



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TÜRKİYE’DE YETİŞTİRİLEN BAZI ERİK ÇEŞİTLERİNİN
TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİNİN VE
BAŞLICA ANTİOKSİDAN BİLEŞENLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Çınar KÜÇÜKÇOBAN
Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı

Danışman
Prof.Dr.Esma TÜTEM

Eylül, 2009

İSTANBUL

Bu çalışma 16/09/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



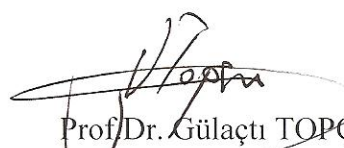
Prof.Dr. Esma TÜTEM (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Prof.Dr. Reşat APAK
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Prof.Dr. Hayati FİLİK
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Prof.Dr. Gülaçtı TOPÇU
İstanbul Teknik Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi



Doç.Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Bu alışma 16/09/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof.Dr. Esmâ TÜTEM (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Prof.Dr. Reşat APAK
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Prof.Dr. Hayati FİLİK
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Prof.Dr. Gülaçtı TOPÇU
İstanbul Teknik Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

Doç.Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin
T-899/27062007 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca gösterdiği her türlü destek, anlayış ve yardımdan dolayı çok değerli hocam Prof.Dr.Esma TÜTEM' e en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Bu çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç.Dr.Kevser SÖZGEN BAŞKAN' a, tecrübelerinden faydalandığım Yüksek Kimyager Şeyda KARAMAN'a ve çalışmalarım süresince hertürlü laboratuvar imkanı sağlayan Analitik Kimya Anabilim Dalı'na ve kürsüdeki tüm hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında desteğini benden esirgemediği gibi bu çalışmam için de ihtiyaç duyduğum her konuda elinden gelen yardımı yapan aileme ve eşim Alper Efe KÜÇÜKÇOBAN'a çalışmamın hazırlanması sırasında göstermiş olduğu destek ve yardımları için çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans öğrenimim boyunca İstanbul'da konaklamamı sağlayan teyzem Makbule EKEN' e teşekkürü borç bilirim. Destekleri için Gözde KANGAL ve Engin ALTAY' a teşekkür ederim. Tez aşamasında deneyleri takip etmem için bana izin veren amirlerim Veli GÖKDERE ve Uğur AFŞAR' a teşekkür ederim.

Tezimle aynı adı taşıyan T-899/27062007 sayılı projeme maddi destek sağlayan İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Eylül, 2009

Çınar KÜÇÜKÇOBAN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİL LİSTESİ	IV
TABLO LİSTESİ	VIII
SEMBOL LİSTESİ	IX
ÖZET.....	X
SUMMARY	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. SERBEST RADİKALLER VE ANTİOKSİDANLAR.....	3
2.2. DOĞAL ANTİOKSİDANLAR.....	5
2.2.1. C Vitamini.....	5
2.2.2. E Vitamini.....	6
2.2.3. Karotenoidler	7
2.2.4. Fenolik Bileşikler.....	8
2.2.4.1. Flavonoidler.....	8
2.2.4.2. Fenolik asitler	15
2.2.4.3. Fenolik Polimerler (Tanenler)	17
2.3. ELEKTRON AKTARIMINA DAYALI TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTE YÖNTEMLERİ.....	18
2.3.1. CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity; Cu(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi.....	18
2.3.2. TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity; Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite)/ABTS Yöntemi	19
2.3.3. FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power; Demir(III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Gücü) Yöntemi.....	21
2.3.4. Folin Ciocalteu Yöntemi.....	21

2.3.5. DPPH Yöntemi	22
2.4. HİDROJEN ATOMU AKTARIMINA DAYALI TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİN YÖNTEMLERİ.....	23
2.4.1. TRAP (Total Radical Trapping Parameter; Toplam Radikal Tutma Parametresi) Yöntemi.....	23
2.4.2. Luminol Yöntemi	24
2.4.3. Diklorofloresin-diasetat (DCFH-DA) Yöntemi	24
2.4.4. Fikoeritrin (PE) Esaslı Yöntemler.....	25
2.4.5. Krosin Yöntemi	26
2.4.6. ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity; Oksijen Radikali Absorplama Kapasitesi) Yöntemi.....	26
2.4.7. TOSC(Total Oxyradical Scavenging Capacity; Toplam Oksiradikal Süpürme Kapasitesi) Yöntemi	27
2.5. ERİĞİN İÇERİĞİ VE SAĞLIK ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ	28
2.6. ERİKTE TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİNİ VE FENOLİK BİLEŞENLERİN BELİRLENMESİ VE MİKTARLANDIRILMASI UYGULAMALARI.....	28
2.7. ÇALIŞILAN ERİK ÇEŞİTLERİ VE ÖZELLİKLERİ.....	34
2.7.1. Can Erikleri.....	35
2.7.2. Japon (İtalyan) Erikleri.....	35
2.7.3. Avrupa Erikleri.....	36
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	37
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR.....	37
3.2. KİMYASAL MADDELER	37
3.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması.....	38
3.3. ANTİOKSİDAN STANDARTLARININ HİDROLİZİ.....	38
3.4. ERİK ÖRNEKLERİNİN ANALİZE HAZIRLANMASI.....	39
3.4.1. Erik Örneklerinin Temin Edilmesi	39
3.4.2. Erik Örneklerinin Dondurularak Kurutulması.....	39
3.4.3. Erik Örneklerinin Su İçeriğinin Belirlenmesi	39
3.4.4. Kurutulmuş Erik Örneklerinin Ekstraksiyonu	39
3.4.5. Örneklerin Hidrolizi	39

3.5. UYGULANAN YÖNTEMLER.....	40
3.5.1. Spektrofotometrik Yöntemler.....	40
3.5.1.1. CUPRAC Yöntemi	40
3.5.1.2. ABTS / HRP Yöntemi.....	40
3.5.2. Kromatografik Yöntem	41
3.5.2.1. HPLC Analizi	41
3.5.3 Birleştirilmiş HPLC- Spektrofotometrik Yöntemler	41
4. BULGULAR	43
4.1. CUPRAC ve ABTS YÖNTEMLERİNİN ÇEŞİTLİ ANTİOKSİDANLARA UYGULANMASI	43
4.2. CUPRAC ve ABTS YÖNTEMLERİYLE ÇEŞİTLİ ANTİOKSİDANLARIN TEAC KATSAYILARININ BELİRLENMESİ	45
4.3. HPLC YÖNTEMİNİN ÇEŞİTLİ ANTİOKSİDANLARA UYGULANMASI	47
4.4. ÇEŞİTLİ ANTİOKSİDAN STANDARTLARININ HİDROLİZ SONUÇLARI.....	49
4.5 ERİK ANALİZLERİNİN SONUCU	53
4.5.1 Erik Örneklerinin Su İçeriği.....	53
4.5.2 Uygun Ekstraksiyon Çözücüsünün Belirlenmesi	53
4.5.3 Erik Örneklerinin Başlıca Fenolik Bileşikleri	59
4.5.3.1 İtalyan Erik.....	59
4.5.3.2 Mürdüm Erik.....	62
4.5.3.2 Can Erik	67
4.5.4 Erik Örneklerinin Toplam Antioksidan Kapasiteleri	68
4.5.4.1 CUPRAC yöntemi ile.....	68
4.5.4.2 ABTS yöntemi ile	68
4.5.4.3 Birleştirilmiş HPLC-CUPRAC yöntemi ile.....	69
4.5.4.4 Birleştirilmiş HPLC-ABTS yöntemi ile	69
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	71
KAYNAKLAR.....	77
ÖZGEÇMİŞ.....	84

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	: Askorbik asitte meydana gelen redoks reaksiyonları.....	6
Şekil 2.2	: α -tokoferol'ün kimyasal yapısı.....	6
Şekil 2.3	: β -karoten, likopen ve lutein'in kimyasal yapıları.....	7
Şekil 2.4	: Flavonoidlerin genel yapısı	9
Şekil 2.5	: Flavonol, flavon, flavanon, flavanol, izoflavon ve antosiyanidin'in kimyasal yapıları	10
Şekil 2.6	: Kuersetin, rutin, izokuersitrin, kamferol, mirisetin ve izoramnetin'in kimyasal yapıları	10
Şekil 2.7	: Apigenin, luteolin ve krisin'in kimyasal yapıları	11
Şekil 2.8	: Kateşin, epikateşin, epigallokateşin, epikateşin gallat ve epigallokateşin gallat'ın kimyasal yapıları.....	11
Şekil 2.9	: Naringin, naringenin, hesperidin, hesperetin'in kimyasal yapıları	12
Şekil 2.10	: Daidzein ve genistein'in kimyasal yapıları	12
Şekil 2.11	: Siyanidin, peonidin, kuromanin, kerasiyanin ve idaein ve peonidin 3-O-glikoziti'in kimyasal yapıları	13
Şekil 2.12	: p-kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit, klorojenik asit, sinapik asit ve neoklorojenik asit'in kimyasal yapıları.....	16
Şekil 2.13	: Gallik, protokateşuik, vanilik asit'in kimyasal yapıları.....	16
Şekil 2.14	: Prosiyanidinlerin genel kimyasal yapısı	17
Şekil 2.15	: Prosiyanidin B1, B2, B3, B4'ün Kimyasal Yapıları.....	18
Şekil 2.16	: (A) Cu(II)-Nc, (B) Cu(I)-Nc komplekslerinin spektrumları.....	18
Şekil 2.17	: ABTS ^{•+} radikal katyonunun yapısı	19
Şekil 2.18	: Radikal katyonunun absorpsiyon spektrumu.....	20
Şekil 2.19	: Can eriği	35
Şekil 2.20	: İtalyan eriği	36
Şekil 2.21	: Mürdüm eriği.....	36
Şekil 4.1	: Çeşitli antioksidan standartlarını içeren sentetik karışımın 280 nm ve 520 nm'deki kromatogramları.....	48
Şekil 4.2	: Kuersetin-3- β -D-Glukozit Standardının 280 nm' deki Kromatogramı .	49

Şekil 4.3	: Rutin standardının $\frac{1}{2}$; 1 ve 2 saat hidroliz sonucu elde edilen hidrolizat kromatogramları.....	49
Şekil 4.4	: Rutin standardının hidroliz öncesi ve 2 saat hidrolizi sonucu elde edilen kromatogramlar	50
Şekil 4.5	: Kuromanin klorür standardının hidrolizati	50
Şekil 4.6	: Kuromanin klorür standardının 2 saat hidrolizati	51
Şekil 4.7	: Kerasiyanin klorür standardının hidrolizati	51
Şekil 4.8	: Kerasiyanin klorür standardının 2 saat hidrolizati	52
Şekil 4.9	: Kerasiyanin klorür standardının 4 saat hidrolizati	52
Şekil 4.10	: Mürdüm eriği kabuk ekstaktlarının mor ötesi-görünür bölge spektrumları.....	53
Şekil 4.11	: %80 Metanol içeren Mürdüm eriği kabuk ekstaktlarının mor ötesi-görünür bölge spektrumları	54
Şekil 4.12	: %50 Metanol ile ekstrakte edilmiş Mürdüm eriği HPLC kromatogramı (280nm).....	54
Şekil 4.13	: %80 Metanol ile ekstrakte edilmiş Mürdüm eriği HPLC kromatogramı (280nm).....	55
Şekil 4.14	: % 15 asetik asit içeren %50 Metanol ile ekstrakte edilmiş Mürdüm eriği HPLC kromatogramı (280 nm)	55
Şekil 4.15	: % 2 hidroklorik asit içeren %50 Metanol ile ekstrakte edilmiş Mürdüm eriği HPLC kromatogramı (280 nm).....	55
Şekil 4.16	: % 15 asetik asit içeren %80 Metanol ile ekstrakte edilmiş Mürdüm eriği HPLC kromatogramı (280 nm)	56
Şekil 4.17	: % 2 hidroklorik asit içeren %80 Metanol ile ekstrakte edilmiş Mürdüm eriği HPLC kromatogramı (280 nm).....	56
Şekil 4.18	: İtalyan erik ekstaktlarının mor ötesi-görünür bölge spektrumları.....	57
Şekil 4.19	: %2 HCl içeren %70 Metanol ile ekstrakte edilmiş İtalyan erik kromatogramı (280 nm)	57
Şekil 4.20	: %2 HCl içeren %50 Metanol ile ekstrakte edilmiş İtalyan erik kromatogramı (280 nm)	58
Şekil 4.21	: Can erik ekstaktlarının mor ötesi-görünür bölge spektrumları	58
Şekil 4.22	: %70 metanol ile ekstrakte edilmiş Can erik kromatogramı.....	59
Şekil 4.23	: %50 metanol ile ekstrakte edilmiş Can erik kromatogramı.....	59

Şekil 4.24	: %2 HCl içeren %50 Metanol ile ekstrakte edilmiş İtalyan eriğın 280 nm'deki kromatogramı.....	60
Şekil 4.25	: %2 HCl içeren %50 Metanol ile ekstrakte edilmiş İtalyan eriğın 520 nm'deki kromatogramı.....	60
Şekil 4.26	: %2 HCl içeren %50 Metanol ile ekstrakte edilmiş İtalyan eriğın 280 ve 520 nm'deki kromatogramı.....	60
Şekil 4.27	: İtalyan erik ekstrakt hidrolizatının 280 nm'deki kromatogramı.....	61
Şekil 4.28	: İtalyan eriğın ekstrakt hidrolizatı 520 nm'deki kromatogramı.....	61
Şekil 4.29	: İtalyan erik ekstrakt hidrolizatının 280 ve 520 nm'deki kromatogramı	62
Şekil 4.30	: %2 HCl içeren %50 Metanol ile ekstrakte edilmiş Mürdüm eriğın 280 nm'deki kromatogramı.....	62
Şekil 4.31	: %2 HCl içeren %50 Metanol ile ekstrakte edilmiş Mürdüm eriğın 520 nm'deki kromatogramı.....	63
Şekil 4.32	: %2 HCl içeren %50 Metanol ile ekstrakte edilmiş Mürdüm eriğın 280 ve 520 nm'deki kromatogramı.....	63
Şekil 4.33	: %2 HCl içeren %50 Metanol ile ekstrakte edilmiş Mürdüm erik kabuğının 280 nm'deki kromatogramı.....	64
Şekil 4.34	: %2 HCl içeren %50 Metanol ile ekstrakte edilmiş Mürdüm erik kabuğının 520 nm'deki kromatogramı.....	64
Şekil 4.35	: Mürdüm erik kabuk ekstraktının 280 ve 520 nm'deki kromatogramı...	65
Şekil 4.36	: Mürdüm erik ekstrakt hidrolizatının 520 nm'deki kromatogramı.....	65
Şekil 4.37	: Mürdüm erik kabuğu ekstrakt hidrolizatının 520 nm'deki kromatogramı.....	66
Şekil 4.38	: Mürdüm erik ekstrakt ve hidrolizatının 280 nm'deki kromatogramı	66
Şekil 4.39	: Mürdüm erik ekstrakt ve hidrolizatının 520 nm'deki kromatogramı	67
Şekil 4.40	: Can erik ve can erik kabuk ekstraktının 280 nm'deki kromatogramı ...	67
Şekil 4.41	: Can erik ve can erik kabuk ekstrakt hidrolizatının 280 nm'deki kromatogramı.....	68

TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1	: Çeşitli antioksidanlar için normal CUPRAC yöntemi verileri.....	43
Tablo 4.2	: Çeşitli antioksidanlar için inkübasyonlu CUPRAC yöntemi verileri....	44
Tablo 4.3	: Çeşitli antioksidanlar için ABTS / HRP yöntemi verileri.....	45
Tablo 4.4	:Çeşitli antioksidanların CUPRAC ve ABTS yöntemlerine göre belirlenen TEAC değerleri	46
Tablo 4.5	: Çeşitli antioksidanların 280 nm'deki HPLC verileri.....	47
Tablo 4.6	: Çeşitli antosiyaninlerin 520 nm'deki HPLC verileri.....	48
Tablo 4.7	: Erik ekstraktlarının CUPRAC yöntemi ile bulunmuş toplam antioksidan kapasiteleri (mmol troloks g ⁻¹).....	68
Tablo 4.8	: Erik ekstraktlarının ABTS yöntemi ile bulunmuş toplam antioksidan kapasiteleri (mmol troloks g ⁻¹).....	69
Tablo 4.9	:Erik ekstraktlarının Birleştirilmiş HPLC-CUPRAC yöntemi ile bulunmuş toplam antioksidan kapasiteleri (mmol troloks g ⁻¹).....	69
Tablo 4.10	: Erik ekstraktlarının Birleştirilmiş HPLC-ABTS yöntemi ile bulunmuş toplam antioksidan kapasiteleri (mmol troloks g ⁻¹)	70
Tablo 5.1	: Erik ekstraktlarında HPLC ile belirlenebilen toplam antioksidan kapasite %' leri.....	73
Tablo 5.2	: Erik ile yapılan HPLC çalışmalarının karşılaştırılması.....	74
Tablo 5.3	: Erik ekstraktlarında toplam antioksidan kapasite çalışmalarının karşılaştırılması	75

SEMBOL LİSTESİ

CUPRAC	: bakır(II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi
Cu(II)-Nc	: bakır(II)-neokuproin
Cu(I)-Nc	: bakır(I)-neokuproin
ABTS	: 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)
ABTS^{•+}	: ABTS radikal katyonu
TEAC	: trolox eşdeğeri antioksidan kapasitesi
HPLC	: yüksek performanslı sıvı kromatografisi
RP-HPLC	: ters faz-yüksek performanslı sıvı kromatografisi
FRAP	: demir(III) iyonu indirgeyici antioksidan gücü
TPTZ	: tripidiltriazin
FCR	: Folin-Ciocalteu reaktifi
TRAP	: toplam radikal tutma parametresi
DCFH-DA	: diklorofloresin-diasetat
DCF	: diklorofloresin
PE	: fikoeritrin
DPPH	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
ORAC	: oksijen radikal absorban kapasitesi
AUC	: eğri altında kalan alan
KMBA	: α -keto- γ metiolbutirik asit
CUPRAC_N	: normal CUPRAC yöntemi
CUPRAC_i	: inkübasyonlu CUPRAC yöntemi
TR	: trolox
ROS	: reaktif oksijen türleri
LDL	: düşük yoğunluklu lipoprotein
UV	: ultraviyole
ϵ	: molar absorplama katsayısı
M	: molar derişim

ÖZET

TÜRKİYE’DE YETİŞTİRİLEN BAZI ERİK ÇEŞİTLERİNİN TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİNİN VE BAŞLICA ANTİOKSİDAN BİLEŞENLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

İnsan sağlığı açısından büyük risk oluşturan pek çok hastalığın (başta kanser olmak üzere kalp ve damar hastalıkları dahil) ortaya çıkmasını engelleyen ve birçok bitki türünde bol miktarda bulunan fenolik bileşikler (polifenoller) insan sağlığı üzerindeki bu etkileri nedeniyle biyolojik aktif maddeler olarak adlandırılmakta ve pek çok çalışmaya konu olmaktadır. Metabolik reaksiyonlar sonucu oluşan serbest radikalleri tutma etkilerinden dolayı bu bileşiklerin en önemli özelliklerinden biri antioksidan aktiviteleridir. Meyve, sebze ve diğer pek çok bitkisel üründe bulunan bu bileşikler aynı zamanda bitkilerin renk, tat ve lezzetinden sorumlu oldukları gibi besin kalitesini de etkilerler.

Yaş ve kurutulmuş olarak yılın büyük kısmında var olması, göreceli ucuzluğu ve pek çok insanın ağız tadına uygunluğu gibi nedenlerle insanların en çok tükettiği meyvelerden olan eriğin ülkemizde yetişen bazı çeşitlerinin toplam antioksidan kapasitelerinin ve bu kapasiteye etki eden bileşenlerinin nitel ve nicel karşılaştırılması bu çalışmanın amacını oluşturmaktadır.

Toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde daha önce indirgen özelliğe sahip bazı maddelerin analizinde yararlandığımız Cu(II)-Nc (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) reaktifinin kullanımı ile gerçekleştirilen ve trolox eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) tayin metodu olarak da benzer amaçlı birçok çalışmada kullanılmış olan, uygulaması basit ve maliyeti düşük CUPRAC yöntemi, karşılaştırma yöntemi olarak ise trolox eşdeğeri antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde yaygın kullanımı olan ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) radikal katyonu ile gerçekleştirilen yöntem kullanılmıştır. Antioksidan özellik gösteren başlıca bileşiklerin tek tek tanımlanmasında ve miktarlandırılmasında ise HPLC yönteminden yararlanılmıştır.

Çalışılan eriklerin toplam antioksidan kapasiteleri CUPRAC yöntemine göre İtalyan > Mürdüm > Can, ABTS yöntemine göre ise İtalyan > Mürdüm $\cong$ Can şeklindedir. Sıralamadaki küçük farklılık, her iki yöntemde çeşitli flavonoidlerin TEAC katsayılarının aynı olmayışından kaynaklanmaktadır. HPLC ile belirlenen bileşenlerden birleştirilmiş HPLC-spektrofotometrik yöntemlerle hesaplanan toplam antioksidan kapasiteler ise spektrofotometrik yöntemle bulunan değerlerin %17.6 - 47.4 aralığındadır. Bunun başlıca sebebi standart eksikliği nedeniyle belirlenemeyen bileşenlerdir.

SUMMARY

COMPARISON OF TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITIES AND PRINCIPAL COMPONENTS WITH ANTIOXIDANT CAPABILITIES OF SOME PLUM VARIETIES CULTIVATED IN TURKEY

Phenolic compounds (polyphenols) prevent many diseases (especially cancer, coronary & cardiovascular diseases) as great risks for human health and are abundantly present in many plants. As a result of this effect on human health, phenolic compounds are named as biologically active compounds and subjected to many studies. One of the most important properties of these compounds is antioxidant activity due to scavenging of free radicals produced with metabolic reactions. Meanwhile these compounds present in fruits, vegetables and many other plant varieties are responsible for their colour, flavour and taste, as well as their food quality.

Aim of this study is to compare of total antioxidant capacities and principal antioxidant components of some plum varieties cultivated in Turkey, qualitatively and quantitatively. Because plum is an abundantly consumed fruit as fresh and dried owing to its presence in major time of year, relatively cheap and tasty fruit for many people.

Total antioxidant capacities (TAC) will be measured with the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) method which is a simple and low-cost assay that has reported the results as trolox equivalent antioxidant capacities (TEAC values) in many published literature, using the copper(II)-neocuproine (2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline) reagent previously used for assaying some important reducing agents. The TAC results obtained with CUPRAC have been compared to those found by decolorization assay of radical cation ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) generated with persulfate. The individual antioxidant compounds have been identified and quantified by HPLC (high performance liquid chromatography).

TAC results of plums studied were as Italian > Mürdüm > Can and Italian > Mürdüm $\cong$ Can according to CUPRAC and ABTS methods, respectively. Small difference at the order is resulted from differences of TEAC values of various flavonoids by both methods. TAC results calculated from individual constituents quantified by HPLC with combined HPLC-spectrophotometric methods. Main reason of this case is unidentified constituents due to the lack of standard materials.

1. GİRİŞ

Süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikal gibi reaktif oksijen türleri (ROS); hücre membranlarının parçalanmasına, dengesinin bozulmasına ve birçoğu yaşa bağlı olan hastalıklara yol açan bazı biyolojik moleküllere saldıran normal metabolizmanın yan ürünleridir [1]. Bu türlerin, organizmada var olan veya gıdayla alınan antioksidanlarla dengelenememesi durumunda oluşan 'oksidatif stres' DNA ve hücre membranları gibi duyarlı biyolojik yapıların oksidatif hasarına neden olan radikalik zincir reaksiyonlarını başlatırlar. Bunun sonucunda başta kanser olmak üzere, kalp-damar hastalıkları ve şeker hastalığı gibi hastalıklara yol açarlar [2,3].

Meyve ve sebzelerdeki fenolik bileşikler serbest radikalleri süpürme özelliği ile yararlı etkiler ortaya koyabilir. Fenolik bileşiklerin çoğunun antioksidan aktiviteye sahip olduğu bilinir ve serbest radikallerin sebep olduğu oksidatif hasara karşı hücreleri korumaya yardımcı olabilir. Bitki polifenolik bileşikleri multifonksiyonel özelliklere sahip olabilir ve indirgeyici madde, hidrojen verici antioksidan ve singlet oksijeni bastırıcı olarak rol oynayabilir. Antioksidan fenolik bileşiklerin uygun beslenme kaynaklarını belirlemeye duyulan ilgi giderek artmaktadır [1-3].

Hidroksinnamik asitler, flavonoller ve antosiyaninler gibi çeşitli fenolik bileşikler içerdiği belirlenen eriklerin yüksek polifenolik içeriğinden dolayı etkili aktiviteye sahip olduğu kanıtlanmıştır. Neoklorojenik asitin taze ve kuru erikte bulunan en baskın polifenol olduğu ve önemli bir flavonol olan kuarsetin 3-rutinozitin nispeten düşük seviyelerde bulunduğu bilinmektedir. Buna ek olarak sarı erik haricindeki bütün erik türleri genellikle siyanidin 3-rutinozit gibi antosiyaninler içerir [1].

Toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesinde kullanılan çok sayıda yöntem arasında ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzotiyazolin-6-sülfonat) yöntemi, uluslararası literatürde yaygın kullanım bulmaktadır [4-7]. CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity, Cu(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite) yöntemi ise

anabilim dalımızda geliştirilen, kayısıda, elmada, bitki çaylarında, maydonoz, kereviz, ısırgan gibi bitkilerde ve serumda toplam antioksidan kapasite tayininde uygulanmış [8,9] kolay ve ucuz bir yöntemdir. HPLC (high performance liquid chromatography, yüksek performanslı sıvı kromatografisi), çok bileşenli pek çok örnekte olduğu gibi erik ve erik kısımlarındaki polifenolik bileşiklerin belirlenmesi amacıyla yaygın kullanımı olan bir yöntemdir [10,11].

Bu çalışmada Latince adı *Prunus Domestica* olan eriğin ülkemizde yetişen Can, Mürdüm ve İtalyan eriği çeşitlerinin toplam antioksidan kapasitelerinin CUPRAC ve ABTS yöntemleriyle ve bu kapasiteye etki eden bileşenlerinin HPLC yöntemiyle nitel ve nicel karşılaştırılması yapılmıştır. HPLC yöntemi ile belirlenen antioksidan bileşenlerin derişimlerinin TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity, troloks eşdeğeri antioksidan kapasite) katsayıları ile (Bir antioksidanın TEAC katsayısı, o antioksidanın 1 mM'lık çözeltisinin indirgeme gücü bakımından eşdeğer olduğu troloks çözeltisinin mM derişimidir) çarpılarak bulunan toplam antioksidan kapasite, CUPRAC ve ABTS yöntemleri ile elde edilen toplam antioksidan kapasite değerleri ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca erik çeşitlerindeki fenolik bileşiklerin nitel ve nicel değerlendirilmesi yapılmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. SERBEST RADİKALLER VE ANTİOKSİDANLAR

Dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektronu bulunan moleküllere serbest radikaller denir. Bu tip maddeler, eşleşmemiş elektronları olması sebebiyle oldukça reaktiftirler. Biyolojik sistemlerde serbest radikaller önemli role sahiptir. Serbest radikaller herhangi bir etkileşime girerek elektron alırlar verirler. Bu nedenle, pozitif, negatif veya nötral olabilirler. Oksijen türevi serbest radikaller proteinlere, yağlara, karbonhidratlara ve nükleik asitlere zarar verebilir. Plazma membranları, serbest radikal reaksiyonlarının en önemli hedefidir.

Antioksidanlar ise radikal oluşumunun sınırlandırılması, radikal reaksiyonlarının sona erdirilmesi, oluşan radikallerin etkisiz hale getirilmesi ve hasarlı moleküllerin ortadan kaldırılmasından sorumlu moleküllerdir. Reaktif oksijen türlerinin üretimi ve çeşitli antioksidan savunmaları arasındaki dengesizlik, antioksidanların yetersizliğinden ve/veya reaktif oksijen türlerin artan oluşumundan kaynaklanan oksidatif stresle sonuçlanır [12].

Antioksidanlar, yiyeceklerde veya vücutta düşük derişimlerde bulunduğu zaman, oksidasyonu önemli derecede engelleyen veya geciktiren maddelerdir [13]. Prooksidanlar ise lipidler, proteinler ve nükleik asitlerde oksidatif hasara sebep olan ve bunun sonucunda çeşitli patolojik olaylara ve/veya hastalıklara yol açan zararlı maddelerdir. Prooksidan terimi, reaktif türler için kullanılan bir terimdir. Antioksidanlar, hücrelere zarar veren bu prooksidanları (reaktif oksijen ve azot türleri, serbest radikaller) etkin bir şekilde indirgeyerek az zararlı veya zararlı olmayan ürünlere dönüştürürler. Bu tehlikeli bileşiklerin varlığı, sağlıklı bir yaşam için antioksidanları önemli kılmaktadır [14].

Antioksidanların en önemlileri polifenoller ve bunların türevleridir. Polifenolik bileşikler; kimyasal yapıları basit bileşiklerden yüksek polimerleşmiş maddelere kadar çeşitlenebilen bitkisel maddelerdir [15]. Bu bileşikler oksidatif düzende farklı şekillerde davranırlar. Örneğin, oksijen derişimini düşürebilirler veya singlet oksijeni durdururlar.

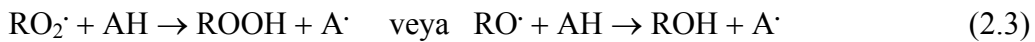
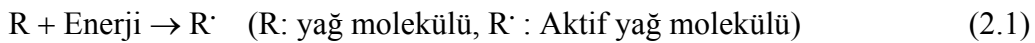
Hidroksil radikalleri gibi birincil radikalleri yutucu özelliğini kullanarak zincir tepkimelerinin başlamasını önlerler, metal iyon katalizörlerini bağlarlar [16].

Antioksidanlar, gıdalarda doğal olarak bulundukları gibi, gıda endüstrisinde ürünlerin kalitesini korumak ve besin değerlerini muhafaza etmek amacıyla sonradan da eklenirler. Besinlerin acılaşmasını, çürümesini geciktirici özelliğe sahip kimyasal maddelerdir. Özellikle yağlarda, havadaki oksijenin sebep olduğu otooksidasyonu yavaşlatmak için kullanılmaktadırlar. Böylelikle yağların tadını, kokusunu, rengini yani kalitesini ve raf ömrünü uzatırlar. Ortamda pek az miktarlarda bulunsalar bile etkin olan maddelerdir [15].

Antioksidanlar; vücut hücreleri tarafından üretildikleri gibi, gıdalar yoluyla da alınabilmektedir. Gıdalarda mevcut olan ve insan vücudunu zararlı serbest radikallerden koruyan başlıca doğal antioksidanlar, esas olarak vitaminler (C, E ve A vitaminleri), karotenoidler ve polifenolik bileşiklerdir. Çoğu araştırmada meyve ve sebze tüketimi ile belirli kanser ve kalp hastalıklarının oluşumu arasında ters orantılı bir ilişki olduğu saptanmıştır [17].

Zincirleme reaksiyon teorisine göre, oksijen ile otookside olabilen madde, oksijenle birleşmekte ve bu şekilde meydana gelen etkinleşmiş peroksit radikal ve molekülleri, enerjilerini maddenin yükseltgenebilen diğer moleküllerine aktarmakta ve bu suretle besinlerdeki otooksidasyon devam etmektedir. Antioksidanlar bu zincir reaksiyonunu koparıcı rol oynarlar. Yani bu bileşikler aktivasyon enerjisini kabul ederler, ancak bu enerjiyi başka moleküllere aktaramazlar. Bu şekilde, bir antioksidan molekülünün araya girmesiyle otookside olabilen maddenin birçok molekülü yükseltgenmekten kurtulur [15].

Antioksidanların etki mekanizmaları şematik olarak aşağıdaki gibi gösterilebilir:



(AH: Antioksidan molekülü, A[·] : Antioksidan etkin molekülü)

Antioksidanlar yükseltgenebilen maddeler olduğundan zincirleme reaksiyonu koparmaları 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.

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

- Radikal süpürme yeteneği
- Hidrojen veya elektron donör olarak göstermiş olduğu reaktivite (redüksiyon potansiyeline bağlı olan)
- Metal kelatlama potansiyeli
- Diğer antioksidanlarla olan etkileşim [17].

2.2. DOĞAL ANTIOKSIDANLAR

2.2.1. C Vitamini

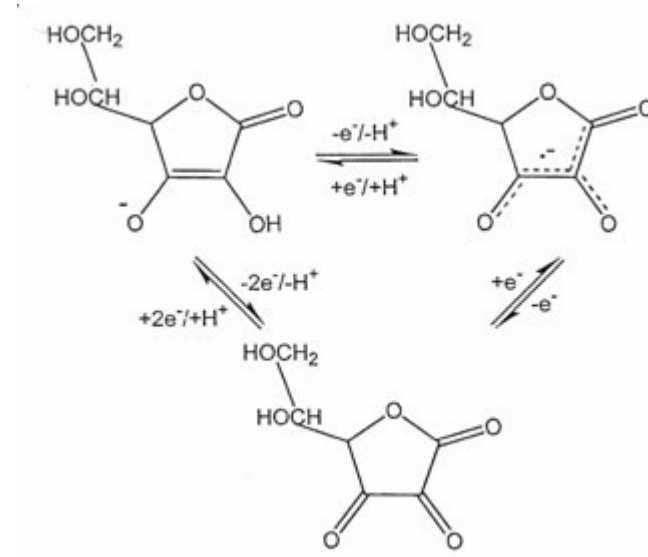
Organizmanın en çok gereksinim duyduğu C-vitamini (Şekil 2.1), diğer adıyla askorbik asit, meyve ve sebzelerde bulunup, suda çözünebilen ve serbest radikalleri doğrudan söndürebilen güçlü bir antioksidan kaynağıdır [18].

Özellikle çilek, papaya, portakal, kivi, greyfurt, kavun, mango gibi meyvelerde, brokoli, brüksel lahanası, kırmızı veya yeşil biber, domates, lahana, patates, karnıbahar gibi sebzelerde, portakal suyu, domates suyu gibi meyve sularında bol miktarda bulunmaktadır [19].

C vitamini, reaktif oksijen (süperoksit, peroksil radikalleri, singlet oksijen, ozon), reaktif azot (peroksinitrit, azot dioksit) ve reaktif klor (hipoklorik asit) türlerini kolayca süpürür ve bu suretle diğer substratları oksidatif hasardan korur [15].

Askorbat (AH^-)

Askorbil Radikali ($A^{\cdot-}$)

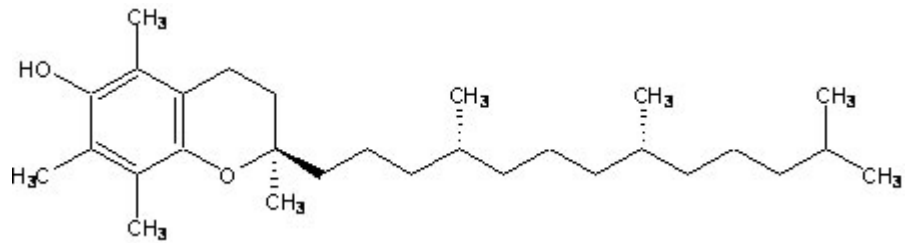


Şekil 2.1: Askorbik asitte meydana gelen redoks reaksiyonları

2.2.2. E Vitamini

Doğada 7 farklı izomer yapısında bulunan tokoferoller, başlıca bitkisel ürünlerde mevcuttur. Hayvan organizması pek az miktarda içerir. Özellikle bitkisel yağlarda, yeşil yapraklı sebzelerde, baklagillerde, ceviz, fındık, süt, yumurtada bulunurlar [15].

E vitamini vücut dokularında etkili bir zincir kırıcıdır ve antioksidan özellik göstermektedir. Bu vitaminin lipid peroksidasyonuna karşı savunma etkisinin olduğu ve hücre membranlarını serbest radikal saldırılarına karşı koruduğu düşünülmektedir [20,21].



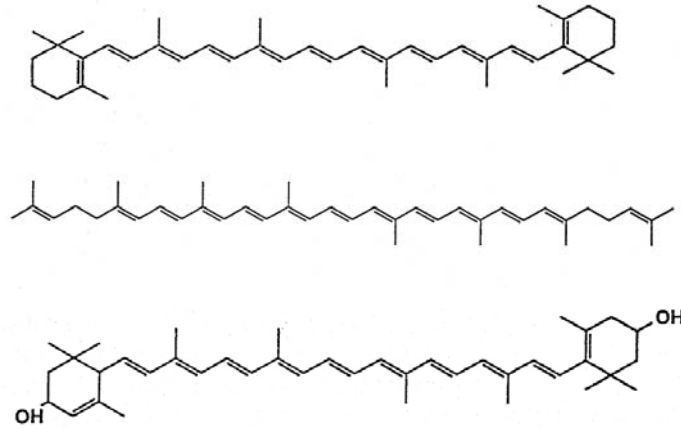
Şekil 2.2: α -tokoferol'ün kimyasal yapısı

2.2.3. Karotenoidler

Doğal pigmentler olan karotenoidler bitkilerde ve çoğu mikroorganizmalarda sentezlenir. Şimdiye kadar doğal kaynaklardan 600'ü aşkın karotenoid izole edilmiştir [22]. Çoğu çiçek ve meyvelerin renkleri gibi birçok kuş, böcek ve deniz hayvanlarının renklerinden de sorumludurlar. Karotenoidler, yağda çözünen poliizoprenoid bileşiklerdir ve 2 ana gruba ayrılırlar.

- Karotenler veya sadece hidrojen ve karbon içeren hidrokarbon karotenoidler
- Hidroksi, keto, epoksi, metoksi veya karboksilik asit grubu gibi en az bir oksijen grubu taşıyan oksijenlenmiş hidrokarbon türevleri olan ksantofiller [23].

Likopen, β -karoten ve α -karoten, karotenler olarak adlandırılan; β -kriptoksantin, lutein ve zeaksantin, ksantofiller olarak adlandırılan karotenoid sınıfına örnek olarak verilmektedir [19]. Yapılarındaki konjuge çift bağlar, kimyasal, biyokimyasal ve fiziksel özelliklerini etkiler [23].



Şekil 2.3: β -karoten, likopen ve lutein'in kimyasal yapıları

Karotenoidlerin hidroksil grubu taşıyanları (ksantofiller) genellikle glikozitleri halinde veya uzun zincirli yağ asitleriyle esterleşmiş halde bulunurlar [24].

Karotenoidlerin insan sağlığı üzerinde önemli etkileri vardır [19]. Karotenoidlerin yapısındaki konjuge çifte bağlar yüksek antioksidan aktivite göstermelerine yol açmaktadır [25,26]. Dolayısıyla karotenoidler biyolojik antioksidan gibi davranmaktadırlar [27]. Karotenoidlerin singlet oksijen türleri ve serbest radikalleri

süpürücü etkisi vardır [25,26]. Karotenoidlerin karakteristiği olan konjuge çifte bağlar bazı koşullarda prooksidan aktivite de gösterebilmektedir. β -karoten fizyolojik koşullar altında, düşük oksijen basıncında serbest radikal süpürücü etkiye sahiptir ancak yüksek oksijen basıncında prooksidan etki göstermektedir [19].

2.2.4. Fenolik Bileşikler

Polifenoller; bitki dünyasının büyük bir kısmında bulunan, fitokimyasalların en geniş sınıflarından birini oluşturan ve insan yaşamında gerekli olan bileşiklerdir.

Polifenoller güçlü antioksidanlardır ve aktiviteleri kimyasal yapılarına bağlıdır. Bitki polifenoller çok fonksiyonlu olup, indirgeme aracı, hidrojen atomu verici ve singlet oksijen söndürücü olarak davranırlar. Bazı polifenoller ise metal iyonu kelatlama özelliklerine sahip antioksidanlar olarak etkilidirler [28]. Bir polifenoün antioksidan olarak tarif edilebilmesi için iki temel şartı sağlaması gerekir:

1. Okside olabilen substratlara oranla düşük derişimlerde bulunduklarında, otoksidasyonu veya serbest radikal merkezli oksidasyonu erteleyebilmeli, geciktirebilmeli veya önleyebilmelidir [29].
2. Süpürme sonunda oluşan radikal, oksidasyon zincir reaksiyonunu kesmekte kararlı olmalıdır [30].

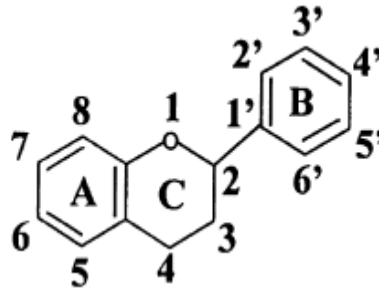
Besin fenolikleri; flavonoidler, fenolik asitler, fenolik polimerler (tanenler) olmak üzere üç sınıfa ayrılır.

2.2.4.1. Flavonoidler

Bitki fenollerinin en geniş sınıfını difenilpropan ($C_6C_3C_6$) iskeletine sahip flavonoidler oluşturmaktadır [19]. Flavonoidler; önemli antioksidan ve kelatlama özelliğine sahip, düşük molekül ağırlıklı ve en geniş bitki fenolikleri sınıfıdır. 6 karbonlu A, B ve 3 C'lu C halkalarından oluşan heterosiklik bileşikler, hetero halkanın yükseltgenme derecesine göre farklılaşırlar. Aromatik halkalar A ve B, hetero halka ise C olarak ifade edilir. Karbon atomları C halkasındaki oksijenden başlayarak, B halkasındaki karbon atomları ise üssü (') rakamlarla numaralandırılır (Şekil 2.4). Doğada, birçoğu yaprak, çiçek ve

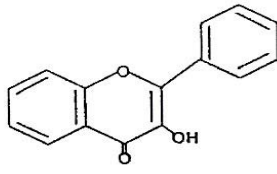
kökte bulunan 4000'den fazla flavonoid çeşidi vardır. Meyve, sebze, şarap, kakao ve çayda bol miktarda bulunurlar. Antioksidan aktivitelerini belirleyen ve aromatik halkalara bağlı olan birçok fenolik hidroksil grubu içerirler. Metal kelatlama, lipid peroksidasyonunu engelleme, reaktif oksijen türlerini içeren diğer prosesleri azaltma özellikleri vardır.

Çoğu flavonoid doğada D-glikoz, L-ramnoz, glukoramnoz, galaktoz, lignin ve arabinoz gibi şekerli bileşikleri (glikozidler) şeklinde bulunur [31]. Bağırsaklarda hidrolizlenerek biyolojik bakımdan aktif aglikonlara dönüşürler [32]. İnsan ve hayvanlarda mide-bağırsak sisteminden emilirler veya değişmeden ya da metabolitleri halinde idrar ve dışkı ile atılırlar. Lipid peroksidasyonunu inhibe eden flavonoidler etkili antioksidan, serbest radikal süpürücü, metal kelatlayıcıdır [33].

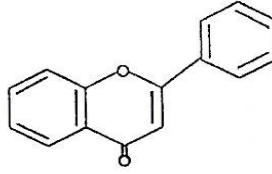


Şekil 2.4: Flavonoidlerin genel yapısı

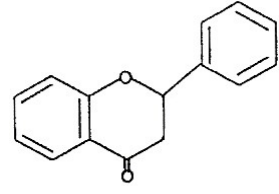
Flavonoidler; antosiyaninler ve antoksantrinler şeklinde sınıflandırılır. Antoksantrinler, renksiz veya beyazdan sarıya dönük renkte olurlar ve flavonol, flavanol, flavon, flavanon ve izoflavonlar olarak sınıflandırılırlar. Antosiyaninler, antosiyanidinlerin glikozitleri olup çiçeklere ve meyvelere kırmızı, mavi ve mor renkleri veren, suda çözülebilen en önemli bitki pigment sınıfıdır [19]. Flavanonlar ve flavonlar çoğunlukla birlikte bulunur ve belirli enzimlerle bağlıdırlar. Çoğu bitki familyasında, flavonlar ve flavonoller arasında karşılıklı bir dışlama vardır ve flavanonca zengin bitkilerde antosiyaninler neredeyse hiç yoktur [34].



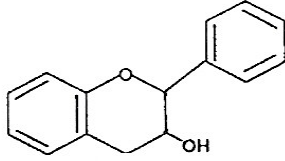
Flavonol



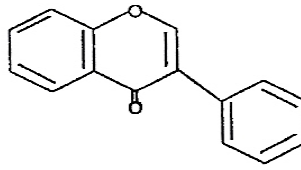
Flavon



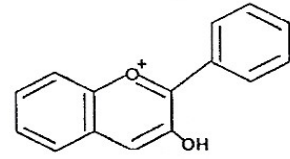
Flavanon



Flavanol



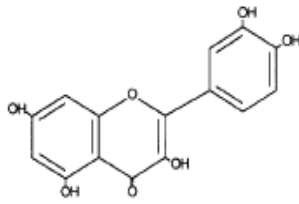
İzoflavon



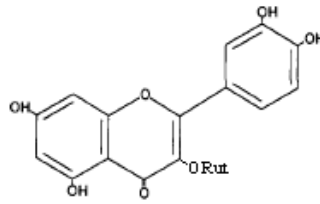
Antosiyanidin

Şekil 2.5: Flavonol, flavon, flavanon, flavanol, izoflavon ve antosiyanidin'in kimyasal yapıları

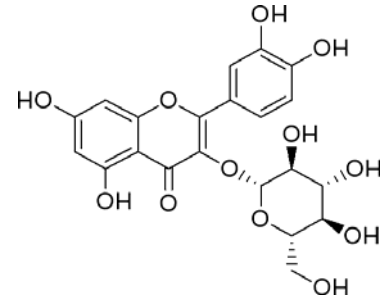
Flavonoller (3-hidroksiflavon), flavonun 3 no'lu C atomuna bağlı bir hidroksil grubu taşırlar. Flavonoidlerin bitkilerde en yaygın olarak bulunan sınıfıdır. En önemli flavonoller; kuersetin, glikozitlenmiş kuersetin (rutin), kamferol, mirisetin, izoramnetindir. Kuersetin, flavonoidlerin en önemli bileşiği ve bitkilerin temel fenolik bileşenidir, elmada, soğanda, çayda ve lahanada bol miktarda bulunmaktadır [28,35].



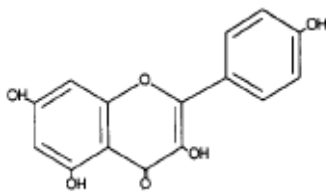
Kuersetin



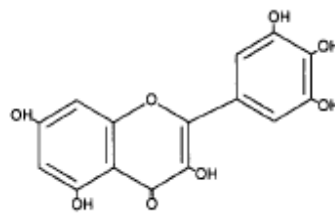
Rutin



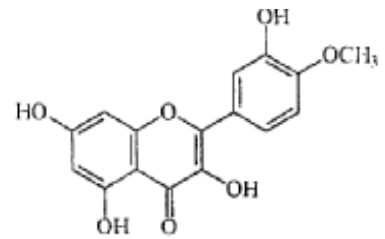
İzokuersitrin



Kamferol



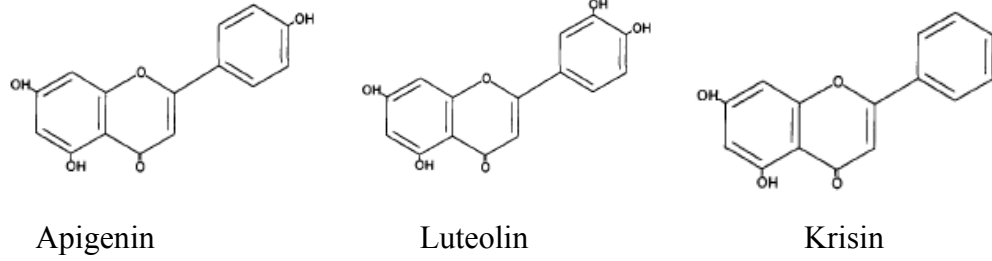
Mirisetin



İzoramnetin

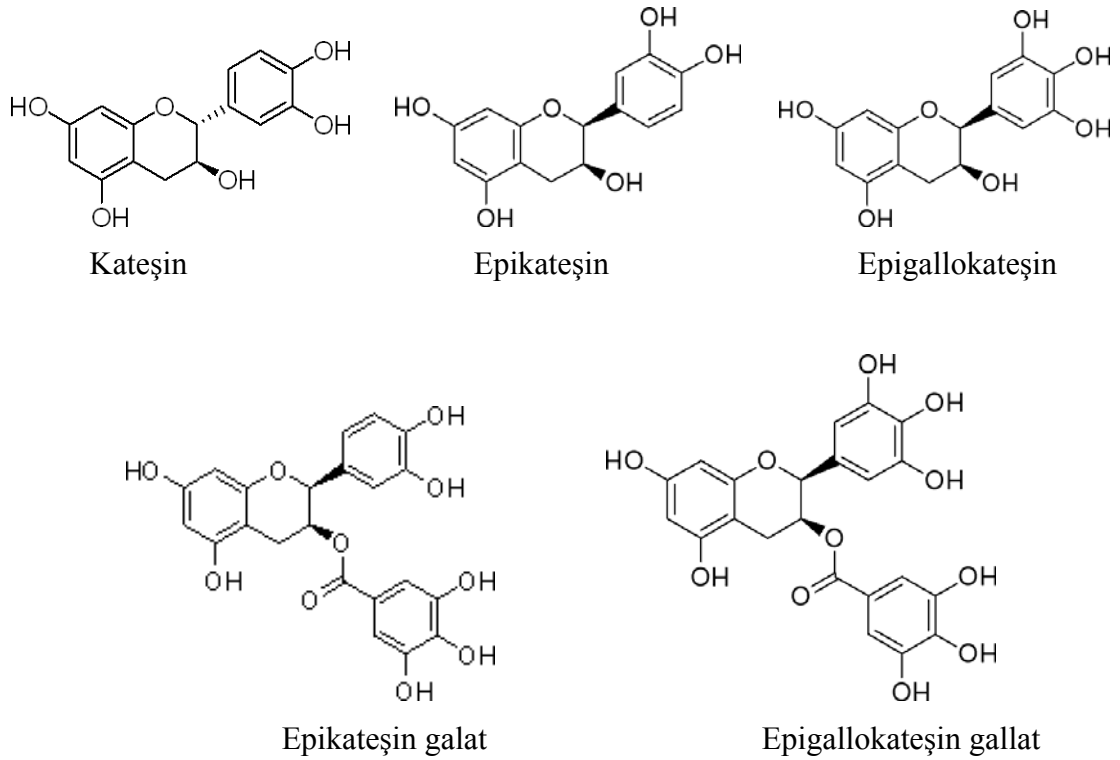
Şekil 2.6: Kuersetin, rutin, izokuersitrin, kamferol, mirisetin ve izoramnetin'in kimyasal yapıları

Flavon sınıfına ait temel bileşikler; apigenin, luteolin ve krisindir. Maydanoz, kereviz ve zeytinde bol miktarda bulunmaktadır [35].



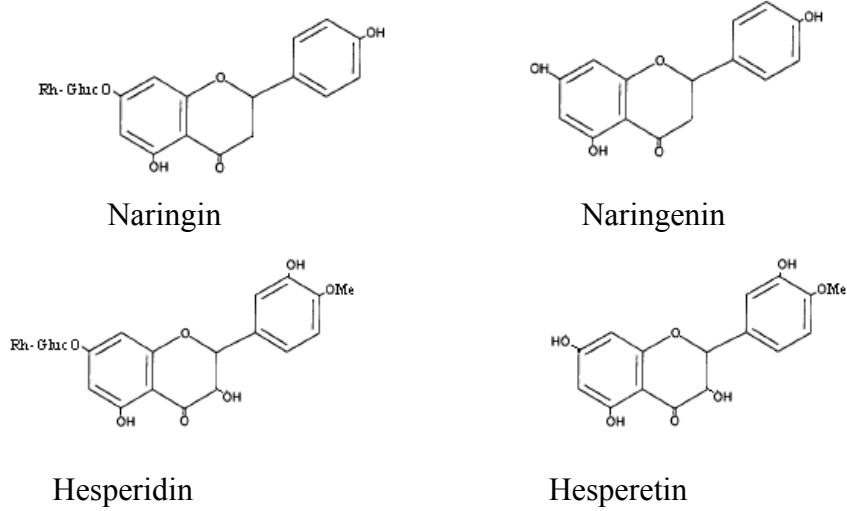
Şekil 2.7: Apigenin, luteolin ve krisin'in kimyasal yapıları

Flavanoller ise flavonların indirgenmiş türevleridir. En önemlileri kateşin ve epikateşin'dir. Kateşin ve epikateşinin gallik asitle kombinasyonları sonucu kateşin ve epikateşin gallatlar meydana gelir. Bu bileşikler çoğunlukla yeşil çay, kırmızı şarap, şeftalide fazla miktarda, ayrıca beyaz şarap ve elmada bulunurlar [17,19,28].



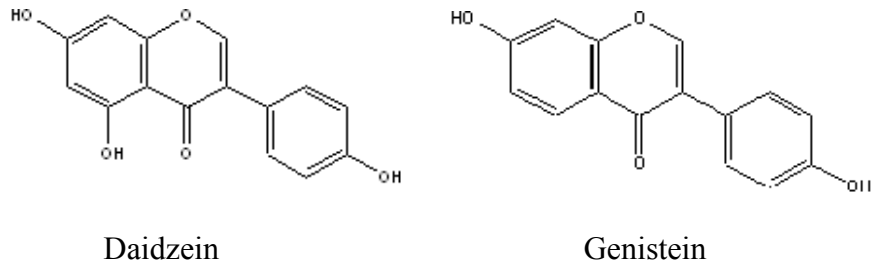
Şekil 2.8: Kateşin, epikateşin, epigallokateşin, epikateşin gallat ve epigallokateşin gallat'ın kimyasal yapıları

Flavonun dihidro türevleri ise flavanonlardır. En önemlileri naringenin, naringin, hesperidin ve hesperetindir. Naringenin, 3'-hidroksi flavanondur. Greyfurtun karakteristik acılığını veren bileşik naringenin glikoziti naringindir. Naringenin aglikonu olan naringenin ise acı değildir. Hesperidin ve hesperetin limon ve portakalda yüksek miktarda bulunur. Hesperidin, hesperetin glikozitidir [36].



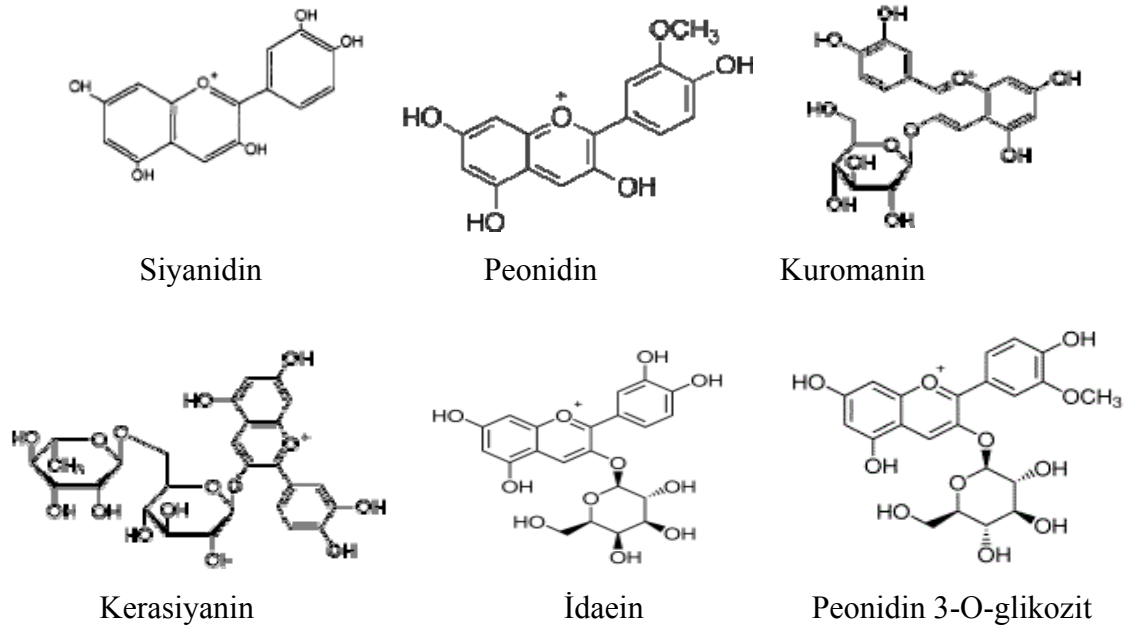
Şekil 2.9: Naringin, naringenin, hesperidin, hesperetin'in kimyasal yapıları

Flavonların izomeri olan izoflavonların en bilinen bileşikleri genistein ve daidzein olup baklagil ve soya fasulyesinde fazla miktarda bulunmaktadır [37].



Şekil 2.10: Daidzein ve genistein'in kimyasal yapıları

Antosiyaninler, suda çözünen, çiçeklere pembe ve turuncudan mavi ve mora değişen meyvelere ise kırmızı ve mor renk veren pigmentlerdir. Aglikonları antosiyanidinlerdir. En önemlileri; apigenidin, siyanidin, malvinidin ve delphinidin'dir [15]. Erikte bulunan en önemli antosiyaninler siyanidin, peonidin, kuromanin, kerasiyanin, idaein ve peonidin 3-O-glikozittir.



Şekil 2.11: Siyanidin, peonidin, kuromanin, kerasiyanin, idaein ve peonidin 3-O-glikozit'in kimyasal yapıları

Flavonoidlerin ve metabolitlerinin antioksidan aktivitesi halkalı çekirdek yapılarındaki fonksiyonel grupların yerleşmesine bağlıdır. Birçok polifenolik antioksidan birbirleriyle karşılaştırıldığında, hem konfigürasyonun hem de toplam hidroksil gruplarının antioksidan aktivitesini büyük oranda etkilediği görülmüştür [16,38].

Serbest radikal süpürme kapasitesinin hidroksil süstitüentlerinin yüksek reaktivitesine bağlı olduğu aşağıdaki reaksiyonda görülmektedir:



Flavonoidlerin yapılarına bağlı olarak antioksidan kapasitelerinin farklılaşmasında kapasite değerlerini belirleyen birkaç husus vardır:

- B halkasındaki o-dihidroksi yapısı (radikal formun yüksek kararlılığını sağlayan ve elektron delokalizasyonuna katılan)
- 2. ve 3. karbon atomları arasındaki çifte bağ (C halkasında 4. karbon atomunda keto grubu oluşturan ve radikalın B halkasından elektron delokalizasyonunu arttıran)
- C ve A halkalarındaki 3. ve 5. pozisyonadaki hidroksil grupları (maksimum radikal-süpürme potansiyeli için gerekli olan) [30]

Bu özelliklerden bir ya da daha fazlasına sahip yapıda olan flavonoidler oldukça yüksek antioksidan etki gösterirler [17].

Lipid peroksidasyonu inhibisyonunda flavonoidlerin yapı-aktivite ilişkisi incelendiğinde [33];

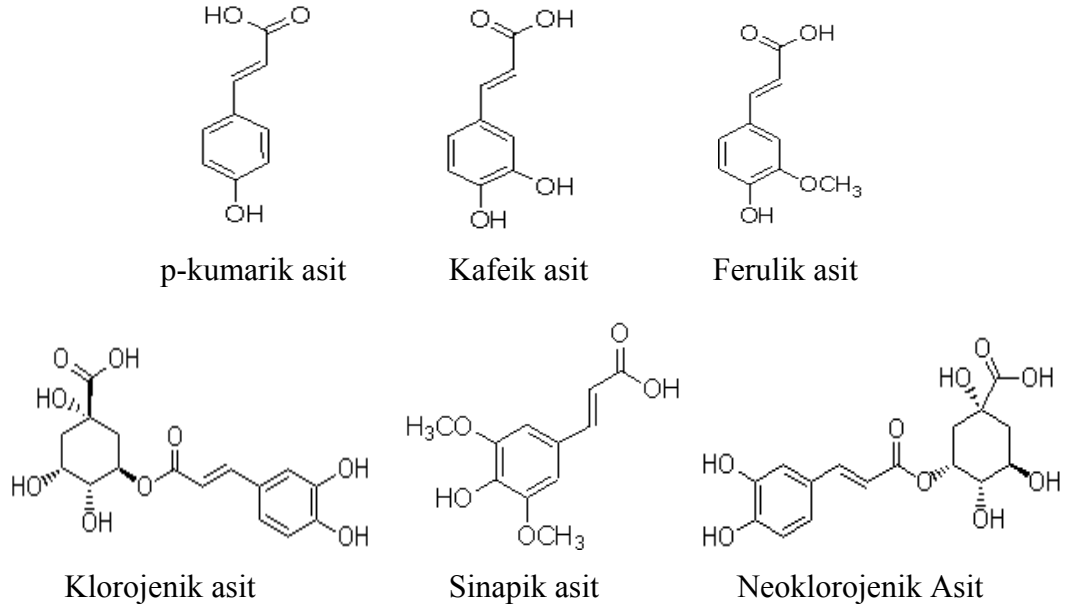
- C halkasındaki 3. karbon atomu üzerinde hidroksil grubunun varlığı;
- Bu yapıya sahip fisetin, (+)-kateşin (Şekil 2.8), kuersetin, mirisetin (Şekil 2.6) ve morin; lipid peroksidasyonunu, C-3. karbon atomu üzerinde hidroksil grubu taşımayan diosmetin, apigenin (Şekil 2.7), hesperetin ve naringenine (Şekil 2.9) göre daha kuvvetli inhibe eder.
- C halkasındaki 2. ve 3. karbon atomları arasındaki çifte bağın varlığı;
- Bu bağın hidrojenlenmesi antiperoksidatif etkiyi azaltır.
- Hidroksil gruplarının sayısı; A ve B halkalarında polihidroksillenmiş yapıların önemi, kuersetin, mirisetin, mirisetrin, floretin, (+)-kateşin, morin ve fisetinin, apigenin, hesperetin, hesperidin, naringenin, naringin, krisin ve 3-hidroksiflavona göre karşılaştırılmasıyla belirlenmeye çalışılmıştır. İlk gruptakiler 4-6 arasında, ikinci gruptakiler 1-3 arasında hidroksil taşıyan flavonoidlerdir. Flavonoidlerin hidroksil radikali süpürme aktivitesi, B halkasındaki hidroksil grupları sayısı (özellikle C-3' konumunda) artar ve hidroksil grupları sayısının azalmasıyla hızlı bir şekilde azalır. Mirisetinin (Şekil 2.6) (Hidroksil konumları: 3,5,7,3',4',5') hidroksil radikali süpürme aktivitesi kamferolden (Hidroksil konumları: 3,5,7,4') daha kuvvetlidir.
- Hidroksil konumları; A halkasındaki C-5 ve C-7, B halkasındaki C-3' ve C-4' ve C halkasındaki C-3 konumundaki hidroksil gruplarının varlığı lipid peroksidasyonun inhibisyonuna katkıda bulunur. Flavonoller, antiperoksidatif aktivite için C-2' konumunda bir hidroksil grubu ve pirogallol grubuna (C-3', C-4', C-5') gereksinim duyarlar.
- Şeker yapısının varlığı; Genelde flavonoid glikozitleri, karşılığı olan aglikon türlerinden daha az antioksidan aktiftir. Malondialdehit üretiminin inhibisyonunda apigenin, naringenin, hesperetin, diosmetin, kuersetin, floretin ve mirisetin karşılık gelen glikozitlerine göre daha etkilidir. Şeker yapısı, sterik engellemeden ötürü çok yakın konumda bulunan hidroksil gruplarının antiperoksidasyon verimini azaltır.

- Metoksi gruplarının varlığı; Sterik engellemeden dolayı flavonoidlerin antiperoksidatif verimini azaltır. Ancak aynı sayıda hidroksil grubu içeren flavonoidlerde –OH'e göre orto- ve para- konumundaki –OMe grupları, elektron desteğiyle aril oksi radikallerini stabilize edeceğinden sonuçta antioksidan aktiviteyi arttırırlar.
- Rutin ve kuersetin gibi (Şekil 2.6) C-4 konumunda karbonil grubu ve C-3 veya C-5 konumunda hidroksil grubu taşıyan flavonoidler, demir iyonlarıyla kelat oluşturur. Flavanoidler demir iyonlarıyla kompleks oluşturduktan sonra da serbest radikal süpürme aktivitelerini yitirmezler.

2.2.4.2. Fenolik asitler

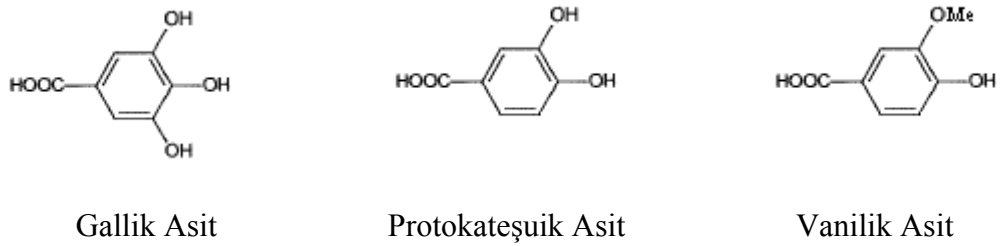
Fenolik asitler, hidroksibenzoik asit ve hidroksisinnamik asit olarak adlandırılan farklı iki sınıftan oluşmaktadır [19]. Benzoik asitlerde karboksilat grubunun elektron-çekme özelliği, hidroksibenzoatların hidrojen atomu verme yeteneklerine negatif etki yapar. Hidroksisinnamik asitler eşdeğer benzoatlarından daha etkilidirler [17].

Hidroksisinnamik asitler, fenil-propanoid türevleridir ve genellikle bitkisel gıdalarda bulunur [39]. Hidroksi sinnamik asitler, bitkilerin fenolik metabolizmalarında merkezi rol oynayan ve fenil alaninin biyosentetik türevi olan fenolik bileşenlerdir. Bu bileşikler aynı zamanda flavonoidlerin öncüsüdür ve bitkilerde hücre duvarının yapısına katılırlar [40]. Genellikle bu tür fenolik asitler bitkilerde esterleri halinde veya şekerlerle, organik asitlerle veya yağlarla birleşmiş halde bulunurlar [41]. Hidroksi sinnamik asitler trans konumunda daha kararlıdır. Ancak UV ışınlarına maruz bırakıldıklarında trans izomerinden cis izomerine dönüşürler [42,43]. Bu bileşenler meyve, sebze, çiçek, fındık, tohum ve şarap, çay, kahve ve zeytinyağı gibi bitki-türevli ürünlerde bulunurlar [19,44]. Kafeik asit, p-kumarik asit ve kafeik asidin kuinik asit esteri olan klorojenik asit, erik, elma, armut ve üzüm gibi meyvelerde ve bitkilerde en çok bulunan hidroksisinnamik asitlerdir. Klorojenik asit, kafeik asidin depolanma şekli olarak düşünülmektedir, çünkü klorojenik asidin biyosentezi sırasındaki tersinirdir [19,45].



Şekil 2.12: p-kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit, klorojenik asit, sinapik asit ve neoklorojenik asit'in kimyasal yapıları

Hidroksibenzoik asitler, yapılarındaki hidroksi ve metoksi gruplarının yerleşimi ve sayılarına göre çeşitlenirler. Bunlardan birkaçı; gallik, vanilik ve protokateşuik asit'dir. Monohidroksibenzoatlar etkili hidroksil radikal süpürücülerdir çünkü hidroksillenmeye ve hidroksil radikallerine yüksek reaktivite göstermeye eğilimlidirler. Dihidroksibenzoik asit türevlerinin antioksidan aktiviteleri hidroksil gruplarının pozisyonlarına bağlı olup, o- ve m- pozisyonlarında aktivite yüksek olurken (2,3-dihidroksibenzoik asit gibi), m-p pozisyonlarına sahip olanlarda (3,4-dihidroksibenzoik asit-protokateşuik asit gibi) aktivite düşer. Gallik asit, üç hidroksil grubuna sahip olmasından dolayı en fazla aktivite gösteren hidroksibenzoik asittir. Ancak karboksilat grubu esterlendiğinde aktivite düşer [17].

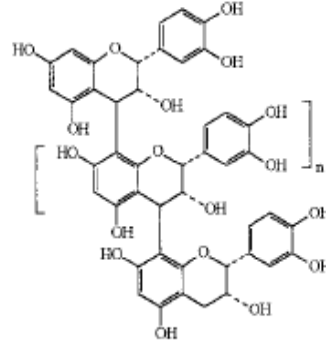


Şekil 2.13: Gallik, protokateşuik, vanilik asit'in kimyasal yapıları

2.2.4.3. Fenolik Polimerler (Tanenler)

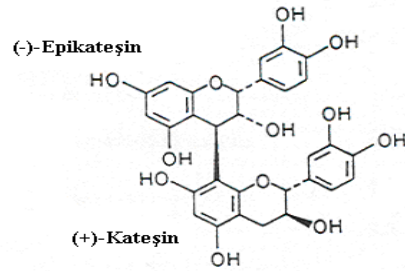
Fenolik polimerler, yüksek moleköl ağırlıklı bileşiklerdir. Kondanse tanenler bu gruba girerler. Besin tanenleri denilince genellikle kateşin ve epikateşin polimerleri anlaşılmaktadır. Koyu renkli ve tadı buruk bileşiklerdir [19].

Prosiyanidinler: (kondanse tanenler) flavan-3,4-diol'ler ve flavan-3-ol'lerden oluşan yapılardır [37,46,47]. Polimer veya oligomer halinde erik, elma, çay ve kırmızı şarapta bulunur [48]. En çok bulunan prosiyanidin dimerleri Prosiyanidin B1, B2, B3 ve B4 'tür . Bu dimerler asit ile ısıtıldığında 1 moleköl kateşin ve 1 moleköl antosiyanidin (siyanidin) serbest hale geçer [42].

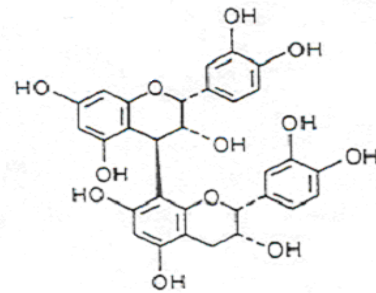


Şekil 2.14: Prosiyanidinlerin genel kimyasal yapısı

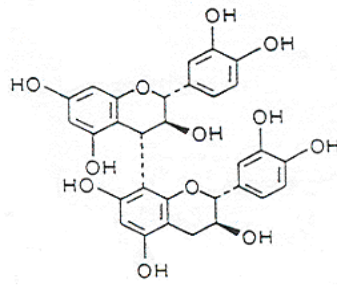
n=0 epikateşin dimer (prosiyanidin B2); n=1 epikateşin trimer; n=2 epikateşin tetramer; n=2 epikateşin oligomer



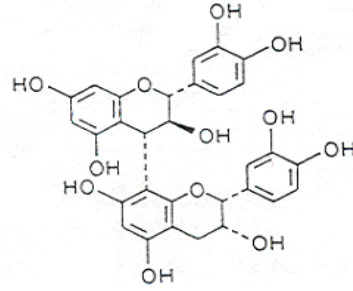
Prosiyanidin B1



Prosiyanidin B2



Prosiyanidin B3



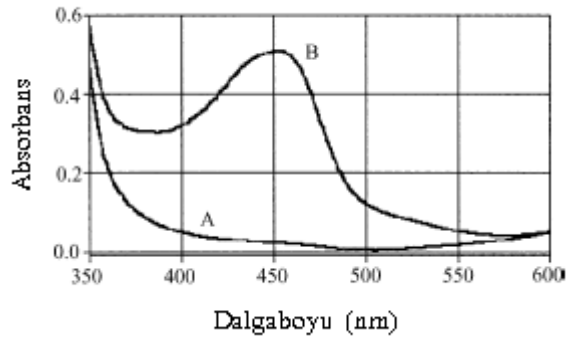
Prosiyanidin B4

Şekil 2.15: Prosiyanidin B1, B2, B3, B4'ün Kimyasal Yapıları

2.3. ELEKTRON AKTARIMINA DAYALI TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTE YÖNTEMLERİ

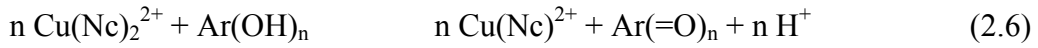
2.3.1. CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity; Cu(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi

Apak ve arkadaşlarının [8] geliştirdiği bu yöntemde, 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neocuproin-Nc)'in Cu(II) ile oluşturduğu bakır(II)-neocuproin kompleksinin (Cu(II)-Nc), 450 nm' de maksimum absorbans veren bakır(I)-neocuproin [Cu(I)-Nc] kelatına (Şekil 2.17) indirgenme yeteneğinden yararlanarak antioksidan kapasitesi hesaplanmaktadır. Bu özellikten yola çıkarak geliştirilen antioksidan kapasite yöntemine 'bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi' denilmiştir ve kısaca CUPRAC metodu olarak adlandırılmıştır.



Şekil 2.16: (A) Cu(II)-Nc, (B) Cu(I)-Nc komplekslerinin spektrumları

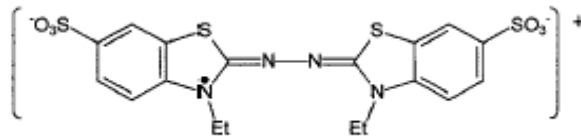
Yöntem; sulu Cu(II) klorür çözeltisi, alkolde hazırlanmış neokuproin çözeltisi ve sulu amonyum asetat (pH=7 tamponu) çözeltilerinin karıştırılmasından sonra, üzerine tavin edilecek herhangi bir antioksidan çözeltisinin ilave edilmesi ve bunu takip eden 30 dakika sonunda, içerisinde antioksidan bulunmayan referansa karşı 450 nm’de absorbanslarının ölçülmesinden ibarettir. Askorbik asit, gallik asit ve kuersetin için renk oluşumu hızlı olurken naringin, naringenin gibi yavaş reaksiyona giren antioksidanlar için 50°C’de 20 dakika inkübasyon işlemi uygulanmaktadır. Flavonoid glikozitlerine % 50 metanol içeren son çözeltide 1.2M HCl ile hidroliz işlemi uygulanarak, maksimum indirgeme güçlerini daha fazla gösterdikleri aglikon haline dönüşmeleri sağlanarak yöntem uygulanmıştır.



Yöntem hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanlara uygulanabilir.

2.3.2. TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity; Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite)/ABTS Yöntemi

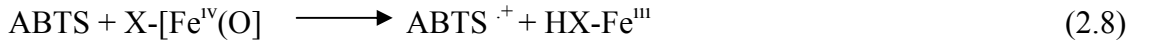
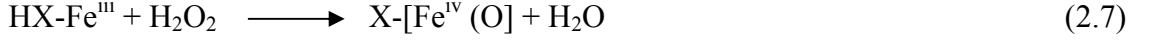
Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite olarak ifade edilen TEAC/ABTS yöntemi, ilk olarak Miller ve arkadaşları [5,48] tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem; 2,2’-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) (ABTS) kromojen radikal katyonunun absorbansının, antioksidanlar tarafından inhibisyonunu temel alır. Antioksidanlar varlığında ABTS^{•+} radikal katyonunun (Şekil 2.18) absorbansında belirli bir süre içindeki azalmadan yararlanarak toplam antioksidan kapasite troloks cinsinden bulunur. Bu nedenle bu yöneme “troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi” (ABTS/TEAC) adı da verilir.



Şekil 2.17: ABTS^{•+} radikal katyonunun yapısı

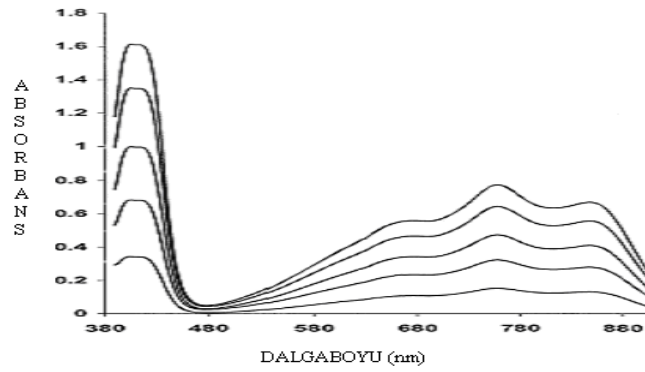
660, 734 ve 820 nm’de maksimum veren ABTS⁺ radikal kasyonu, metmiyoglobinin H₂O₂ ile aktivasyonu ile üretilen ferrilmiyoglobin radikal türlerinin ABTS ile etkileşiminden meydana gelmektedir.

ABTS⁺ kasyon radikalini oluşturmak için, ABTS; miyoglobin ve H₂O₂ ile inkübe edilir [49].



(HX-Fe^{III} = miyoglobin; X-[Fe^{IV}(O)] = ferrilmiyoglobin)

Orijinal TEAC denemesinin bağıl standart sapma değerleri, gün içi denemeler için %0.54-1.59, günler arası denemeler için % 3.6–6.1 olarak bulunmuştur [48].



Şekil 2.18: Radikal kationunun absorpsiyon spektrumu

Re ve arkadaşları [37] tarafından modifiye edilmiş ve geliştirilmiş TEAC yönteminde potasyum persülfatla ABTS’in oksidasyonu sonucu üretilen ABTS⁺ radikal kasyonları kullanılır. Üretilen bu ABTS radikalleri oda sıcaklığında karanlıkta beklediği zaman 2 gün kararludur. Geliştirilen bu yöntem, hem lipofilik hem de hidrofilik sistemlerde kullanılabilir.

Cano ve arkadaşları [6] tarafından hidrofilik antioksidan aktivitesini ölçmek için ABTS/H₂O₂/HRP (horse radish peroxidase) enzimatik sistemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde ABTS radikal kasyonu (ABTS⁺) enzimatik olarak oluşturulur ve antioksidan veya örnek çözelti bu reaksiyon ortamına ilave edilir. Sonuçlar ABTS⁺ radikal

katyonunun yok olması yani absorbansının düşüşü ile elde edilir. Bu patentli metod kolay, hızlı ve kesindir. Bu yöntemin pek çok avantajları vardır. Çünkü istenmeyen pek çok reaksiyonu önler, yüksek sıcaklık gerektirmez ve geniş pH aralığında çalışabilir. Bu yöntem ayrıca, örneklerin kendi içsel peroksidaz aktivitesinden kaynaklanan girişimi önler. Aynı örnek içindeki hem lipofilik hem hidrofilik antioksidan aktivite, çözelti hazırlama ortamını değiştirerek bu metodla ölçülebilir [4,50].

2.3.3. FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power; Demir(III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Gücü) Yöntemi

Benzie ve Strain tarafından geliştirilen bu yöntemde [51] demir(III)'in indirgenme kapasitesi yoluyla antioksidanların toplam miktar tayini yapılmaktadır. Düşük pH larda Fe(III) 'ün, kısa adı TPTZ olan tripiridiltiazin ile reaksiyonu sonucu oluşan [Fe(III)-TPTZ] kompleksi antioksidanların etkisiyle Fe(II)-tripiridiltiazin [Fe(II)-TPTZ] kompleksine indirgenmektedir. Meydana gelen Fe(II)-TPTZ kompleksinin rengi koyu mavidir ve 593 nm'de maksimum absorbans vermektedir.

Bu yöntemin en önemli özelliklerinden biri de biyolojik bir örnekte bulunan antioksidanların hem [Fe(III)-TPTZ] kompleksini Fe(II)-TPTZ kompleksine indirgemesi hem de Fe(II) iyonlarının ortamdaki H₂O₂ ile reaksiyonu sonucu oluşan hidroksil radikalleri ile etkileşmesinden dolayı antioksidan kapasitesinin doğrudan ölçülememesidir. Kısaca FRAP metodu toplam antioksidan gücü tayin edebilen dolaylı bir metoddur [52]. pH=3.6'da uygulanan FRAP yöntemi fizyolojik pH'larda çalışmadığından bulunan sonuçların insan vücudundaki redoks reaksiyonlarına uyarlanması beklenmemelidir. Yöntemin asidik pH'larda çalışması protonlarını vermemiş bazı antioksidanların kolay yükseltgenememesine ve dolayısıyla toplam antioksidan kapasitenin olduğundan düşük bulunmasına yol açabilmektedir.

2.3.4. Folin Ciocalteu Yöntemi

Bu yöntem, Singleton ve arkadaşları [53,54] tarafından toplam fenolik içeriği ölçmek için geliştirilmiştir. Şaraptaki toplam fenol miktarını tayin etmişlerdir. Toplam fenolik bileşenlerin tayin yöntemi olarak bilinen Folin-Ciocalteu ayırıcı (FCR) bazlı yöntem,

gerçekte örneğin indirgenme kapasitesini tayin etmektedir. FC reaktifi sadece fenolik bileşenlere özgü değil, pek çok fenolik yapıda olmayan bileşenleri de indirgeme yeteneğine sahiptir. Bu yöntemde kullanılan CuSO₄ (bakır(II) sülfat) alkali ortamda protein veya antioksidanla kompleks yapar. Folin fenol reaktifi (fosfo molibdik fosfotungstik asit) eklendiğinde, folin reaktifi proteine bağlanır. Protein veya antioksidanla Cu(II)'nin reaksiyonundan açığa çıkan Cu(I) olasılıkla molibdatotungstat ayıracını heteropoli mavisine indirger ve rengi sarıdan maviye dönüşür. Reaksiyon tamamlanınca 750 nm'de örnek absorbansları ölçülür.

Bu denemede, ard arda geri dönüşümlü bir veya iki elektron indirgeme reaksiyonları, P(MoW₁₁O₄₀)⁴⁻ olması muhtemel mavi türlerin oluşumunu sağlar. Esasen, molibdenin kompleks içinde indirgenmesinin daha kolay olduğuna ve elektron-transfer reaksiyonunun indirgenler ve Mo(VI) arasında gerçekleştiğine inanılır.



Fenolik bileşikler FCR ile sadece bazik ortamlarda reaksiyon verirler. (Sodyum karbonat çözeltisi ile pH 10'a ayarlanır). Fenolik protonun dissosiasyonu, ayıracı indirgeme yeteneği bu nedenle artan fenolat anyonunun oluşumunu sağlar.

2.3.5. DPPH Yöntemi

Sanchez ve arkadaşları tarafından geliştirilen bu yöntem [55,56] meyve ve sebze ekstraktlarına uygulanan doğru ve basit bir yöntemdir. Organik azot radikali tayin yöntemlerinden kararlı ve ticari olanlarından biridir. Bu yöntem; antioksidanların kararlı bir organik azot radikali olan DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikalini süpürücü etkilerini ölçmeye dayalı bir yöntemdir. Bu radikal, hidrojen donörlerle etkileştiğinde hidrazine indirgenir. Kırmızı renkli DPPH radikali 515 nm'de maksimum absorpsiyon verir. DPPH çözeltisine antioksidanın ilave edilmesiyle absorbansta düşüş meydana gelir ve antioksidanların varlığıyla radikalın rengi kırmızıdan sarıya döner. Bu yöntem antioksidanların radikal süpürme kabiliyetlerini değerlendiren kolay ve geçerli bir yöntemdir.

Yöntem hızlı ve basittir. Ancak bazı bileşenlerin (özellikle karotenoidler) 515 nm’de DPPH ile çakışık spektrum vermesi analizin yorumunu güçleştirir. Ayrıca çoğu sterik engellemeden dolayı DPPH ile yavaş tepkimeye girer. Bundan dolayı yöntem; DPPH ile tepkimeye giren antioksidanların antioksidan kapasitesi hakkında doğru bir değerlendirme vermez. Bunlara ek olarak DPPH’ın rengi, ışık, hava oksijeni, nem ve pH’a fazlaca duyarlı olduğundan tekrarlanabilir sonuçlar eldesi güçtür.

2.4. HİDROJEN ATOMU AKTARIMINA DAYALI TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİN YÖNTEMLERİ

Bu yöntemlerde zamana bağlı denklemlerden yararlanılarak ve troloksla karşılaştırılarak toplam antioksidan aktiviteye dayananan toplam antioksidan kapasite hesaplanmaktadır.

2.4.1. TRAP (Total Radical Trapping Parameter; Toplam Radikal Tutma Parametresi) Yöntemi

Wayner ve arkadaşları [57] tarafından geliştirilen bu yöntem, plazma veya serumdaki toplam antioksidan kapasiteyi ölçmek için kullanılan başlıca yöntemlerden biridir. Bu yöntemde plazma ve diğer biyolojik sıvılarda bulunan peroksitelebilen maddelerden ve 2,2’-diazobis (2-amido propan) dihidroklorürden (AAPH) meydana gelen peroksil radikalleri kullanılır.

Plazmaya AAPH ilave edilir ve yükseltgenebilen maddelerin oksidasyonu reaksiyon sırasında tüketilen oksijenin ölçülmesiyle belirlenir. Plazma içerisinde bulunan antioksidanlar yükseltgenme tepkimesinin yavaş gerçekleşmesine sebep olur. Reaksiyonun gecikme zamanı ölçülerek plazmadaki toplam antioksidan kapasitesi, iç standart olarak kullanılan troloks eşdeğeri cinsinden hesaplanmaktadır.

Wayner ve arkadaşları orjinal TRAP yöntemini modifiye etmişlerdir. Bu yeni yöntemde, peroksil radikalleri tarafından yükseltgenme başlatılmadan önce plazma örneğine linoleik asit ilavesi yapılmıştır [58]. TRAP yönteminin en önemli olumsuzluğu

oksijen elektrodu ile ilgilidir. Oksijen elektrodu gereken süre içinde kararlılığını koruyamamaktadır[48].

2.4.2. Luminol Yöntemi

Metsä-Ketelä ve arkadaşları tarafından 1991’de geliştirilen ve yayınlanan kemiluminesans esaslı TRAP yöntemi daha sonra Alho ve Leinonen tarafından detaylı şekilde ifade edilmiştir [59]. AAPH’dan üretilen peroksil radikallerinin luminolü yükseltgemesi sonucu ışık yayan luminol radikalleri meydana gelmektedir. Yayılan ışık luminometre cihazı ile ölçülür. Örnek içindeki antioksidanlar, kemiluminesans ışımasının oluşumunu belli bir zaman için engeller. Gecikme zamanı bir örnekteki toplam antioksidan potansiyeli ile doğrudan orantılıdır. Elde edilen sonuçlar troloks eşdeğeri cinsinden hesaplanmaktadır.

Whitehead ve arkadaşlarının [60] 1992 yılında biyolojik sıvılarda antioksidan kapasitenin ölçümü için geliştirdikleri kemiluminesans yönteminde luminol AAPH yerine, H_2O_2 veya perborat ile yükseltgenerek luminol radikallerini oluşturur. Reaksiyonu daha hızlı gerçekleştirebilmek için katalizör olarak horseradish peroksidaz (HRP) kullanılmış ve böylece ışık yayılması daha çabuk olmuştur. Normal şartlar altında bu reaksiyon, hızla azalan düşük şiddetli bir ışık yayılması olarak gerçekleşir. Ortama p-iyodofenol ilave edildiği zaman ışık emisyonu daha şiddetli, uzun süreli ve kararlı hale gelir. Işığın luminol radikalleri tarafından yayılması için ortamdaki bütün antioksidanların tüketilmesi gerekmektedir.

2.4.3. Diklorofloresin-diasetat (DCFH-DA) Yöntemi

TRAP yöntemini temel alan başka bir yöntem ise Valkonen ve Kuusi’ nin geliştirdiği diklorofloresin-diasetat (DCFH-DA) yöntemidir. Bu yöntemde AAPH, peroksil radikalini oluşturmak için, DCFH-DA ise yükseltgenebilen substrat olarak kullanılmıştır. Peroksil radikali ile DCFH-DA arasındaki yükseltgenme tepkimesi sonucu oluşan diklorofloresin (DCF) yüksek floresans özelliğine sahip olmaktadır. DCF 480’ nm de uyarılıp 526’ nm de emisyon yapmaktadır. 504’ nm de maksimum absorpsiyon göstermektedir. Bu bakımdan hem floresans yöntemi hem de

spektrofotometrik yöntem kullanılarak DCF miktarı ve buna bağlı olarak toplam antioksidan kapasite hesaplanmaktadır.

Bu yöntemde toplam antioksidan kapasite iki kademede bulunmaktadır. İlk kademede örnek içindeki antioksidanların kapasitesi gecikme zamanı cinsinden hesaplanmaktadır. Sonra aynı örnek üzerine miktarı bilinen troloks çözeltisi ilave edilmektedir. Troloks çözeltisi serbest radikaller tarafından tüketildikten sonra ikinci gecikme zamanı hesaplanır. Bu iki gecikme zamanı arasındaki farktan yararlanarak troloks cinsinden toplam antioksidan kapasite hesaplanmaktadır. Gecikme zamanlarının belirlenmesini sağlayan TRAP esaslı bu yöntemin gün içi ve günler arası bağıl standart sapma değerlerinin sırasıyla % 3.4 ve 4.6 olduğu ifade edilmiştir [61].

2.4.4. Fikoeritrin (PE) Esaslı Yöntemler

Ghiselli ve arkadaşları [62] tarafından 1994 yılında yayınlanan bu yöntem, peroksil radikallerinin kullanıldığı ve 1990 yılında yayınlanan Glazer çalışmasının [63] temelinde bir benzeridir. Glazer, peroksil radikallerini oluşturmak için AAPH, hidroksil radikallerini oluşturmak için Cu(II)-askorbat, yükseltgenebilir substrat olarak B- veya R-PE kullanmıştır. B- veya R-PE substratının peroksil veya hidroksil radikalleri varlığında gösterdiği floresansın zamanla lineer olarak azaldığı belirtilmiştir. B- veya R-PE'nin peroksil veya hidroksil radikallerine karşı sağladığı gecikme zamanının uzunluğu troloksun sağladığı gecikme zamanına oranlanarak örneğin antioksidan kapasitesi troloks eşdeğeri cinsinden belirlenir. Ama, PE floresans sönümünün kinetikleri, peroksil veya hidroksil radikalleri varlığında doğrusal değildir. Ayrıca analiz edilen örnek, plazma veya serum olduğu zaman gecikme zamanını belirlemek genellikle zordur [52].

Yeni bir yöntem olarak yayınlanan Ghiselli' nin yönteminde Glazer' ın geliştirmiş olduğu yönteme atıf yapılmamıştır. Ayrıca yapılan çalışmada R-PE floresansının yaklaşık % 80' in söndürülmesine kadar R-PE floresansının zamanla doğrusal olarak azaldığı belirtilmiştir. Ancak bu çalışma farklı kişiler tarafından tekrarlandığında aynı sonuçlar alınamamıştır [64,65]. Ayrıca yöntemin, plazmanın toplam antioksidan kapasitesini ölçmeye yönelik bir yöntem olduğu belirtilse de yöntemde, yapay plazma

örnekleri kullanılmıştır ve % 0.96 bağıl standart sapma değeri yapay serum örnekleri için oldukça düşüktür [52].

2.4.5. Krosin Yöntemi

Tubaro ve arkadaşlarının geliştirdiği bu yöntemde kinetik parametreler karşılaştırılarak plazma içindeki antioksidan kapasite ölçülmektedir. Bu yöntem; AAPH tarafından oluşturulan peroksil radikallerinin krosini yükseltgemesi (rengini gidermesi) esasına dayanmaktadır. Krosinin peroksil radikalleri ile yükseltgenme reaksiyonunda antioksidanların olmadığı durumdaki hızı V_0 ve antioksidanların olduğu durumdaki hızı ise V , 10 dakika içinde ölçülmektedir. Bu ölçülen hızların oranı $(V_0/V) \times$ eksenini, antioksidan derişiminin $[A]$ krosin derişimine $[C]$ oranı y eksenini oluşturacak şekilde bir grafik oluşturulmaktadır. Oluşan bu lineer grafiğin eğimi k_a / k_c oranını yani peroksil radikalleri ile etkileşen bileşiğin göreceli kapasitesini belirtir. k_a ; antioksidanlar ile peroksil radikalleri arasındaki tepkime hız sabiti, k_c ; krosin ile peroksil radikalleri arasındaki reaksiyon hız sabitidir. Bulunan k_a/k_c oranı, daha önceden troloks ile hesaplanan k_a/k_c oranına bölünerek sonuçlar troloks cinsinden hesaplanmaktadır. Bu yöntemde iki antioksidanın peroksil radikalleriyle etkileşimleri kıyaslanabilmektedir [65].

Tubaro ve arkadaşları bu kinetik yaklaşım sayesinde antioksidan koruma etkinliğinin kesin olarak değerlendirilebileceğine inanmaktadırlar. Ancak bu metod bir antioksidanın diğer bir antioksidana karşı mücadele etme yeteneğini ölçmektedir. Ayrıca kullanılan krosinin derişimi sabittir fakat analizlenecek olan bileşiğin farklı derişimlerinin kullanılması için farklı krosin derişimleri gerekmektedir. Bu yöntemin diğer bir eksikliği, askorbik asit için bulunan troloks cinsinden antioksidan kapasitesinin 7.7 olması ve bu sonucun diğer metodlarla bulunanlardan çok daha yüksek olmasıdır [52].

2.4.6. ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity; Oksijen Radikali Absorplama Kapasitesi) Yöntemi

ORAC yöntemi [14,64]; büyük oranda Glazer [63] tarafından yayınlanan çalışmayı temel alır. Bu yöntemle bitkisel ve biyolojik örneklerdeki toplam antioksidan kapasite

geniş ölçüde tayin edilebilmektedir. Hidroksil radikalini oluşturmak için Cu(II) - H₂O₂, peroksil radikalini oluşturmak için AAPH kullanılır. Oluşturulan serbest radikaller ile yükseltgenebilen protein substrat olan β-PE arasındaki yükseltgenme tepkimesi sonucunda fikoeritrinin floresansındaki düşüş ölçülerek toplam antioksidan kapasite hesaplanmaktadır. Bu yöntemde β-PE'nin kullanılma nedeni bu maddenin eksitasyon ve emisyon dalga boyu, yüksek floresans özelliğe sahip olması, reaktif oksijen türlerine karşı duyarlı olması ve suda çözünbilmesinden dolayıdır [66].

Serbest radikal etkisini inceleyen ve miktar tayininde eğri altında kalan alan (area under curve, AUC) tekniğini kullanan bu yöntem, antioksidanların serbest radikalleri hem inhibe etme yüzdesini ve hem de yok etme süresini tek bir değer olarak ifade edebilen bir yöntemdir [52]. Net AUC (AUC_{örnek} – AUC_{boş}), antioksidan miktarıyla orantılıdır.

2.4.7. TOSC(Total Oxyradical Scavenging Capacity; Toplam Oksiradikal Süpürme Kapasitesi) Yöntemi

Winston ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olan bu yöntem; AAPH bileşiğinden meydana gelen peroksil radikalleri tarafından α-keto-γ metiolbutirik asitin (KMBA) etilene yükseltgenmesine dayanır [67]. Kısmen antioksidanlar tarafından engellenen etilen oksidasyonu gaz kromatografisi ile ölçülmektedir. Toplam kapasiteyi ölçmek için kullanılan denklem aşağıda verilmiştir:

$$TOSC = 100 - (JSA / JCA \times 100) \quad (2.10)$$

SA: Örnek tepkime eğrisi; CA: Kontrol tepkime eğrisi

Antioksidan veya TOSC değerleri 0-100 arasında verilmiştir. Bu yöntemde kullanılan alan integralleri açık bir sistemdir, çünkü KMBA tarafından oluşan etilen üretimi antioksidanların tüketilmesiyle artar. Uygun değerlerde kullanılan KMBA sınırlayıcı bir faktör değildir. Bu yöntemin plazma antioksidanlarını değerlendiren bir uygulaması bulunmamaktadır [52].

2.5. ERİĞİN İÇERİĞİ VE SAĞLIK ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Erikler, *Gülgiller (Rosaceae)* familyası içindeki *Prunus* türlerinden bir meyvedir [68].

Hidroksinnamik asitler, flavonoller ve antosiyaninleri içine alan fenolik bileşiklerin çeşitli türlerini içerir. Klorojenik asit, yaygın olarak kan LDL (low density lipoprotein, düşük yoğunluklu lipoprotein) kolesterol seviyesini düşüren bir antioksidan olarak bilinir. Aynı zamanda oksijen ve azotun reaktif türleri için bir süpürücü ve linoleik asit oksidasyonu ile konjuge dienlerin oluşmasına karşı bir inhibitör olarak bilinir. Neoklorojenik asit, taze ve kuru erikte bulunan en baskın polifenoldür [69]. Erikte bulunan flavonoller yaygın olarak kuersetin türevleridir. Rutin eriklerde bulunan en baskın flavonoldür [70]. Kuersetin, kanser ve kalp hastalıklarına karşı koruyucu etki gösteren yüksek antioksidan özelliğe sahip bir bileşendir. Epidemiyolojik araştırmalar sonucunda yüksek kuersetin miktarının göğüs ve kolon kanser hücrelerinin üremesini engellediği ve düşük kuersetin miktarının ise hücre üremesini arttırdığı (kolon kanser hücrelerinde %20, göğüs kanser hücrelerinde %100) belirlenmiştir [71]. Sarı erik haricindeki bütün erik türlerinde genellikle siyanidin 3-rutinozit gibi antosiyaninler bulunur [69].

2.6. ERİKTE TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİNİ VE FENOLİK BİLEŞENLERİN BELİRLENMESİ VE MİKTARLANDIRILMASI UYGULAMALARI

Kim ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada [70], 11 çeşit taze erikte spektrofotometrik yöntemlerle toplam fenolik, toplam flavanoid ve toplam antioksidan kapasite tayini yapmışlardır. Polifenolik bileşiklerin tek tek belirlenmesi ve miktarlandırmasında da dizi diyot dedektörlü ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemini kullanmışlardır. Kırmızı erikler (Early Magic), sarı erikler (Mirabellier ve NY 101), koyu mavi ve mor eriklerden (Autumn Sweet, Beltsville Elite B70197, Castleton, Empress, Longjohn, NY 6, Stanley ve NY9) oluşan erik çeşitlerini dondurarak kurutup toz haline getirdikten sonra %80 sulu metanol ile 20 dakikada sonikasyonla ekstrakte etmişlerdir. Watman 2 numaralı süzgeç kağıdından süzdükleri ekstraktların çözücüsünü 40 °C’de döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıp kalan fenolik bileşikleri %50 sulu

metanolle alıp 20 dakika 12000 g devirde soğukta santrifüjleyip analize kadar -20 °Cde bekletmişlerdir.

Eriklerin toplam fenolik miktarlarını Folin-Ciocalteu belirteci ile 100g taze örnekte mg gallik asit eşdeğeri olarak belirlemişlerdir. Eriklerin toplam flavonoid miktarları ise örneğe %5 sodyum nitrit eklenmesinden 5 dk sonra %10 AlCl₃, 6 dakika sonra da 1 M NaOH çözeltileri ilave edilip karıştırıldıktan sonra karışımın absorbansının 510 nm de su körüne karşı okunmasıyla 100 g taze örnek başına kateşin eşdeğeri olarak hesaplanmıştır. Toplam antioksidan kapasite ise fostat tamponlu tuz çözeltilisindeki ABTS çözeltilisine AAPH ilavesi ile oluşturulan ABTS radikalinden yararlanarak 100 g taze ağırlık başına C vitamini eşdeğeri olarak ölçülmüştür. Ayrıca ksantin/ksantin oksidaz sistemiyle oluşturulan süperoksit radikalinin uzaklaştırılması, NBT' nin (nitro blue tetrazolium) indirgenmesi ile ölçülüp süperoksit radikal anyonu süpürme aktivitesi de belirlenmiştir. Çalışılan eriklerin toplam fenolik içerikleri; 125 ile 372.6 mg GAE (Gallik asit eşdeğeri)/100 g aralığında, toplam flavonoid içerikleri; 64.8-257.5 mg KE (Kateşin eşdeğeri)/100 g, antioksidan kapasiteleri; 204.9-567.0 VCE (Vitamin C eşdeğeri)/100g olarak bulunmuştur. En yüksek fenolik, toplam flavonoid ve VCEAC değerleri, koyu renkli Beltsville Elite B70197 erik cinsi için saptanmıştır. Dedektör dalga boyu hidroksisinnamik asitler için 320 nm, flavonoller için 370 nm ve antosiyaninler için 520 nm'ye ayarlanarak HPLC ile sarı renkli iki erik cinsi hariç erik cinsine göre değişen miktarlarda siyanidin 3-glukozit, siyanidin 3- rutinozit ve peonidin türevi antosiyaninler mg/100 g taze ağırlık olarak miktarlandırılmıştır.

Vasanth Rupasinghe ve arkadaşları [72], Avrupa erik cinslerini toplan fenolik içerikleri ve toplam antioksidan kapasiteleri açısından incelemişlerdir. 20 erik türü için erikleri HCl:Metanol:Su; 2:80:18 (v/v/v) bileşimindeki çözeltide blendırda karıştırarak elde edilen karışım 50 °C de 2 saat karıştırılmalı su banyosunda ekstrakte ettikten sonra 3000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Erik ekstraktlarının toplam fenolik içerikleri Folin-Ciocalteu belirteci ile mg GAE/100 g taze örnek cinsinden belirlenmiştir. Toplam antioksidan kapasiteleri ise FRAP yöntemi ile mg AAE (Askorbik asit eşdeğeri)/100 g taze ağırlık olarak hesaplanmıştır. Eriklerin kabuk renk ölçümleri de yapılmıştır ve kabuk renk şiddeti ile toplam fenolik içerik arasında doğru orantı olduğu gözlenmiştir. 20 türün toplam fenolik içerikleri 86-413 mg GAE/100 g , toplam antioksidan

kapasiteleri 105-524 mg AAE/100 g olarak belirlenmiş ve bu iki parametre arasında kuvvetli ilişki olduğu ($r^2=0.96$) görülmüştür.

Chun ve arkadaşları[73], farklı renklerdeki 11 erik cinsi için toplam fenolik , toplam flavonoid ve tek tek fenolik bileşenlerin miktarlarını ve bunların C vitamini eşdeğeri olarak antioksidan kapasiteye etkilerini incelemişlerdir. Dondurularak kurutulan erik örnekleri %80 sulu metanolla azot gazı akımında 20 dk sonikasyonla ekstrakte etmişlerdir. Daha önceki çalışmalarına olduğu gibi [70], süzme 40 °C’de buharlaştırma %50 metanolde çözüp 2000 g devirde 20 dk santrifüjleme işlemlerinin ardından örnekler -20 °C de saklanmıştır. Toplam fenolik ve flavonoid içerikleri yine önceki çalışmada kullanılan yöntemlerle spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Fenolik bileşiklerin tek tek belirlenmesi için dizi diyot dedektörlü ve 4’lü pompalı HPLC 3 mobil fazın gradienti ile ve hidrokisisinnamik asitler için 320 nm , flavonoller için 370 nm, antosiyaninler için 520 nm çalışma dalga boylarında kullanılmıştır. Neoklorojenik asit miktarı klorojenik asit eşdeğeri olarak ifade edilmiştir.Ticari standartlarla belirlenemeyen kuersetin ve peonidin türevleri için alıkonma zamanlarında defalarca toplanan eluatın 1,2 N HCl ilavesiyle 90 °C su banyosuyla 2 saat hidroliziyle aglikonlarına dönüştürülmesi sağlanmıştır. C vitamini eşdeğeri olarak toplam antioksidan kapasite daha önceki çalışmada olduğu gibi fosfat tamponlu tuz çözeltisindeki ABTS’ den AAPH ile elde edilen radikalın absorbans ölçümü ile belirlenmiştir. Toplam fenolik miktarı ve toplam antioksidan kapasite arasında ve toplan flavonoid miktarı ile toplam antioksidan kapasite arasında sırasıyla $r^2= 0,9887$, $r^2= 0,9653$ ile gösterilen iyi uyumlar görülmüştür. HPLC ile tek tek belirlenen fenoliklerden hesaplanan toplam antioksidan kapasite ile deneysel toplam antioksidan kapasite arasındaki uyumun daha düşük olduğu ($r^2= 0,9299$) görülmüştür. Klorojenik asitler ve siyanidin, peonidin ve kuersetin glukozitleri başlıca fenolik bileşikler olarak saptanmıştır. Bir porsiyon (100 g) erik tüketiminin 144,4- 889,6 mg C vitaminine eşdeğer antioksidan sağlayacağı ifade edilmiştir.

Kim ve arkadaşlarının bir diğer çalışmasında [74], 6 erik cinsi ve Gala cinsi elma %80 sulu metanolla sonikasyonla ekstrakte edildikten sonra toplam fenolik, flavonoid ve antioksidan kapasite tayinleri yapılmıştır. Erik türleri için toplam fenolik içeriği taze örnek temelinde 174-375 mg GAE/100 g, toplam flavonoid miktarları 118 - 237 mg CE/

100 g olarak, elma için bulunan 118 mg GE/100 g ve 62.0 mg CE/100 g değerlerinden yüksektir. C vitamini olarak ifade edilen toplam antioksidan kapasite değerleri de erik türleri için 266–559 mg VCEAC /100 g olup, Gala elmasının 205 mg VCEAC / 100 mg değerinden büyüktür.

Erik türlerinin antioksidant kapasitelerinin aşağıdaki sıraya göre azaldığı belirlenmiştir. Beltsville Elite B70197 > Cacak Best $\geq$ French Damson > Yugoslavian Elite T101 > Long John > Stanley.

Chun, Kim ve Lee'nin [69] bir diğer çalışmasında daha önceki çalışmalarında [70,73] incelemiş oldukları 11 erik türü bu kez süperoksit radikali süpürme aktiviteleri (Superoxide Radical Scavenging Activity, SRSA) açısından çalışılmıştır. Bunun için ksantin/ ksantin oksidaz ile üretilen süperoksit radikalının uzaklaştırılma hızının NBT ile ölçülmesine dayanan Kweon ve arkadaşlarının [75], enzim denemesi ufak değişikliklerle uygulanmıştır. SRSA süperoksit sönümünün yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Deneme erik çeşitlerinin toplam SRSA'larına tek tek polifenollerin katkısını incelemek için 3 adımda uygulanmıştır. İlk olarak, %50 inhibisyonunu (IC_{50}) belirlemek için tek tek polifenoller ölçülmüştür. İkinci olarak, taze eriklerden erik çeşitlerinin toplam SRSA ve IC_{50} değerlerini belirlemek için polifenoller ekstrakte edilmiştir. Üçüncü olarak, eriklerin toplam SRSA değerlerini tek tek polifenollerin katkısını değerlendirebilmek için HPLC ile belirlenen her bir polifenolik bileşiğin derişiminden ve SRSA denemesi ile saptanan IC_{50} değerlerinden SRSA hesaplamaları yapılmıştır. Spektrofotometrik olarak belirlenen toplam fenolik ve toplam flavonoid içerikleri ile IC_{50} değerleri arasında toplam flavonoidler için daha büyük olan uyum ($r^2=0,8699$ toplam flavonoidler için, $r^2=0,8355$ toplam fenolikler için) belirlenmiştir. BY 69-339 erik cinsi en düşük IC_{50} değerini (yani süperoksit radikallerini süpürmede en yüksek antioksidan aktivite) gösterirken, French Damson, Cacak Best, Beltsville Elite B70197 Empress, Castleton, Stanley, NY 6, NY 101, Mirabellier ve NY 9 cinsleri bu erikten sonra gelir. Erikteki antosiyaninler toplam SRSA değerine en fazla katkı sağlar. Klorojenik asit %1 ile 94,9 arasında SRSA değeri verir. Erikteki başlıca flavonoller olan kuersetinlerin ise toplam SRSA'ya katkıları oldukça düşük olduğu görülmüştür.

Chun ve Kim [73], klorojenik asit açısından zengin olan eriklerin toplam fenolik içeriklerinin ifade edilmesinde gallik asit yerine klorojenik asit kullanılmasının tercih

edilmesi gerektiğini 13 erik cinsi ile yaptıkları çalışmada iddia etmişlerdir. Bu iddiayı gallik asit ve kateşinin Folin-Ciocalteu yönteminde eriklerin başlıca fenolik bileşiği olan klorojenik ve neoklorojenik asitten daha yüksek absorbans göstermesine dayandırmışlardır.

Eriklerin antioksidan kapasiteleri fenolik bileşiklerin pek çok çalışmadan başka meyve ve sebzelerin bu özellikleri ve bileşenleriyle karşılaştırılmıştır.

Proteggente ve arkadaşları [76] düzenli olarak tüketilen meyve ve sebzelerin başlıca fenolik bileşenlerini dizi diyot dedektörlü HPLC yöntemi ile ayrıca toplam fenolik ve C vitamini içeriklerini ve TEAC, FRAP ve ORAC yöntemleriyle toplam antioksidan kapasitelerini belirleyerek karşılaştırmışlardır. Toplam fenolik tayini dondurularak kurutulmuş örneklerin %70 sulu metanolla 70 °C de 19 dakika bekletilmesi ve 800g devirde 10 dk santrifüjlenerek elde edilen ekstraktlarda Folin-Ciocalteu yöntemi ile yapılmıştır. Antioksidan aktivite tayini için ise dondurularak kurutulmuş örnek 10 mL su/20 mL metanol karışımı ile 30 dk refluks edildikten sonra süzülen ekstraktın metanolü döner buharlaştırıda vakum altında uzaklaştırılmış sulu ekstrakt analize kadar -70 °C'da korunmuştur. Antosiyanince zengin olan meyvelerin (çilek, ahududu ve kırmızı erik) en yüksek antioksidan aktiviteyi gösterdiği belirlenmiştir. TEAC değerleri 100 g taze örnek açısından aşağıdaki şekilde sıralanmıştır.

Çilek >> ahududu = kırmızı erik >>kırmızı lahana>>> greyfurt = portakal> ıspanak > brokoli > yeşil üzüm $\cong$ soğan > yeşil lahana > bezelye > elma > karnabahar $\cong$ armut > domates $\cong$ şeftali = pırasa > muz $\cong$ marul

Tomás-Barberán ve arkadaşlarının [77], 25 şeftali, nektarin ve erik türleriyle yaptığı çalışmada; HPLC-DAD-ESIMS ile fenolik bileşikler belirlenip miktarlandırılmıştır. Bu çalışmada sarı ve kırmızı erikler hem kabuk hem et dokuları açısından iki farklı olgunlukta incelenmiştir. HPLC-MS analizleri erikteki prosiyanidin trimerlerinin varlığının yanısıra B ve A tipi dimerlerinin de tanımlanabilmesine de olanak sağlamıştır. Dondurulmuş meyvelerden alınan örnekler polifenol oksidazları inaktive etmek için 2mM NaF içeren 2:8; Su/Metanol ekstraksiyon çözeltisi ile homojenize edilmiştir. Homojenatlar 16000 g devirde 15 dk 2-5 °C 'da sıcaklıkta santrifüjlendikten ve 0,45 µm filtreden süzildükten sonra kullanılmıştır. Hem suya hem metanole pik

ayırımını arttırmak için %5 formik asit ilave edilen 4 mobil faz karışımı 4 pompa kullanılarak HPLC analizlerinde gradient elüsyon kullanılmıştır. Mobil fazlar; %95 distile su+%5 metanol (mobil faz 1); %88 distile su+%12 metanol (mobil faz 2); %20 distile su+%80 metanol (mobil faz 3); metanol (mobil faz 4) dür. Elüsyon %100 A çözücüsü ile başlatılmıştır. Toplam 57 dk'da analiz sonuçlanmıştır. Dedeksiyon dalga boyları 510, 340 ve 280 nm'dir. Elektrosprey kütle spektrofotometrik analizler negatif iyon modunda yapılmıştır. Diğer kromatografik şartlar HPLC-DAD analizleriyle aynıdır. Bu çalışma eriklerdeki başlıca hidroksisinamik bileşenin neoklorojenik asit olduğunu doğrulamıştır. Başlıca flavan 3-ol türevleri olarak prosiyanidin dimerleri ve trimerleri belirlenirken kateşin ve epikateşin önemli miktarlarda gözlenmemiştir. Kuersetin türevleri bu çalışmada da belirlenmiştir. Çalışılan eriklerden Black Beaut ve Angeleno fenolik açısından zengin olduğu saptanmıştır.

Kim ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada [78]; toplam fenolikler kolorimetrik Folin Ciocalteu fenol reaktifi kullanılarak analiz edildi. 2001 ve 2002 yılında yetiştirilmiş koyu mavi/mor, kırmızı ve sarı olmak üzere rengine göre ayrılmış 10 farklı taze meyve ile çalışıldı. Erikteki fenolikler sulu metanol kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Farklı erik çeşidi, büyüme mevsimi, ürün yılına göre toplam fenoliklerde önemli farklar vardır. 2001 yılında yetiştirilen eriklerin toplam fenolikleri 192.1 mg/100 g ortalama ile hasat edilen gallik asit ekivalenti, 2002 yılında 285,8 mg/100 g GAE gösterdi. Eriklerdeki antioksidan kapasitesi vitamin C ekivalenti antioksidant kapasitesi olarak gösterildi. VCEAC kimyasal reaksiyon temelli mavi/yeşil ABTS radikali kullanılarak belirlendi. 2001 ve 2002 yılında yetiştirilmiş 10 farklı taze meyvenin ile VCEAC'si belirlendi. 2001 yılında yetiştirilen eriklerin toplam fenolikleri 204.9-567.0 mg/100 g VCEAC, 2002 yılında 144.4-889.6 mg/100 g VCEAC arasında değişmektedir. Neoklorojenik asit, klorojenik asit, rutin, kuersetin 3-glukozit, kuersetin 3-galaktozit, siyanidin 3-glukozit, siyanidin 3-rutinozit, peonidin 3-glukozit ve siyanidin, peonidin ve kuersetin türevi fenolik bileşenler RP-HPLC ile belirlendi.

Gil ve arkadaşlarının [79], 25 çeşit nektarin, şeftali ve erik ile yaptığı çalışmada; bu meyvelerin bileşimleri ve antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiştir. C vitamini, karetenoid ve fenolik bileşikler için örnekler ayrı ayrı ekstraksiyon işlemlerine tabi tutularak HPLC ile analizlenmiştir. Fenolik bileşiklerin tanımlanması ve

miktarlandırılmasında hem dizi diyot hem de kütle dedektör kullanılmıştır. Antioksidan aktivitenin belirlenmesi için DPPH ve FRAP olmak üzere 2 yöntem kullanılmıştır. Erikler için toplam askorbik asit miktarı; mg/100 g taze ağırlık olarak 33-10, toplam karetenoid derişimi; 70-260, toplam fenolik içerikleri; 42-109 olarak belirlenmiştir. Çalışılan 25 çeşidin antioksidan aktivitelerinin büyük ölçüde değişiklik gösterdiği ve fenolik bileşiklerin miktarları ile yüksek uyum sağladığı gözlenmiştir. Genelde eriklerin, özellikle Black Beaut, Red Beaut ve Angeleno olmak üzere, nektarin ve şeftaliden daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip oldukları bulunmuştur.

2.7. ÇALIŞILAN ERİK ÇEŞİTLERİ VE ÖZELLİKLERİ

Erikler *Prunus cerasifera* (Yeşil erikler=Can erikler), *Prunus salicina* (Japon erikler=İtalyan Erikler) ve *Prunus domestica* (Avrupa erikleri) olmak üzere üç türe ayrılmaktadır. Bu türler içinde can erikleri sofralık ve anaçlık olarak, Japon erikleri sofralık ve teknolojik (reçel, meyve suyu, marmelat vb.) olarak, Avrupa erikleri ise kurutmalık ve sofralık olarak tüketilmeye uygundur [80].

Türkiye'nin hemen hemen her bölgesinde yetişmekte olan erik, sert çekirdekli meyveler grubu içinde yıllık üretim bakımından kayısı ve şeftaliden sonra üçüncü sırada yer almaktadır. Bununla birlikte yetiştiriciliği açısından büyük iklim toprak potansiyeline sahip olan ülkemizde sofralık erik yetiştiriciliği konusunda yeterli gelişmenin sağlandığını söylemek güçtür. Bunda dünyadaki gelişmelerin iyi takip edilememesi ve eriğin diğer sert çekirdekli meyve türlerine göre gerek beslenme değerinin düşük, gerekse daha az karlı olması gibi yanlış bir anlayışı etkili olmuştur [81].

Oysa ki eriğin besin içeriğini incelediğimizde bol miktarda B vitaminleri içerdiğini, ayrıca potasyum, magnezyum, kalsiyum ve fosfor mineralleri açısından da zengin bir meyve olduğunu görürüz. 100 gr taze erik; 48 (kkal) kalori, 12.3 gr karbonhidrat, 170 mg potasyum, 18 mg fosfor, 1 mg sodyum, 5 mg demir, 12 mg kalsiyum, içermektedir. Ayrıca A, Thiamin B1, Riboflavin B2, Niacin B, C ve E vitaminlerini de değişik miktarlarda içerdiği belirlenmiştir [82].

Ülkemiz sahip olduğu uygun iklim ve toprak koşulları nedeniyle meyvecilik açısından çok sayıda tür ve çeşit yetiştirme şansına sahiptir. Türkiye bugün gerek meyve tür ve çeşit sayısı, gerekse üretim miktarı bakımından dünyanın önemli meyve üreticisi ülkeleri arasında yer almaktadır. Ülkemiz elma, armut, ayva, erik, kiraz, vişne, fındık, antepfıştığı, badem, ceviz, kestane, zeytin, incir, nar ve üzümün anavatanıdır. Bu meyve türleri arasında renk, tat, aroma, bakımından hoşa giden ve aranan meyvelerden biriside de eriktir. Yabani eriklerin çok eski zamanlardan beri Küçük Asya'dan tüm Akdeniz ülkelerini kapsayan geniş alanlarda yetiştiği bilinmektedir. Birçok araştırıcıya göre eriğin orijininin Karadeniz ile Orta Asya arasındaki bölge olduğu bildirilmektedir [83].

2.7.1. Can Erikleri

Yeşil turfanda olarak tüketilen bu eriklerde meyveler Nisan-Mayıs aylarında toplanır. Ağaçlar sık dallı, yayvan taçlıdır. Meyve orta büyüklükte ortalama 15-20 gram ağırlığında, açık yeşil, mayhoş ve suludur. Olgunluk ilerledikçe yeme kalitesi artar. [80].



şekil 2.19: Can eriği

2.7.2. Japon (İtalyan) Erikleri

Pazarda ve halk arasında İtalyan eriği olarak bilinirler. Haziran-Eylül aylarında olgunlaşırlar. Çoğu kendine kısır veya kısmen kendine verimli olduğundan tozlayıcıları ile birlikte dikilmeleri zorunludur. Ağaçları çeşide göre değişmek üzere sık veya seyrek dallı, yayvan, dik-yayvan veya sarkık taçlıdır[80].



Şekil 2.20: İtalyan eriği

2.7.3. Avrupa Erikleri

Kurutmalık olmakla birlikte sofralık tüketime uygun olanları da vardır. Kendine verimlidirler. Ağaçları seyrek dallı, dik, yayvan veya sarkık taçlıdır.

Mürdüm eriği ağustos sonunda olgunlaşır. Meyve ortalama 58 gram ağırlığında, yumurta şeklinde, puslu mor-siyah renklidir. Meyve eti sarı, gevrek, tatlıdır [80].



Şekil 2.21: Mürdüm eriği

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Bu çalışmada kullanılan cihazlar; kimyasal madde ve erik örneklerini tartmak için Shimadzu-AX 200 analitik terazi, pH ölçümleri için İSTEK Neomet pH/ISE Meter pH-240L pH metre, ekstraksiyon işlemleri ve kimyasal maddelerin çözünmesine yardımcı olmak için Branson 221 ultrasonik banyo, santrifüj işlemleri için Elektro-mag M 4812 P (5000 rpm) santrifüj cihazı, inkübasyon işlemleri için 10 kademeli Clifton su banyosu, hidroliz işlemleri için HB4 basic KIKA-WERKE su banyosu, çözeltileri karıştırmak için Elektro-mag girdap karıştırıcı, erik örneklerinin dondurularak kurutulmasında Telstar Cryodos freeze-dryer, bidistile su üretimi için Millipore Simpak 1 Synergy 185 bidistile su sistemi, absorbans ölçümleri ve spektrum çizimleri için Cary 1E UV-Vis spektrofotometre, HPLC ayırımları için Perkin Elmer Series 200 UV-Vis dedektör, pompa, vakum degazer, Perkin Elmer 600 Series Link Chromatography ara yüzeyinden oluşan HPLC cihazıdır. Özellikle antosiyaninler ile ilgili çalışmalarda Waters 1525 Binary HPLC pompa, 2998 PDA dedektör, İn-Line degazerden oluşan HPLC cihazı kullanılmıştır.

3.2. KİMYASAL MADDELER

Kullanılan kimyasal maddeler; troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) (Aldrich), gallik asit (Fluka), kateşin (Fluka), klorojenik asit (Sigma), epikateşin (Fluka), kafeik asit (Aldrich), rutin (Sigma), kuersetin (Fluka), siyanidin klorür (Fluka), kuersetin-3-β-D-glukozit (Fluka), peonidin klorür (Fluka), peonidin 3-glukozit (Fluka), kuromanin klorür (Fluka), kerasiyanin klorür (Fluka), idaein (siyanidin 3-O galaktozit) klorür (Fluka), bakır (II) klorür dihidrat ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck), amonyum asetat (Riedel-de Haën), neocuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) (Sigma-Aldrich), ABTS (2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat]) (Fluka), %30'luk hidrojen peroksit (Merck), % 96'lık etanol (Merck), metanol (Merck), % 37'lik hidroklorik asit (Merck), *m*-fosforik asit (Sigma), *o*-fosforik asit (Merck), sodyum bikarbonat (Merck), HRP (Horseradish Peroksidaz) (Fluka) , KH_2PO_4 (Merck) , K_2HPO_4 (Merck)

Kromatografik ayrımlar Macherey-Nagel Nucleodur C18 (250x4,6mm,5µm) kolonda gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması

Gallik asit, kateşin, klorojenik asit, epikateşin, kafeik asit, rutin (kuersetin 3-rutinozit), kuersetin, siyanidin klorür, kuersetin-3-β-D-glukozit, peonidin klorür, kuromanin (siyanidin 3-glukozit) klorür, kerasiyanin (siyanidin 3-rutinozit) klorür, idaein (siyanidin 3-O galaktozit) klorür stok çözeltileri metanolde çözüldü. Tüm stok antioksidan çözeltileri -20 ° C' de saklanarak kullanıldı.

CUPRAC yönteminde; 1.0×10^{-2} M Cu(II) klorür çözeltisi ve 1 M amonyum asetat tampon (pH 7.0) çözeltisi distile suda, 7.5×10^{-3} M neokuproin çözeltisi % 96'lık etanolde hazırlandı.

ABTS/HRP yönteminde; 4.0×10^{-3} M ABTS çözeltisi distile suda, 1.2×10^{-4} M hidrojen peroksit çözeltisi %96'lık etanolde, 2.4×10^{-5} M HRP çözeltisi etanol ve distile su karışımında (1:1,v/v) hazırlandı. Asidik ekstraktlar ve antosiyanin standartları için, 4.0×10^{-3} M ABTS çözeltisi, 3.9×10^{-4} M hidrojen peroksit çözeltisi ve 2.4×10^{-5} M HRP çözeltisi pH 7,4 fosfat tamponunda hazırlandı.

pH 7,4 fosfat tamponu: 0,1M olacak şekilde susuz KH_2PO_4 ve K_2HPO_4 uygun tartımlarının distile suda çözülmesiyle hazırlandı.

ABTS/AAPH yönteminde; 1.0×10^{-3} M ABTS ve 2.5×10^{-3} M AAPH çözeltisi pH=7.4 tamponunda birlikte hazırlanır.

3.3. ANTİOKSİDAN STANDARTLARININ HİDROLİZİ

Gallik asit, kateşin, klorojenik asit, epikateşin, kafeik asit ve rutin, son derişim 10^{-3} M olacak şekilde ayrı ayrı 120 dakika süreyle 90 °C'de hidroliz (% 50 metanol ve 1.2 M HCl ortamında) [84,85] edildi.

3.4. ERİK ÖRNEKLERİNİN ANALİZE HAZIRLANMASI

3.4.1. Erik Örneklerinin Temin Edilmesi

Can erik Muğla ili Fethiye ilçesi Seki yaylasından Haziran ayının son haftası, Mürdüm erik Uşak ilinden Ağustos-Eylül ayı olan hasat zamanlarında bizzat dallarından toplanarak, İtalyan ise Uşak köylü pazarından temin edildi.

3.4.2. Erik Örneklerinin Dondurularak Kurutulması

Yaş meyve örnekleri freze-dryer'da -40 °C' de yaklaşık 40 – 50 saat süreyle kurutuldu. Analizleri öncesinde porselen havanda öğütüldü.

3.4.3. Erik Örneklerinin Su İçeriğinin Belirlenmesi

Erik örneklerinin su içeriği; freze-dryer'a konmadan önce yaş örnek ve erlen tartımı alınıp, freze-dryer'dan çıkartıldıktan sonra erlen ve kuru örnek tartımı alınıp, aradaki % fark hesaplanarak bulundu.

3.4.4. Kurutulmuş Erik Örneklerinin Ekstraksiyonu

Ekstraksiyonlar %2 hidroklorik asit içeren %50 metanol ve %2 hidroklorik asit içeren %70 metanol çözeltileri ile yapıldı. Dondurularak kurutulmuş (liyoofilize) erikten yaklaşık 2 g tartılıp ; önce 1. kademe olarak çözücünün 10 mL'si ile 60 dakika ve 2. kademe olarak çözücünün 10 mL'si ile 45 dakika olmak üzere ekstraksiyon aşaması iki kademeli olarak toplam 105 dakikada, ultrasonik banyoda ve ağzı kapalı erlenler içinde gerçekleştirildi. Ekstraksiyon sonucunda son hacimler 25 mL'ye tamamlandı. Analiz öncesinde 1,0/0,45µm mikrofiltrelerden geçirildi.

3.4.5. Erik Örneklerinin Hidrolizi

%2 HCl içeren %50 Metanollü ekstraktlar son derişim %50 metanol ve 1.2M HCl olacak şekilde %50 metanolle seyreltilerek 90 °C'de 2 saat hidroliz edildi. [84,85]

Hidroliz sonunda hidrolizat hacmi hidroliz balonunu yıkamak suretiyle 25 mL'ye metanolle tamamlandı, 1,0/0,45µm mikrofiltreden süzülerek analiz edildi.

3.5. UYGULANAN YÖNTEMLER

3.5.1. Spektrofotometrik Yöntemler

3.5.1.1. CUPRAC Yöntemi

- Normal yöntem;

Bir deney tüpü içerisine sırasıyla 1 mL 1.0×10^{-2} M Cu(II) klorür çözeltisi, 1 mL 7.5×10^{-3} M neokuproin çözeltisi ve 1 mL 1 M amonyum asetat tampon (pH 7.0) çözeltisi ilave edildi. Daha sonra x mL antioksidan standart çözeltisinden veya erik örneklerinden $(1.0-x)$ mL %50 metanol-su ve son olarak 0,5 mL 0,1 M NaHCO_3 çözeltisi (erik örnekleri ve antosiyanin standartları asidik olduğu için) eklenerek karıştırıldı. Tüpler oda sıcaklığında ağzı kapalı olarak 30 dakika bekletildi. Süre sonunda çözeltilerin içinde örnek bulunmayan referans çözeltiliye karşı 450 nm'deki absorpsanları ölçüldü [18]. Toplam hacim, asidik örnekler için orijinal yönteme göre 0,5 mL artmış oldu.

Kalibrasyon doğruları antioksidan standartlarıyla oluşturulup, molar absorplama katsayıları hesaplandı.

- İnkübasyonlu Yöntem;

İnkübasyonlu metod 50 °C'de ve orijinal yöntemden farklı olarak 20 dakika yerine 30 dakika bekletildi. Bu şekilde normal metoda göre hazırlanmış çözeltiler ağızları kapatılarak 50 °C'lik su banyosunda 30 dakika bekletilerek inkübe edildi. Süre sonunda tüpler soğuk su içinde birkaç dakika soğutuldu. Tüplerin ağızları açılıp tekrar karıştırıldıktan sonra içinde örnek bulunmayan referans çözeltiliye karşı 450 nm'deki absorpsanları ölçüldü [18].

Kalibrasyon doğruları antioksidan standartlarıyla oluşturulup, molar absorplama katsayıları hesaplandı.

3.5.1.2. ABTS / HRP Yöntemi

Arnao ve arkadaşlarının geliştirdikleri bu yöntem [4] ayıraç miktarları ve süre biraz değiştirilerek uygulandı. Bir deney tüpü içerisine sırasıyla 0.5 mL 4×10^{-3} M ABTS, 0.5 mL 1.2×10^{-4} M H_2O_2 ve 0.5 mL 2.4×10^{-5} M HRP ilavesinden sonra çözelti karıştırıldı ve oluşan ABTS radikalinin absorpsanının kararlı hale gelebilmesi için 5 dakika

bekletildi. Bu süre sonunda x mL örnek ve (0.5–x) mL etanol ilave edildi ve 5 dakika daha bekletildi. 10. dakikada 730 nm’de etanole karşı absorbans okundu. Radikal çözeltisinin (örnek yerine örnek çözücüsü içeren) absorbansından, örnek içeren çözeltinin absorbansı çıkarılarak ΔA absorbans değerleri hesaplandı .

3.5.2. Kromatografik Yöntem

3.5.2.1. HPLC Analizi

Polifenolik bileşiklerin nitel ve nicel analizi için geliştirilen HPLC metodunda, antioksidan standart çözeltileri ve asidik sulu metanol çözeltileri ile hazırlanan kurutulmuş erik ekstraktları, 1 mL/dakika akış hızıyla 280 ve 520 nm’ lerde dedekte edilerek Metanol (A) ve %0.2 o-H₃PO₄ içeren bidistile su (B) ikili çözücü sisteminden oluşan hareketli fazın gradient elüsyonu ile analizlendi.

Gradient elüsyon, 5 dakika %30 (A), eğim (0.0);

35 dakika %66 (A) eğim (1.0) olarak uygulandı.

Kalibrasyon doğruları antioksidan standartlarının pik alanlarıyla oluşturuldu.

%50 ve %70 metanol içeren asidik çözeltiler ile hazırlanan kurutulmuş erik ekstraktlarının nitel ve nicel analizi, örneklerin en az iki enjeksiyonu ile gerçekleştirildi.

Çalışılan her bir erik örneği enjekte edilmeden önce kolon, 10 dakika % 100 metanolle yıkandı ve 10 dakika da % 30 (A) : % 70 (B) ile dengelendi.

3.5.3 Birleştirilmiş HPLC- Spektrofotometrik Yöntemler

HPLC sonuçlarından hesaplanan erik örneklerindeki bileşenlerin bireysel derişimlerinin bu bileşenlerin spektrofotometrik olarak belirlenen TEAC değerleriyle çarpılması sonucu, örneklerin teorik antioksidan kapasiteleri hesaplandı.

$$(\text{Antioksidan Kapasite})_{\text{Toplam}} = \sum_{i=1}^n C_i \text{ TEAC}_i \quad (3.1)$$

(c_i : i- bileşeninin HPLC yoluyla bulunan derişimini; TEAC_i : i- bileşeninin seçilen kapasite ölçüm yöntemine göre TEAC katsayısını ifade etmektedir.)

Kromatografik derişimler ve spektrofotometrik TEAC değerleri kullanıldığı için bu hesap yöntemi HPLC-Spektrofotometrik yöntemler olarak adlandırıldı ve TEAC katsayılarının hesaplandığı yöntemi simgeleyen kısaltmalar kullanılarak HPLC-CUPRAC_N, HPLC-CUPRAC_I ve HPLC-ABTS olarak adlandırıldı.

4. BULGULAR

4.1. CUPRAC VE ABTS YÖNTEMLERİNİN ÇEŞİTLİ ANTİOKSİDANLARA UYGULANMASI

Troloks, gallik asit, kateşin, klorojenik asit, epikateşin, kafeik asit, rutin, kuersetin, siyanidin klorür, kuersetin-3-β-D-glukozit, peonidin klorür, kuromanin klorür ve kerasiyanin klorür, idaein klorür ve peonidin 3-glukozitin normal ve inkübasyonlu CUPRAC ve ABTS/HRP yöntemleriyle kalibrasyon doğruları çizildi.

Tablo 4.1-4.3’de verilen doğru denklemlerinde x: derişim, y: absorbans ve r: korelasyon katsayısını ifade etmektedir.

Tablo 4.1: Çeşitli antioksidanlar için normal CUPRAC yöntemi verileri

Antioksidan	Doğru Denklemi	(r)	Doğrusal Aralık (mol L ⁻¹)
Troloks	$y = 1.6 \times 10^4 x + 0.0048$	0.9994	$9.76 \times 10^{-5} - 6.83 \times 10^{-5}$
Gallik asit	$y = 4.8 \times 10^4 x + 0.0004$	0.9998	$4.88 \times 10^{-6} - 1.95 \times 10^{-5}$
Kateşin	$y = 5.6 \times 10^4 x + 0.0058$	0.9994	$2.44 \times 10^{-6} - 1.71 \times 10^{-5}$
Klorojenik asit	$y = 5.1 \times 10^4 x + 0.0005$	0.9998	$2.44 \times 10^{-6} - 1.71 \times 10^{-5}$
Epikateşin	$y = 6.5 \times 10^4 x - 0.0152$	0.9991	$2.44 \times 10^{-6} - 1.46 \times 10^{-5}$
Kafeik asit	$y = 5.0 \times 10^4 x - 0.0113$	0.9997	$2.44 \times 10^{-6} - 1.95 \times 10^{-5}$
Kuersetin-3-β-D-glukozit	$y = 5.5 \times 10^4 x + 0.0165$	0.9998	$4.44 \times 10^{-6} - 2.22 \times 10^{-5}$
Rutin	$y = 5.2 \times 10^4 x + 0.0040$	0.9999	$2.44 \times 10^{-6} - 1.95 \times 10^{-5}$
Kuersetin	$y = 7.5 \times 10^4 x + 0.0121$	0.9996	$1.22 \times 10^{-6} - 1.10 \times 10^{-5}$
Kuromanin klorür	$y = 7.6 \times 10^4 x + 0.0287$	0.9996	$3.05 \times 10^{-6} - 1.52 \times 10^{-5}$
Kerasiyanin klorür	$y = 7.7 \times 10^4 x + 0.0055$	0.9997	$1.37 \times 10^{-6} - 6.84 \times 10^{-6}$
Siyanidin klorür	$y = 9.4 \times 10^4 x + 0.0114$	0.9994	$1.52 \times 10^{-6} - 7.64 \times 10^{-6}$
Peonidin klorür	$y = 7.7 \times 10^4 x + 0.0397$	0.9928	$1.19 \times 10^{-6} - 5.94 \times 10^{-6}$
Peonidin-3-O-glukozit	$y = 5.4 \times 10^4 x + 0.0217$	0.9995	$1.44 \times 10^{-6} - 7.22 \times 10^{-6}$
Idaein klorür	$y = 7.5 \times 10^4 x + 0.0297$	0.9950	$1.83 \times 10^{-6} - 9.15 \times 10^{-6}$

Tablo 4.2: Çeşitli antioksidanlar için inkübasyonlu CUPRAC yöntemi verileri

Antioksidan	Doğru Denklemi	(r)	Doğrusal Aralık (mol L ⁻¹)
Troloks	$y = 1.6 \times 10^4 x - 0.0041$	0.9999	$9.76 \times 10^{-6} - 6.83 \times 10^{-5}$
Gallik asit	$y = 5.4 \times 10^4 x + 0.0082$	0.9994	$2.44 \times 10^{-6} - 1.71 \times 10^{-5}$
Kateşin	$y = 7.0 \times 10^4 x + 0.0333$	0.9987	$2.44 \times 10^{-6} - 1.46 \times 10^{-5}$
Klorojenik asit	$y = 6.0 \times 10^4 x + 0.0299$	0.9993	$4.88 \times 10^{-6} - 1.71 \times 10^{-5}$
Epikateşin	$y = 7.9 \times 10^4 x + 0.0007$	0.9999	$2.44 \times 10^{-6} - 1.22 \times 10^{-5}$
Kafeik asit	$y = 6.1 \times 10^4 x + 0.0162$	0.9993	$2.44 \times 10^{-6} - 1.46 \times 10^{-5}$
Kuersetin-3-β-D-glukozit	$y = 6.5 \times 10^4 x + 0.0019$	0.9980	$4.44 \times 10^{-6} - 2.22 \times 10^{-5}$
Rutin	$y = 6.1 \times 10^4 x + 0.0083$	0.9999	$2.44 \times 10^{-6} - 1.71 \times 10^{-5}$
Kuersetin	$y = 9.7 \times 10^4 x + 0.0021$	0.9992	$1.22 \times 10^{-6} - 9.76 \times 10^{-5}$
Kuromanin klorür	$y = 9.4 \times 10^4 x + 0.0125$	0.9963	$2.06 \times 10^{-4} - 3.43 \times 10^{-5}$
Kerasiyanin klorür	$y = 8.6 \times 10^4 x + 0.0423$	0.9975	$1.58 \times 10^{-4} - 2.60 \times 10^{-5}$
Siyanidin klorür	$y = 1.1 \times 10^5 x + 0.0125$	0.9988	$1.52 \times 10^{-6} - 7.64 \times 10^{-6}$
Peonidin klorür	$y = 9.3 \times 10^4 x + 0.0397$	0.9950	$1.19 \times 10^{-6} - 5.94 \times 10^{-6}$
Peonidin-3-O-glukozit	$y = 7.2 \times 10^4 x + 0.0270$	0.9988	$1.44 \times 10^{-6} - 7.22 \times 10^{-6}$
Idaein klorür	$y = 8.4 \times 10^4 x + 0.0593$	0.9964	$1.83 \times 10^{-6} - 9.15 \times 10^{-6}$

Tablo 4.3: Çeşitli antioksidanlar için ABTS / HRP yöntemi verileri

Antioksidan	Doğru Denklemi	(r)	Doğrusal Aralık (mol L ⁻¹)
Troloks	$y = 2.4 \times 10^4 x + 0.0022$	0.9985	$5.00 \times 10^{-6} - 2.50 \times 10^{-5}$
Gallik asit	$y = 1.0 \times 10^5 x - 0.0770$	0.9999	$2.50 \times 10^{-6} - 1.00 \times 10^{-5}$
Kateşin	$y = 1.3 \times 10^5 x - 0.0405$	0.9999	$1.50 \times 10^{-6} - 3.75 \times 10^{-6}$
Klorojenik asit	$y = 3.5 \times 10^4 x - 0.0178$	0.9994	$4.80 \times 10^{-6} - 1.20 \times 10^{-5}$
Epikateşin	$y = 1.3 \times 10^5 x - 0.0121$	0.9992	$1.05 \times 10^{-6} - 5.25 \times 10^{-6}$
Kafeik asit	$y = 3.1 \times 10^4 x - 0.0711$	0.9981	$1.00 \times 10^{-5} - 2.50 \times 10^{-5}$
Kuersetin-3-β-D-glukozit	$y = 6.6 \times 10^4 x - 0.0655$	0.9997	$2.5 \times 10^{-6} - 1.25 \times 10^{-5}$
Rutin	$y = 8.8 \times 10^4 x + 0.0707$	0.9988	$1.00 \times 10^{-6} - 1.00 \times 10^{-5}$
Kuersetin	$y = 1.1 \times 10^5 x + 0.0182$	0.9994	$1.50 \times 10^{-6} - 7.50 \times 10^{-6}$
Kuromanin klorür	$y = 1.1 \times 10^5 x + 0.0359$	0.9981	$1.71 \times 10^{-6} - 5.14 \times 10^{-6}$
Kerasiyanin klorür	$y = 1.1 \times 10^5 x + 0.031$	0.9957	$7.70 \times 10^{-7} - 3.85 \times 10^{-6}$
Siyanidin klorür	$y = 1.2 \times 10^5 x + 0.1779$	0.9991	$2.58 \times 10^{-6} - 6.45 \times 10^{-6}$
Peonidin klorür	$y = 5.7 \times 10^4 x + 0.1287$	0.9919	$2.00 \times 10^{-6} - 8.00 \times 10^{-6}$
Peonidin-3-O-glukozit	$y = 9.00 \times 10^4 x - 0.0102$	0.9991	$1.62 \times 10^{-6} - 8.12 \times 10^{-6}$
Idaein klorür	$y = 7.83 \times 10^4 x - 0.0095$	0.9999	$2.06 \times 10^{-6} - 8.24 \times 10^{-6}$

4.2. CUPRAC VE ABTS YÖNTEMLERİYLE ÇEŞİTLİ ANTİOKSİDANLARIN TEAC KATSAYILARININ BELİRLENMESİ

Gallik asit, kateşin, klorojenik asit, epikateşin, kafeik asit, rutin, kuersetin, siyanidin klorür, kuersetin-3-β-D-glukozit, peonidin klorür, kuromanin klorür ve kerasiyanin klorür, idaein klorür ve peonidin 3-glukozit standart antioksidanlarına uygulanan CUPRAC normal ve inkübasyonlu yöntem ve ABTS/HRP yöntemi sonrasında, absorbans ve molar derişim arasında çizilen kalibrasyon grafiğinin eğiminden molar absorplama katsayıları (ε) bulunarak, bu değerin troloksun molar absorplama

katsayısına bölünmesiyle elde edilen troloks eşdeğeri antioksidan kapasiteleri (TEAC) hesaplandı.

Laboratuvarımızda yapılan daha önceki bir tez çalışmasında [86] ABTS/persülfat yöntemiyle; gallik asit için 2.52, kateşin için 1.44, epikateşin için 1.01, rutin için 0.93 ve kuersetin için 2.89 olarak bulunan TEAC katsayıları, bileşiklerin molekül yapısındaki hidroksil gruplarının sayısı ve yerlerine ve CUPRAC değerlerine uygun olmadığı için bu çalışmada ABTS/HRP yöntemi uygulandı.

Tablo 4.4’de çeşitli antioksidanların CUPRAC ve ABTS/HRP yöntemlerine göre elde edilen TEAC değerleri görülmektedir.

Tablo 4.4: Çeşitli antioksidanların CUPRAC ve ABTS yöntemlerine göre belirlenen TEAC değerleri

ANTIOKSIDAN	TEAC _{CUPRAC}		TEAC _{ABTS}
	TEAC _N	TEAC _I	
Gallik asit	2,99	3,25	3,64
Kateşin	3,46	4,22	4,56
Klorojenik asit	3,15	3,64	1,38
Epikateşin	4,04	4,80	4,58
Kafeik asit	3,12	3,67	1,11
Kuersetin-3-β-D-glukozit	3,54	4,10	3,21
Rutin	3,24	3,68	3,19
Kuersetin	4,64	5,88	4,01
Kuromanin klorür	4,73	5,89	4,68
Kerasiyanin klorür	4,80	5,35	4,50
Siyanidin klorür	5,84	7,03	5,10
Peonidin klorür	4,81	4,17	2,36
Peonidin-3-O-glukozit	3,41	4,57	3,67
Idaein klorür	4,70	5,22	3,48

4.3. HPLC YÖNTEMİNİN ÇEŞİTLİ ANTIOKSİDANLARA UYGULANMASI

Tablo 4.5 ve 4.6’da standart antioksidanların HPLC’de geliştirilen metodla elde edilen pik alanları ile derişim arasında çizilen doğru denklemleri görölmektedir.

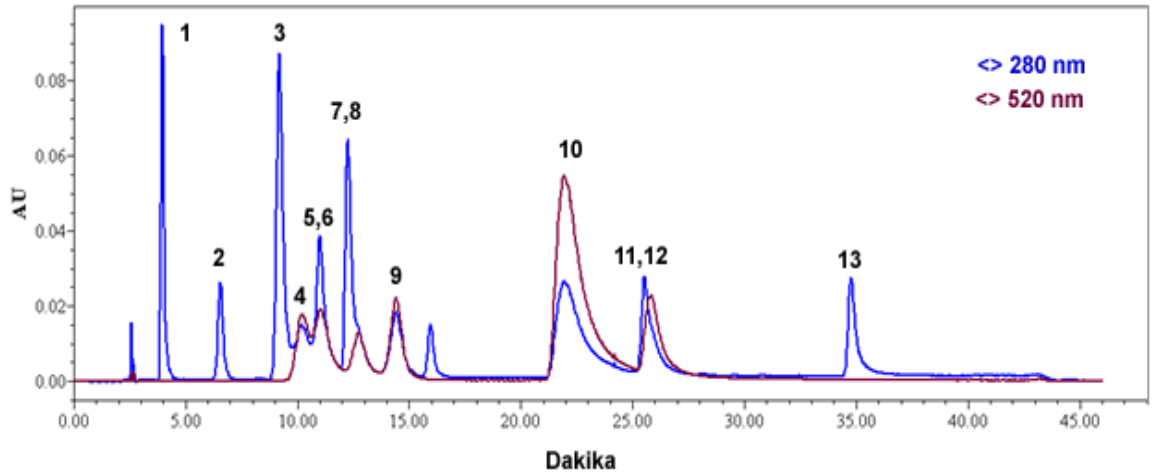
Tablo 4.5: Çeşitli antioksidanların 280 nm’deki HPLC verileri

Antioksidan	Doğru Denklemi	(r)	Doğrusal Aralık (mol L ⁻¹)
Gallik Asit	$y = 1.01 \times 10^{10} c - 4668$	0.9998	$6.22 \times 10^{-5} - 5.00 \times 10^{-4}$
Kateşin	$y = 4.22 \times 10^9 c - 36$	0.9999	$6.22 \times 10^{-5} - 5.00 \times 10^{-4}$
Klorojenik asit	$y = 1.5 \times 10^{10} c + 164641$	0.9999	$6.22 \times 10^{-5} - 5.00 \times 10^{-4}$
Epikateşin	$y = 4.28 \times 10^9 c - 10322$	1.0000	$6.22 \times 10^{-5} - 5.00 \times 10^{-4}$
Kafeik asit	$y = 1.33 \times 10^{10} c - 20291$	0.9999	$6.22 \times 10^{-5} - 5.00 \times 10^{-4}$
Kuersetin-3-β-D-glukozit	$y = 3.7 \times 10^{12} c - 57500$	0.9999	$5.38 \times 10^{-6} - 1.08 \times 10^{-6}$
Rutin	$y = 9.09 \times 10^9 c - 156986$	0.9989	$6.22 \times 10^{-5} - 5.00 \times 10^{-4}$
Kuersetin	$y = 8.02 \times 10^9 c - 587992$	0.9993	$6.22 \times 10^{-5} - 5.00 \times 10^{-4}$
Kuromanin klorür	$y = 2.29 \times 10^{10} c + 76200$	0.9994	$2.06 \times 10^{-4} - 5.16 \times 10^{-5}$
Kerasiyanin klorür	$y = 2.44 \times 10^{10} c + 168000$	0.9994	$1.54 \times 10^{-4} - 3.08 \times 10^{-5}$
Siyanidin klorür	$y = 2.13 \times 10^{10} c + 129000$	0.9992	$1.55 \times 10^{-5} - 1.55 \times 10^{-4}$
Peonidin klorür	$y = 2.33 \times 10^{10} c + 110000$	0.9996	$1.20 \times 10^{-4} - 2.40 \times 10^{-5}$
Peonidin-3-O-glukozit	$y = 2.93 \times 10^{10} c + 6810$	0.9998	$1.95 \times 10^{-6} - 1.95 \times 10^{-5}$
Idaein klorür	$y = 2.69 \times 10^{10} c + 54400$	0.9998	$2.06 \times 10^{-5} - 2.06 \times 10^{-4}$

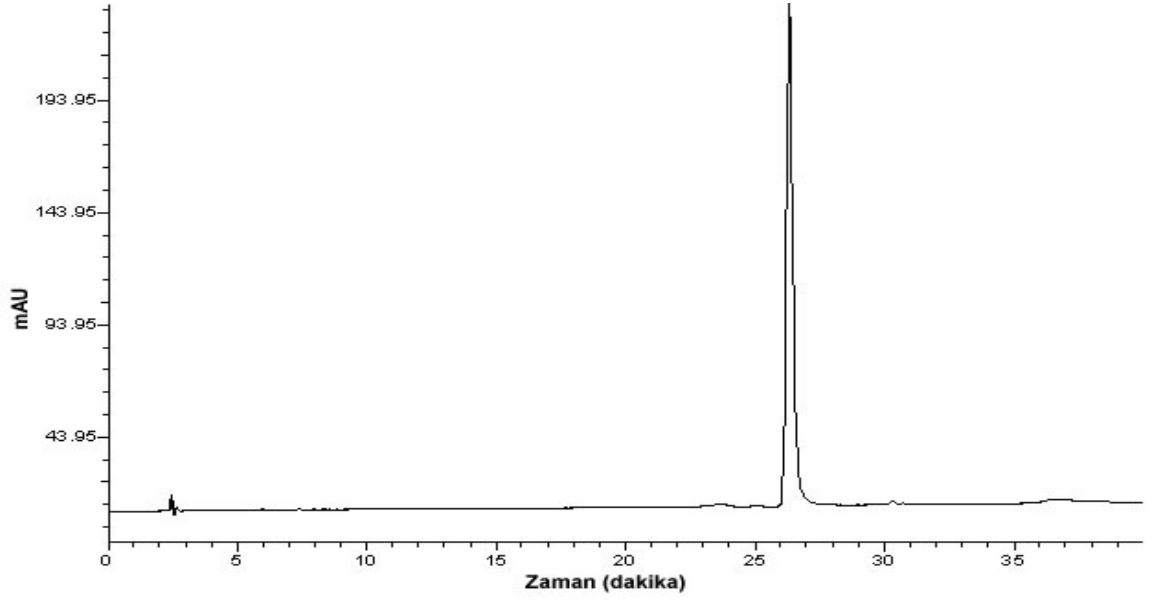
Tablo 4.6: Çeşitli antosiyaninlerin 520 nm’deki HPLC verileri

Antioksidan	Doğru Denklemi	(r)	Doğrusal Aralık (mol L ⁻¹)
Kuromanin klorür	$y = 3.04 \times 10^{10}c + 64800$	0.9998	$2.06 \times 10^{-4} - 5.16 \times 10^{-5}$
Kerasiyanin klorür	$y = 3.25 \times 10^{10}c + 191000$	0.9989	$1.54 \times 10^{-4} - 3.08 \times 10^{-5}$
Siyanidin Klorür	$y = 4.67 \times 10^{10}c + 228000$	0.9993	$1.55 \times 10^{-5} - 1.55 \times 10^{-4}$
Peonidin klorür	$y = 4.88 \times 10^{10}c + 187000$	0.9996	$1.20 \times 10^{-4} - 2.40 \times 10^{-5}$
Peonidin-3-O-glukozit	$y = 3.58 \times 10^{10}c + 27500$	0.9998	$1.95 \times 10^{-6} - 1.95 \times 10^{-5}$
Idaein klorür	$y = 3.74 \times 10^{10}c + 85400$	0.9998	$2.06 \times 10^{-5} - 2.06 \times 10^{-4}$

Şekil 4.1’de çeşitli antioksidan standartlarını içeren sentetik karışımın 280 nm ve 520 nm’deki; Şekil 4.2’de kuersetin-3-glukozit 280 nm’deki standardının kromatogramı görülmektedir.

**Şekil 4.1:** Çeşitli antioksidan standartlarını içeren sentetik karışımın 280 nm ve 520 nm’deki kromatogramları

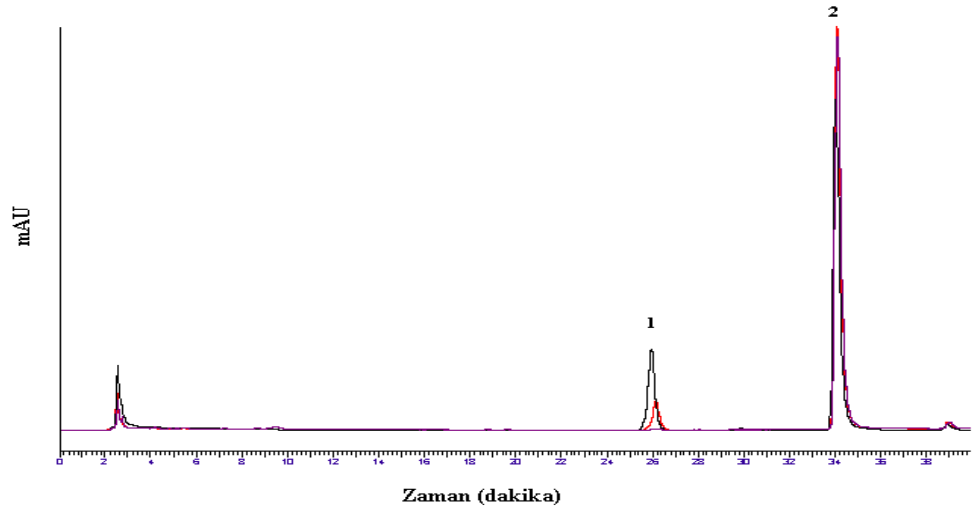
(1: Gallik Asit; 2: Kateşin; 3: Klorojenik Asit; 4: İdaein Klorür; 5,6: Epikateşin, Kuromanin; 7,8: Kafeik Asit, Kerasiyanin; 9: Peonidin 3-Glukozit, 10: Siyanidin, 11,12: Rutin, Peonidin 13: Kuersetin)



Şekil 4.2: Kuersetin-3-β-D-Glukoze Standardının 280 nm’ deki kromatogramı

4.4. ÇEŞİTLİ ANTİOKSİDAN STANDARTLARININ HİDROLİZ SONUÇLARI

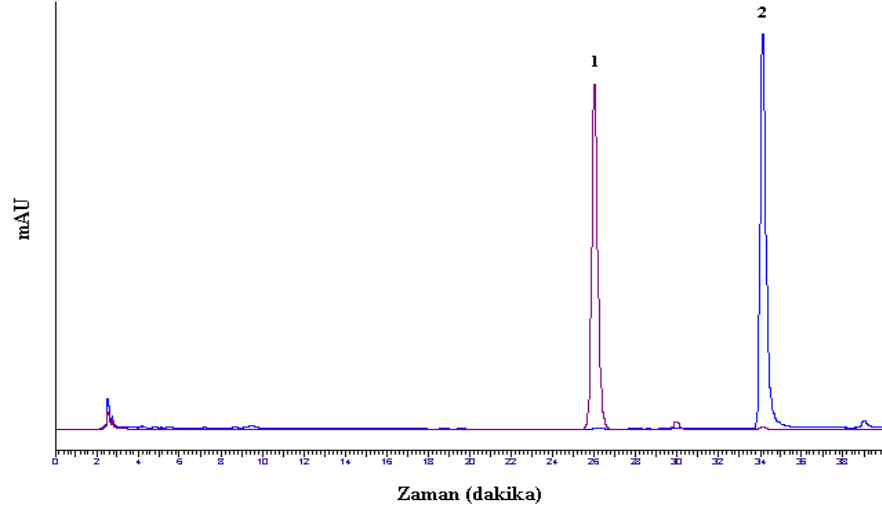
Şekil 4.3’te ½, 1 ve 2 saat süreyle hidroliz edilmiş rutin standardının kromatogramları görülmektedir. Hidrolizatlara standart madde katkısı yapılarak kuersetin belirlenmiştir.



Şekil 4.3: Rutin standardının ½ ; 1 ve 2 saat hidroliz sonucu elde edilen hidrolizat kromatogramları

(1: Rutin; 2: Kuersetin)

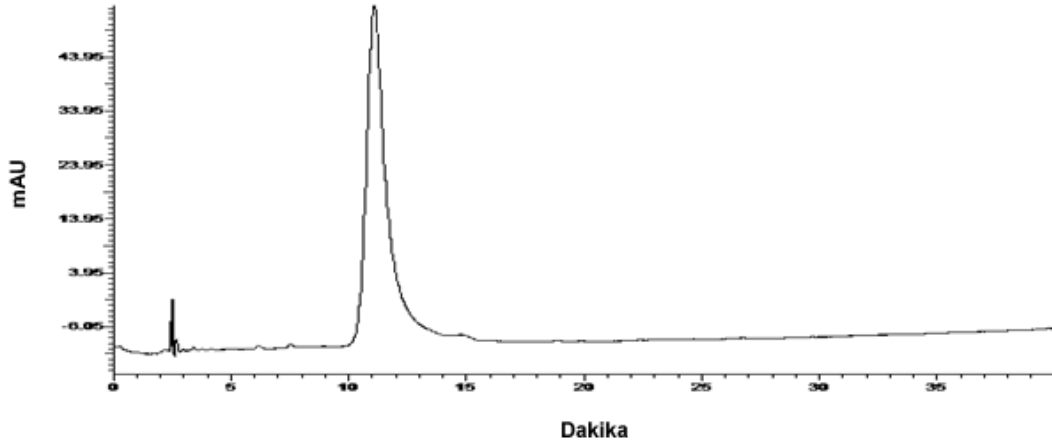
Şekil 4.4’ te hidroliz edilmemiş ve 2 saat hidroliz edilmiş rutin standardının kromatogramları görülmektedir.



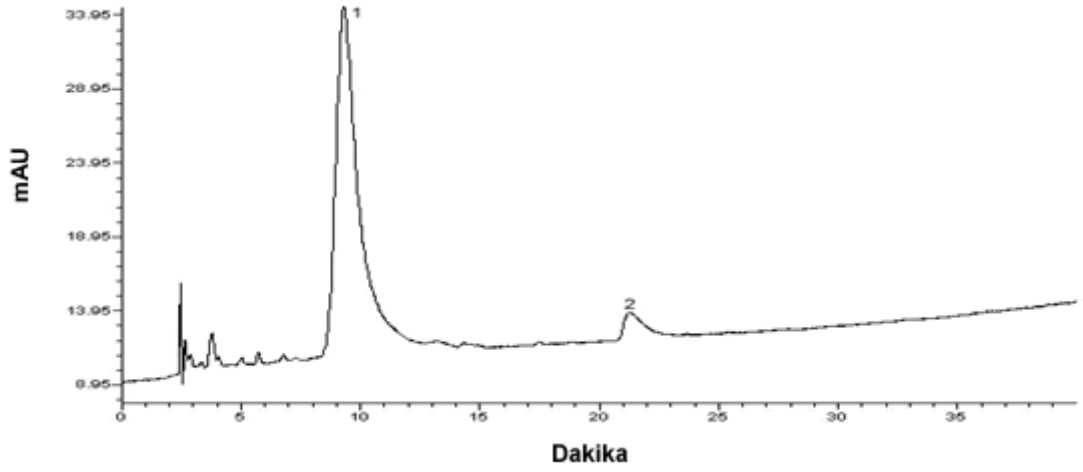
Şekil 4.4: Rutin standardının hidroliz öncesi ve 2 saat hidrolizi sonucu elde edilen kromatogramlar

(1: Hidroliz öncesi,Rutin; 2: Hidroliz sonrası,Kuersetin)

Şekil 4.5’te kuromanin klorür standardının kromatogramı, Şekil 4.6’ da 2 saat süreyle hidroliz edilmiş kuromanin klorür standardının kromatogramı görülmektedir. Hidrolizatlara standart madde katkısı yapılarak kuromanin ve siyanidin belirlenmiştir.



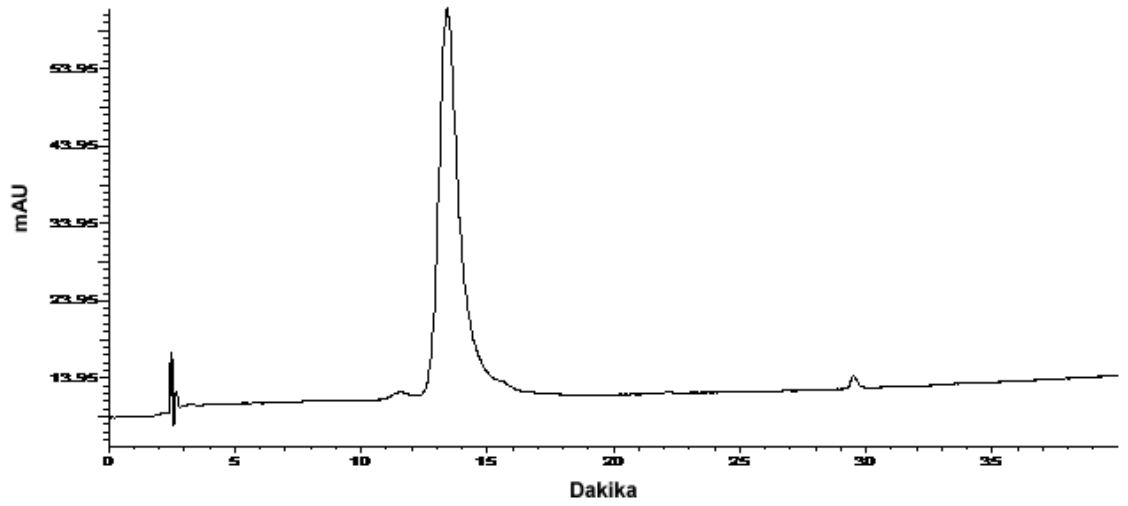
Şekil 4.5: Kuromanin klorür standardının kromatogramı



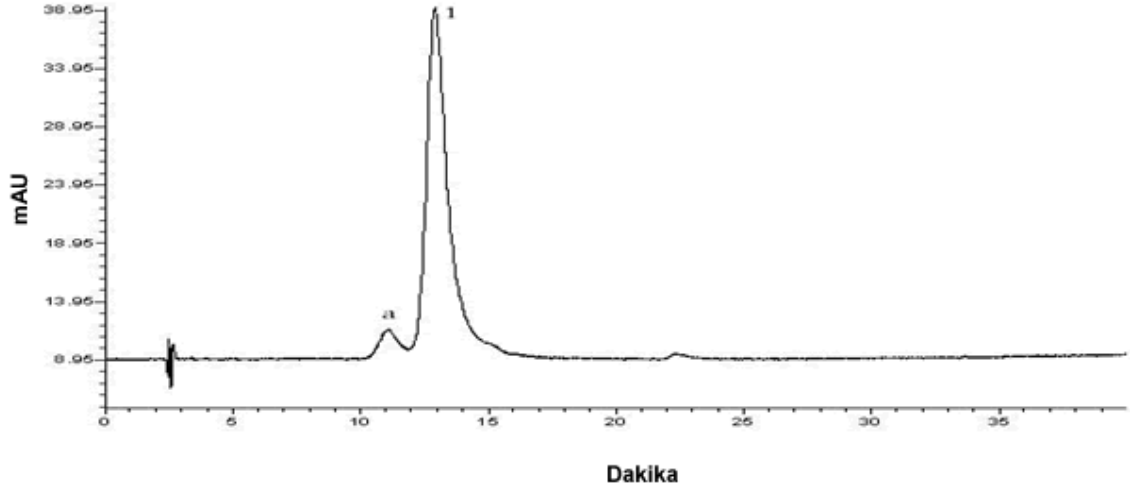
Şekil 4.6: Kuromanin klorür standardının 2 saat hidrolizatı

(1:Kuromanin, 2:Siyanidin)

Şekil 4.7’ de kerasiyanin klorür standardının kromatogramı ve Şekil 4.8 ve 4.9’ da 2 ve 4 saat süreyle hidroliz edilmiş kerasiyanin klorür standardının kromatogramı görülmektedir. Hidrolizatlara standart madde katkısı yapılarak kerasiyanin ve siyanidin belirlenmiştir.

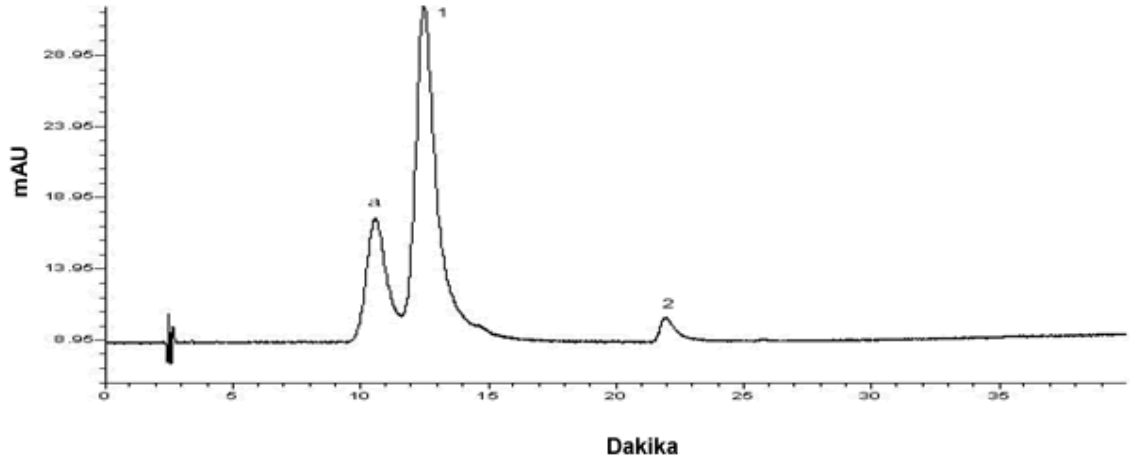


Şekil 4.7: Kerasiyanin klorür standardının kromatogramı



Şekil 4.8: Kerasiyanin klorür standardının 2 saat hidrolizati

(1:Kerasiyanin)



Şekil 4.9: Kerasiyanin klorür standardının 4 saat hidrolizati

(1:Kerasiyanin, 2:Siyanidin)

Hidroliz amacımız, yeterli glikozit standardımız olmaması nedeniyle tanımlayamadığımız antosiyanin ve kuersetin glikozitlerini aglikonlarına bozunmadan dönüştürmektir. Bu nedenle varolan glikozit standartlarımızın farklı sürelerdeki hidroliz kromatogramlarından 2 saatin uygun olduğuna karar verildi. Bu arada kateşin,

epikateşin, klorojenik asit ve kafeik asidin hidroliz şartlarında bozunduğu görölmüştü. Fakat amacımız açısından bu kabul edilmesi gereken bir durumdur.

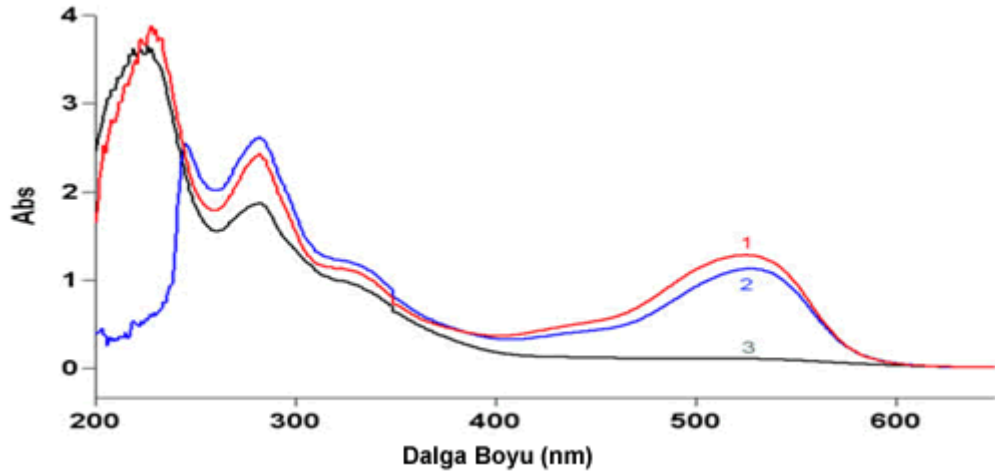
4.5 ERİK ANALİZLERİNİN SONUCU

4.5.1 Erik Örneklerinin Su İçeriğı

Can, italyan ve mürdüm erik için belirlenen su içerikleri sırasıyla %90, %79 ve %84'tür.

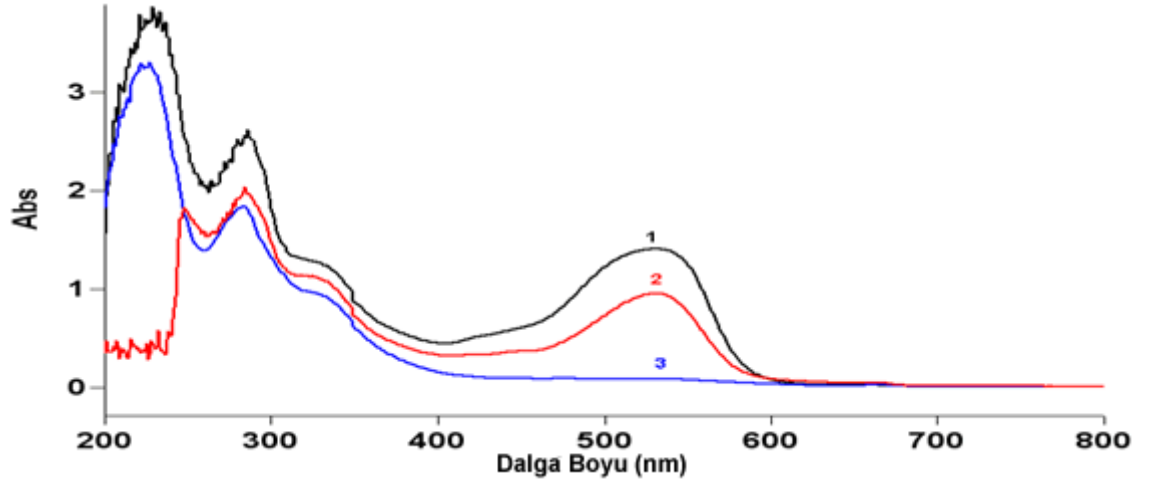
4.5.2 Uygun Ekstraksiyon Çözücüsünün Belirlenmesi

Şekil 4.10-4.11'de farklı çözücülerde ekstrakte edilmiş derişik mürdüm erik ekstraktlarının mor ötesi-görünür bölge spektrumları görölmektedir.



Şekil 4.10: Mürdüm eriğı kabuk ekstaktlarının mor ötesi-görünür bölge spektrumları

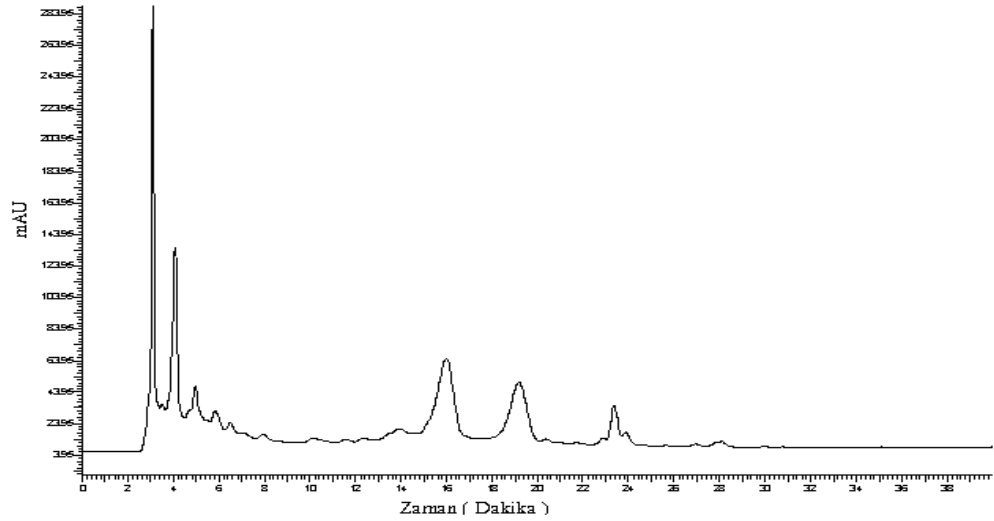
(1: % 2 hidroklorik asit içeren %50 Metanol 2: % 15 asetik asit içeren %50 Metanol 3: %50 Metanol)



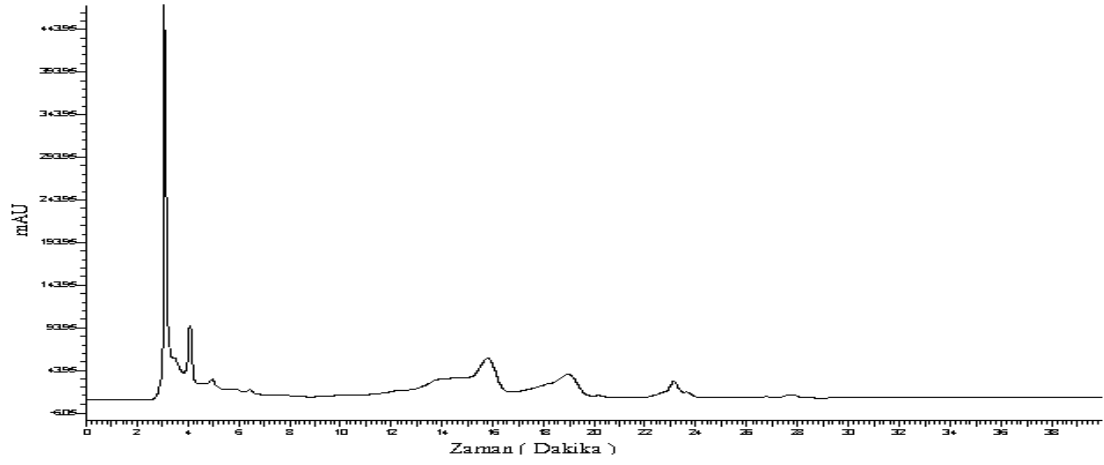
Şekil 4.11: %80 Metanol içeren Mürdüm eriği kabuk ekstaktlarının mor ötesi-görünür bölge spektrumları

(1: % 2 hidroklorik asit içeren %80 Metanol, 2: % 15 asetik asit içeren %80 Metanol, 3: %80 Metanol)

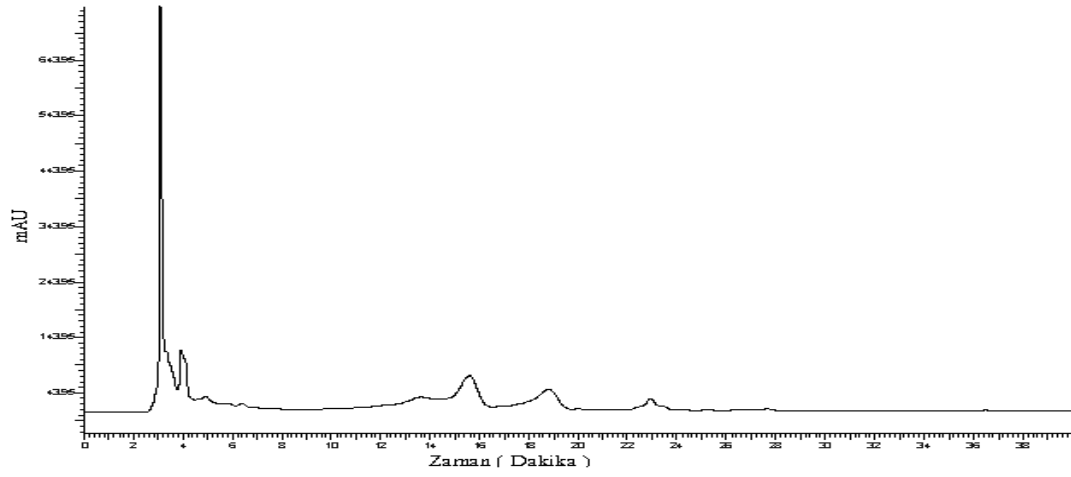
Şekil 4.12–4.17 ile gösterilen kromatogramlarda farklı çözücülerde ekstrakte edilmiş derişik mürdüm erik ekstaktlarının kromatogramları görölmektedir.



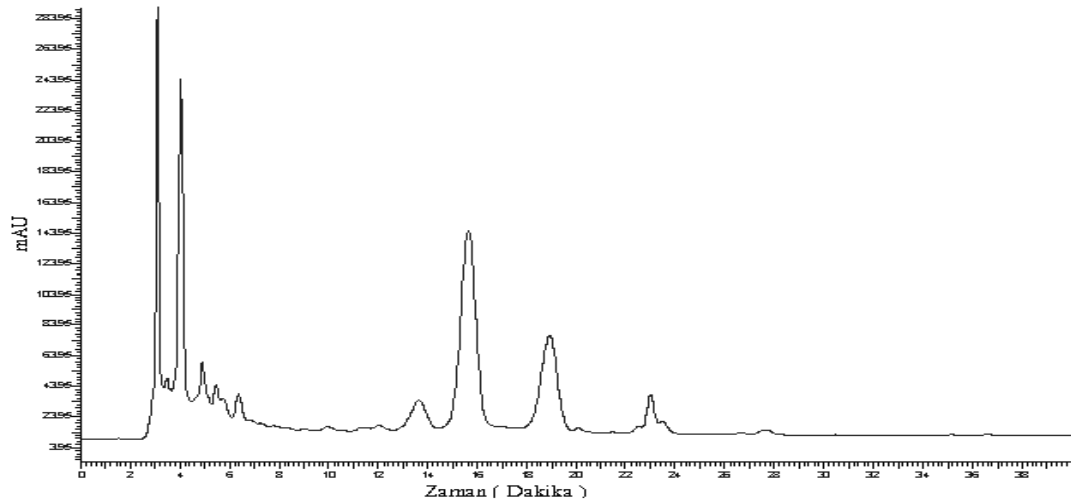
Şekil 4.12: %50 Metanol ile ekstrakte edilmiş Mürdüm eriği HPLC kromatogramı (280nm)



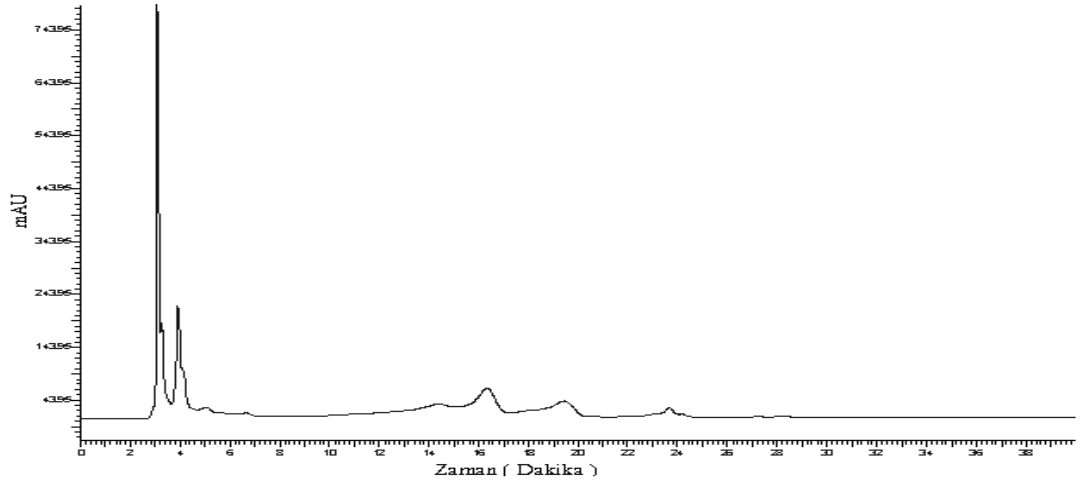
Şekil 4.13: %80 Metanol ile ekstrakte edilmiş Mürdüm eriği HPLC kromatogramı (280nm)



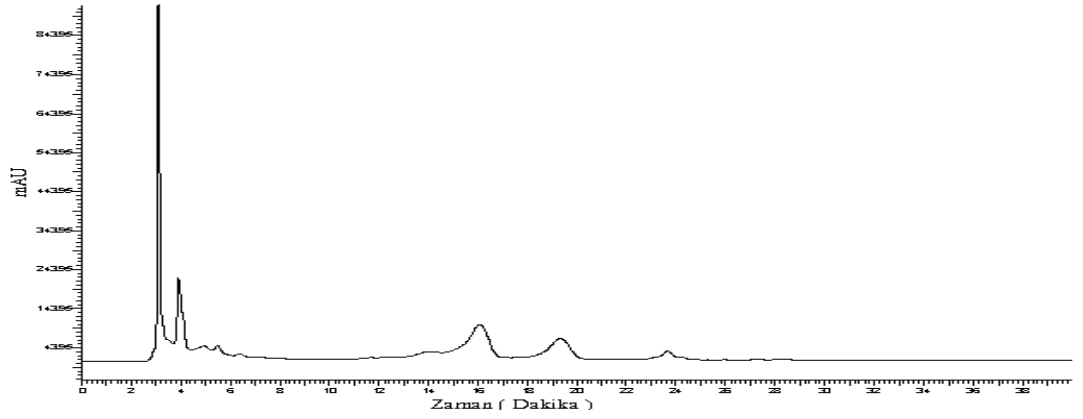
Şekil 4.14: % 15 asetik asit içeren %50 Metanol ile ekstrakte edilmiş Mürdüm eriği HPLC kromatogramı (280nm)



Şekil 4.15: % 2 hidroklorik asit içeren %50 Metanol ile ekstrakte edilmiş Mürdüm eriği HPLC kromatogramı (280nm)

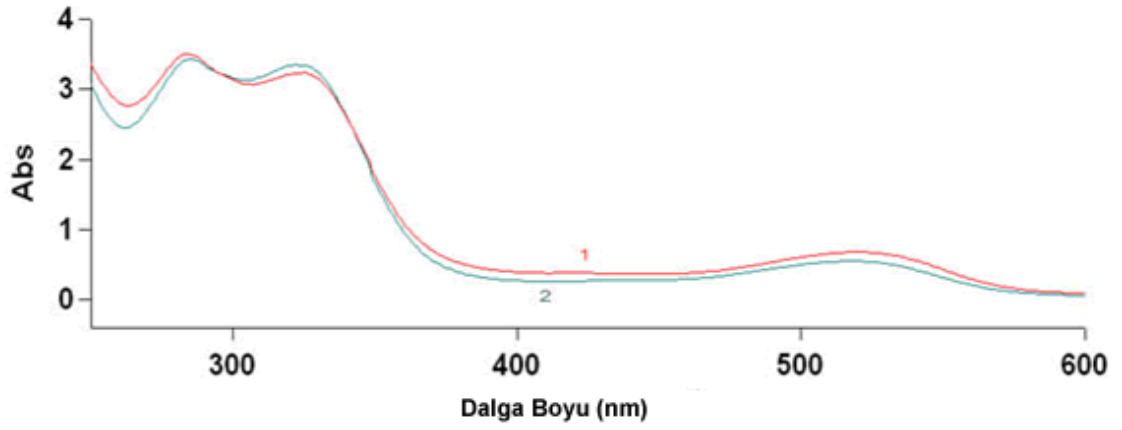


Şekil 4.16: % 15 asetik asit içeren %80 Metanol ile ekstrakte edilmiş Mürdüm eriği HPLC kromatogramı (280nm)



Şekil 4.17: % 2 hidroklorik asit içeren %80 Metanol ile ekstrakte edilmiş Mürdüm eriği HPLC kromatogramı (280nm)

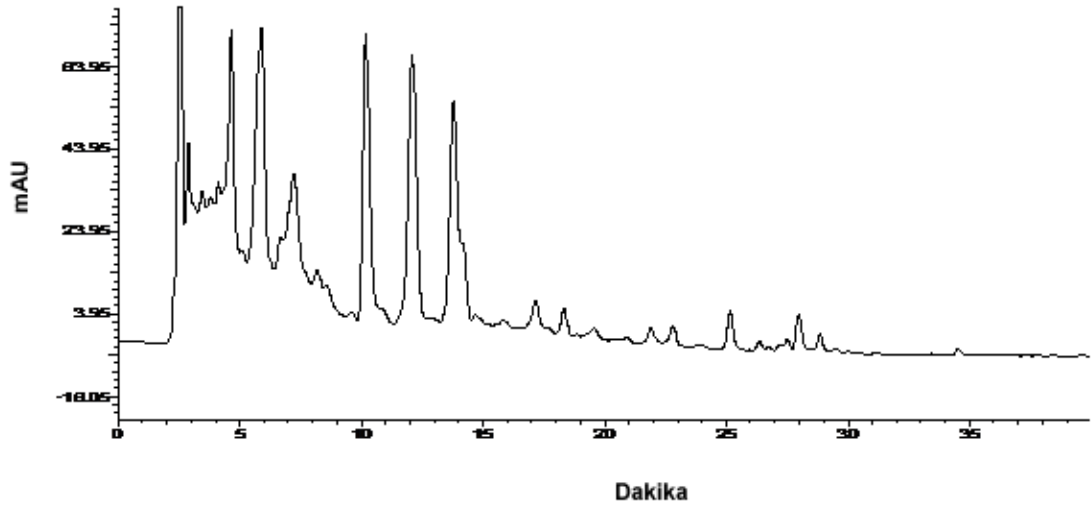
Şekil 4.18’de farklı metanol yüzdelerinde ekstrakte edilmiş derişik italyan erik ekstraktlarının spektrumu görölmektedir.



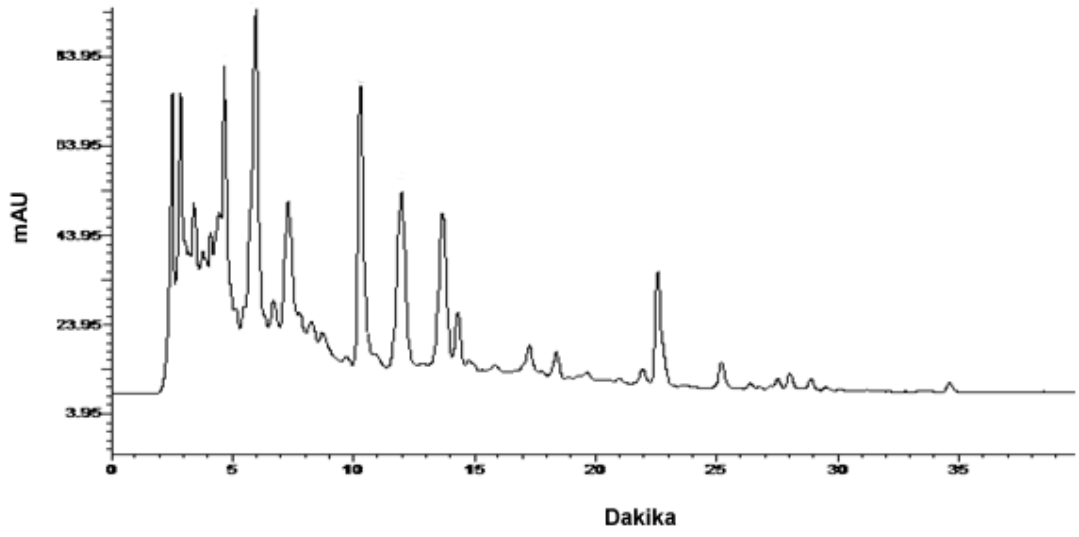
Şekil 4.18: İtalyan erik ekstraktlarının mor ötesi-görünür bölge spektrumları

(1: %2 HCl içeren %70 Metanol 2: %2 HCl içeren %50 Metanol)

Şekil 4.19–4.20 ile gösterilen kromatogramlarda farklı metanol yüzdelerinde ekstrakte edilmiş derişik italyan erik ekstraktlarının kromatogramları görölmektedir.

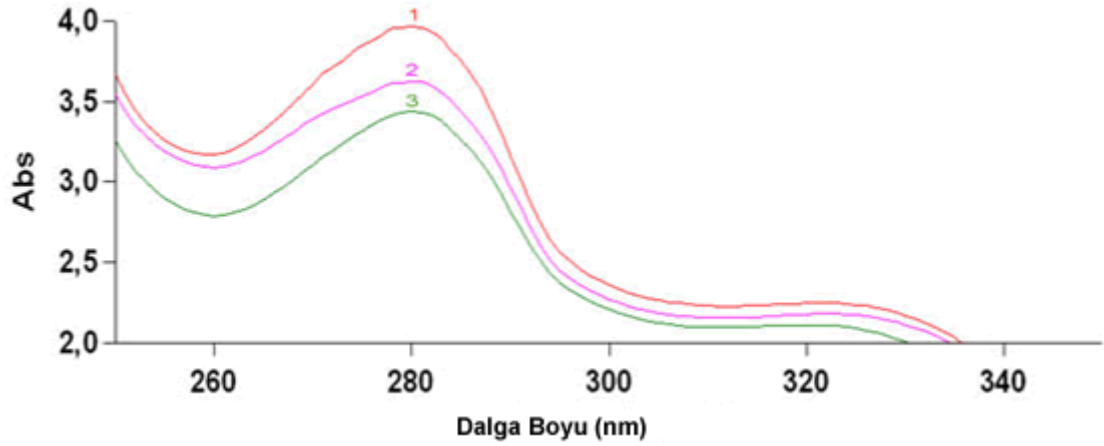


Şekil 4.19: %2 HCl içeren %70 Metanol ile ekstrakte edilmiş İtalyan erik kromatogramı (280nm)



Şekil 4.20: %2 HCl içeren %50 Metanol ile ekstrakte edilmiş İtalyan erik kromatogramı (280nm)

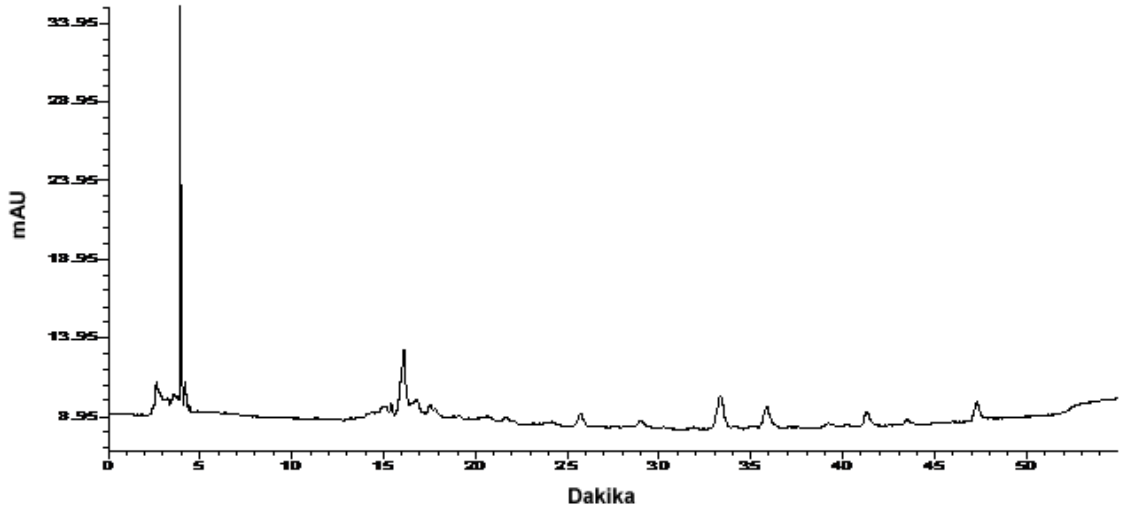
Şekil 4.21’de farklı metanol yüzdelerinde ekstrakte edilmiş derişik can erik ekstraktlarının spektrumu görölmektedir.



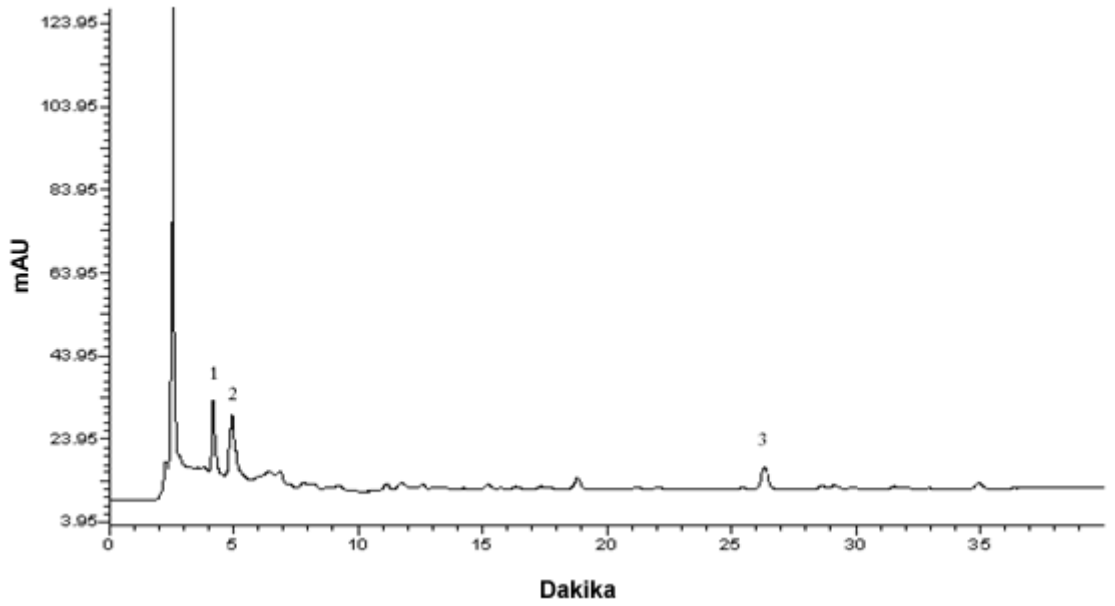
Şekil 4.21: Can erik ekstraktlarının mor ötesi-görünür bölge spektrumları

(1: %70 Metanol 2: %80 Metanol 3: %50 Metanol)

Şekil 4.22–4.23 ile gösterilen kromatogramlarda farklı metanol yüzdelerinde ekstrakte edilmiş derişik italyan erik ekstraktlarının kromatogramları görölmektedir.



Şekil 4.22: %70 metanol ile ekstrakte edilmiş Can erik kromatogramı (280 nm)

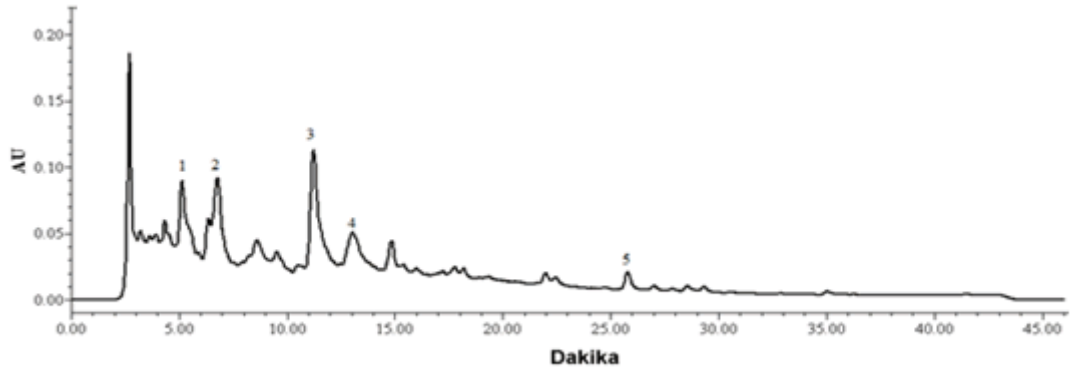


Şekil 4.23: %50 metanol ile ekstrakte edilmiş Can erik kromatogramı (280 nm)

4.5.3 Erik Örneklerinin Başlıca Fenolik Bileşikleri

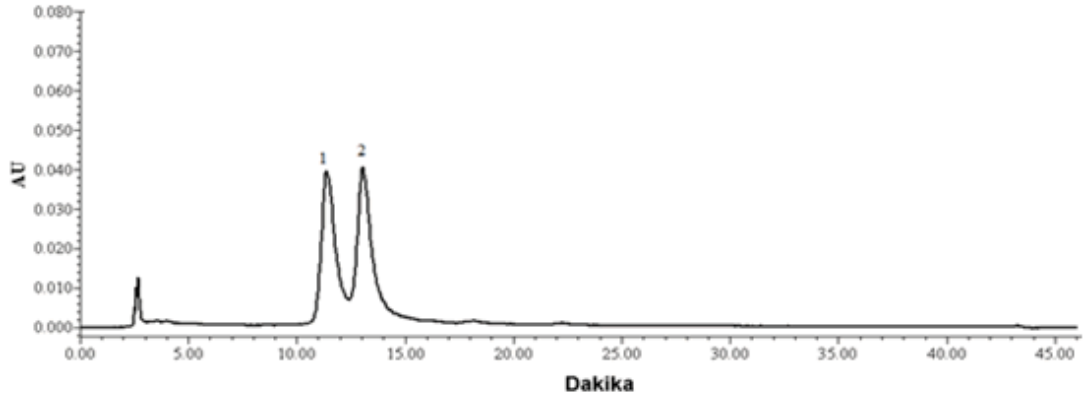
4.5.3.1 İtalyan Erik

Şekil 4.24 ve 4.25’ te %2 HCl içeren %50 Metanol ile ekstrakte edilmiş İtalyan eriğın 280 ve 520 nm’deki kromatogramları görölmektedir. Şekil 4.26’ da ise bu kromatogramların çakışık halleri verilmiştir.



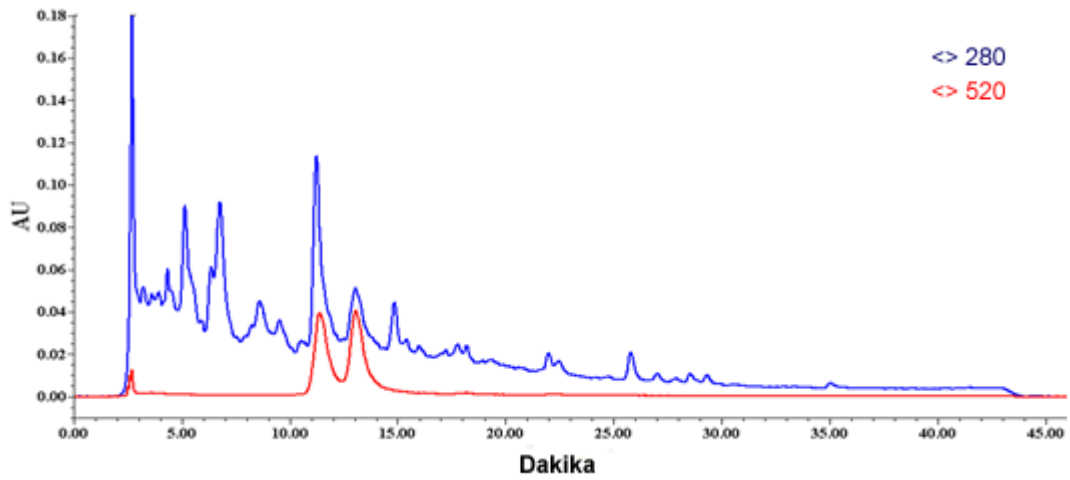
Şekil 4.24: %2 HCl içeren %50 Metanol ile ekstrakte edilmiş İtalyan eriğın 280 nm'deki kromatogramı

(1: Neoklorojenik Asit; 2: Kateşın; 3: Epikateşın, Kuromanın; 4: Kerasiyanın, Kafeik Asit; 5: Rutin)



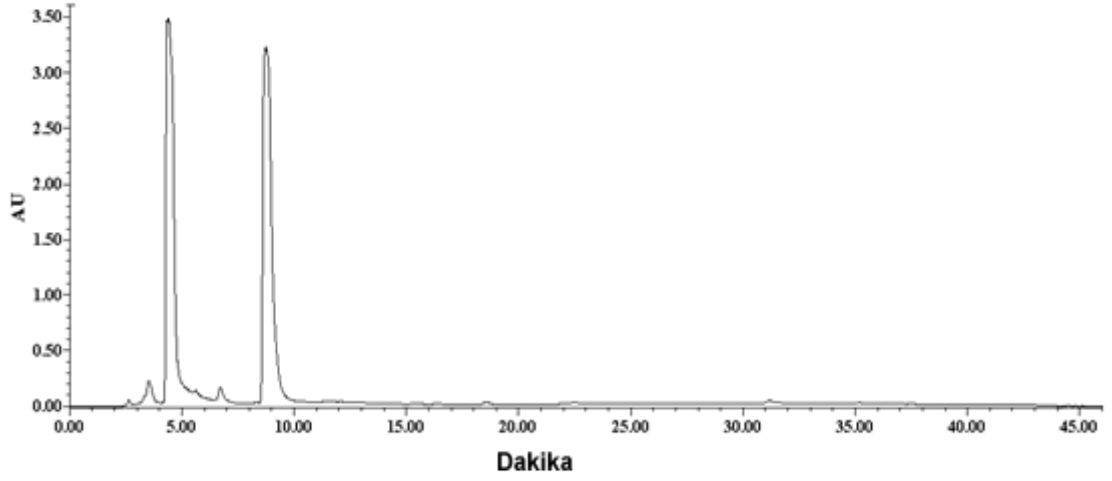
Şekil 4.25: %2 HCl içeren %50 Metanol ile ekstrakte edilmiş İtalyan eriğın 520 nm'deki kromatogramı

(1: Kuromanın; 2: Kerasiyanın)

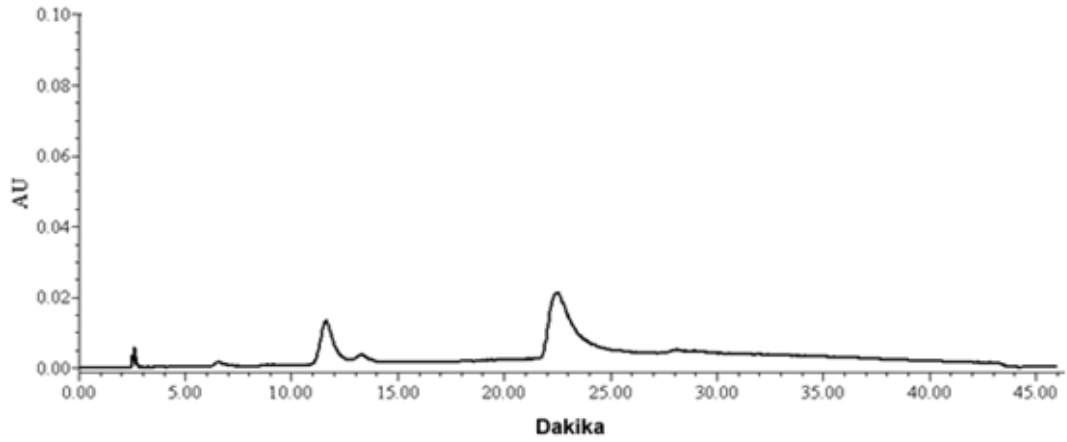


Şekil 4.26: %2 HCl içeren %50 Metanol ile ekstrakte edilmiş İtalyan eriğın 280 ve 520 nm'deki kromatogramı

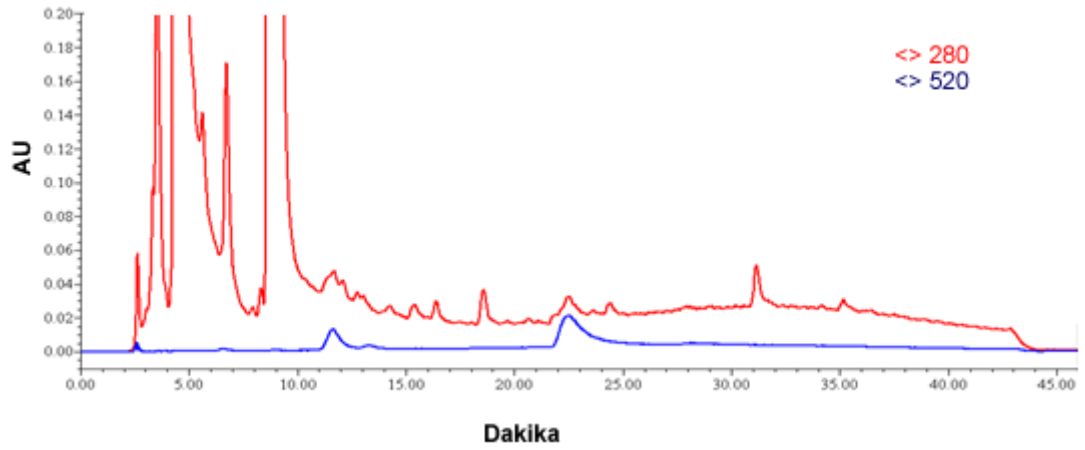
Şekil 4.27 ve 4.28’ de İtalyan erik ekstrakt hidrolizatının 280 ve 520 nm’deki kromatogramı görülmektedir. Şekil 4.29’ da ise bu kromatogramların çakışık halleri verilmiştir.



Şekil 4.27: İtalyan erik ekstrakt hidrolizatının 280 nm’deki kromatogramı



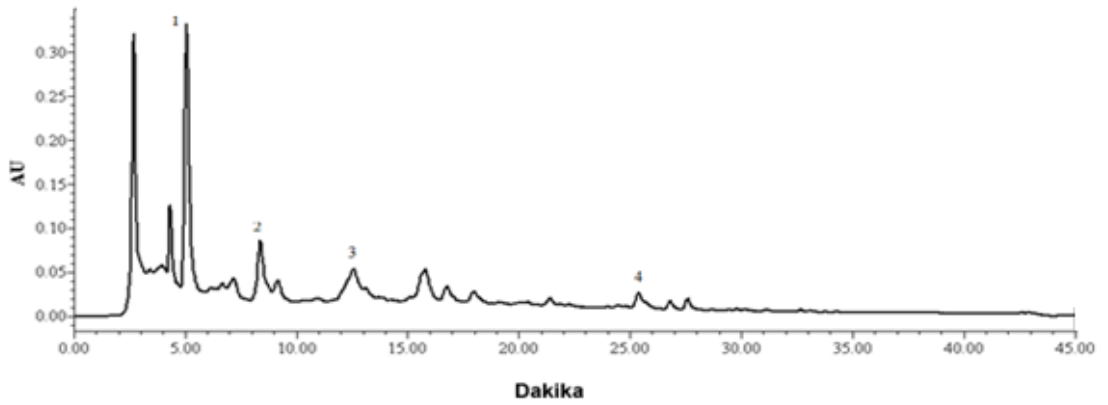
Şekil 4.28: İtalyan eriğın ekstrakt hidrolizatı 520 nm’deki kromatogramı



Şekil 4.29: İtalyan erik ekstrakt hidrolizatının 280 ve 520nm'deki kromatogramı

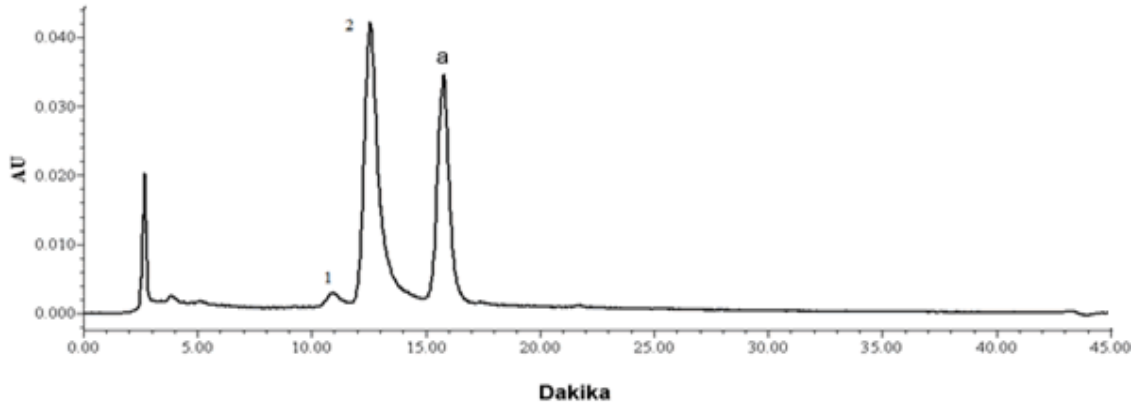
4.5.3.2 Mürdüm Erik

Şekil 4.30 ve 4.31' de %2 HCl içeren %50 Metanol ile ekstrakte edilmiş Mürdüm eriğın 280 ve 520 nm'deki kromatogramları görölmektedir. Şekil 4.32' de ise bu kromatogramların çakışık halleri verilmiştir.



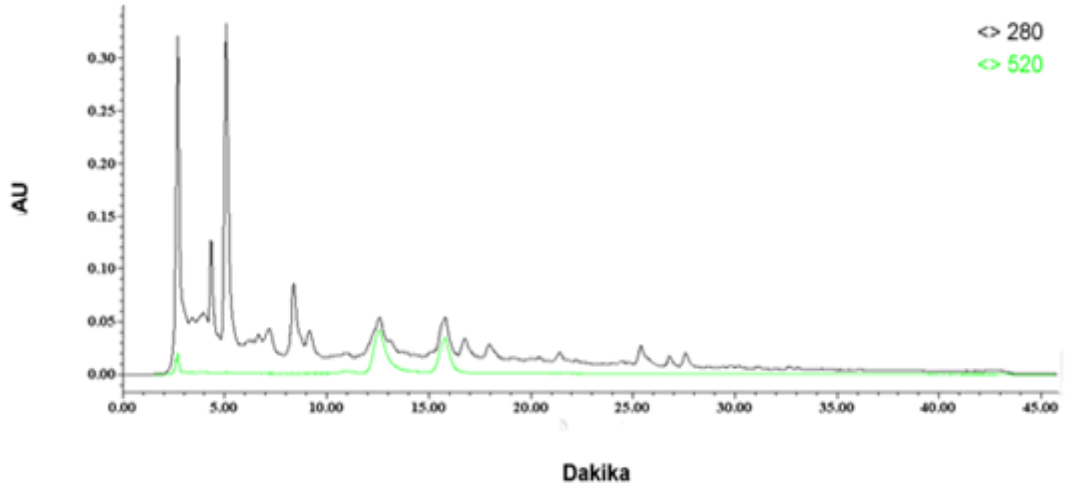
Şekil 4.30: %2 HCl içeren %50 Metanol ile ekstrakte edilmiş Mürdüm eriğın 280 nm'deki kromatogramı

(1: Neoklorojenik Asit; 2: Klorojenik Asit; 3: Kerasiyanin, Kafeik Asit; 4: Rutin)



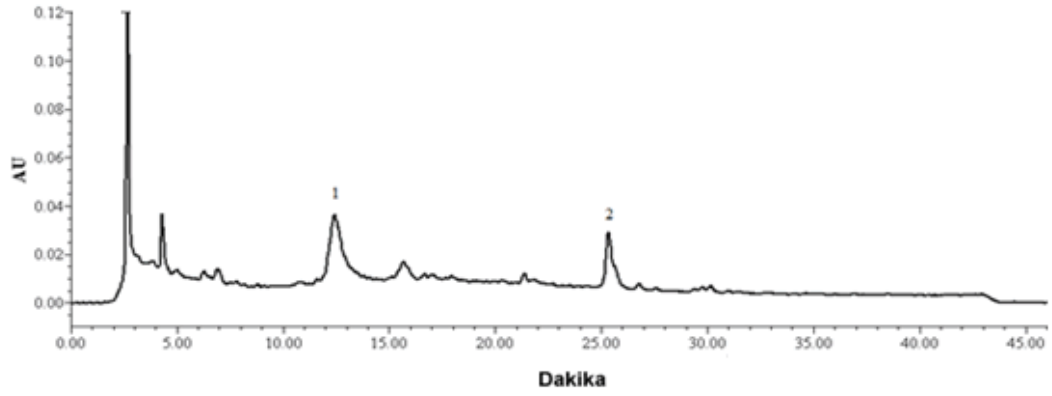
Şekil 4.31: %2 HCl içeren %50 Metanol ile ekstrakte edilmiş Mürdüm eriğın 520 nm’deki kromatogramı

(1: Kuromanin; 2:Kerasiyanin; a: Peonidin glikozidi)



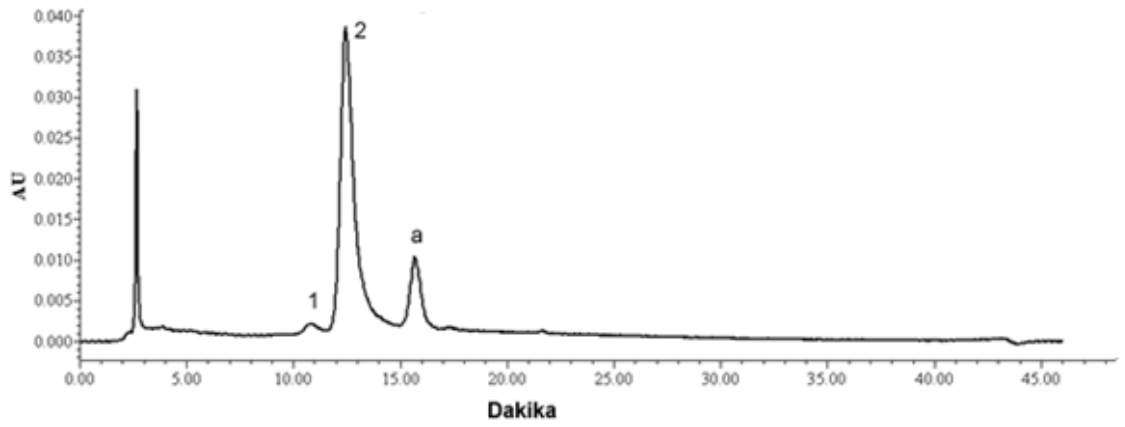
Şekil 4.32: %2 HCl içeren %50 Metanol ile ekstrakte edilmiş Mürdüm eriğın 280 ve 520 nm’deki kromatogramı

Şekil 4.33 ve 4.34’ te %2 HCl içeren %50 Metanol ile ekstrakte edilmiş Mürdüm erik kabuğının 280 ve 520 nm’deki kromatogramları görölmektedir. Şekil 4.35’ te ise bu kromatogramların çıkışık halleri verilmiştir.



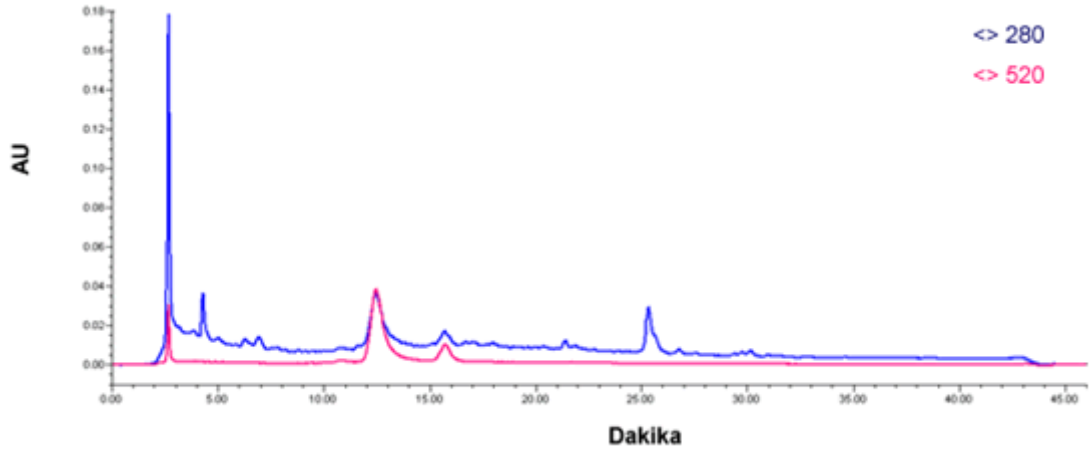
Şekil 4.33: %2 HCl içeren %50 Metanol ile ekstrakte edilmiş Mürdüm erik kabuğunun 280 nm'deki kromatogramı

(1: Kerasiyanin, Kafeik Asit; 2:Rutin)



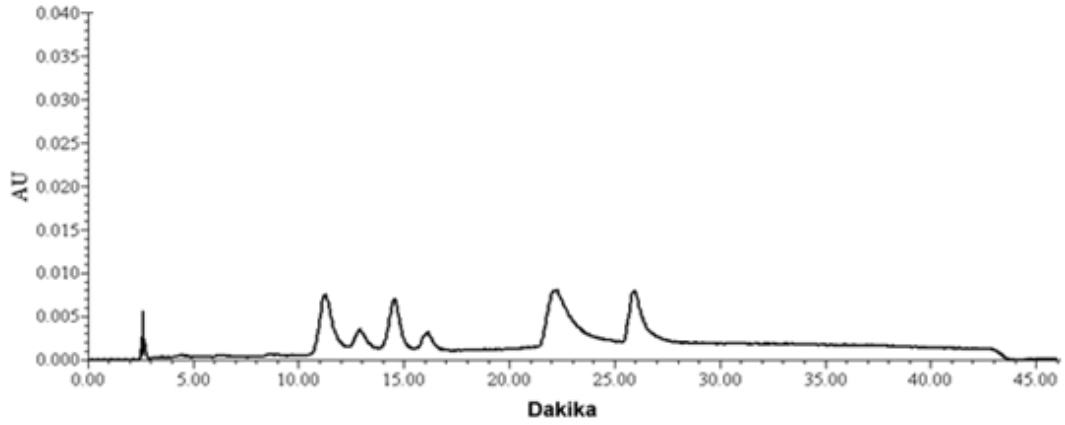
Şekil 4.34: %2 HCl içeren %50 Metanol ile ekstrakte edilmiş Mürdüm erik kabuğunun 520 nm'deki kromatogramı

(1: Kuromanin; 2:Kerasiyanin; a: Peonidin+Şeker)

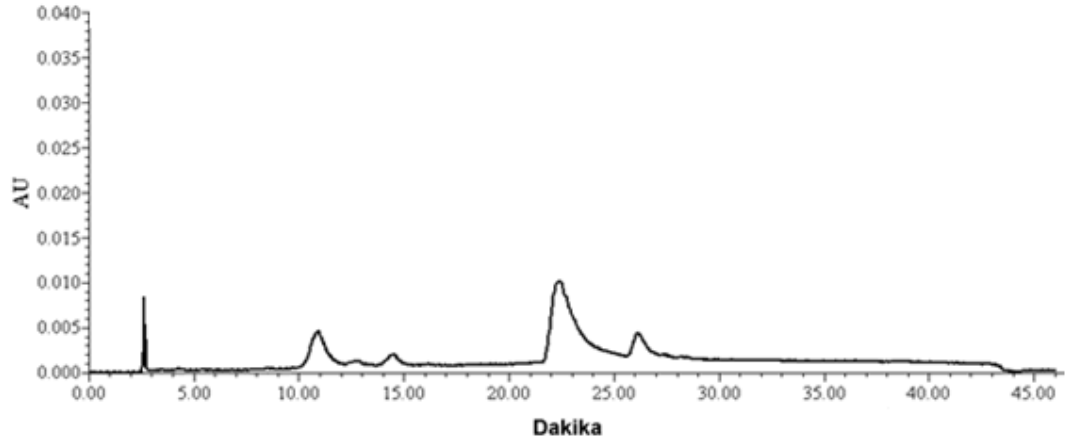


Şekil 4.35: Mürdüm erik kabuk ekstraktının 280 ve 520 nm'deki kromatogramı

Şekil 4.36' da Mürdüm erik ekstrakt hidrolizatının 520 nm'deki kromatogramı, Şekil 4.37' de mürdüm erik kabuğu ekstrakt hidrolizatının 520 nm'deki kromatogramları görülmektedir.

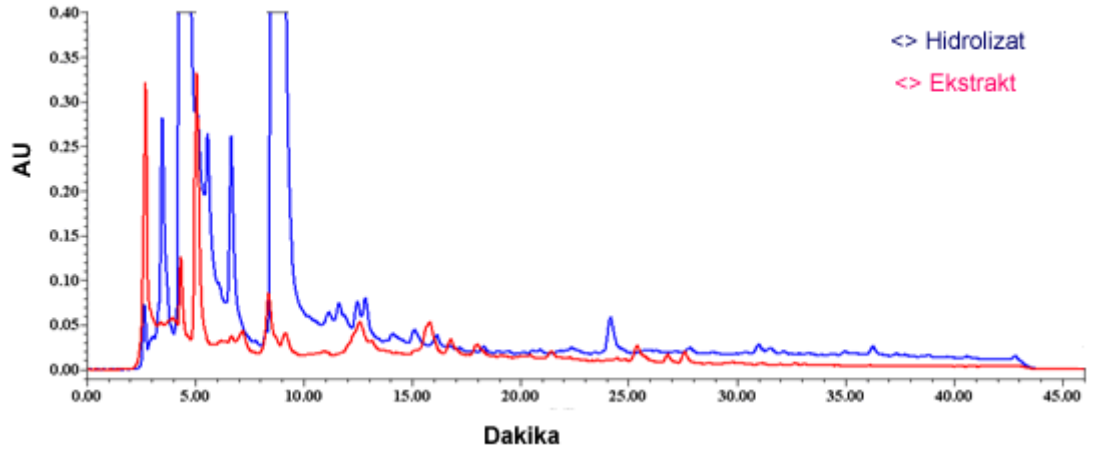


Şekil 4.36: Mürdüm erik ekstrakt hidrolizatının 520 nm'deki kromatogramı

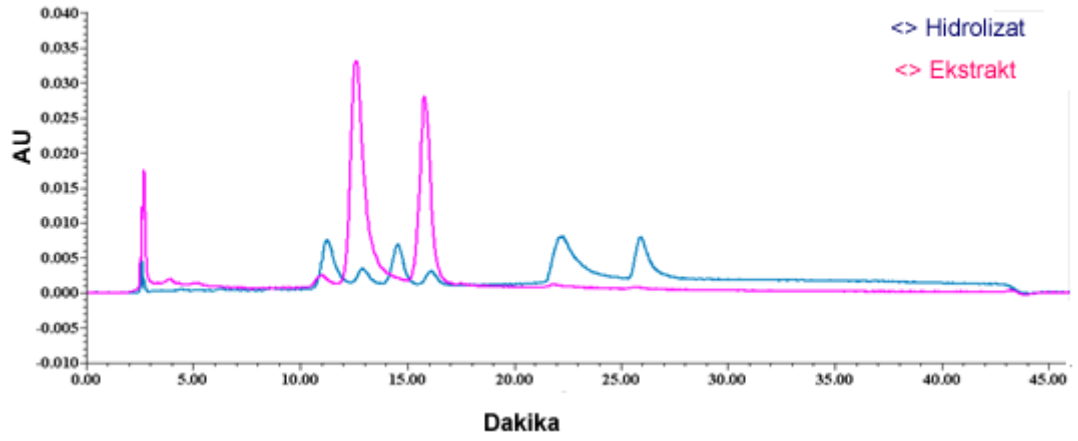


Şekil 4.37: Mürdüm erik kabuğu ekstrakt hidrolizatının 520 nm'deki kromatogramı

Şekil 4.38' de Mürdüm erik ekstrakt ve hidrolizatının 280 nm'deki çakışık kromatogramı, Şekil 4.39'da Mürdüm erik ekstrakt ve hidrolizatının 520 nm'deki çakışık kromatogramı görülmektedir.



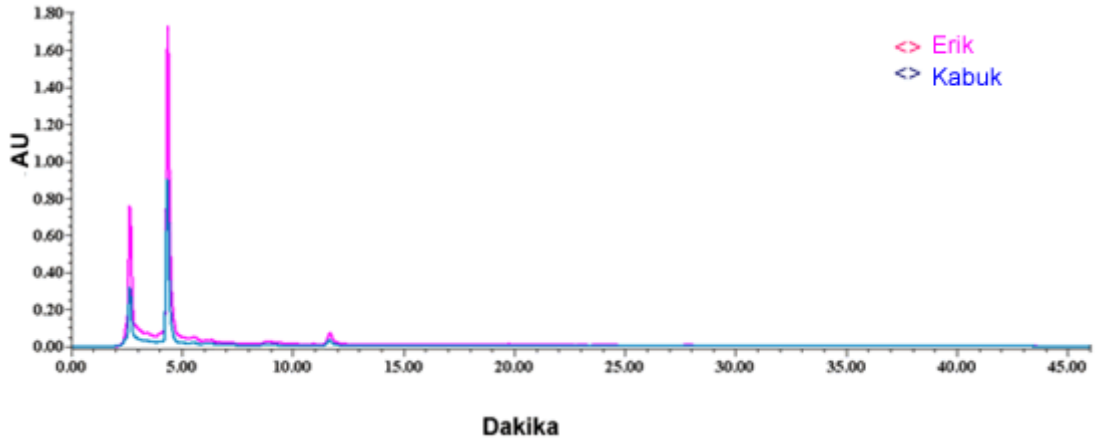
Şekil 4.38: Mürdüm erik ekstrakt ve hidrolizatının 280 nm'deki kromatogramı



Şekil 4.39: Mürdüm erik ekstrakt ve hidrolizatının 520 nm'deki kromatogramı

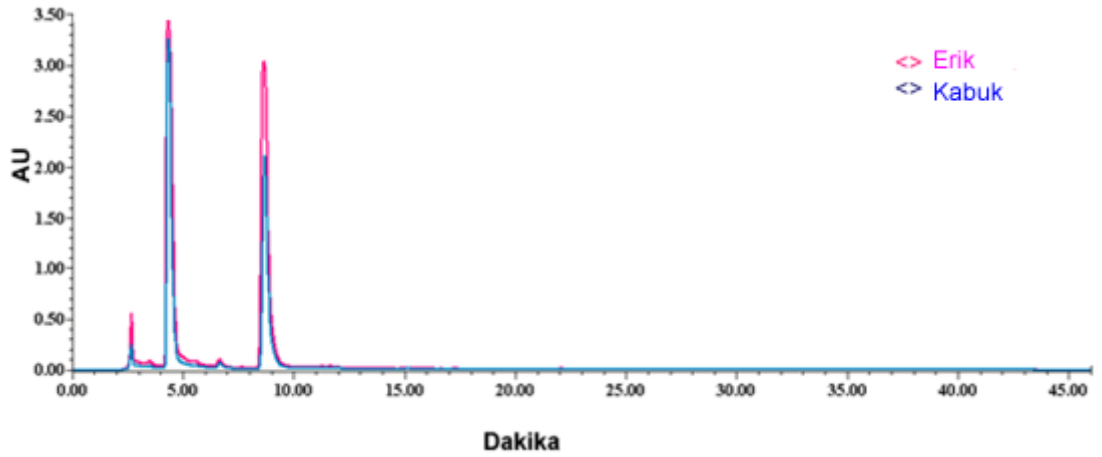
4.5.3.2 Can Erik

Şekil 4.40'ta Can erik ve can erik kabuk ekstraktının 280nm'deki çakışık kromatogramları görülmektedir.



Şekil 4.40: Can erik ve can erik kabuk ekstraktının 280nm'deki kromatogramı

Şekil 4.41'de Can erik ve can erik kabuk ekstrakt hidrolizatının 280nm'deki çakışık kromatogramları görülmektedir.



Şekil 4.41: Can erik ve can erik kabuk ekstrakt hidrolizatının 280nm'deki kromatogramı

4.5.4 Erik Örneklerinin Toplam Antioksidan Kapasiteleri

4.5.4.1 CUPRAC yöntemi ile

Tablo 4.7' de erik ekstraktlarının CUPRAC yöntemi ile bulunmuş toplam antioksidan kapasiteleri görülmektedir.

Tablo 4.7: Erik ekstraktlarının CUPRAC yöntemi ile bulunmuş toplam antioksidan kapasiteleri (mmol troloks g⁻¹)

Erik Örnekleri	CUPRAC _N	CUPRAC _I
Mürdüm	0.05	-
Mürdüm (Kabuk)	0.11	-
Mürdüm Hidrolizat	0.09	0.11
Mürdüm (Kabuk) Hidrolizat	0.37	0.48
İtalyan	0.10	0.13
İtalyan Hidrolizat	0.06	0.10
Can	0.05	0.13
Can (Kabuk)	0.05	0.08
Can Hidrolizat	0.09	0.14
Can (Kabuk) Hidrolizat	0.10	0.06

4.5.4.2 ABTS yöntemi ile

Tablo 4.8' de erik ekstraktlarının ABTS yöntemi ile bulunmuş toplam antioksidan kapasiteleri görülmektedir.

Tablo 4.8: Erik ekstraktlarının ABTS yöntemi ile bulunmuş toplam antioksidan kapasiteleri (mmol troloks g-1)

Erik Örnekleri	ABTS
Mürdüm	0.04
Mürdüm (Kabuk)	0.09
Mürdüm Hidrolizat	0.08
Mürdüm (Kabuk) Hidrolizat	0.33
İtalyan	0.10
İtalyan Hidrolizat	0.05
Can	0.04
Can (Kabuk)	0.03
Can Hidrolizat	0.04
Can (Kabuk) Hidrolizat	0.06

4.5.4.3 Birleştirilmiş HPLC-CUPRAC yöntemi ile

Tablo 4.9’ da erik ekstraktlarının Birleştirilmiş HPLC-CUPRAC yöntemi ile bulunmuş toplam antioksidan kapasiteleri görülmektedir.

Tablo 4.9: Erik ekstraktlarının Birleştirilmiş HPLC-CUPRAC yöntemi ile bulunmuş toplam antioksidan kapasiteleri (mmol troloks g-1)

Erik Örnekleri	CUPRAC _N	CUPRAC _I
Mürdüm 280 nm	1.57×10^{-2}	1.81×10^{-2}
Mürdüm 520 nm	1.88×10^{-3}	2.09×10^{-3}
Mürdüm (Kabuk) 280 nm	1.92×10^{-2}	2.19×10^{-2}
Mürdüm (Kabuk) 520 nm	7.94×10^{-3}	8.91×10^{-3}
İtalyan 280 nm	2.54×10^{-2}	3.03×10^{-2}
İtalyan 520 nm	3.07×10^{-3}	3.60×10^{-3}

4.5.4.4 Birleştirilmiş HPLC-ABTS yöntemi ile

Tablo 4.10’ da erik ekstraktlarının Birleştirilmiş HPLC-ABTS yöntemi ile bulunmuş toplam antioksidan kapasiteleri görülmektedir.

Tablo 4.10: Erik ekstraktlarının Birleştirilmiş HPLC-ABTS yöntemi ile bulunmuş toplam antioksidan kapasiteleri (mmol troloks g-1)

Erik Örnekleri	ABTS
Mürdüm 280 nm	8.30×10^{-3}
Mürdüm 520 nm	1.76×10^{-3}
Mürdüm (Kabuk) 280 nm	1.59×10^{-2}
Mürdüm (Kabuk) 520 nm	7.46×10^{-3}
İtalyan 280 nm	2.81×10^{-2}
İtalyan 520 nm	2.95×10^{-3}

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yaş ve kurutulmuş olarak yılın büyük kısmında var olması, göreceli ucuzluğu ve pek çok insanın ağız tadına uygunluğu gibi nedenlerle insanların en çok tükettiği meyvelerden olan eriğin antioksidan özelliğe sahip temel bileşiklerin neler olduğunun ve erik çeşidine göre nasıl bir farklılık ve dağılım gösterdiğinin ve bu bileşiklerin, örneklerin toplam antioksidan kapasitelerine ne oranda katkıda bulunduğunun araştırıldığı çalışmada, değişik yöntemlerle elde edilen sonuçlar mevcut ve sınırlı sayıdaki standart antioksidan maddelerle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada toplam antioksidan kapasite tayini için, spektrofotometrik olarak CUPRAC ve ABTS/HRP yöntemleri seçilmiştir. Bunlardan CUPRAC yöntemi;

- ✓ Kolay, hızlı, etkili ve maliyeti düşük bir yöntemdir.
- ✓ Absorbansların toplamsallığı ilkesi geçerlidir.
- ✓ CUPRAC yöntemi ile hidrofilik antioksidanlar kadar lipofilik antioksidanların da kapasiteleri ölçülebilmektedir.
- ✓ CUPRAC yönteminde kullanılan reaktif ABTS, DPPH gibi kromojenik radikal reaktiflerinden çok daha karardır. Ayrıca Folin reaktifiyle yükseltgenebilen sitrik asit ve basit şekerler, CUPRAC reaktifi ile yükseltgenmezler.
- ✓ CUPRAC yöntemi ile tiyol içerikli (glutatyon ve sistein gibi) antioksidanların da kapasite tayinini yapılabilirken FRAP yöntemi ile, bu yapıdaki antioksidanların kapasite tayinleri yapılamaz. Bu durum Cu (II) ve Fe(III)'ün farklı kinetik davranışlara sahip olması ile açıklanabilir. Cu (II)'nin reaksiyon kinetiği Fe(III)'e göre daha hızlı gerçekleşir. Çünkü, Fe(III)'ün yüksek spin d-orbitallerinin yarı dolu oluşu ona kinetik bakımdan bir inertlik verir. Oysa Cu(II) 'nin elektronik konfigürasyonu, daha hızlı kinetik etki göstermesine imkan tanır. Sert ve Yumuşak Asit-Baz teorisine göre; Cu(II) (yumuşak asit), Fe (III)'e göre tiyol tipi (yumuşak baz) antioksidanlarla daha fazla etkileşir.

CUPRAC yöntemi ile fizyolojik pH'a yakın ortamlarda çalışılabilirken, fizyolojik pH'dan daha asidik koşullarda (FRAP; pH 3.6) örneğin indirgeme kapasitesi, fenolik

antioksidanların protonlanması sebebiyle bastırılır. Daha bazik koşullarda ise (Folin; pH 10) fenolik türlerin dissosiasyonu nedeniyle örneğin indirgeme kapasitesi artar.

ABTS yöntemi ise öncelikle persülfat ve HRP ile uygulanan iki farklı şekli karşılaştırılmış, ABTS/HRP yönteminin diğerinden üstün olduğuna karar verilmiştir. Bunun nedenleri; persülfatlı yöntemin sıcaklığa karşı oldukça duyarlı olması ve oda sıcaklığındaki düşüşten hızla etkilenecek çökelti oluşturması; HRP'li yöntemin ise sıcaklığa yüksek duyarlılık göstermemesi; persülfatlı yöntemde absorbansın 6. dakikada okuma zorunluluğunun olması ve absorbansın bu süreden sonra düşme eğiliminde olması; HRP'li yöntemde ise absorbansların 10. dakikada okunması ve kararlılığının yüksek olmasından dolayı 10. dakikadan sonra da absorbans değişiminin yavaşlığı; persülfatlı yöntemin bazı antioksidan standartları (gallik asit, kateşin, epikateşin, rutin, kuersetin) ile HRP'li yöntemle göre daha düşük TEAC katsayısı vermesi ve bu şekilde CUPRAC yöntemiyle belirlenen TEAC değerleri ile uyumsuzluklar görülmesi olarak sıralanabilir.

HPLC ile belirlenen bileşenlerden (sayfa 41'de gösterilen formül ile hesaplanan) toplam antioksidan kapasite değerleri, spektrofotometrik CUPRAC ve ABTS yöntemleriyle bulunan değerlerden daha düşüktür. Bunun başlıca nedeni, kromatogramlarda görülen piklerin tamamının standart yetersizliği nedeniyle tanımlanamamasıdır.

Seçilen erik örneklerinin analize hazırlanması için %50 metanol ve metanolün %2 HCl içeren % 70, % 80 ve % 50 (v/v)'lik çözeltileri ve %15 asetik asit içeren %80 ve %50 (v/v)'lik çözeltileri kullanılarak ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Yapılan ön denemeler sonucunda % 2 HCl içeren % 50' lik metanol çözeltisi ile 105 dakika ekstraksiyon işlemi uygulamanın uygun olduğu görülmüştür. Bu nedenle de diğer örneklerde sadece belirlenen koşullarda ekstraksiyon yapılmıştır. Literatürde metanolün koruyucu rolü olduğu ve fenolik bileşiklerin fenoloksidaz gibi enzimlerle yükseltgenmesini engellediği de belirtilmiştir [87]. Hazırlanan bütün örnekler 0.45 µm'lik filtrelerden süzildikten sonra ve gerektiği durumlarda seyreltme yapılarak kullanılmıştır.

Tablo 5.1’de erik ekstraktlarında HPLC ile belirlenebilen toplam antioksidan kapasite yüzdeleri görülmektedir. Belirlenebilen toplam antioksidan kapasite çok düşük olmasının başlıca nedeni, daha önce de belirtildiği gibi standart yetersizliğidir.

Tablo 5.1: Erik ekstraktlarında HPLC ile belirlenebilen toplam antioksidan kapasite %’ leri

Erik Ekstraktları	CUPRAC _N	ABTS
Mürdüm	%30.0	%24.7
Mürdüm Kabuk	%17.6	%47.4
İtalyan	%24.5	%30.5

Şekil 4.9 ve 4.10’ da gösterilen 520 nm’deki antioksidan kapasite değerleri erikteki özellikle kabuğunda daha yoğun bulunan antosiyaninlerin kapasitesidir.

Tablo 5.2’ de erik ekstraktlarında HPLC ile belirlediğimiz bileşenlerin literatur verileri ile karşılaştırılması gösterilmiştir.

Tablo 5.2: Erik ile yapılan HPLC çalışmalarının karşılaştırılması

Referans	70	73	76	Çalışmamız
Rutin	3.8±0.6 (Stanley) 6.3±0.6 (Early Magic) 6.7±0.5 (Mirabellier)	3.3±0.1 (Stanley) 8.3±0.1 (Early Magic) 7.2±0.4 (Mirabellier)	-	2.3 (İtalyan) 9.2 (Mürdüm)
Neoklorojenik asit	104.2±16.4 (Stanley) 18.1±5.4 (Early Magic) 63.9±7.3 (Mirabellier)	108.6±4.3 (Stanley) 19.1±0.1 (Early Magic) 44.1±2.4 m(Mirabellier)	10.7±0.1 (Kırmızı Erik)	35.4 (Mürdüm)
Klorojenik Asit	7.8±1.5 (Stanley) 0.9±0.5 (Early Magic) 16.4±2.7 (Mirabellier)	9.2±0.3 (Stanley) 3.0±0.0 (Early Magic) 15.9±0.9 (Mirabellier)	-	12.6 (İtalyan) 54.0 (Mürdüm)
Kuersetin 3-Glukozit	2.2±0.3 (Early Magic) 1.2±0.1 (Mirabellier)	1.5±0.0 (Early Magic) 0.5±0.0 (Mirabellier)	2.7±0.1 (Kırmızı Erik)	-
Siyanidin 3-Glukozit	2.1±0.3 (Stanley) 6.7±0.6 (Early Magic)	3.4±0.1 (Stanley) 4.1±0.1 (Early Magic)	15.9±1.1 (Kırmızı Erik)	3.5 (İtalyan) 7.0 (Mürdüm)
Siyanidin 3-Rutinozit	21.5±3.9 (Stanley) 18.9±1.9 (Early Magic)	25.5±0.9 (Stanley) 23.4±0.5 (Early Magic)	3.5±0.2 (Kırmızı Erik)	4.8 (İtalyan)

Sonuçlar mg/100g taze ağırlık olarak verilmiştir.

Erik ekstraktlarında belirlediğimiz toplam antioksidan kapasite değerleriyle literatürdeki değerlerin karşılaştırılması tablo 5.3'te gösterilmiştir.

Tablo 5.3: Erik ekstraktlarında toplam antioksidan kapasite çalışmalarının karşılaştırılması

Referans	76	Çalışmamız	
		CUPRAC	ABTS
Toplam Antioksidan Kapasite (TAC)	1.83±0.028 (ABTS) (Kırmızı Erik) 2.56±0.19 (ORAC) (Kırmızı Erik)	5.35 Mürdüm 10.95 Mürdüm (Kabuk) 9.00 Mürdüm Hidr. 37.42 Mürdüm (Kabuk) Hidr. 10.43 İtalyan 5.55 İtalyan Hidr. 5.26 Can 4.60 Can (Kabuk) 8.92 Can Hidrolizat 10.04 Can (Kabuk) Hidr.	3.79 Mürdüm 8.51 Mürdüm (Kabuk) 8.28 Mürdüm Hidr. 33.36 Mürdüm (Kabuk) Hidr. 9.92 İtalyan 5.31 İtalyan Hidrolizat 3.72 Can 2.58 Can (Kabuk) 4.01 Can Hidrolizat 6.36 Can (Kabuk) Hidr.

Sonuçlar mmol troloks/100g olarak verilmiştir.

Tablo 4.9 ve 4.10’ da görüldüğü gibi çalışılan erik ekstraktlarında CUPRAC yöntemi ile belirlenmiş olan toplam antioksidan kapasite sıralaması;

✓ İtalyan > Mürdüm > Can şeklinde;

ABTS yöntemine göre ise;

✓ İtalyan > Mürdüm $\cong$ Can şeklinde sıralanabilir.

Fenolik bileşiklerin bazılarının TEAC katsayılarının iki yöntemde de birbirinden farklı olması ve her erikte bu bileşenlerin miktarlarının değişmesi toplam antioksidan kapasite sıralamasını değiştirmektedir. Tablo 4.4’de görüldüğü gibi antioksidanların TEAC katsayıları CUPRAC yöntemine göre,

✓ Siyanidin Klorür > Peonidin Klorür $\cong$ Kerasiyanin Klorür > Kuromanin Klorür $\cong$ Idaein Klorür > Kuersetin > Epikateşin > Kuersetin 3-D-Glukozit > Kateşin > Peonidin 3-O-Glukozit > Rutin > Klorojenik Asit > Kafeik Asit > Gallik Asit şeklinde sıralanırken;

ABTS yöntemine göre,

- ✓ Siyanidin Klorür > Kuromanin Klorür > Epikateşin $\cong$ Kateşin > Kerasiyanin Klorür > Kuersetin > Peonidin 3-O-Glukozit $\cong$ Gallik Asit > Idaein Klorür > Kuersetin 3-D-Glukozit $\cong$ Rutin > Peonidin Klorür > Klorojenik Asit > Kafeik Asit şeklinde sıralanmaktadır.

Antioksidan özelliğe sahip maddelerin en çok rastlanılanlarından olan flavonoid sınıfı bileşikler genellikle glikozidler halinde bulunmaktadır ve bu haliyle belirlenmeleri, her biri için ayrı bir standart madde ihtiyacı gündeme geldiğinden dolayı oldukça zordur. Bu sorunu ortadan kaldırmak için erik örnekleri hidroliz edilmiş ve aglikon türevlerine dönüştürülerek miktarlandırılmıştır. Bitki örnekleri, 1.2 M HCl ve % 50 metanol içeren ortamda 90 °C’ de 2 saat süre ile hidroliz edilmiştir [84,85]. Bu koşullarda erik ekstraktları 2 saat hidroliz edilmiş ve glikozit formunda olan siyanidin glikozitleri aglikonu olan siyanidine dönüştürülerek tayin edilmiştir. Sonuç olarak Tablo 4.13’de görüldüğü gibi hidrolizatlarda sadece siyanidin klorür tanımlanabilmiştir. Bütün hidrolizatlarda 280 nm’de izlenen 4. ve 9. dakika civarındaki iki pik tanımlanamamakta fakat bu piklerin antioksidan kapasiteye katkı sağladığı düşünülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre çalışılan erik ekstrakt hidrolizatlarının CUPRAC yöntemi ile belirlenmiş olan toplam antioksidan kapasite (Tablo 4.9 ve 4.10) sıralaması;

- ✓ Mürdüm Kabuk > Can Kabuk > Mürdüm > Can > İtalyan şeklinde sıralanırken;

ABTS yöntemine göre,

- ✓ Mürdüm > Can Kabuk > İtalyan > Mürdüm Kabuk şeklinde sıralanmaktadır.

Sonuç olarak, eriklerin toplam antioksidan kapasite sıralaması spektrofotometrik CUPRAC yöntemine göre İtalyan > Mürdüm > Can ve HPLC yöntemine göre ise İtalyan > Mürdüm şeklindedir.

KAYNAKLAR

1. KIM D.O., CHUN K., KIM Y., LEE C.Y. "Superoxide radical scavenging activity of the major polyphenols in fresh plums" J. Agric. Food. Chem., 51 (2003) 8067-8072
2. FANG, Y. Z., YANG, S., WU, G., 2002, Free radicals, antioxidants, and nutrition, Nutrition, 18, 872-879.
3. HALLIVEL, B., ARUOMA, O. I., 1991, DNA damage by oxygen-derived species:its mechanisms and measurement in mammalian systems, FEBS Lett, 281, 9-19.
4. ARNAO M. B., CANO A., ACOSTA M., "The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity ", Food Chem., 73 (2001) 239
5. MILLER N. J., DIPLOCK A. T., RICE-EVAN, C., DAVIES M. J., GOPINATHAN V., MILNER A. A., "A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates ", Clin. Sci., 84 (1993) 407.
6. CANO, A., HERNÁNDEZ-RUIZ, J., GARCÍA-CÁNOVAS, F., ACOSTA, M., ARNAO, M. B., 1998, An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material, Phytochemical Analysis, 9, 196-202.
7. PELLEGRINI, N., DEL RIO, D., COLOMBI, B., BLANCHI, M., BRIGHENTI, F., 2003, Application of the 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation assay to a flow injection system for the evaluation of antioxidant activity of some pure compounds and beverages, J. Agric. Food Chem., 51, 260-264.
8. APAK R., GÜÇLÜ K., ÖZYÜREK M., KARADEMİR S. E., " 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 ", J. Agric. Food. Chem., 52 (2004) 7970.
9. APAK R., GÜÇLÜ K., ÖZYÜREK M., KARADEMİR S. E., ERÇAĞ E., " The CUPRAC antioxidant capacity and polyphenolics content of some herbal teas ", Int. J. Food Sci. Nutr., (2006) (Makale Baskıda).
10. ALONSO-SALCES R.M., KORTA E., BARRANCO A., BERRUETA L.A, GALLO B., VICENTE F. "Pressurized liquid extraction for the determination of polyphenols in apple " Journal of Chromatography A, 933 (2001) 37-43
11. CHINNICI, F., BENDINI, A., GAIANI, A., RIPONI, C., 2004, Radical scavenging activities of peels and pulps from cv. golden delicious apples as related to their phenolic composition, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 4684-4689.

12. GÖNENÇ, A., ATAĞ, Y., ORMAN, M. N., ŞİMŞEK, B., 2002, Lipid Peroxidation and Antioxidant Systems in Hemodialyzed Patients, *Dialysis and Transplantation*, 31, 88-96.
13. HALLIWELL, B., AESCHBACH, R., LÖLIGER, J., ARUOMA, O. I., 1995, The characterization of antioxidants, *Food and Chemical Toxicology*, 33, 601-617.
14. CAO, G., PRIOR, R. L., 1999, The measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples, *Methods in Enzymology* 299, 50-62.
15. KESKİN, H., ERKMEN, G., 1987, *Besin Kimyası*, Güryay Matbaacılık, Beşinci Basım, İstanbul.
16. SHAHIDI, F., 1996, *Natural Antioxidants*, Chemistry, Health Effects and Applications, AOCS Press, Campaign, Illinois.
17. RICE-EVANS, C.,A., MILLER, N. J., PAGANGA, G., 1997, Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends in Plant Science*, 2, 152-159.
18. GÜÇLÜ, K., SÖZGEN, K., TÜTEM, E., ÖZYÜREK, M., APAK, R., 2005, Spectrophotometric determination of ascorbic acid using copper(II)-neocuproine reagent in beverages and pharmaceutical, *Talanta*, 65, 1226-1232.
19. CADENAS, E., PACKER, L., 2002, *Handbook of Antioxidants*, Marcel Dekker, New York-Basel, 0-8247-0547-5.
20. HORWITT, M. K., 1986, Interpretations of requirements for thiamin, riboflavin, niacin-tryptophan, and vitamin E plus comments on balance studies and vitamin B-6, *American Journal of Clinical Nutrition*, 44, 973-985.
21. VAN GOSSUM, A., SHARIFF, R., LEMOYNE, M., KURIAN, R., JEEJEEBHOY, K., 1988, Increased lipid peroxidation after lipid infusion as measured by breath pentane output, *American Journal of Clinical Nutrition*, 48, 1394-1399.
22. PFANDER, H., 1987, *Key to Carotenoids*, Birkhäuser Verlag, Basel, 0817618600.
23. QUIRÓS, A. R.B., COSTA, H. S., 2006, Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review, *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 97-111.
24. OLSON, J.A., 1999, *Carotenoids*, Modern Nutrition in Health and Disease, Williams & Wilkins, Baltimore, 0781741335.
25. KRINSKY, N. I., 1993, Actions of carotenoids in biological systems, *Annual Review of Nutrition*, 13, 561-587.

26. SIES, H., STAHL, W., 1995, Vitamins E and C, α -carotene, and other carotenoids as antioxidants, *American Journal of Clinical Nutrition*, 62, 1315-1321.
27. PALOZZA, P., KRINSKY, N., 1992, *Methods in Enzymology* (Packer, L., ed.), Academic Press, New York, 213, 403-420.
28. 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.
29. HALLIVEL, B., 1990, How to characterise a biological antioxidant, *Free Radical Research Communication*, 9, 1-32.
30. SHAIDI, F., WANASUNDARA, P. K. J., 1992, Phenolic antioxidants, *Critical Review of Food Science and Nutritional*, 32, 67-103.
31. HAVSTEEN, B., 1983, Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency, *Biochemical Pharmacology*, 32, 1141-1148.
32. KUHNAU, J., 1976, The Flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition, *Wld. Rev. Nutr. Diet.*, 24, 117-191.
33. COOK, N. C., SAMMAN, S., 1996, Flavonoids –Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *Nutritional Biochemistry*, 7, 66-76.
34. HARBORNE, J. B., 1967, *Comparative biochemistry of the flavonoids*, Academic Press, London.
35. 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.
36. 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.
37. RE R., PELLEGRINI N., PROTEGGENTE A., PANNALA A., YANG M., RICE-EVANS C., "Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay ", *Free Radical Biol. Med.*, 26 (1999) 1231.
38. NISHIKIMI, M., 1975, *Biosci. Biophys. Res. Commun.*, 63, 463.
39. ABU-AMSHA, R., CROFT, K. D., PUDDEY, I. B., PROUDFOOT, J. M., BEILIN, L. J., 1996, Phenolic content of various beverages determines the extent of inhibition of human serum and low density lipoprotein oxidation in vitro: identification and mechanism of action of some cinnamic acid derivatives from red wine, *Clinical Science*, 91, 449-458.

40. HELLER, W., FORKMANN, G., 1993, Biosynthesis of flavonoids, *The flavonoids: Advances in Research since 1986*, Chapman & Hall, London, 499-535.
41. WALLACE, G., FRY, S. C., 1994, Phenolic components of the plant cell wall, *International Review of Cytology*, 151, 229-267.
42. SPANOS, G. A., WROLSTAD, R. E., 1992, Phenolics of apple, pear and white grape juices and their changes with processing and storage: A review, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1478-1487.
43. KAHNT, G., 1967, Trans-cis equilibrium of hydroxy cinnamic acids during irradiation of aqueous solutions at different pH, *Phytochemistry*, 6, 755-758.
44. HERRMANN, K., 1989, Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods, *Critical Review Food Science and Nutrition*, 28, 315-347.
45. RHODES, M., WOOLTORTON, L., 1976, The enzymic conversion of hydroxycinnamic acids to p-coumarylquinic and chlorogenic acids in tomato fruits, *Phytochemistry*, 18, 929-933.
46. HERRMANN, K., 1976, Flavonols and flavones in food plants: A review, *Journal of Food Technology*, 11, 433.
47. LU, Y., FOO, L. Y., 2000, Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace, *Food Chemistry*, 68, 81-85.
48. MILLER, N. J., RICE-EVANS, C. A., 1994, Total antioxidant status in plasma and body fluids, *Methods in Enzymology*, 234, 279-293.
49. GIROTTI S., FERRI E., MACCAGNANI L., BUDINI R., BIANCHI G., 2002 Plasma Antioxidant Capacity Determination: Comparative Evaluation of Chemiluminescent and Spectrophotometric Assays, *Talanta*, 56, 407-414.
50. ARNAO, M. B., CANO, A., ACOSTA, M., 1998, Total antioxidant activity in plant material and its interest in food technology, *Recent Res. Devel. in Agricultural and Food Chemistry*, 2, 893-905.
51. BENZIE, I. F. F., STRAIN, J. J., 1996, Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power'; the FRAP assay, *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
52. CAO, G., PRIOR, R. L., 1999, In vivo antioxidant capacity: comparison of different analytical methods, *Free Radical Biology & Medicine*, 27, 1173-1181.
53. SINGLETON, V. L., ROSSI, J. A., 1965, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

54. SINGLETON, V. L., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTOS, R. M., 1999, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent, *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
55. SANCHEZ, M. C., LARRAURI, J.A., SAURA, C. F., 1998, A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 270-276.
56. SANCHEZ, M. C., 2002, Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems, *Food Science Technology Internal* , 8,121-137.
57. WAYNER D.D.M., BURTON G. W., INGOLD K. LOCKE U. S., 1985, Quantitative measurement of the total peroxyl radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation, *FEBS Letters*, 187, 33-37.
58. WAYNER D.D.M., BURTON G. W., INGOLD K. LOCKE U. S., 1986, The antioxidant efficiency of vitamin C is concentration –dependent , *Biochem. Biophys. Acta*, 884, 119-123.
59. ALHO, H., LEINONEN, J., 1999, Total antioxidant activity measured by chemiluminescence methods, *Methods in Enzymology*, 299, 3-14.
60. WHITEHEAD, T. P., THORPE, G. H. G., MAXWELL, S. R. J., 1992, Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids, *Analytica Chimica Acta*, 266, 265-277.
61. VALKONEN, M., KUUSI, T., 1997, Spectrophotometric assay for total radical-trapping antioxidant potential in human serum, *Journal of Lipid Research*, 38, 823-833.
62. GHISELLI, A., SERAFINI, M., MAIANI, G., AZZINI, E., FERRO-LUZZI, A., 1995, A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability, *Free Radical Biology & Medicine*, 18, 29-36.
63. GLAZER, A. N., 1990, Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species, *Methods in Enzymology*, 186, 161-168.
64. CAO, G., VERDON, C. P., WU, A. H. B., WANG, H., PRIOR, R. L., 1995, Automatedoxygen radical absorbance capacity assay using the COBAS FARA II, *Clinical Chemistry*, 41,1738-1744.
65. TUBARO, F., GHISELLI, A., PAPUZZI, P., MAIORINO, M., URSINI, F., 1998, Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics, *Free Radical Biology Medicine*, 24, 1228-1234.

66. CAO, G., ALESSIO, H. M., CUTLER, R. G., 1993, Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants, *Free Radical Biology & Medicine*, 14, 303-311.
67. WINSTON, G. W., REGOLI, F., DUGAS, A. J. Jr., FONG, J. H., BLANCHARD, K. A., 1998, A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids, *Free Radical Biology & Medicine*, 24, 480-493.
68. FANG N., YU S., PRIOR R.L., 2002, "LC/MS/MS Characterization of phenolic constituents in dried plums " *J. Agric. Food. Chem.*, 50, 3579-3585.
69. KIM D.O., CHUN K., KIM Y., LEE C.Y., 2003, "Superoxide radical scavenging activity of the major polyphenols in fresh plums" *J. Agric. Food. Chem.*, 51 8067-8072.
70. KIM D.O., CHUN O.K., KIM J.K., MOON H.Y., LEE C.Y., 2003 "Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums" *J. Agric. Food. Chem.*, 51 6509-6515.
71. Van der WOUDE, H., GLISZCYNKA-SWIGLO, A., STRUIJS, K., SMEETS, A., ALINK, G., REITJENS, I., 2003, Biphasic modulation of cell proliferation by kuersetin at concentrations physiologically relevant in humans, *Cancer Lett.*, 200, 41-47.
72. VASANTHA RUPASINGHE H.P., JAYASANKAR S., LAY W., 2006 "Variation in total phenolics and antioxidant capacity among European plum genotypes" , *Scientia Horticulturae*, 108 243-246.
73. CHUN O.K., KIM D.O., 2004 "Consideration on equivalent chemicals in total phenolic assay of chlorogenic acid-rich plums " *Food Research International*, 37, 337-342.
74. KIM D.O, JEONG S.W., LEE C.Y., 2003 "Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums " *Food Chemistry* 81, 321-326.
75. KWEON M.H., HWANG H.J., SUNG H.C., 2001, Identification and antioxidant activity of novel chlorogenic acid derivatives from bamboo (*Phyllostachys edulis*) *J. Agric. Food. Chem.*, 49, 4646-4655.
76. PROTEGGENTE A.R., PANNALA A.S., PAGANGA G., BUREN L.V., WAGNER E., WISEMAN S., VAN DE PUT F., DACOMBE C., RICE-EVANS C.A. 2002 "The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition" *Free Radicals Research*, 36(2), 217-233.
77. TOMAS-BARBERAN F.A., GIL M.I., CREMIN P., WATERHOUSE A.L., HESS-PIERCE B., KADER A.A., 2001 "HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds nectarines, peaches, and plums" *J. Agric. Food. Chem.*, 49, 4748-4760.

78. KIM D.O., KIM Y.J., HEO H.J., FREER J., PADILLA-ZAKOUR O.I., LEE C.Y., 2004 "Phenolics and antioxidant capacity in selected New York State plums" *New York Fruit Quarterly*, 12 (4), 9-12.
79. GIL M.I., TOMAS-BARBERAN F.A., HESS-PIERCE B., KADER A.A., 2002, "Antioxidant capacities, phenolic compound, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California " *J. Agric. Food. Chem.*, 50 4976-4982.
80. http://www.tarimkutuphanesi.com/ERIK_YETISTIRICILIGI_00069.html 2007
81. AYANOĞLU H., 1995, Doğu Akdeniz Bölgesinde Sofralık Erik Seleksiyonu. Çukurova Üniversitesi Doktora Tezi , Adana, 147s.
82. KARADENİZ T., 2004, Şifalı Meyveler (Meyvelerle Beslenme Ve Tedavi Şekilleri) 72/208 Ordu.
83. YILMAZ K.U., 2002, Kahramanmaraş'ta Dış Satıma Yönelik Sofralık Kayısı Yetiştiriciliği Üzerine Araştırmalar, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi , Kahramanmaraş (Yayınlanmamış) 89 s.
84. HERTOĞ, M. G. L., HOLLMAN P. C. H., VENEMA, D. P., 1992, Optimization of quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1591-1598
85. HERTOĞ, M. G. L., HOLLMAN P. C. H., KATAN, M. B., 1992, Content of anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly in the Netherlands, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 2379-2383.
86. KARAMAN, S., 2007, *Türkiye’de yetiştirilen bazı elma çeşitlerinin toplam antioksidan kapasitelerinin ve antioksidan özellik gösteren başlıca bileşenlerinin karşılaştırılması*, İstanbul Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi.
87. SINGH, J., UPADHYAY, A. K., BAHADUR, A., SINGH, B., SINGH, K. P., RAI, M., 2006, Antioxidant phytochemicals in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata), *Scientia Horticulturae*, 108, 233-237.

ÖZGEÇMİŞ

14.07.1982’de Edirne Uzunköprü’ de doğdum. İlköğrenimimi Şehsuvarbey İlköğretim okulunda, lise öğrenimimi Uzunköprü (Yabancı Dil Ağırlıklı) Lisesi’nde tamamladım. 2001 yılında Öğrenci Seçme ve Yerleştirme Merkezi tarafından düzenlenen üniversite giriş sınavı sonucunda Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’ne girmeye hak kazandım ve 4 yıllık üniversite öğrenimimi tamamlayıp 2005 yılında mezun oldum. 2004 yılı yaz döneminde 15 günlük stajımı İstanbul Topkapı’ da İbrahim Ethem Ulagay İlaç Sanayii Türk A.Ş’de; 2005 yılı yaz döneminde 30 günlük stajımı Çorlu Çerkezköy ’de Eczacıbaşı Özgün Kimya ’da tamamladım. 2006 yılında İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Programı’nda yüksek lisans öğrenimime başladım. 2007 yılında Uşak’ ta çalışma hayatıma başladım. Halen Tüprag Metal Madencilik Sanayi ve Ticaret AŞ’ de Kimyager olarak çalışmaktayım.