Spektroflorometrik Yöntemi Uygulanması ile Beklenen ve Ölçülen Floresans İntensitesi Değerleri

Flavonol grubu bileşikler için farklı kombinasyonlarda üçlü karışımlar oluşturulup aseton-M- β -CD ortamında spektroflorometrik- $AlCl_3$ yöntemine göre beklenen ve ölçülen floresans intensite değerleri birbiriyle karşılaştırıldı. $AlCl_3$ /potasyum asetat spektroflorometrik yöntemine göre elde edilen bu üçlü sentetik karışımların floresans intensiteleri, kuersetin referans alınarak incelendiğinden ve karışımlardan tespit edilen eksitasyon ve emisyon dalgaboylarının da yaklaşık olarak bu dalgaboyunda maksimum floresans intensitesi gösterdiği 470 nm eksitasyon ve 525 nm emisyon dalgaboyu kullanılarak ölçüldü. Beklenen floresans değerleri, her bir sentetik madde için yöntemden bulunan denklemler (Tablo 4.21) yardımıyla karışımdaki son konsantrasyonlarından floresans intensite değerlerinin hesaplanması ve son olarak da bunların birbirleriyle toplanması sonucu elde edildi.

Konsantrasyonları 10 μ M olan çeşitli flavonol grubu bileşikler için farklı kombinasyonlarda üçlü karışımlar oluşturulup beklenen ve deneysel olarak bulunan floresans intensite değerleri karşılaştırıldı (Tablo 4.22).

Tablo 4.22: Sentetik karışım çözeltilerinin aseton-M- β -CD ortamında spektroflorometrik- $AlCl_3$ yöntemine göre beklenen ve ölçülen floresans intensite değerlerinin karşılaştırılması

Karışımın İçeriği	Beklenen floresans intensite	Deneysel olarak bulunan floresans intensite
40 μ L 10 μ M QR	168.0	183.6
40 μ L 10 μ M MRC		
40 μ L 10 μ M MOR		
60 μ L 10 μ M QR	238.9	262.4
60 μ L 10 μ M MRC		
60 μ L 10 μ M MOR		
80 μ L 10 μ M QR	310.0	309.4
80 μ L 10 μ M MRC		
80 μ L 10 μ M MOR		

Karışımın İçeriği	Beklenen floresans intensite	Deneyssel olarak bulunan floresans intensite
40 µL 10 µM MRC	143.2	148.8
40 µL 10 µM MOR		
40 µL 10 µM KAM		
60 µL 10 µM MRC	202.6	187.5
60 µL 10 µM MOR		
60 µL 10 µM KAM		
80 µL 10 µM MRC	258.1	224.8
80 µL 10 µM MOR		
80 µL 10 µM KAM		
40 µL 10 µM QR	156.9	182.4
40 µL 10 µM MRC		
40 µL 10 µM FIS		
60 µL 10 µM QR	218.5	229.0
60 µL 10 µM MRC		
60 µL 10 µM FIS		
80 µL 10 µM QR	280.3	275.9
80 µL 10 µM MRC		
80 µL 10 µM FIS		
40 µL 10 µM QR	142.1	173.4
40 µL 10 µM MRC		
40 µL 10 µM KAM		
60 µL 10 µM QR	202.2	217.0
60 µL 10 µM MRC		
60 µL 10 µM KAM		
80 µL 10 µM QR	258.5	251.8
80 µL 10 µM MRC		
80 µL 10 µM KAM		

Karışımın İçeriği	Beklenen floresans intensite	Deneysel olarak bulunan floresans intensite
40 µL 10 µM MRC	158.0	164.9
40 µL 10 µM MOR		
40 µL 10 µM FIS		
60 µL 10 µM MRC	218.9	221.1
60 µL 10 µM MOR		
60 µL 10 µM FIS		
80 µL 10 µM MRC	279.9	292.5
80 µL 10 µM MOR		
80 µL 10 µM FIS		
40 µL 10 µM QR	146.8	143.8
40 µL 10 µM MOR		
40 µL 10 µM FIS		
60 µL 10 µM QR	203.3	191.5
60 µL 10 µM MOR		
60 µL 10 µM FIS		
80 µL 10 µM QR	259.9	251.8
80 µL 10 µM MOR		
80 µL 10 µM FIS		
40 µL 10 µM QR	132.0	152.9
40 µL 10 µM MOR		
40 µL 10 µM KAM		
60 µL 10 µM QR	187.0	190.9
60 µL 10 µM MOR		
60 µL 10 µM KAM		
80 µL 10 µM QR	238.1	253.9
80 µL 10 µM MOR		
80 µL 10 µM KAM		

Karışımın İçeriği	Beklenen floresans intensite	Deneysel olarak bulunan floresans intensite
40 µL 10 µM MRC		
40 µL 10 µM FIS	132.1	137.4
40 µL 10 µM KAM		
60 µL 10 µM MRC		
60 µL 10 µM FIS	182.2	176.6
60 µL 10 µM KAM		
80 µL 10 µM MRC		
80 µL 10 µM FIS	228.4	223.5
80 µL 10 µM KAM		
40 µL 10 µM MOR		
40 µL 10 µM FIS	122.0	101.6
40 µL 10 µM KAM		
60 µL 10 µM MOR		
60 µL 10 µM FIS	167.0	142.1
60 µL 10 µM KAM		
80 µL 10 µM MOR		
80 µL 10 µM FIS	208.0	186.8
80 µL 10 µM KAM		
40 µL 10 µM QR		
40 µL 10 µM FIS	120.9	132.3
40 µL 10 µM KAM		
60 µL 10 µM QR		
60 µL 10 µM FIS	166.6	166.2
60 µL 10 µM KAM		
80 µL 10 µM QR		
80 µL 10 µM FIS	208.4	210.3
80 µL 10 µM KAM		

4.3. BAZI FENOLİK BİLEŞİKLERE $AlCl_3$ /POTASYUM ASETAT SPEKTROFOTOMETRİK VE CUPRAC YÖNTEMLERİNİN UYGULANMASI

Literatürde daha önce yapılan ve bu tez çalışmasında analizi yapılan fenolik bileşiklerin $AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik ve CUPRAC yöntemlerine göre molar konsantrasyon-absorbans arasındaki kalibrasyon eğrilerinin eğimleri hesaplanarak bulunan molar absorplama katsayıları (ϵ) Tablo 4.23’de verildi [32]. Bu çalışmada kullanılan ve literatürde eksik olan kuersitrin ve galangin bileşiklerinin bu iki yönleme göre doğru denklemleri ve molar absorplama katsayıları ayrı ayrı belirlenerek, aynı tabloda (Tablo 4.23) gösterildi.

$AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin uygulaması şu şekilde yapıldı; x mL alınan örnek üzerine sırasıyla 1.5 mL EtOH, 0.1 mL %10’luk $AlCl_3$ çözeltisi, 0.1 mL 1 M KAc ve (3.3-x) mL su ekleme işlemiyle toplam hacim 5 mL olacak şekilde tamamlandı ve 30 dakika oda şartlarında inkübasyon sonrasında örnek içermeyen referansa karşı okuma yapıldı. Yöntem kuersetinin maksimum absorbans verdiği 427 nm dalgaboyunda uygulandı.

CUPRAC yöntemine göre; bir cam tüp içerisine sırasıyla bakır(II) çözeltisi, neokuproin çözeltisi ve amonyum asetat tamponundan 1’er mL eklendi. Üzerine x mL örnek ilave edilip çalkalandı ve son hacim 4.1 mL olacak şekilde (1.1-x) mL su eklendikten sonra iyice çalkalandı. Tüpler oda koşullarında ağzı kapalı olarak 30 dakika boyunca bekletildi. Bu süre sonunda örnek içermeyen referansa karşı 450 nm dalgaboyunda absorbans değerleri ölçüldü.

Tablo 4.23: Çeşitli flavonoidlerin AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi ve CUPRAC yöntemine göre doğru denklemleri ve molar absorplama katsayıları

Flavonoid	Doğru Denklemi (AlCl_3)	ε ($\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	Doğru Denklemi (CUPRAC)	ε ($\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
Kuersetin	$y=2.31 \times 10^4 x + 0.018$ $r = 0.999$	2.31×10^4	$y=8.24 \times 10^4 x + 0.029$ $r = 0.998$	8.24×10^4
Mirisetin	$y=1.96 \times 10^4 x + 0.035$ $r = 0.9989$	1.96×10^4	$y=4.88 \times 10^4 x + 0.0577$ $r = 0.995$	4.88×10^4
Fisetin	$y=2.14 \times 10^4 x + 0.024$ $r = 0.998$	2.14×10^4	$y=6.50 \times 10^4 x + 0.0043$ $r = 0.999$	6.50×10^4
Kaemferol	$y=1.18 \times 10^4 x - 0.0143$ $r = 0.999$	1.18×10^4	$y=2.32 \times 10^4 x + 0.0288$ $r = 0.997$	2.32×10^4
Morin	$y=1.59 \times 10^4 x - 0.008$ $r = 0.999$	1.59×10^1	$y=3.15 \times 10^4 x + 0.027$ $r = 0.999$	3.15×10^1
Rutin	$y=1.52 \times 10^4 x + 0.007$ $r = 0.999$	1.52×10^3	$y=4.27 \times 10^4 x + 0.0003$ $r = 1$	4.27×10^3
Luteolin	$y=1.01 \times 10^4 x + 0.142$ $r = 0.995$	1.01×10^4	$y=3.96 \times 10^4 x + 0.0322$ $r = 0.999$	3.96×10^4
Galangin	$y=1.02 \times 10^4 x - 0.006$ $r = 0.999$	1.02×10^4	$y=2.05 \times 10^4 x + 0.039$ $r = 0.997$	2.05×10^4
Kuersitrin	$y=1.19 \times 10^4 x + 0.017$ $r = 0.999$	1.19×10^4	$y=4.75 \times 10^4 x - 0.009$ $r = 0.999$	4.75×10^4

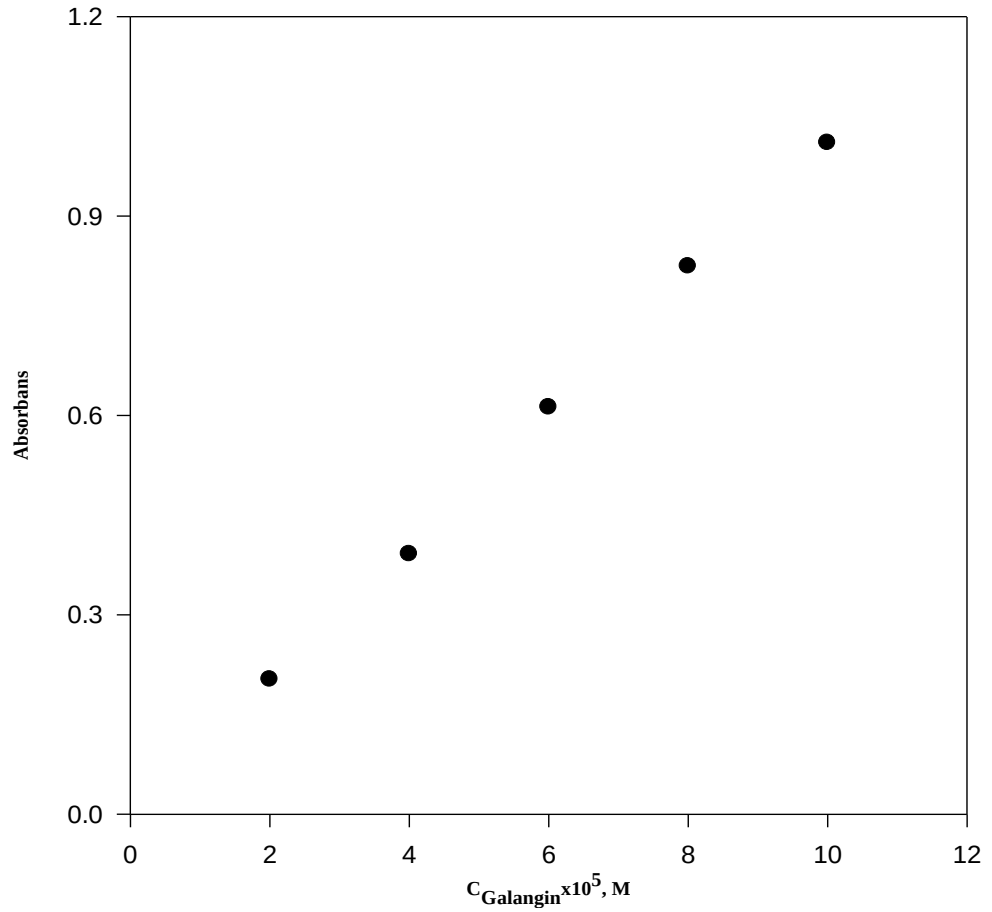
Tablo 4.23’de verilen Rutin değerleri, hidrolizli CUPRAC yöntemi uygulanması sonucu elde edilmiştir.

4.3.1. Galangin ve Kuersitrinin AlCl_3 /Potasyum Asetat Spektrofotometrik Yöntemi ile Elde Edilen Doğru Denklemleri ve Kalibrasyon Grafikleri

4.3.1.1. Galangin

Tablo 4.24: Galanginin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi (x: molar konsantrasyon ve y: absorbans)

Konsantrasyon (M)	Absorbans
2×10^{-5}	0.2029
4×10^{-5}	0.3916
6×10^{-5}	0.6125
8×10^{-5}	0.8246
1×10^{-4}	1.0106
Doğru Denklemi: $y = 10242 x - 0.006$ $r = 0.999$	

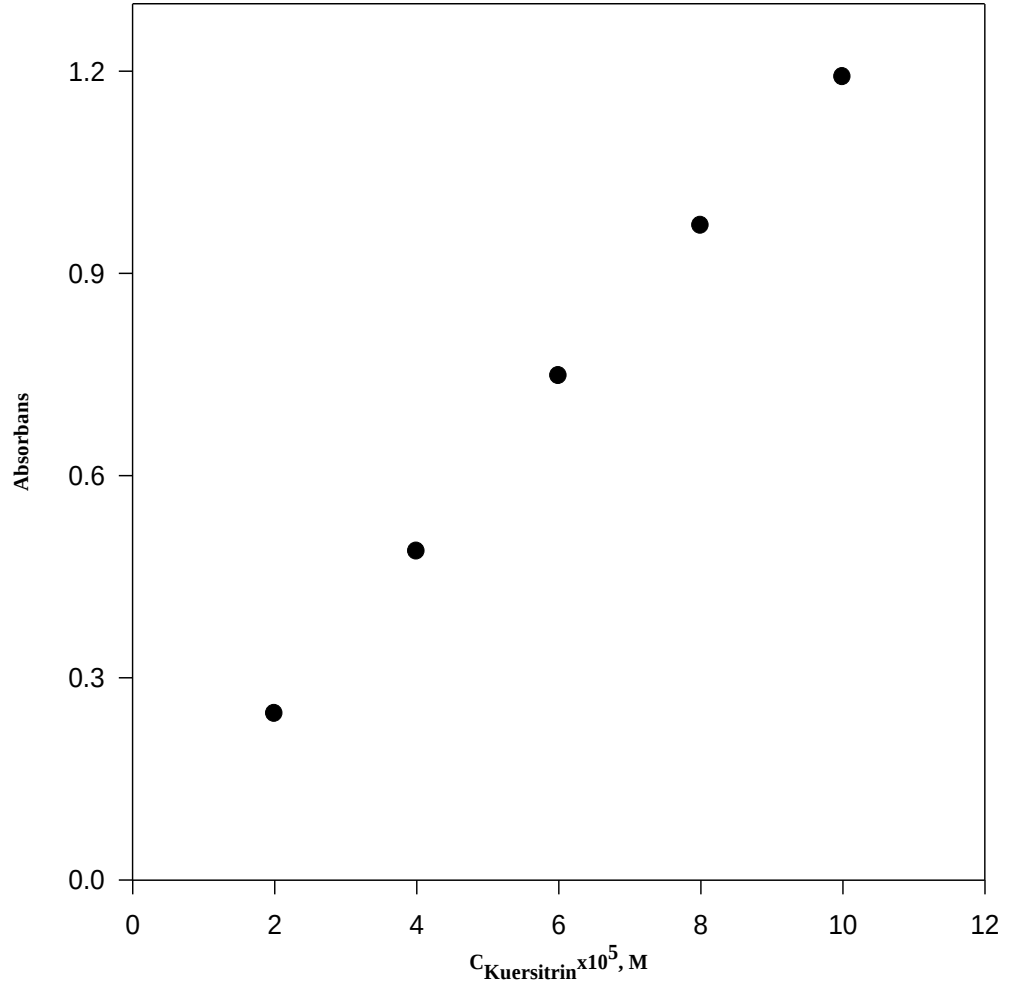


Şekil 4.54: Galanginin kalibrasyon eğrisi

4.3.1.2 Kuersitrin

Tablo 4.25: Kuersitrinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi (x: molar konsantrasyon ve y: absorbans)

Konsantrasyon (M)	Absorbans
2×10^{-5}	0.2465
4×10^{-5}	0.4872
6×10^{-5}	0.7476
8×10^{-5}	0.9706
1×10^{-4}	1.1912
Doğru Denklemi : $y = 11864 x + 0.017$ $r = 0.999$	



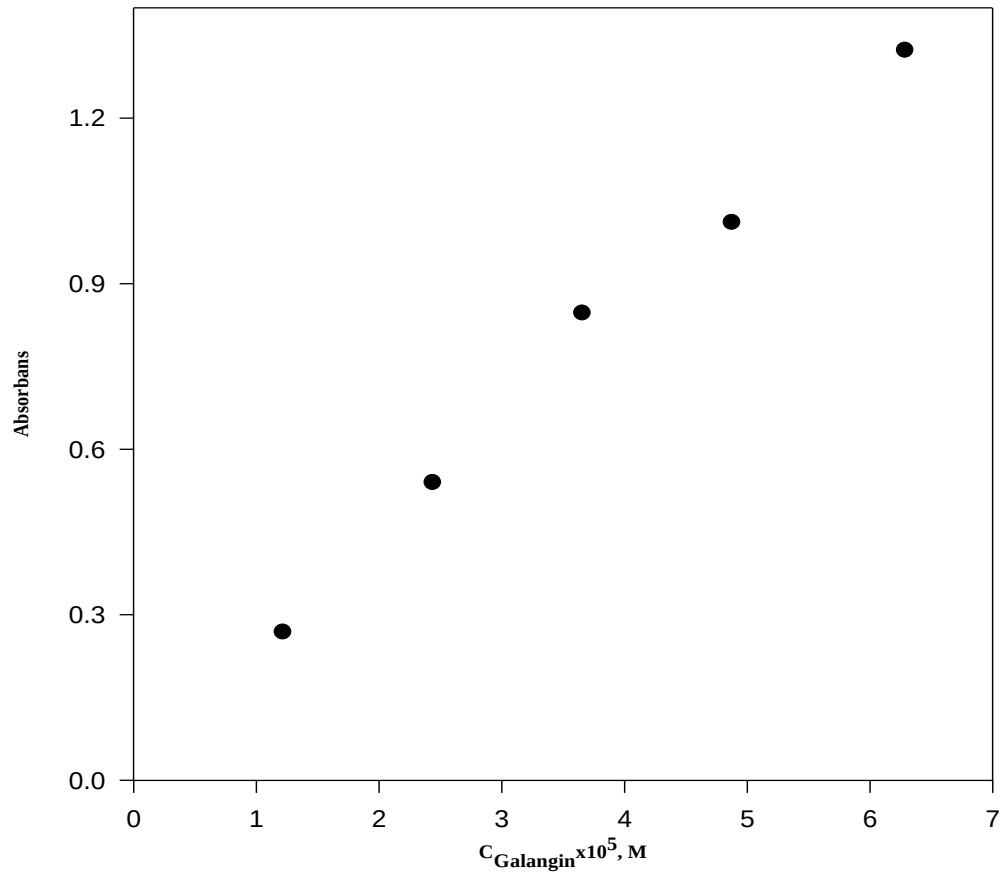
Şekil 4.55: Kuersitrinin kalibrasyon eğrisi

4.3.2. Galangin ve Kuersitrinin CUPRAC Yöntemi ile Elde Edilen Doğru Denklemleri ve Kalibrasyon Grafikleri

4.3.2.1. Galangin

Tablo 4.26: Galanginin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi (x: molar konsantrasyon ve y: absorbans)

Konsantrasyon (M)	Absorbans
1.22×10^{-5}	0.2681
2.44×10^{-5}	0.5390
3.66×10^{-5}	0.8461
4.88×10^{-5}	1.0105
6.10×10^{-5}	1.3226
Doğru Denklemi: $y = 20484 x + 0.039$ $r = 0.997$	

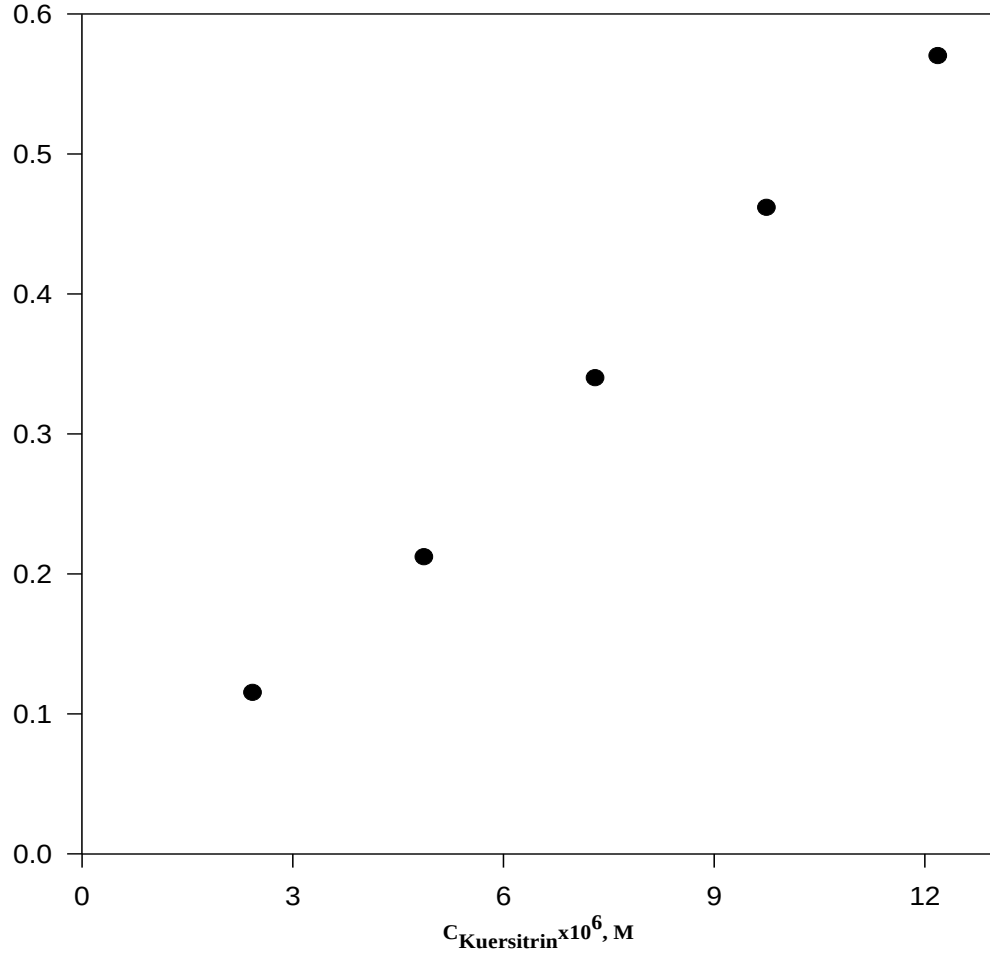


Şekil 4.56: Galanginin kalibrasyon eğrisi

4.3.2.2. Kuersitrin

Tablo 4.27: Kuersitrinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi (x: molar konsantrasyon ve y: absorbans)

Konsantrasyon (M)	Absorbans
2.44×10^{-6}	0.1148
4.88×10^{-6}	0.2116
7.32×10^{-6}	0.3395
9.76×10^{-6}	0.4612
1.22×10^{-5}	0.5696
Doğru Denklemi: $y = 47554 x - 0.009$ $r = 0.999$	



Şekil 4.57: Kuersitrinin kalibrasyon eğrisi

4.4. FENOLİK BİLEŞİKLERİN UYGULANAN YÖNTEMLERLE ELDE EDİLEN KUERSETİN EŞDEĞERİ FLAVONOİD KONSANTRASYONU (QREFC) KATSAYISI DEĞERLERİ

Uygulanan dört yöntemdeki verilerin birbirleriyle karşılaştırılması amacıyla QREFC (Kuersetin Eşdeğeri Flavonoid Konsantrasyonu) katsayısı cinsinden değerleri belirlendi. Her bir sentetik maddenin ayrı ayrı AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi, aseton-M- β -CD ortamında AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi, AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi ve CUPRAC yöntemleriyle kuersetin cinsinden değerleri belirlenerek, uygulanan dört yöntemin sonuçları arasındaki uyum incelendi.

Tablo 4.28’de fenolik bileşiklerin AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi, aseton-M- β -CD ortamında AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi, AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi ve CUPRAC yöntemleriyle belirlenen QREFC katsayısı değerleri gösterildi.

Tablo 4.28: Fenolik bileşiklerin AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi, aseton-M- β -CD ortamında AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi, AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi ve CUPRAC yöntemleriyle belirlenen QREFC (Kuersetin Eşdeğeri Flavonoid Konsantrasyonu) katsayı değerleri

Flavonoid	QREFC [FL- AlCl_3]	QREFC [(FL-Ac-M- β - CD)-(AlCl_3)]	QREFC [AlCl_3]	QREFC [CUPRAC]
Kuersetin	1.000	1.000	1.000	1.000
Mirisetin	1.016	1.197	0.848	0.592
Fisetin	0.592	0.461	0.926	0.788
Morin	0.574	0.966	0.688	0.382
Kaemferol	0.357	0.310	0.510	0.480
Rutin	0.027	0.072	0.658	0.518
Luteolin	0.020	0.044	0.437	0.281
Galangin	0.031	0.041	0.441	0.248
Kuersitrin	0.014	0.045	0.510	0.576

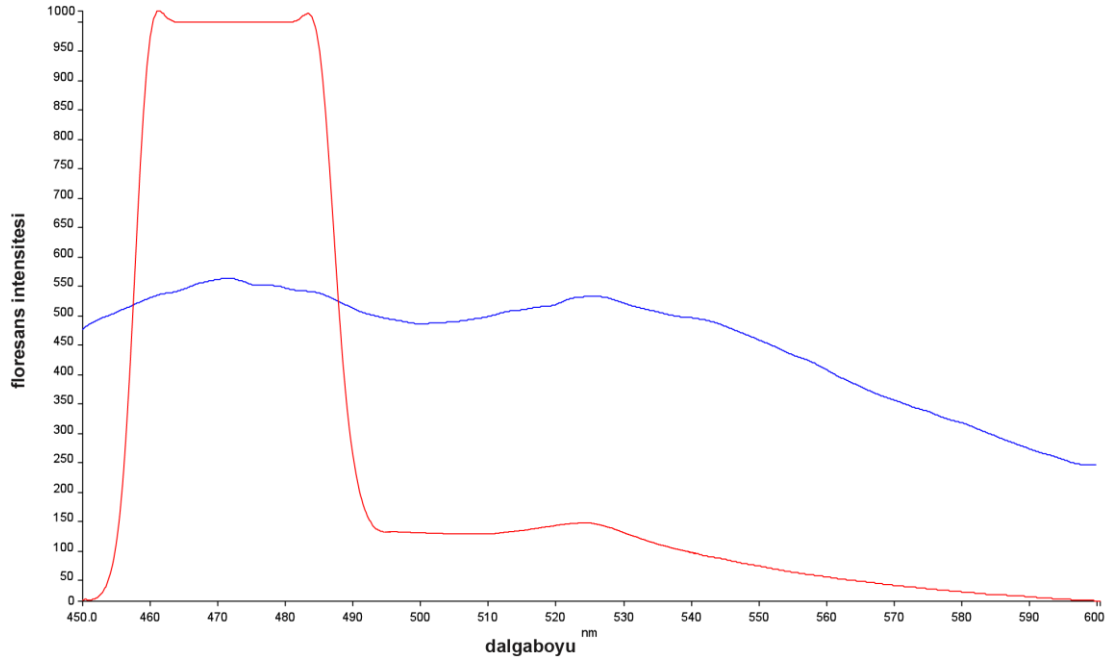
Tablo 4.28’de verilen Rutin değerleri, hidrolizli CUPRAC yöntemi uygulanması sonucu elde edilmiştir.

4.5. GERÇEK ÖRNEKLERDE YÖNTEMLERİN UYGULANMASI

4.5.1. Gerçek Örneklerin Hazırlanması ve Yöntemlerin Optimizasyonu

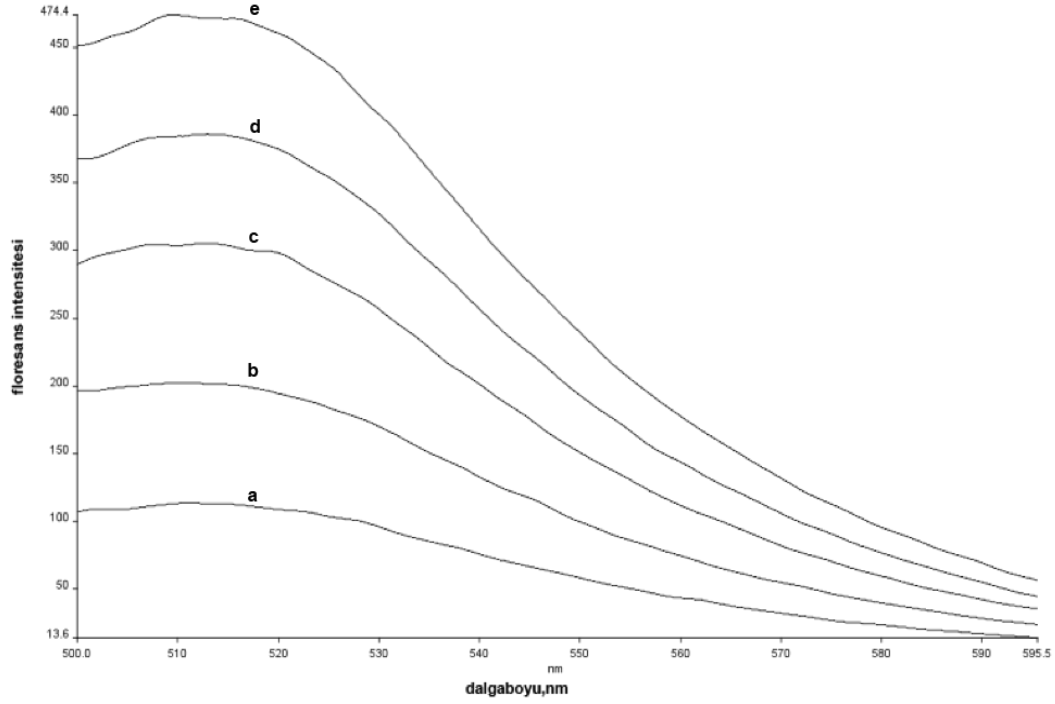
Tez çalışması sırasında geliştirilen AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin flavonol bileşiklerini tayin etmesinden dolayı, literatürden belirlenen kuersetin başta olmak üzere yüksek miktarda flavonol içeren gerçek örneklerle çalışma gerçekleştirildi. Bu amaçla öncelikli olarak zengin kuersetin kaynağı olan soğan üzerinde uygulama yapıldı.

Soğan örneğinden alınan 1 gramlık tartım, 100 mL %50 metanol-su karışımı ile geri soğutucu eşliğinde 80 °C sıcaklıktaki su banyosunda 30 dakika süre ile ekstrakte edildi. Ele geçen özüte yapılan gerekli seyreltme işlemlerinin ardından AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin uygulaması yapıldı. Öncelikli olarak cihazın prescan (öntarama) özelliğinden yararlanarak eksitasyon ve emisyon dalgalıboylarının, sentetik bileşik analizi yapılan çalışmalardan farklılık gösterip göstermediği kontrol edildi. Bunun için elde edilen soğan çözeltisinden 1 mL kullanılarak AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi uygulandı ve eksitasyon ile emisyon spektrumları elde edildi (Şekil 4.58).



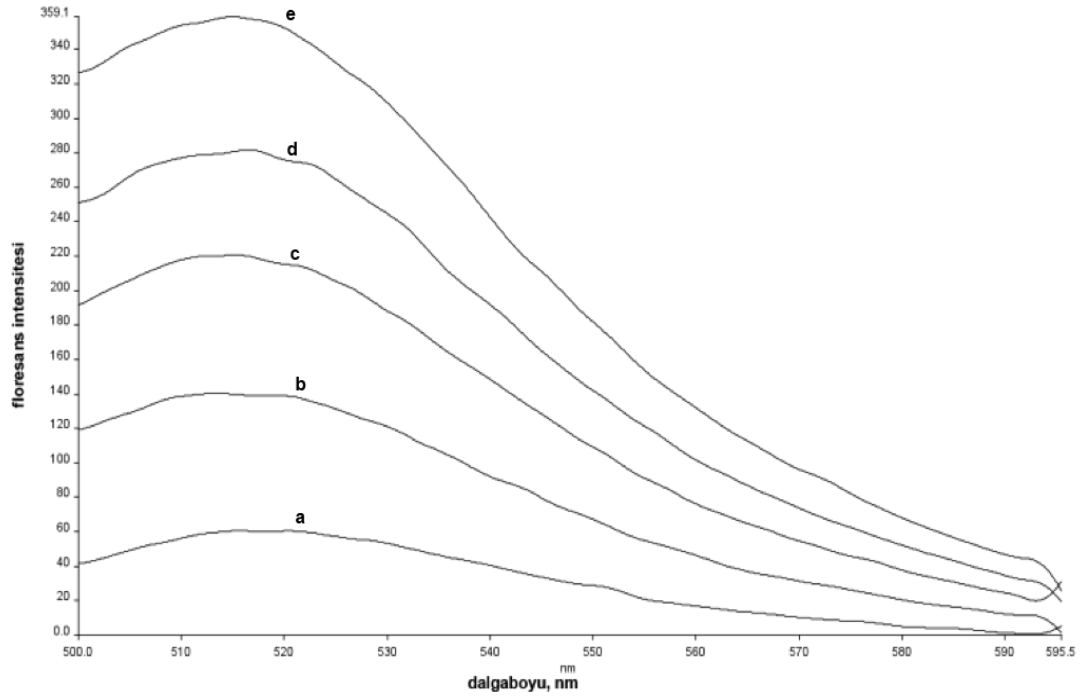
Şekil 4.58: Soğan özütüne AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin uygulanması ile elde edilen floresans spektrumu (1 mL soğan çözeltisi). Mavi renkli spektrum eksitasyon, kırmızı renkli spektrum emisyon spektrumu

Eksitasyon dalgaboyunun değişmediği belirlendikten sonra, 470 nm dalga boyunda eksitasyonu sabit tutarak, soğanın çeşitli miktardaki seyrelmiş çözeltileri kullanılarak emisyon spektrumu elde edildi (şekil 4.59).



şekil 4.59: Spektroflorometrik- AlCl_3 yöntemine göre soğanın emisyon spektrumu (Uyarılma dalgaboyu 470 nm). Elde edilen soğan çözeltisinden sırasıyla **(a)** 0.5 mL **(b)** 1 mL **(c)** 1.5 mL **(d)** 2 mL **(e)** 2.5 mL ilave edilerek spektrum elde edildi.

Benzer şekilde aseton-M- β -CD ortamında AlCl_3 /potasyum asetat spektroflorometrik yöntemi uygulanarak 470 nm dalgaboyunda eksitasyonu sabit tutarak, soğanın çeşitli miktardaki seyrelmiş çözeltileri kullanılarak emisyon spektrumu elde edildi (şekil 4.60).

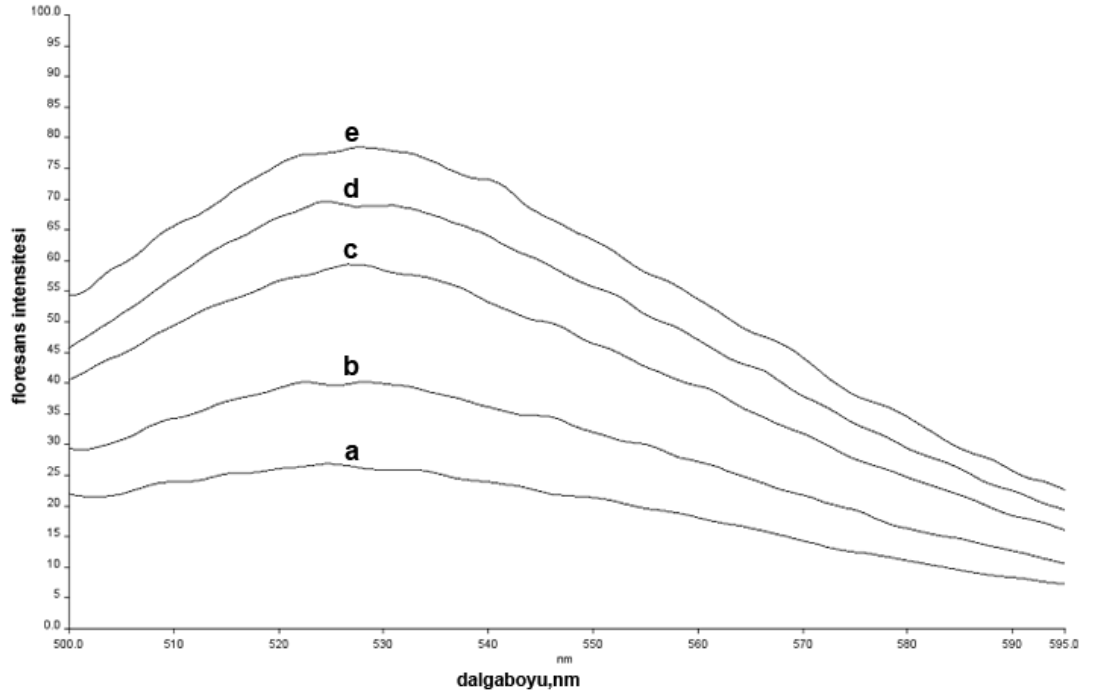


Şekil 4.60: Aseton-M-β-CD ortamında soğanın emisyon spektrumu (Uyarılma dalgaboyu 470 nm). Elde edilen soğan çözeltisinden sırasıyla **(a)** 0.5 mL **(b)** 1 mL **(c)** 1.5 mL **(d)** 2 mL **(e)** 2.5 mL ilave edilerek spektrum elde edildi.

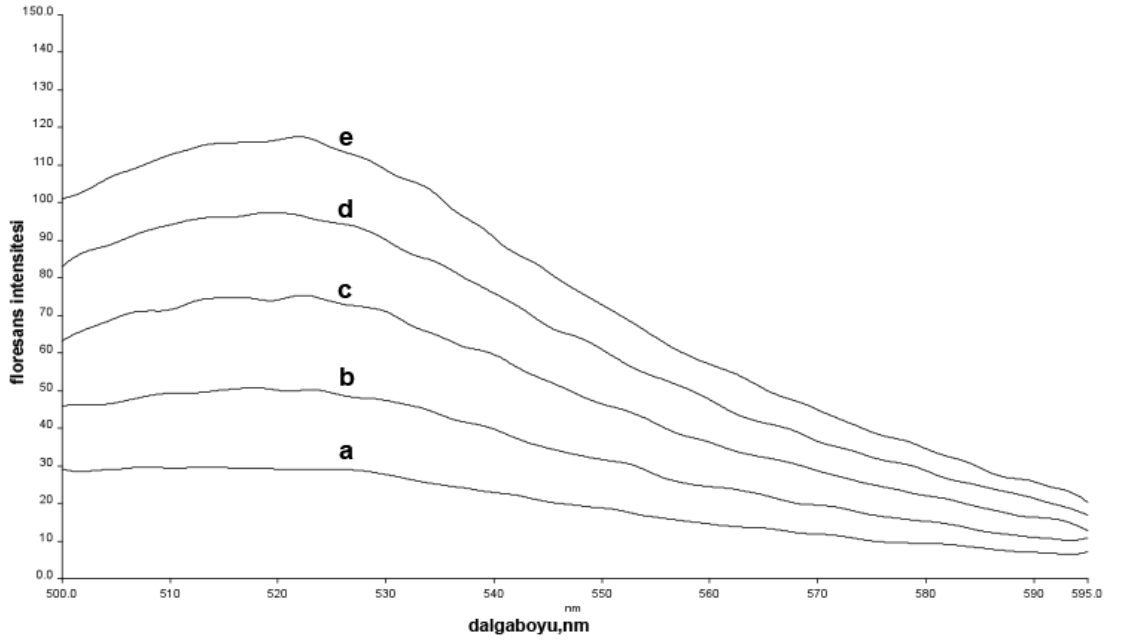
Diğer bir yüksek miktarda flavonol içeren örnek olarak kırmızı şarapla çalışıldı. Kırmızı şarap iki kez süzgeç kağıdından geçirildikten sonra gözenekli yapıdaki filtreden şırınga yardımıyla iyice süzülüp, gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra kullanıldı.

AlCl₃/potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi uygulanarak 470 nm dalgaboyunda eksitasyonu sabit tutarak, kırmızı şarabın çeşitli miktardaki seyrelmiş çözeltileri kullanılarak emisyon spektrumu elde edildi (Şekil 4.61).

Diğer bir çalışma ise elma suyu ile yapıldı. %100 elma suyu içeren hazır alınmış bir meyve suyu, iki kez süzgeç kağıdından geçirildikten sonra gözenekli yapıdaki filtreden şırınga yardımıyla iyice süzülüp, gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra kullanıldı. AlCl₃/potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi uygulanarak 470 nm dalgaboyunda eksitasyonu sabit tutarak, elma suyunun çeşitli miktardaki seyrelmiş çözeltileri kullanılarak emisyon spektrumu elde edildi (Şekil 4.62).



Şekil 4.61: Spektroflorometrik- AlCl_3 yöntemine göre kırmızı şarabın emisyon spektrumu (Uyarılma dalgaboyu 470 nm). Süzülen kırmızı şarap çözeltisi 1:100 oranında seyreltildikten sonra ele geçen çözeltiden sırasıyla **(a)** 0.2 mL **(b)** 0.4 mL **(c)** 0.6 mL **(d)** 0.8 mL **(e)** 1 mL ilave edilerek spektrum elde edildi.



Şekil 4.62: Spektroflorometrik- AlCl_3 yöntemine göre elma suyunun emisyon spektrumu (Uyarılma dalgaboyu 470 nm). Süzülen elma suyu çözeltisi 1:3 oranında seyreltildikten sonra ele geçen çözeltiden sırasıyla **(a)** 0.5 mL **(b)** 1.0 mL **(c)** 1.5 mL **(d)** 2 mL **(e)** 2.5 mL ilave edilerek spektrum elde edildi.

Portakal suyu, vişne suyu ve domates suyu örnekleri de, elma suyu ile benzer şekilde hazırlandı. Siyah çay ve yeşil çay örnekleri ise, paketlenmiş haldeki 2 gramlık miktarlarının, 250 mL kaynamış distile su içine iki dakika sürekli batırıldıktan sonra, üç dakika kaynamış suyun içinde bırakılmak yoluyla demlenmesi sonucu elde edilen çözeltinin, iki defa süzgeç kağıdından geçirilmesi ve sonrasında gerekli seyreltme işlemlerinin yapılması sonucunda elde edildi.

4.5.2. Gerçek Örneklerle $AlCl_3$ /Potasyum Asetat Spektroflorometrik, Aseton-M- β -CD Ortamında $AlCl_3$ /Potasyum Asetat Spektroflorometrik, $AlCl_3$ /Potasyum Asetat Spektrofotometrik ve CUPRAC Yöntemlerinin Uygulanması

Çalışılan gerçek örneklerin floresans intensiteleri, geliştirilen $AlCl_3$ /potasyum asetat spektroflorometrik yönteminde ve aseton-M- β -CD ortamındaki uygulamasında 470 nm eksitasyon dalga boyu ve 525 nm emisyon dalgaboyunda ölçüldü. Bu amaçla spektroflorometre cihazının tayin sınırları arasında kalabilmek için uygun seyreltme işlemleri yapıldı.

Çeşitli şekillerde hazırlanan flavonol olarak zengin olduğu bilinen gerçek örneklerin toplam flavonoid içerikleri, $AlCl_3$ /potasyum asetat spektroflorometrik, aseton-M- β -CD ortamında $AlCl_3$ /potasyum asetat spektroflorometrik, $AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik ve CUPRAC yöntemleri kullanılarak QREFC değerleri cinsinden belirlendi (Tablo 4.29). Bu değerler soğan, siyah çay ve yeşil çay için $\mu\text{mol QR/g}$ örnek, kırmızı şarap, elma suyu, domates suyu, vişne suyu ve portakal suyu için ise $\mu\text{mol QR/mL}$ örnek olarak ifade edildi.

Tablo 4.29: Gerçek örneklerin belirlenen Kuersetin Eşdeğeri Flavonoid Konsantrasyonu (QREFC) değerleri ($\mu\text{mol QR/g}$ örnek, $\mu\text{mol QR/ mL}$ örnek)

GERÇEK ÖRNEKLER	QREFC_[FL-AICl3] ($\mu\text{mol QRxg}^{-1}$ / $\mu\text{mol QRxmL}^{-1}$)	QREFC_[(FL-Ac-MβCD)- (AICl3)] ($\mu\text{mol QRxg}^{-1}$ / $\mu\text{mol QRxmL}^{-1}$)	QREFC_[AICl3] ($\mu\text{mol QRxg}^{-1}$ / $\mu\text{mol QRxmL}^{-1}$)	QREFC_[CUPRAC] ($\mu\text{mol QRxg}^{-1}$ / $\mu\text{mol QRxmL}^{-1}$)
Soğan	0.633	0.522	4.2	6.2
Elma Suyu	0.657	0.436	13.4	194
Portakal Suyu	0.342	0.254	32.5	300
Vişne Suyu	0.748	0.707	67.1	1021
Domates Suyu	1.650	1.530	150.0	260
Kırmızı Şarap	42.400	17.970	323.0	4680
Yeşil Çay	1.140	1.090	62.4	1714
Siyah Çay	1.180	0.597	119.0	1010

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Literatürde toplam flavonoid tayininde geniş kullanım alanına sahip AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin [6], spektroflorometrik olarak uygulanması sağlandı. Geliştirilen AlCl_3 /potasyum asetat spektroflorometrik yöntemi ve bunun lipofilik antioksidanlara özgü çeşitlemesi olan aseton/metil- β -siklodekstrin ortamındaki uygulaması kullanılarak flavonol olarak zengin bazı gerçek örneklerin toplam flavonoid miktarı tayini yapıldı. Karşılaştırma yöntemi olarak AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik [6] yöntemi ve CUPRAC (Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite) yöntemi [7] kullanıldı.

AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi temelde alüminyum klorür bileşiğindeki Al^{3+} katyonunun, flavon ve flavonol grubu bileşiklerin esas olarak C-4 keto grubu ve C-3 veya C-5 hidroksil gruplarından biriyle stabil bir kelat oluşturmaya dayanmaktadır (Al-Flavon veya Al-Flavonol kompleksi). Bununla birlikte alüminyum, flavonoid grubu bileşiklerin A ve B halkalarındaki orto-dihidroksi (kateşol) gruplarıyla da kararsız kompleksler oluşturmaktadır [6] ve bu komplekslerin stökiyometrilere farklı olabilmektedir. Flavonoidlerin flavanon ve flavanonol grupları bu reaksiyonu vermemektedir [33]. Bu yöntem referans bileşik olan kuersetinin maksimum absorpsiyon gösterdiği 427 nm dalga boyunda uygulanmaktadır [32].

Floresansın diğer optik yöntemlere göre başlıca avantajı fazlaca duyarlı olmasıdır. Spektroflorometrinin birçok uygulaması, dedeksiyon için örneğin çok küçük miktarlarının yeterli olmasına dayanılarak gerçekleştirilmektedir. Çoğunlukla nanomolar seviyedeki çözeltilerin kantitatif olarak belirlenebilmesini mümkün kılar [5]. Bu yüzden spektroflorometrik analiz yöntemlerinin toplam antioksidan kapasite tayin yöntemlerine uyarlanabilmesi önemlidir. Buna karşılık spektroflorometride floresans intensitesinin analit derişimine karşı kaydedildiği kalibrasyon eğrilerinin doğrusallığı (linearitesi), karşı gelen spektrofotometrik eğrilerinkinden daha kötü olabilmektedir,

çünkü oluşan çeşitli stökiyometrilereki Al-flavonol komplekslerinin floresans sönüm ömürleri de farklıdır [34]. Doğaldır ki bu durum, tek bir ürünün absorptimetrik ölçümüne dayalı spektrofotometrik yöntemlerde rastlandığından daha düşük bir linearite sağlayacaktır.

Spektrofotometrik yöntemde oluşan Al-flavonoid komplekslerinin floresans özellik gösterip göstermedikleri tespit edilmeye çalışılmıştır. Yöntemde referans bileşik olarak kullanılması düşünülen kuersetin öncelikli olarak incelenen bileşik olmuştur. İlk önce geliştirilecek yöntemin literatürdeki AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemle benzer konsantrasyonlarla aynı şekilde uygulanmasına çalışılmıştır. Fakat floresans intensitesinin çok yüksek değerler vermesi, spektrofluorometre cihazının tayin sınırları (maksimum floresans intensitesi 1000 değeri) dışına çıkması sebebiyle, literatürdeki çalışmada Al-Flavon veya Al-Flavonol kompleksi oluşturmak amacıyla kullanılan %10'luk AlCl_3 çözeltisi ve son konsantrasyonu 10^{-5} M mertebelerinde olan flavonoid çözeltilerinin konsantrasyonları kademeli olarak düşürülmüştür. Son olarak %1'lik AlCl_3 çözeltisi ve son konsantrasyonu 10^{-7} M mertebelerinde olan flavonoid çözeltilerinin oluşturdukları stabil kelatin spektrofluorometre cihazının tayin sınırları arasında floresans özellik gösterdiği belirlenmiştir.

Deneyisel çalışmaların ilk adımında kullanılacak olan AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin, spektrofluorometrik olarak uygulanabilmesinin sağlanabilmesi amacıyla optimum çalışma şartlarını belirlemek üzere bir dizi uygulama yapılmıştır. Bunlar sırasıyla eksitasyon (uyartım) ve emisyon (yayınım) dalgaboylarının belirlenmesi, uygun pH'nın bulunması ve inkübasyon süresinin tespit edilmesi olarak belirlenmiştir.

Geliştirilecek yöntemde öncelikli olarak eksitasyon ve emisyon dalgaboylarının belirlenmesi amacıyla, sonuçların kuersetin referans alınarak inceleneceği düşünüldüğünden, kuersetin kullanılarak floresans spektroskopisi cihazının prescan (öntarama) ve eksitasyonun sabit tutulmasıyla elde edilen emisyon spektrumu özelliklerinden yararlanılmış ve yöntem için uygun eksitasyon dalgaboyu 470 nm, emisyon dalgaboyu ise 525 nm olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1 ve 4.2).

Yapılan çalışmalar sonucunda inkübasyonun oda sıcaklığında yarım saat süre ile yapılması kararlaştırılmıştır (Şekil 4.3). Yapılan pH çalışmasında yöntemin maksimum duyarlılığı sağlayan nötral pH'da uygulanması uygun görülmüştür, ayrıca spektrofotometrik yöntemdeki pH değişimlerinin spektrofotometrik $AlCl_3$ yöntemine [32] göre elde edilen sonuçlarda oldukça büyük farklılıklara yol açtıkları belirlenmiştir (Şekil 4.4). Bunun olası nedeni, floresans olayında kelat bağı yapmamış flavonoid -OH gruplarının uyarılmış (eksite) konumda pK_a değerlerindeki şiddetli değişime paralel olarak floresans özelliklerinin değişmesidir. Örneğin, $Al(III)$ -morin kompleksinin floresans özelliklerinin incelenmesinde $\pi^* \rightarrow \pi$ singlet emisyonu ortaya çıkar, çünkü kelat bağında kullanılmış olan 3-OH grubunda molekül içi proton transferi engellendiğinden oda sıcaklığında emisyon yapmayan ya da zayıf emisyon yapan foto-tautomer oluşur; bu durumda piron halkasının 7-OH grubunun anyon formu floresansdan sorumlu olur. Söz konusu 7-OH grubunun kararlı konumda 7.4 olan pK_a değeri uyarılmış konumda -2.2'ye kadar azalır ki bu da çok hızlı bir fotodisosiasyon ile elele yürür [34].

Yöntemde emisyon spektrumları elde edilirken eksitasyon ve emisyon slitleri 10 olarak, floresans intensiteleri ölçülmesinde ise eksitasyon ve emisyon slitleri 5 olarak belirlenmiştir. Bunun nedeni, spektrum alınırken, slit 5 alındığında piklerin fazlaca gürültülü olması nedeniyle dalgaboylarının net görülememesi ve floresans intensiteleri okunurken de slit 10 alındığında bazı yüksek floresans veren maddelerin, spektrofotometre cihazının tayin sınırları (maksimum floresans intensitesi olan 1000 değeri) dışına çıkmasıdır.

$AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi, $AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemine cevap veren flavon, flavonol ve isoflavon grubu fenolik bileşiklere uygulandığında, flavonol grubu bileşiklerin ve flavon yapıya sahip luteolinin alüminyum ile oluşturdukları komplekslerinin floresan yapıda olduğu ve bu yöntemle tayin edilebilecekleri görülmüştür.

Flavonoid bileşiklerden kuersetin, mirisetin, fisetin, kaempferol, morin, rutin, luteolin, galangin ve kuersitrin bileşiklerinin standart çözeltileri hazırlanmış ve $AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi kullanılarak fenolik bileşiklerin ayrı ayrı eksitasyon

ve emisyon dalga boyları ile molar floresans katsayıları belirlenmiştir (Tablo 4.10). Molar floresans katsayısı (ϵ'), analizi yapılan fenolik bileşiğin molar konsantrasyonu-floresans intensitesi arasındaki kalibrasyon eğrisinin eğimi hesaplanarak elde edilmiştir. Buradan hesaplanan belirtme sınırları (limit of detection: LOD değerleri), Al-flavonoid komplekslerinin spektrofotometrik analizinde rastlanan değerlerden bir ondalık mertebesi daha düşük (yani 10^{-7} M yerine 10^{-8} M düzeyinde) bulunmaktadır.

Flavonoidlerin ikili ve üçlü kombinasyonlarından oluşturulan sentetik karışımları hazırlanmış ve uygun çözeltiler ile seyreltilmelerinin ardından, yöntemle göre sonuçlar kuersetin referans alınarak incelenmiştir. Sentetik karışımlardaki flavonoidlerin Al-kompleksleri yaklaşık olarak 470 nm'de uyarıldığından eksitasyon 470 nm dalga boyunda sabit tutulup AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi uygulanarak bu sentetik karışımların emisyon spektrumları elde edilmiştir.

Flavonol grubu bileşikler için farklı kombinasyonlarda üçlü karışımlar oluşturulup, spektrofotometrik- AlCl_3 yöntemine göre beklenen ve ölçülen floresans intensite değerleri birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Bu işlemler kuersetin referans alınarak yapıldığından ve karışımlardan tespit edilen eksitasyon ve emisyon dalga boyları da yaklaşık olarak bu dalga boylarında maksimum floresans intensitesi gösterdiğinden, floresans intensite ölçümleri 470 nm eksitasyon ve 525 nm emisyon dalga boyu kullanılarak yapılmıştır. Sentetik karışımlar için teorik olarak beklenen ve deneysel olarak bulunan floresans intensitesi değerlerinin birbiriyle uyumlu sonuçlar verdiği gözlenmiştir (Tablo 4.11). Bir diğer deyişle floresans intensiteleri yaklaşık olarak toplamsal bulunmuştur, yani bir flavonoid karışımını oluşturan bileşenlerin floresans intensiteleri toplamı, iyi bir yaklaşıklıkla karışımın deneysel olarak ölçülen toplam floresans intensitesini vermektedir. Ancak bu toplamsallık, (kalibrasyon doğrularının linearitesi için belirtilen nedenlerle) spektrofotometrik ölçümlerde rastlandığı kadar belirgin değildir.

Geliştirilen AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin değişik çözücü ortamlarına uyarlanabilmesi amacıyla, daha önce lipofilik antioksidanların tayini için geliştirilmiş olan aseton/metil- β -siklodekstrin ortamında uygulaması gerçekleştirilmiştir. Hidrofobik ortamlarda floresans özelliğinin bir miktar artabileceği

bilindiğinden, burada duyarlılığın artırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla yapılan denemelerde flavonoid bileşiklerin standartları, aseton-su (9:1, v/v) ortamında çözülerek hazırlanmış olan %2'lik (w/v) M- β -CD çözeltisi içinde hazırlanmıştır. Başta kuersetin olmak üzere flavonol bileşiklerinin ve flavon yapıya sahip luteolinin bu ortamdaki molar floresans katsayıları belirlenmiştir (Tablo 4.21).

Aynı etanol ortamında olduğu gibi, aseton/M- β -CD ortamında da, fenoliklerin ikili ve üçlü kombinasyonlarından oluşan sentetik karışımları hazırlanmış ve uygun çözeltiler ile seyreltilmelerinin ardından, eksitasyon 470 nm dalgaboyunda sabit tutulup $AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi uygulanarak bu sentetik karışımların emisyon spektrumları elde edilmiştir. Genelde aseton/M- β -CD ortamında uygulanan florometrik yöntemin, etanol ortamındaki florometrik yöntemde görece düşük duyarlılıkla saptanan luteolin, galangin ve kuersitrin için tayin duyarlılığını pek az arttırabildiği gözlenmiştir. Daha önce antioksidan tayinleri için geliştirilmiş olan aseton/M- β -CD çözelti ortamı [35] daha çok lipofilik antioksidanları tayinde avantajlı olduğundan bu çalışmada, bitkilerin yaprak yüzeylerinde UV/B ışınları filtresi antioksidan, antifungal ajan ve sinyalleme vasıtası olarak bulunan quercetagenin-3,7-dimetil eter ve 6-hidroksikaempferol-3,7-dimetil eter gibi lipofilik flavonoidler [36] –teminindeki güçlük nedeniyle– kullanılamamıştır. Bu lipofilik flavonoidlerin test edilmesi durumunda önerilen çözücü (çözelti) sisteminin, florometrik tayinlerin duyarlılığını arttırabileceği öngörülmektedir.

Aseton/M- β -CD ortamında flavonol grubu bileşikler için farklı kombinasyonlarda üçlü karışımlar oluşturulup, spektrofotometrik- $AlCl_3$ yöntemine göre 470 nm eksitasyon ve 525 nm emisyon dalgaboyu kullanılarak yapılan floresans intensitesi ölçümleri ile beklenen floresans intensite değerlerinin birbirleriyle uyumlu olduğu görülmüştür (Tablo 4.22).

Bu tez çalışmasında analizi yapılan flavonoid bileşiklerden literatürde [32] daha önce incelenen bazılarının ve literatürde eksik olan kuersitrin ve galanginin $AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometri ve CUPRAC yöntemlerine göre molar konsantrasyon-absorbans arasındaki kalibrasyon eğrilerinin eğimleri hesaplanarak bulunan molar absorplama katsayıları (ϵ) Tablo 4.23'de verilmiştir.

Analizlenen fenolik bileşikler için hem geliştirilen AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi, hem de bu yöntemin aseton/M- β -CD ortamında yapılan uygulamasında elde edilen molar floresans katsayıları referans bileşik olarak seçilen kuersetinin molar floresans katsayısına bölünerek ($\epsilon'_{\text{fenolik}}/\epsilon'_{\text{QR}}$) aynı şartlarda karşılaştırma yapılabilecek Kuersetin (QR) Eşdeğeri Flavonoid Konsantrasyonu (QREFC) katsayıları elde edilmiştir (Tablo 4.28). Aynı tabloda ayrıca CUPRAC ve AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemleri için de benzer bir hesaplamayla, yani molar absorplama katsayılarının oranlanmasıyla ($\epsilon_{\text{fenolik}}/\epsilon_{\text{QR}}$) bulunan QREFC katsayıları gösterilmiştir.

Elde edilen sonuçlara bakıldığında rutin, luteolin, galangin ve kuersitrinin AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminde, spektrofotometrik yöntemdekilere göre oldukça düşük QREFC katsayılarına sahip oldukları görülmüştür. Bu durum olasılıkla, rutin ve kuersitrin'in Al-kelatlayıcı özellikteki 3-OH grubu yerine sırasıyla 3-rutinosid ve 3-O-rhamnosid gruplarına sahip olmalarından, luteolin'de 3-OH grubunun hiç olmamasından ve galangin'in de görece az sayıda -OH grubuna sahip olmasından, yani kelat formda Al-bağlı kompleksleşme eksikliğinden veya oluşan komplekslerin kararsızlığından kaynaklanmaktadır. Bu durumun sonucu olarak bir flavonoid karışımının kuersetin eşdeğeri birimiyle miktarlandırılmasında bir takım güçlükler doğabilir, çünkü karışımı oluşturan bazı flavonoidlerin toplam flavonoid kapasitesi içindeki temsil payları çok düşük kalmaktadır. Fisetin ve kaemferolde AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemine göre QREFC katsayılarında düşüşler gözlenirken, mirisetinde ise artış görülmüştür.

Geliştirilen yöntemin aseton-M- β -CD ortamında olan uygulamasında ise etanolu ortama göre QREFC katsayılarında genel olarak uyumluluk varken, morinde belirgin artış, fisetinde ise düşüş görülmüştür.

Tez çalışması sırasında geliştirilen AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemin flavonol bileşiklerini tayin etmesinden dolayı, literatürden belirlenen kuersetin başta olmak üzere yüksek miktarda flavonol içeren gerçek örneklerle çalışma gerçekleştirilmiştir. Çalışılan gerçek örneklerin floresans intensiteleri, geliştirilen

AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminde ve aseton/M- β -CD ortamındaki uygulamasında 470 nm eksitasyon dalgaboyu ve 525 nm emisyon dalgaboyunda ölçülmüştür (Şekil 4.58, 59, 60).

Çeşitli şekillerde hazırlanan flavonolce zengin olduğu bilinen gerçek örneklerin toplam flavonoid içerikleri AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik, aseton-M- β -CD ortamında AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik, AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik ve CUPRAC yöntemleri kullanılarak QREFC değerleri cinsinden belirlenerek gösterilmiştir (Tablo 4.29). Sonuçlara bakıldığında AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin her iki çözücü ortamında da (EtOH ve aseton-M- β -CD) elde edilen QREFC değerlerinin, spektrofotometrik yöntemler olan AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik ve CUPRAC yöntemlerine göre oldukça düşük olduğu görülmüştür. Bunun nedeni, çalışılan örnekler içindeki spektrofotometrik uygulamada floresans özellik gösteren ve dolayısıyla analizi yapılabilen maddelerin, spektrofotometrik yöntemlerle tayin edilen maddelere göre daha sınırlı olmasıdır. Bu yüzden AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin, referans olarak kullanılan spektrofotometrik yöntemlerle kantitatif olarak karşılaştırılması zordur. Ancak aralarındaki relatif QREFC değerleri sırasına göre bir karşılaştırmadan bahsedilebilir.

Tez çalışması sırasında uygulanan dört yönteme göre analizlenen gerçek örnekler arasında QREFC değerleri cinsinden sıralama yaptığımızda, hepsinde en fazla QREFC değerinin kırmızı şarapta olduğu görülmüştür. AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi ile spektrofotometrik yöntemin QREFC değerleri cinsinden sıralaması yapıldığında da genel olarak bir uyumluluk bulunmaktadır. Aseton/M- β -CD ortamında yapılan uygulamada da, EtOH kullanılan ortamda elde edilen sıralama ile genel bir uyumluluk vardır.

KAYNAKLAR

1. WAYNER, D.D.M., BURTON, G.W., INGOLD, K.U., LOCKE, S., 1985, Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capacity of human blood plasma by controlled peroxidation, *FEBS Letters*, 187 (1), 33-37.
2. KESKİN, H., ERKMEN, G., 1987, *Besin Kimyası*, Güryay Matbaacılık, Beşinci basım, İstanbul.
3. 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.
4. TÜTEM, E., İstanbul Üniversitesi Kimya Bölümü, Analitik Kimya-2 dersi, ders notları.
5. JONES, C., MULLOY, B., THOMAS, A.H., 1993, *Microscopy, optical spectroscopy, and macroscopic techniques*, 1nd ed., Humana Press, UK, 089-6032-329.
6. WOISKY, R., SALATINO, A., 1998, Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control, *Journal Apicultural Research*, 37, 99-105.
7. 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.
8. RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., PAGANGA, G., 1997, Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends in Plant Science*, 2, 152-159.
9. GHISELLI, A., SERAFINI, M., NATELLA, F., SCACCINI, C., 2000, Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical view and experimental data, *Free Radical Biology & Medicine*, 29 (11), 1106-1114.
10. HARBORNE, J., 1986, *Nature, distribution and function of plant flavonoids*, in *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical Pharmacological and Structure- Activity Relationships*, Alan R. Liss, Inc., New York.

11. KUHNAU, J., 1976, The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition, *World Review of Nutrition Dietetics*, 24, 117–191.
12. MIDDLETON, E.JR., KANDASWAMI, C, THEOHARIDES, T.C., 2000, The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer, *Pharmacological Reviews*, 52, 673–751.
13. ZHANG,S., MORRIS, M.E., 2003, Effects of the Flavonoids biochanin a, morin, phloretin, and silymarin on p-glycoprotein-mediated transport, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 304 (3), 1258-1267.
14. RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., PAGANGA, G., 1996, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 933-956.
15. LU, X., JUNG, J.I., CHO, H.J, LIM, D.Y., HYUN, H.S., CHUN, H.S., KWON, D.Y., PARK, J.H.Y., 2005, Fisetin Inhibits the Activities of Cyclin-Dependent Kinases Leading to Cell Cycle Arrest in HT-29 Human Colon Cancer Cells, *The Journal of Nutrition*, 135 (12), 2884-2890.
16. 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.
17. CADENAS, E., PACKER, L., 2002, Handbook of Antioxidants, *Marcel Dekker*, 2nd Ed., New York, 0-8247-0547-5.
18. SHAHIDI, F., WANASUNDARA, P.K.J., 1992, Phenolic antioxidants, *Critical Review of Food Science and Nutritional*, 32, 67-103.
19. BROWN, J., O'PREY, J., HARRISON P.R., 2003, Enhanced sensitivity of human oral tumours to the flavonol, morin, during cancer progression: involvement of the Akt and stress kinase pathways, *Carcinogenesis*, 24 (2), 171–177.
20. RAMANATHAN, L., DAS, N.P., LI, Q.T., 1994, Studies on lipid oxidation in fish phospholipid liposomes. *Biological Trace Element Research*, 40, 59–70.
21. HANASAKI, Y., OGAWAA, S., FUKUI, S., 1994, The correlation between active oxygen's scavenging and antioxidative effects of flavonoid, *Free Radicals Biol. Med.*, 16, 845–850.
22. BAUMANN, J., BRUCHHAUSEN, F.V., WURM, G., 1980, Flavonoids and related compounds as inhibitors of arachidonic acid peroxidation, *Prostaglandins*, 20, 627–639.

23. NAKADATE, T., YAMAMOTO, S., AIZU, E., KATO, R., 1984, Effects of flavonoids and antioxidants on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-caused epidermal ornithine decarboxylase induction and tumor promotion in relation to lipoxigenase inhibition by these compounds, *Gann*, 75, 214–222.
24. TANAKA, T., NISHIKAWA, A., MORI, Y., MORISHITA, Y., MORI, H., 1989, Inhibitory effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs, piroxicam and indomethacin on 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis in male ACI/N rats, *Cancer Letters*, 48, 177–182
25. FRANCIS, A.R., SHETTY, T.K., BHATTACHARYA, R.K., 1989, Modifying role of dietary factors on the mutagenicity of aflatoxin B1: in vitro effect of plant flavonoids, *Mutation Research*, 222, 303–401.
26. KAWABATA, K., TANAKA, T., HONJO, S., KAKUMOTO, M., HARA, A., MAKITA, H., TATEMATSU, N., USHIDA, J., TSUDA, H., MORI, H., 1999, Chemopreventive effect of dietary flavonoid morin on chemically induced rat tongue carcinogenesis, *International Journal of Cancer*, 83, 381–386.
27. JIMENEZ M., CARMONA, F.G., 1999, Myricetin, an antioxidant flavonol, is a substrate of polyphenol oxidase, *Journal of Science and Food Agriculture*, 79, 1993-2000.
28. CAO, G., ALESSIO, H.M., CUTLER, R.G., 1993, Oxygen-Radical absorbance capacity assay for antioxidants, *Free Radical Biology & Medicine*, 14, 303-311.
29. OU, B., WOODILL, M.H., PRIOR, R.L., 2001, Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4619-4626.
30. DELANGE, R. J., GLAZER, A. N., 1989, Phycoerythrin fluorescence-based assay for peroxy radicals: a screen for biologically relevant protective agents, *Analytical Biochemistry* 177, 300–306.
31. OU, B., WOODILL, M.H., FLANAGAN, J., DEEMER, E.K., PRIOR, R.L., HUANG, D., 2002, Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2772-2777.
32. BENER, M., 2009, *Bitki özütleri ve tekstil boyalarındaki flavonoidler için spektrofotometrik analiz yöntemlerinin geliştirilmesi*, yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
33. CHANG, C. C., YANG, M. H., WEN, H. M., CHERN, J. C., 2002, Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods, *Journal of Food and Drug Analysis*, 10, 178-182.

34. GUTIERREZ, A.C., GEHLEN, M.H., 2002, Time resolved fluorescence spectroscopy of quercetin and morin complexes with Al^{3+} , *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 58, 83-89.
35. 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.
36. NIKOLAVA, M., BERKOV, S., IVANCHEVA, S., 2004, A rapid TLC method for analysis of external flavonoid aglycones in plant exudates, *Acta Chromatographica*, 14, 110-114.

ÖZGEÇMİŞ

11.11.1983 yılında Almanya’da doğdum. 1989 yılında Fikret Yüzatlı İlkokulunda başladığım ilköğrenimimi bitirdikten sonra, 1994 yılında Büyükşehir Hüseyin Yıldız Anadolu Lisesinde öğrenim görmeye başladım. Lise öğrenimim ardından 2001 yılında İstanbul Üniversitesi Kimya Bölümünü kazandım. 2006 yılında Kimya Bölümü’nden mezun oldum. 28.09.2006 tarihinde İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Programı’nda yüksek lisans öğrenimime başladım.