



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOCAYEMİŞ (STRAWBERRY TREE-*Arbutus unedo L.*)
BİTKİSİNİN ANTIOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN
KARAKTERİZASYONU

TUĞBA UYSAL
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Gülbin Erdoğan

İSTANBUL 2015



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOCAYEMİŞ (STRAWBERRY TREE-*Arbutus unedo L.*)
BİTKİSİNİN ANTIOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN
KARAKTERİZASYONU**

TUĞBA UYSAL
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Gülbin Erdoğan

İSTANBUL 2015

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Analitik Kimya
Tez Sahibi : Tuğba Uysal
Tez Başlığı : Kocayemiş (Strawberry Tree-*Arbutus unedo* L.) Bitkisinin
Antioksidan Özelliklerinin Karakterizasyonu
Sınav Yeri : Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya ABD.
Sınav Tarihi : 19/08/2015

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Kurumu

Yrd. Doç. Dr. Gülbin Erdoğan

Marmara Ü. Eczacılık Fakültesi,
Analitik Kimya

Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Yrd. Doç. Dr. Ayşen Kurt Cücü

Marmara Ü. Eczacılık Fakültesi,
Analitik Kimya

Doç. Dr. Kevser Sözgen Başkan

İstanbul Ü. Mühendislik Fakültesi,
Analitik Kimya

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun **03./09/2015** tarih ve **23** sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Göksel SENER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

TUĞBA UYSAL

I. TEŞEKKÜR

Çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda olduğu kadar beşeri ilişkilerde de engin fikirleriyle yetişmeme ve gelişmeme katkıda bulunan danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Gülbin Erdoğan'a,

Tez çalışmam süresince huzurlu bir ortamda çalışmamı sağlayan, başta Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Başkanı, Sayın Prof. Dr. Güler YALÇIN olmak üzere Analitik Kimya Bölümündeki bütün hocalarıma yardım ve katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamda deneyimlerini, bilgilerini ve önerilerini esirgemeyerek bana destek veren hocam Sayın Doç. Dr. Kevser Sözgen Başkan'a,

Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkezi Araştırma Laboratuvarındaki çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Türkan Yurdun'a ve Öğr. Gör. Nuray Yüктаş'a,

Her zaman ve her koşulda yanımda olan, hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen, beni yetiştirip bugünlere getiren, fedakar, hakkı ödenmez annem Filiz Silahtaroğlu, babam Ahmet Silahtaroğlu ve abim Uğur Silahtaroğlu'na,

Araştırmam sırasında bana destek olan, sevgisini ve emeğini esirgemeyen eşim Deniz Uysal'a

Hayatımın mucizesi, henüz doğmamış oğlum Tefvik Ali'ye

en içten duygularıyla teşekkürlerimi sunarım.

Tuğba UYSAL

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından SAĞ-C-YLP 100713-0307 numaralı proje ile desteklenmiştir.

II. İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

I. TEŞEKKÜR.....	iii
II. İÇİNDEKİLER	v
III. KISALTMALAR VE SİMGELER.....	vii
IV. TABLO LİSTESİ.....	viii
V. ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
1.ÖZET.....	1
2.SUMMARY	2
3.GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BÖLÜM.....	5
4.1. Genel Bilgiler.....	5
4.1.1. Serbest radikaller ve antioksidanlar	5
4.1.2. Doğal antioksidanlar	7
4.2. Toplam antioksidan kapasite tayin yöntemleri	18
4.2.1. CUPRAC(Cupric reducing antioxidant capacity; Cu(II) iyonu indirgeme antioksidan kapasite) yöntemi.....	20
4.2.2. FRAP (ferric reducing antioxidant power; demir(III) iyonu indirgeyici antioksidan gücü) yöntemi	23
4.2.3. Folin ciocalteu yöntemi.....	25
4.2.4. TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity; trolox eşdeğeri antioksidan kapasitesi) / ABTS yöntemi.....	26
4.3. Antioksidan Kapasiteye Etki Eden Faktörler.....	30
4.3.1. Yapısal etki.....	30
4.3.2. Çözücü etkisi.....	32
4.3.3. Sinerjik etki	33
4.3.4. Polimerizasyon etkisi	34
4.4. Kocayemiş'in (<i>Arbutus unedo</i> L.) İçeriği ve Sağlık Üzerindeki Etkileri... 36	
4.5. Kocayemiş ile İlgili Yapılan Çalışmalar	37
5.GEREÇ VE YÖNTEM.....	41
5.1. Kullanılan Cihazlar	41
5.2.Kullanılan Kimyasallar	42

5.2.1. Çözeltilerin hazırlanması	43
5.3. Kocayemiş Bitkisinin Analize Hazırlanması	44
5.3.1. Kocayemiş bitkisinin temin edilmesi	44
5.3.2. Kocayemiş bitkisinin kurutulması ve saklanması	44
5.3.3. Bitki ekstralarının hazırlanması	44
5.4.Uygulanan Yöntemler	45
5.4.1. Spektrofotometrik yöntemler	45
6. BULGULAR.....	54
6.1. Kocayemiş'in (<i>Arbutus unedo</i> L.) Antioksidan Kapasitelerine Çözücü Etkisi	54
6.1.1. Troloksun farklı çözücü ortamlarında cuprac, abts, frap yöntemlerine ve gallik asidin folin-ciocalteu yöntemine göre kalibrasyon denklemlerinin belirlenmesi	54
6.1.2. CUPRAC yöntemine göre farklı çözücü ortamlarında molar absorplama katsayıları ve TEAC değerlerinin belirlenmesi	57
6.1.3. ABTS yöntemine göre farklı çözücü ortamlarında molar absorplama katsayıları ve TEAC değerlerinin belirlenmesi	58
6.1.4. FRAP yöntemine göre farklı çözücü ortamlarında molar absorplama katsayıları ve TEAC değerlerinin belirlenmesi.....	59
6.1.5. Kocayemiş'in (<i>Arbutus unedo</i> L.) Folin-Ciocalteu yöntemine göre farklı çözücü ortamlarında molar absorplama katsayıları ve GAE değerlerinin belirlenmesi	60
6.2. Kocayemiş(<i>Arbutus unedo</i> L.)'nin Ekstraksiyonu için Uygun Çözücünün Belirlenmesi	61
6.3. Toplam Antioksidan Kapasitelerinin Kalibrasyon Eğrileri.....	63
7.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	67
8.KAYNAKLAR	72
9.ÖZGEÇMİŞ.....	85

III. KISALTMALAR VE SİMGELER

A	: Absorbans
ABTS	: 2,2'azinobis(3-etilbenzotiyozalin-6-sülfonik asit)
ABTS^{•+}	: ABTS radikal katyonu
CUPRAC	: Bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite
Cu(I)-Nc	: Bakır(I)-neokuproin
Cu(II)-Nc	: Bakır(II)neokuproin
DPPH	: 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
ET	: Tek elektron transferi reaksiyonu
FCR	: Folin-Ciocalteu reaktifi
FRAP	: Demir(III) iyonu indirgeyici antioksidan gücü
GAE	: Gallik asit eşdeğeri antioksidan kapasite
HAT	: Hidrojen atomu transferi reaksiyonuna dayananlar
ORAC	: Oksijen radikal absorbans kapasitesi
ROS	: Reaktif oksijen türleri
TEAC	: Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite
TPTZ	: 2,4,6-tripridil-s-triazin
TR	: Troloks
TRAP	: Toplam radikal yakalama antioksidan kapasitesi
ΔA	: Absorbans farkı

IV. TABLO LİSTESİ

SAYFA NO

Tablo 4.1: Polifenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması	11
Tablo 4.1a: Flavonoidlerin sınıflandırılması, adları, süstitüsyon modelleri ve besin kaynakları	14
Tablo 6.1: Farklı çözücü ortamlarında CUPRAC yöntemine göre troloksun kalibrasyon eğrilerinden elde edilen lineer kalibrasyon denklemleri ve korelasyon katsayıları	54
Tablo 6.1a: Farklı çözücü ortamlarında ABTS yöntemine göre troloksun kalibrasyon eğrilerinden elde edilen lineer kalibrasyon denklemleri ve korelasyon katsayıları ...	55
Tablo 6.1b: Farklı çözücü ortamlarında FRAP yöntemine göre troloksun kalibrasyon eğrilerinden elde edilen lineer kalibrasyon denklemleri ve korelasyon katsayıları ...	55
Tablo 6.1c: Farklı çözücü ortamlarında Folin-Ciocalteu yöntemine göre Gallik asidin kalibrasyon eğrilerinden elde edilen lineer kalibrasyon denklemleri ve korelasyon katsayıları.....	56
Tablo 6.1d: Farklı çözücü ortamlarında CUPRAC yöntemine göre belirlenmiş molar TEAC değerleri	57
Tablo 6.1e: Farklı çözücü ortamlarında ABTS yöntemine göre belirlenmiş molar TEAC değerleri	58
Tablo 6.1f: Farklı çözücü ortamlarında FRAP yöntemine göre belirlenmiş molar TEAC değerleri	59
Tablo 6.1g: Farklı çözücü ortamlarında Folin-Ciocalteu yöntemine göre göre belirlenmiş molar GAE değerleri	60
Tablo 7.1: Kocayemiş bitkisiyle yapılan toplam antioksidan kapasite sonuçları	70
Tablo 7.1a: Kocayemiş bitkisinin ekstraktlarında toplam fenol çalışmalarının sonuçları	71

V. ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA NO

Şekil 4.1. L-Askorbik asitin kimyasal yapısı	8
Şekil 4.1a. α - tokoferol'ün kimyasal yapısı	9
Şekil 4.1b. β -Karoten'in kimyasal yapısı	10
Şekil 4.1c. α -Karoten'in kimyasal yapısı	10
Şekil 4.1d. Likopen'in kimyasal yapısı	10
Şekil 4.1e. Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı	12
Şekil 4.1f. Flavonoidlerin temel kimyasal yapıları	13
Şekil 4.1g. Fenolik asitlerin kimyasal yapıları	16
Şekil 4.1h. Fenolik polimerin kimyasal yapısı	17
Şekil 4.2. CUPRAC yönteminin kromojenik oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc reaktifinin antioksidanlarla (Ar(OH)n) reaksiyonu sonucu Cu(I)-Nc renkli kelatının oluşumu	21
Şekil 4.2a. A: [Cu(I)-Nc] ve B: [Cu(II)-Nc] kelatının absorpsiyon spektrumu.....	22
Şekil 4.2b. Fe(III)-TPTZ kompleksinin, Fe(II)-TPTZ formuna indirgenmesi	23
Şekil 4.2c. ABTS ⁺ radikal katyonunun yapısı.....	27
Şekil 4.2d. 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS)'nin persülfatla oksidasyonu.....	27
Şekil 4.2e. ABTS ⁺ radikal katyonunun absorpsiyon spektrumu	28
Şekil 4.3. Flavonoidlerin klasik antioksidan kapasitelerini belirlemede önemli olan özellikleri gösteren kimyasal yapı.....	31
Şekil 4.4. Kocayemiş meyvesi	36
Şekil 6.2. Kocayemiş ekstraktlarının mor ötesi-görünür bölge spektrumları	61
Şekil 6.2a. Kocayemiş ekstraktlarının asidik ortamda mor ötesi-görünür bölge spektrumları.....	62
Şekil 6.3. Cuprac Yöntemi MeOH/H ₂ O (4:1) Çözücüleri için Troloks Eşdeğeri Kalibrasyon Eğrisi.....	63
Şekil 6.3a. Cuprac Yöntemi MeOH/HCl/H ₂ O (80:0.5:19,5) Çözücüleri için Troloks Eşdeğeri Kalibrasyon Eğrisi.....	63
Şekil 6.3b. ABTS Yöntemi MeOH/H ₂ O (4:1) Çözücüleri için Troloks Eşdeğeri Kalibrasyon Eğrisi.....	64
Şekil 6.3c. ABTS Yöntemi MeOH/HCl/H ₂ O (80:0.5:19,5) Çözücüleri için Troloks Eşdeğeri Kalibrasyon Eğrisi.....	64

Şekil 6.3d. FRAP Yöntemi MeOH/H ₂ O (4:1) Çözücüleri için Troloks Eşdeğeri Kalibrasyon Eğrisi.....	65
Şekil 6.3e. FRAP Yöntemi MeOH/HCl/H ₂ O (80:0.5:19,5) Çözücüleri için Troloks Eşdeğeri Kalibrasyon Eğrisi.....	65
Şekil 6.3f. Folin-Ciocalteu Yöntemi MeOH/H ₂ O (4:1) Çözücüleri için Gallik Asit Eşdeğeri Kalibrasyon Eğrisi.....	66

Kocayemiş (Strawberry Tree-*Arbutus unedo* L.) Bitkisinin Antioksidan Özelliklerinin Karakterizasyonu

Öğrencinin Adı: Tuğba Uysal

Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Gülbin Erdoğan

Anabilim Dalı: Analitik Kimya Anabilim Dalı

1.ÖZET

Amaç: Vücutta çeşitli metabolik reaksiyonlar sonucu oluşan serbest radikallerin aşırı miktarları doku, organ ve sistemlerde hasarlara neden olmaktadır. Bu hasarı sınırlandırmak için vücutta birçok savunma mekanizması geliştirilmiştir, besinlerle alınan C ve E vitaminleri, flavonoidler, karotenoidler bu savunmaya yardımcı antioksidanlar olarak rol almaktadır. Bu çalışmada, insanlar tarafından yiyecek olarak tüketildiği gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan kocayemiş bitkisinin toplam antioksidan kapasitesi farklı yöntemler kullanılarak belirlenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Cu(II)-neocuproin reaktifinin kullanıldığı CUPRAC yöntemi, ABTS radikal katyonu kullanılarak troloks eşdeğeri antioksidan kapasite tayin yöntemi (TEAC), demir(III) iyonu indirgeyici antioksidan gücü (FRAP) yöntemi ve toplam fenolik bileşik miktarının belirlenmesinde Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılmıştır. Kocayemiş bitkisinin antioksidan kapasitesi farklı çözücüler kullanılarak tayin edilmiş ve yöntemler arasında karşılaştırma yapılmıştır.

Bulgular: CUPRAC yöntemi kullanılarak kocayemiş meyveleriyle yapılan antioksidan kapasite tayininde metanol-asit ekstresi, metanol ekstresi sonuçlarına göre yüksek, ABTS radikal süpürme aktivitesi aynı bulunmuştur. Deneyler yaprak ekstraktları kullanılarak da yapılmış, ABTS ve CUPRAC yöntemleri sonuçları yakın bulunmuştur. İncelenen yöntemlerden $TEAC_{CUPRAC}$ ile $TEAC_{FRAP}$ değerleri arasında pozitif ilişki tespit edilirken $TEAC_{CUPRAC}-TEAC_{ABTS}$ ve $TEAC_{FRAP}-TEAC_{ABTS}$ değerleri negatif ilişki göstermiştir. En yüksek toplam fenolik madde içeriği Kocayemiş meyvesinin metanollü ekstraktında belirlenmiştir.

Sonuçlar: *Arbutus Unedo* L. ile yapılan antioksidan kapasite tayininde meyve ve yapraklarının antioksidan özelliğe sahip olduğu belirlenmiş, in vitro antioksidan kapasite tayininde birkaç yöntemin birlikte kullanılmasının gerektiği vurgulanmıştır.

Anahtar Sözcükler: *Arbutus Unedo* L., CUPRAC, FRAP, TEAC, Toplam fenolik madde.

Characterization of Antioxidant Properties of Strawberry Tree(*Arbutus unedo* L.)

Student Name: Tugba Uysal

Supervisor: Assist. Doç. Dr. Gulbin Erdogan

Department: Department of Analytical Chemistry

2.SUMMARY

Objective: Excessive amounts of free radicals that are produced from various metabolic reactions in the organism and are highly reactive due to their unpaired electrons cause damage in tissues, organs, systems. The organism has developed many defence mechanisms, the food-ingested C and E vitamins, flavonoids, caretenoids act as antioxidants aiding this defence. In this study, the total antioxidant capacity of the strawberry plants used in the treatment of various diseases such as food consumed by humans were determined by using different methods.

Materials and Methods: The copper(II)-neocuproine reagent is used CUPRAC method, trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay with ABTS radical cation, ferric(III) ion reducing antioxidant power (FRAP) method, determining the amount of total phenolic compounds Folin-Ciocalteu method was used. Antioxidant capacity of strawberry plants were determined using different solvents and the methods were compared between.

Results: CUPRAC antioxidant capacity of methanol-acid extracts of strawberry tree were found to be higher than of methanolic extract. ABTS radical scavenging were found to be same that extracts, ABTS and CUPRAC antioxidant capacity were found the same that of plant extract. There was positive correlation between $TEAC_{CUPRAC}$ and $TEAC_{FRAP}$ whereas the correlation was negative for $TEAC_{CUPRAC}-TEAC_{ABTS}$ and $TEAC_{FRAP}-TEAC_{ABTS}$. The highest total phenolic content, were obtained for methanol extract of Strawberry tree.

Conclusion: The determination of antioxidant capacity with made *Arbutus unedo* L. were found to have too much antioxidant properties of fruit and leaves. It was emphasized that various methods for in vitro antioxidant capacity measurement should be used together.

Key Words: *Arbutus Unedo* L., CUPRAC, TEAC, FRAP, Total phenolics.

3.GİRİŞ VE AMAÇ

Süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali 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(Kim, Lee, Kim, Lee ve Chun, 2003). 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(Fang, Yang ve Wu, 2002; Halliwell ve Aruoma, 1991).

Meyve ve sebzelerdeki fenolik bileşikler serbest radikalleri süpürme özelliği ile yararlı etkiler ortaya koyabilir. Fenolik bileşiklerin çoğunun antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve serbest radikallerin sebep olduğu oksidatif hasara karşı hücreleri korumaya yardımcı oldukları bilinmektedir. Bitkilerde bulunan polifenolik bileşikler multifonksiyonel özelliklere sahip olup, indirgeyici madde, hidrojen verici antioksidan ve singlet oksijeni bastırıcı olarak rol oynamaktadırlar. Antioksidan fenolik bileşikleri içeren beslenme kaynaklarına duyulan ilgi giderek artmaktadır(Kim ve ark., 2003; Fang ve ark., 2002 ve Halliwell ve ark., 1991).

Flavonoller, elajik asit, antosiyaninler gibi çeşitli fenolik bileşikler içerdiği belirlenen kocayemişin yüksek polifenolik içeriğinden dolayı etkili aktiviteye sahip olduğu kanıtlanmıştır. Kocayemiş meyvesi genellikle yüksek miktarda proantosiyanidin gibi flavonoidler ve delphinidin, siyanidin-3-galaktozid gibi antosiyaninler içerir(Pallauf, Rivas-Gonzola, Castillo, Cano ve Pascual-Teresa, 2008).

Toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesinde kullanılan çok sayıda yöntem arasında ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) yöntemi, uluslararası literatürde yaygın kullanım bulmaktadır(Miller, Rice-Evans, Davies, Gopiathan ve Milner, 1993; Arnao, Cano ve Acosta, 1998 ve

Pellegrini, Serafini, Colombi, Del Rio, Salvatore, Bianchi ve Brighenti, 2003). CUPRAC(Cu(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite) yöntemi kayısında, elmada, bitki çaylarında, maydanoz, kereviz, ısırgan otu gibi bitkilerde ve serumda toplam antioksidan kapasite tayininde uygulanmış (Apak, Güçlü, Özyürek ve Karademir, 2004; Apak, Güçlü, Özyürek, Karademir ve Erçağ, 2006) kolay ve ucuz bir yöntemdir. HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi), çok bileşenli pek çok örnekte olduğu gibi kocayemiş (*Arbutus unedo* L.) bitkisindeki polifenolik bileşiklerin belirlenmesi amacıyla yaygın kullanımı olan bir yöntemdir(Alonso-Salces, Korta, Barranco, Berrueta, Gallo ve Vicente, 2001; Chinnici, Bendini, Gaiani ve Riponi, 2004).

Bu çalışmada Latince adı *Arbutus unedo* L. olan kocayemiş meyve ve yapraklarının toplam antioksidan kapasitelerinin CUPRAC, FRAP, Folin Ciocalteu ve ABTS yöntemleriyle tayininin yapılması CUPRAC, FRAP ve ABTS yöntemleri ile elde edilen sonuçların toplam antioksidan kapasite TEAC(Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite) değerleri ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

4. GENEL BÖLÜM

4.1. Genel Bilgiler

4.1.1. Serbest radikaller ve antioksidanlar

Bir veya birden fazla eşleşmemiş elektronu bulunan atom ya da moleküllere serbest radikaller denir. Bu tip maddeler, eşleşmemiş elektronu olması sebebiyle oldukça reaktiftirler. Biyolojik sistemlerde serbest radikaller önemli role sahiptir. Serbest radikaller herhangi bir etkileşime girerek elektron alırlar veya elektron 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(Atak, Gönenç, Orman ve Şimşek, 2002).

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 çıkan oksidatif stresle sonuçlanır(Atak ve ark., 2002).

Antioksidanlar, yiyecekte veya vücutta düşük konsantrasyonlarda bulunduğu zaman, oksidasyonu önemli derecede engelleyen veya geciktiren maddelerdir(Aeschbach, Halliwell, Löliger ve Aruoma, 1995). Gıda üreticileri gıdaların bozunmasını önlemek ve gıdanın besin değerini korumak amacıyla sentetik gıda koruyucu antioksidanları kullanırlar. Antioksidanlar, biyokimyacıların ve sağlık uzmanlarının ilgi konusudur, çünkü reaktif oksijen türlerinin ve dejeneratif hastalıkların neden olduğu zararlara karşı vücudu korumaktadırlar.

Antioksidanların yağ moleküllerinin farklı oksidatif kademelerinde rol oynadığı bilinmektedir. Antioksidanlar; oksijen derişimini azaltmada, singlet oksijeni durdurmada, hidroksil radikali gibi başlatıcı radikalleri süpürerek birinci başlatıcı zinciri engellemede, reaktif oksijen türlerinin üretim katalizleyicisi metal iyonlarını

bağlamada, radikal olmayan bileşiklerin temel ürünlerini bozundurmada ve substratlardan hidrojen alınmasını önlemek amacıyla zincir kırmada görev alırlar.

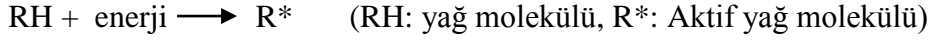
Bu nedenle yiyecek ve biyolojik sistemlerde doğal olarak oluşan moleküllerin antioksidan aktivite etkisine artan bir ilgi vardır. Antioksidan aktivite ve antioksidan kapasite terimleri birbiri yerine kullanılırlar. Fakat farklı anlamlara sahiptirler. Aktivite, spesifik bir antioksidan ve oksidan arasındaki reaksiyonun hız sabitini kapsar. Kapasite, bir numune tarafından süpürülen belirli bir serbest radikalın miktarının ölçüsüdür. Antioksidan kapasite ölçümleri, örneğin toplam süpürme kabiliyetini belirleyen, heterojen bir antioksidan karışımının miktarını verir. Her bir bileşenin antioksidan kapasitesini ölçmez (Garg ML, MacDonald-Wicks LK, Wood LG, 2006).

Farklı antioksidanlar ve oksidanlar arasındaki reaksiyonlar farklı hız sabitlerine sahiptir ve bu yüzden örneğin antioksidan kapasitesi farklı oksidanlarla değişir (Ghiselli, Serafini, Natella ve Scaccini 2000). Ölçümde kullanılan analitik metotlar ve analizin olduğu koşullar da aynı gıda türü için, farklı sonuçlara neden olabilir (Büyüktuncel, 2013).

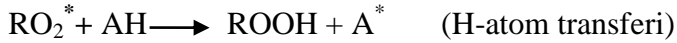
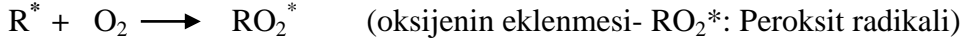
Yağların yükseltgenme derecesi, yağ asitlerinin kimyasal yapısına bağlı olduğu kadar, gıdaların saklanma koşulları ve reaksiyon ortamına da bağlıdır(Shahidi 1996). Besinlerde otooksidasyon ve acılaştırmanın oluşma prosesi; başlama, ilerleme ve sonlanma kademeleri ile yürümektedir(Nacz ve Shadidi, 1995). Başlama kademesinde ilk olarak R[•] serbest radikali oluşur. İlerleme kademesinde aktif yağ molekülü ile havanın oksijeni arasında kendiliğinden ortaya çıkan ve ‘otoksidasyon’ adı verilen tepkimeler oluşur. İlerleme kademesinde zincir reaksiyon meydana gelmektedir. Bu zincir döngüde çoğu yağ molekülü hidroperokside (ROOH) dönüşürler. Hidroperoksitler, oksidasyonun ilk önemli ürünleridir ve sonradan parçalanarak yağların oksidasyonuna ve acılaştırmasına sebep olmaktadır. (Gaddis, Ellis ve Currie, 1961; Horvat, McFadden, Lane, Lundin, Scherer, Shephard, 1969). Sonlanma reaksiyonuna kadar ilerleme kademesinde bir zincir reaksiyonu devam eder.

Besinlerde otooksidasyon ve acılaşmanın oluşma prosesi;

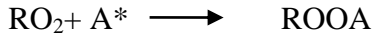
Başlama;



İlerleme;



Sonlanma;



Antioksidanlar (AH), yukarıdaki oluşumu doymamış yağlardan oluşan radikallere bir hidrojen atomu veya elektron vererek bozarlar.

AH: Antioksidan molekülü

A*: Antioksidan etkin molekülü

ROOH: Hidroperoksit

Antioksidanlar yükseltgenebilen maddeler olduğundan zincirleme reaksiyonu koparmaları sırasında kendileri yükseltgenerek bozunurlar. Bu nedenle antioksidanlar yalnız sınırlı bir zaman için yükseltgenebilen maddeyi koruyabilirler ve belli bir noktadan sonra madde ortamda hiç antioksidan yokmuş gibi yükseltgenmeye devam eder.

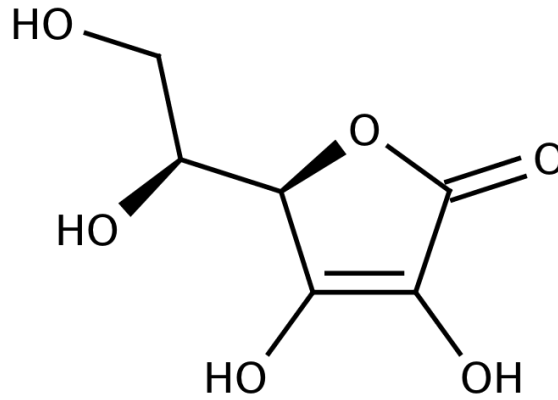
4.1.2. Doğal antioksidanlar

4.1.2.1. C vitamini (L-askorbik asit)

C vitamini (askorbik asit, askorbat) bitkilerde yaygın olarak bulunan, suda çözünen bir vitamindir. Altı karbonlu lakton yapısına sahiptir(Cadenas, Packer, 2002). Çoğu hayvanın karaciğer veya böbreklerinde glikozdan sentezlenir. Bitkilerde

ise yaprak kısımlarında özellikle kloroplastlarında sentezlenir(Jones, Wheeler ve Smirnoff, 1998). İnsanlar bu vitamini vücutta sentezleyemezler(Ames ve Woodall, 1997). Bundan dolayı bu ihtiyaçlarını taze sebze ve meyvelerden karşılarlar(Bendich, 1997). Özellikle çilek, papatya, portakal, kivi, greyfurt, kavun, mango gibi meyvelerde, brokoli, brüksel lahanası, kırmızı veya yeşilbiber, domates, lahana, patates, karnıbahar gibi sebzelerde, portakal suyu, domates suyu gibi meyve sularında bol miktarda bulunmaktadır(Cadenas ve ark., 2002).

C vitamini (Şekil 4.1), reaktif oksijen (süperoksit, peroksil radikalleri, singlet oksijen, ozon), reaktif azot (peroksinitrit, azot dioksit) ve reaktif klor (hipoklorik asit) türlerini kolayca süpürür ve bu nedenle diğer substratları oksidatif hasardan korur(Halliwell, 1996).

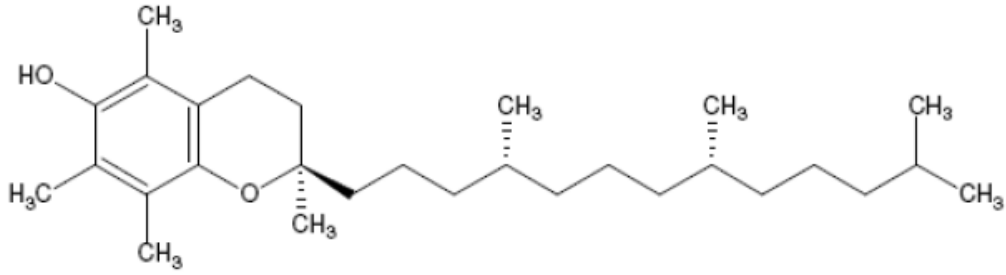


Şekil 4.1: L-Askorbik asitin kimyasal yapısı

Hem askorbik asit hem de bunun bir elektron yükseltgenmiş hali olan askorbil radikali düşük redüksiyon potansiyeline sahiptir(Buettner, 1993). Böylece ilgili radikal ve oksidanlarla reaksiyona girebilir. Askorbil radikali, eşleşmemiş elektronun rezonans kararlılığı nedeniyle düşük redüksiyon potansiyeli gösterir ve kolayca askorbat ve dehidroaskorbik asite dönüşür(Buettner ve Jurkiewicz, 1996). Bununla birlikte, askorbik asit, hem askorbil radikalinden hem de dehidroaskorbik asitten enzimatik veya enzimatik olmayan yollarla kolaylıkla üretilir. Bu özelliklerinden dolayı askorbik asit etkili bir antioksidandır.

4.1.2.2. E vitamini (α - tokoferol)

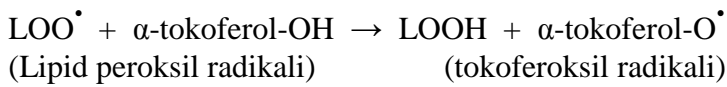
E vitamini doğada α -, β -, δ -, γ -tokoferoller ve tokotrienollerin oluşturduğu 8 farklı izomerik yapıda bulunmaktadır. Özellikle α -tokoferol (Şekil 4.1a), yüksek biyolojik aktivite göstermektedir. α -tokoferol vitaminlerin en güçlüsü ve yiyeceklerde en geniş şekilde yayılmış olanıdır (Diplock, Landvik ve Packer 1998). Yapısında bulunan fenolik hidroksil gruplu aromatik halka, vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır.



Şekil 4.1a: α - tokoferol'ün kimyasal yapısı

Yağca zengin bitkiler, E vitaminin temel doğal kaynaklarıdır. Tokotrienoller, palm yağında ve pirinç kepeğinde yüksek miktarda, hindistan cevizi yağı, kakao yağı, soya fasulyesi, arpa, buğday, kırmızı et ve yumurtada bulunmaktadır. Ayçiçeği, yer fıstığı, ceviz, susam ve zeytinyağı ise sadece tokoferol içermektedir (Pennington, Sheppard, ve Weihrauch, 1993; Ong, 1993).

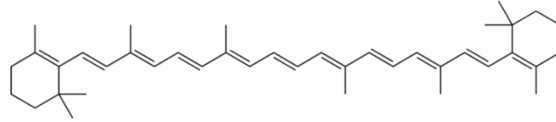
Çok güçlü bir antioksidan olan E-vitamini çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikal etkilerinden koruyucu savunma elemanıdır. α -tokoferol, $O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} , singlet O_2 , lipid peroksil (LOO^{\bullet}) radikallerini ve diğer radikalleri temizler. Lipid peroksidasyonunu inhibe eder. Lipid peroksil radikallerini yıkarak lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırdığı için zincir kırıcı bir antioksidan olarak da bilinir. Lipid peroksidasyonunu önleyici mekanizması aşağıdaki gibi özetlenebilir:



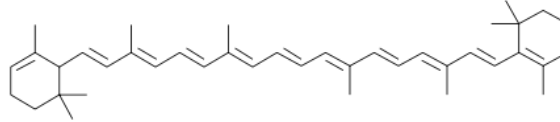
Sonuçta oluşan tokoferoksil radikali stabildir ve kendi kendine lipid peroksidasyonunu başlatmak için yeterince reaktif değildir.

4.1.2.3. Karotenoidler

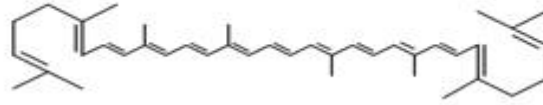
Birçok bitki, alg ve küçük organizmalarda bulunan karotenoidler yağda çözünebilen doğal antioksidanlardır. 600'den fazla karotenoid çeşidinin var olduğu bilinmektedir. Karotenoidlerin çoğunun temel yapısı poliizoprenoidden oluşmaktadır (Atkinson, Deming, Boileau, Heintz, ve Erdman, 2002). Yapıda bulunan çift bağlardan dolayı sarı, portakal veya kırmızı renktedirler. Absorpsiyon maksimumu, konjuge çift bağ sayısına bağlıdır ve 400-500 nm arasında değişmektedir. Karotenoidler, oldukça etkili ROS (reaktif oksijen türleri) süpürücüleridir. Karotenoidlerin antioksidan aktivitesi, yapısındaki konjuge çift bağlardan ileri gelmektedir. (Şekil 4.1b; Şekil 4.1c; Şekil 4.1d)



Şekil 4.1b: β -Karoten'in kimyasal yapısı



Şekil 4.1c: α -Karoten'in kimyasal yapısı



Şekil 4.1d: Likopen'in kimyasal yapısı

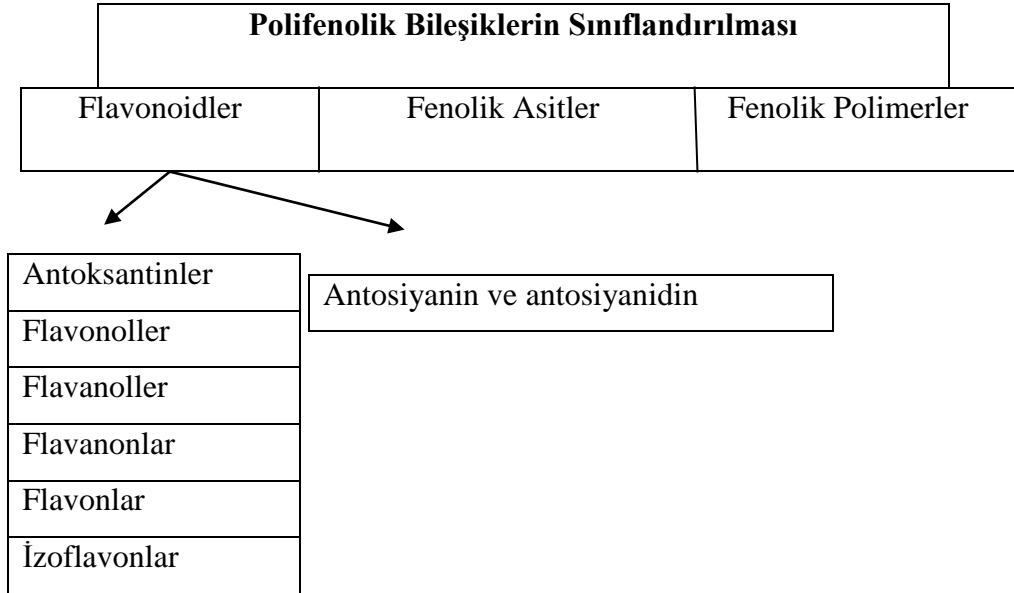
4.1.2.4. Polifenolik bileşikler

Polifenoller; bitki dünyasının büyük bir kısmında mevcut olan, fitokimyasalların en geniş kategorilerinden birini oluşturan ve insan yaşamında gerekli olan bileşiklerdir. Besin fenolikleri; flavonoidleri, fenolik asitleri ve fenolik polimerleri içerir (Tablo 4.1).

Polifenoller güçlü antioksidanlardır ve aktiviteleri kimyasal yapılarına bağlıdır. Bitki polifenolleri multifonksiyonel bileşikler olup, indirgeme aracı, hidrojen atom-donör antioksidanlar ve singlet oksijen söndürücü olarak, bazıları metal iyonu kelatlama özelliklerine sahip antioksidanlar olarak davranırlar(Miller, Rice, ve Paganga, 1996). Bir polifenolün antioksidan olarak tarif edilebilmesi için iki temel şartı sağlaması gerekir:

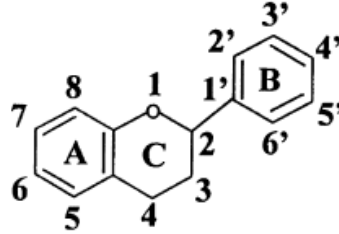
- Okside olabilen substratlara oranla düşük konsantrasyonlarda bulduklarında, otooksidasyonu veya serbest radikal merkezli oksidasyonu erteleyebilmeli, geciktirebilmeli veya önleyebilmelidir(Halliwell, 1990).
- Süpürme sonunda oluşan radikal, oksidasyon zincir reaksiyonunu kesmekte kararlı olmalıdır(Shahidi ve Wanasundara, 1992).

Tablo 4.1: Polifenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması



4.1.2.4.1. Flavonoidler

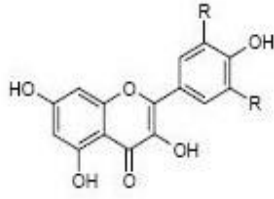
Bitki fenollerinin en geniş sınıfını difenilpropan ($C_6C_3C_6$) iskeletine sahip flavonoidler oluşturmaktadır. Şu ana kadar bitkilerin yaprak, tohum, kabuk ve çiçek kısımlarında 4000'in üzerinde farklı yapıda flavonoid belirlenmiştir. Molekül yapısı; aromatik A halkası yanında bulunan heterosiklik C halkası ve bu halkaya bağlı ikinci aromatik B halkasından oluşmaktadır (Şekil 4.1e). Bu halkalara bağlanan çeşitli fenolik hidroksil grupları, bu yapıların antioksidan aktivite göstermelerini sağlar. Farklı türdeki bitkilerde veya aynı bitkinin değişik kısımlarında bulunan flavonoidlerin büyük yapısal farklılıkları vardır(Cadenas ve ark., 2002).



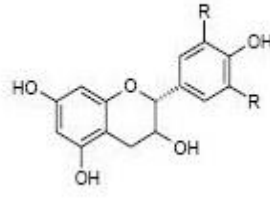
Şekil 4.1e: Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı

Lipid peroksidasyonunu inhibe eden flavonoidler etkili antioksidan, serbest radikal süpürücü, metal kelatlayıcıdır(Cook ve Samman 1996).

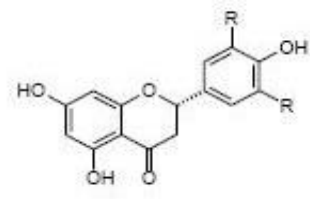
Flavonoidler; antosiyaninler ve antoksantrinler şeklinde sınıflandırılır (Tablo 4.1a). Antoksantrinler ise renksiz veya beyazdan sarıya dönük renkte olurlar ve flavonol, flavanol, flavanon, flavon ve izoflavonlar olarak sınıflandırılırlar. Antosiyaninler, antosiyanidinlerin glikozitleridir(Cadenas ve ark., 2002). 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(Harborne, 1968).



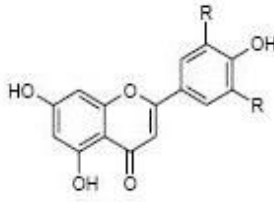
Flavonol



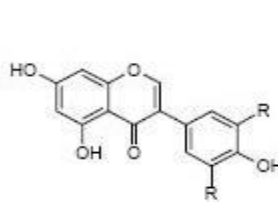
Flavanol



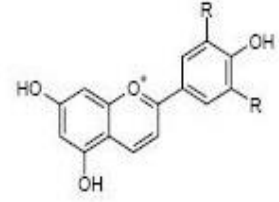
Flavanon



Flavon



İzoflavon



Antosiyanidin

Şekil 4.1f: Flavonoidlerin temel kimyasal yapıları

Flavonoidlerin en yaygın sınıfı flavonollerdir ve en önemli bileşikleri kuersetin, kuersetin glikoziti rutin, kamferol, mirisetin, izoramnetindir (Şekil 4.1f)(Tablo 2.3). Kuersetin bitkilerin en temel flavonollerindendir ve soğan, elma, lahana ve çayda yüksek miktarda bulunmaktadır.

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

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.

Flavonların dihidro türevleri ise flavanonlardır. En önemlileri eriodiktol, naringenin, naringin, hesperidin ve hesperetin'dir. Naringin naringenin'in, hesperidin hesperetin'in glikozitidir. Greyfurt ve portakalda bol miktarda bulunurlar.

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

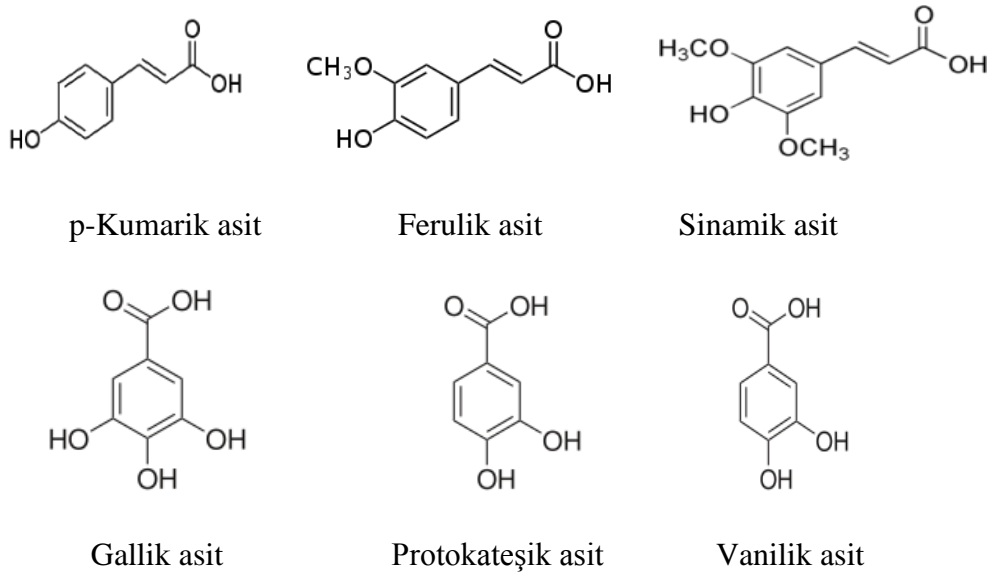
Antosiyaninler, antosiyanidinlerin glikozidleri olup çiçeklere ve meyvelere kırmızı, mavi ve mor renkleri veren, suda çözülebilen en önemli bitki pigment sınıfıdır. En önemlileri; apigenin, siyanidin, malvidin ve delphinidin'dir.

Tablo 4.1a: Flavonoidlerin sınıflandırılması, adları, sübstitüsyon modelleri ve besin kaynakları

SINIFI	ADLARI	SÜBSTITÜSYON MODELLERİ	BESİN KAYNAKLARI
Flavanol	(+)-Kateşin (-)-Epikateşin Epigallokateşin Epikateşin gallat Epigallokateşin gallat	3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH 3,5,7,3',4'-OH,3-gallat 3,5,7,3',4',5'-OH, 3-gallat	Yeşil ve siyah çay Yeşil ve siyah çay Yeşil ve siyah çay Yeşil ve siyah çay Yeşil ve siyah çay
Flavon	Krisin Apigenin Rutin	5,7-OH 5,7,4'-OH 5,7,3',4'-OH,3-rutinoz	Meyve Kabuğu Maydonoz, kereviz sapı K.şarap, domates kabuğu, turunçgiller
Flavonol	Luteolin Kaempferol Kuersetin Mirisetin Morin Fisetin	5,7,3',4'-OH 3,5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH 3,7,3',4'-OH	Kırmızı biber Brokoli, greyfurt, çay Soğan, brokoli, domates Çay, k.şarap, mor meyveler, zeytinyağı, elma Üzüm, böğürtlen K.şarap K.şarap, mor meyveler
Flavanon	Naringin Naringenin Taksifolin Hesperidin Hesperetin	5,4'-OH,7-ramnoglukoz 5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,3'-OH,4'-OMe,7-rutinoz 3,5,3'-OH,4'-OMe	Turunçgiller, greyfurt Turunçgiller Turunçgiller Portakal Portakal
İzoflavon	Genistin Genistein Daidzin Daidzein	5,4'-OH,7-glukoz 5,7,4'-OH 4'-OH,7-glukoz 7,4'-OH	Soya fasulyesi ve fıstığı Soya fasulyesi ve fıstığı Soya fasulyesi ve fıstığı Soya fasulyesi ve fıstığı
Antosiyanidin	Apigenidin Siyanidin Malvidin	5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,4'-OH,3',5'-OMe	Renkli meyveler Vişne, çilek, böğürtlen Kırmızı üzüm ve şarap

4.1.2.4.2. Fenolik asitler

Fenolik asitler hidroksi benzoik asit ve hidroksi sinnamik asit olarak adlandırılan farklı iki sınıftan oluşmaktadır (Şekil 4.1g)(Cadenas ve ark., 2002). Fenolik asitlerin ve esterlerinin antioksidan aktiviteleri, sterik engelleme ile güçlenen moleküldeki hidroksil gruplarının sayısına bağlıdır(Dziedzic ve Hudson ,1983). Benzoik asitlerde karboksilat grubunun elektron-çekme özelliği, hidroksi benzoatların hidrojen atomu verme yeteneklerine negatif etki yapar. Hidroksi sinnamik asitler eşdeğer benzoatlarından daha etkilidirler(Miller ve ark., 1996).



Şekil 4.1g: Fenolik asitlerin kimyasal yapıları

Hidroksi sinnamik asitler, fenilpropanoidler, bitkilerin fenolik metabolizmasında temel rol oynayan ve fenil alaninden biyosentetik olarak türeyen fenolik bileşiklerdir(Forkmann ve Heller, 1993; Abu-Amsha, Croft, Puddey, Proudfoot ve Beilin, 1996). Genellikle bu tür fenolik asitler, bitkilerde şeker, organik asit veya yağlarla birleşmiş veya esterleri halinde bulunurlar ve aralarında etkili bir dönüşüm görülmektedir(Fry ve Wallace, 1994). Meyve, sebze, çiçek, tohum ve şarap, çay, kahve, zeytinyağı gibi bitki türevli ürünlerde bulunmaktadır(Herrmann, 1989; Naczk ve ark., 1995). Kafeik asit, onun kuinik ester türevi klorojenik asit, p-kumarik asit bitkilerde en fazla bulunan hidroksi sinnamik asitlerdir.

4.2. Toplam antioksidan kapasite tayin yöntemleri

Antioksidanlarla ilgili bilimsel makaleler incelendiğinde farklı araştırmacılar tarafından antioksidan kapasiteyi tanımlamak için farklı terimlerin kullanıldığı görülür. Karşılaşılabilecek terimler total antioksidan “kapasite” veya “etkinlik”, “güç”, “parametre”, “potansiyel”, “potens” ve “aktivite” dir. Bir kimyasalın “aktivitesi” basınç, sıcaklık, reaksiyon ortamı, diğer reaktifler gibi spesifik reaksiyon koşulları belirtilmedikçe anlamsızdır. Tek bir analiz yöntemi ile ölçülen “antioksidan aktivite” o yöntemde uygulanan spesifik koşullardaki kimyasal reaktiviteyi yansıttığından verileri “total antioksidan aktivitenin” göstergesi olarak genellemek uygun olmayabilir ve yanıltıcıdır. Bu nedenle “aktivite” terimi yerine farklı deneylerde elde edilen sonuçları “kapasite” olarak sunmak önerilmektedir. Ya da “peroksil radikal süpürücü kapasite”, “süperoksit süpürücü kapasite”, “demir iyonu indirgeme kapasitesi” gibi ölçüm yöntemini daha spesifik olarak belirten terimlerin kullanılması da önerilmektedir (Koleva, Beek, Linssen, Groot ve Evstatieva, 2002).

Antioksidan kapasite tayin yöntemleri, kullanılan kimyasal reaksiyon açısından temel olarak iki sınıfta toplanabilir:

- 1) Hidrojen atomu transferi(HAT) reaksiyonuna dayananlar
- 2) Tek elektron transferi (ET) reaksiyonlarına dayananlar

HAT-esaslı analiz yöntemlerinde yarışmalı reaksiyon kinetiği izlenir ve kantitasyon kinetik eğrilerden türetilir. HAT- esaslı yöntemler sentetik serbest radikal oluşturucu, oksitlenebilen prob ve antioksidandan oluşur. (Huang, Ou ve Prior, 2005).

HAT ve ET esaslı yöntemler bir örneğin radikal (veya oksidan) süpürücü kapasitesini ölçmeye dönüktür.

HAT reaksiyonuna dayanan analiz yöntemlerinin çoğu azo bileşiklerinin bozunması sonucu oluşan peroksil radikallerinin antioksidan ve substrat tarafından yarışmalı bir şekilde giderilmesi prensibine dayanır.

HAT analiz yöntemleri:

- a) Oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC)
- b) Toplam radikal yakalama antioksidan kapasitesi (TRAP)
- c) İndüklenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein otooksidasyonu
- d) Krosin Yöntemi

ET esaslı analiz yöntemleri, antioksidan maddenin indirgendiğinde renk değiştiren bir oksidan maddeyi indirgeme kapasitesinin ölçümüne dayanır. Renk değişiminin derecesi örnekteki antioksidan derişimi ile bağlantılandırılır(Huang ve ark., 2005).

Oksidan + e⁻ (antioksidan) → indirgenmiş oksidan + yükseltgenmiş antioksidan

ET esaslı analiz yöntemleri:

- a) CUPRAC(Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi olarak sıralanabilir.
- b) Ferrik iyonu indirgeme antioksidan gücü (FRAP)ölçümü
- c) Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile toplam fenolik madde analizi
- d) Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) ölçümü
- e) Cu(II) kompleksini oksidan olarak kullanılan “toplam antioksidan potansiyel” ölçüm yöntemi
- f) DPPH kullanarak “toplam antioksidan potansiyel” ölçüm yöntemi

Bu yöntemlerden FCR’in antioksidanın indirgeme kapasitesinin belirlenmesinde ve ORAC’ın ise antioksidan radikal süpürücü kapasitesinin belirlenmesinde kullanılması önerilmektedir (Lopez-Alarcon ve Lissi, 2005). Yukarıda bahsedilen tüm yöntemlerin bir bitkinin antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde kullanılması mümkün olmakla birlikte, örnekteki antioksidan maddelerin moleküler çeşitliliği bu

yöntemler arasında her zaman doğrusal ilişki oluşmasını engelleyebilir. Bu nedenle tek bir yöntem kullanarak bitkinin antioksidan kapasitesi hakkında karar vermek uygun olmayabilir.

Antioksidan kapasitenin ölçümü için literatürde verilen yirmiden fazla yöntem vardır. Bitkilerin antioksidan kapasitelerinin tayini söz konusu olduğunda literatürdeki sonuçlar açıkça göstermektedir ki antioksidan aktivite seçilen tayin yöntemine son derece bağımlıdır ve gözlenen antioksidan aktivite (veya kapasite) ile bitki ekstraktlarının total fenolik içeriği arasında tam bir korelasyon gözlenmeyebilir (Dorman, Peltoketo, Hiltunen ve Tikkanen, 2003; Trouillas, Calliste, Allais, Simon, Marfak, Delage ve Duroux, 2003; Miliauskas, Venskutonis ve Beek, 2004).

Bu çalışmada kullanılan antioksidan aktivite tayin yöntemlerinin prensipleri aşağıda açıklanmıştır.

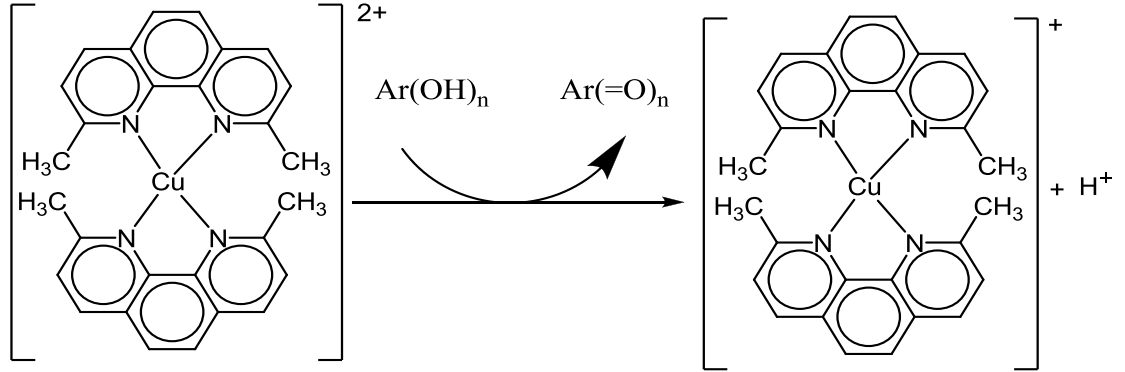
4.2.1. CUPRAC(Cupric reducing antioxidant capacity; Cu(II) iyonu indirgeme antioksidan kapasite) yöntemi

Apak ve arkadaşlarının 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 absorban veren bakır(I)-neocuproin [Cu(I)-Nc] kelatına indirgenme yeteneğinden yararlanarak antioksidan kapasitesi hesaplanmaktadır. Bu özellikten yola çıkarak geliştirilen antioksidan kapasite yöntemine “bakır(II) iyonu indirgeme antioksidan kapasite yöntemi” denilmiştir ve kısaca CUPRAC metodu olarak adlandırılmıştır(Apak ve ark., 2004).

Fenantrolin kompleksleri suda çok düşük çözünürlüğe sahiptirler ve %95'lik etanol gibi organik çözücülerde çözünmelidirler ve seyreltilmelidirler. Polifenoller için FRAP değerleri oldukça daha düşük iken, CUPRAC değerleri TEAC değerleriyle benzerdir.

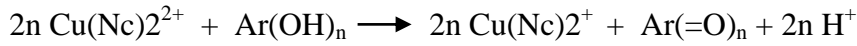
Yöntem; sulu Cu(II) klorür çözeltisi, alkolde hazırlanmış neocuproin çözeltisi ve sulu amonyum asetat (pH=7 tamponu) çözeltilerinin karıştırılmasından sonra, üzerine tayin edilecek herhangi bir antioksidan çözeltisinin ilave edilmesi ve bunu

takip eden 30 dakika sonunda, içerisinde antioksidan bulunmayan referansa karşı 450 nm’de absorbanlarının ölçülmesinden ibarettir.



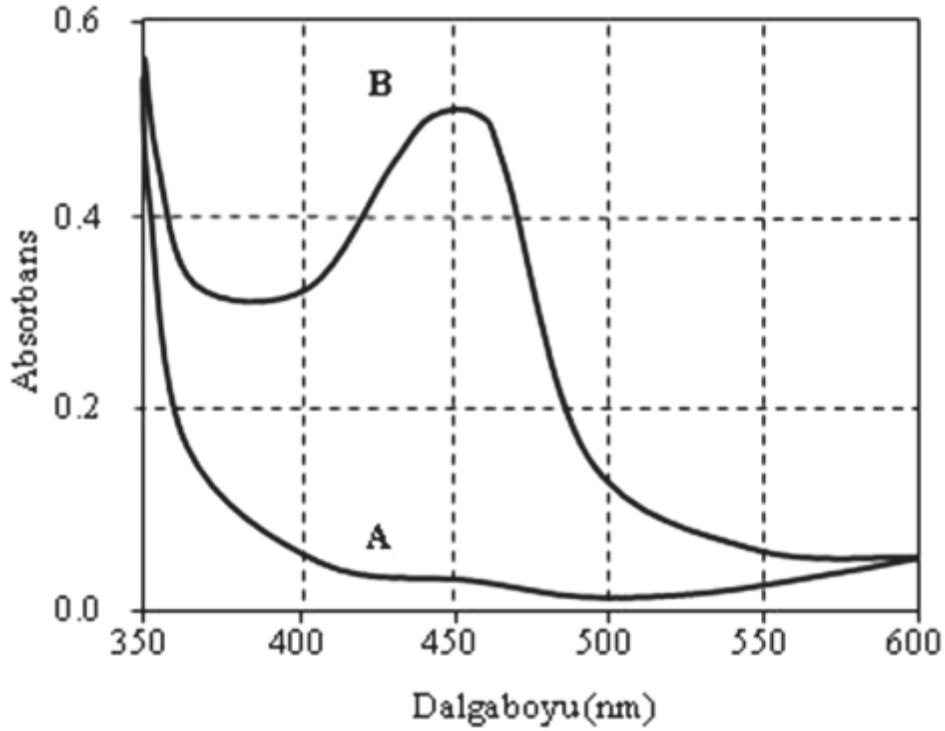
Açık mavi CUPRAC reaktifi

Sarı renkli ürün, $\lambda_{\max} = 450 \text{ nm}$



Şekil 4.2: CUPRAC yönteminin kromojenik oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc reaktifinin antioksidanlarla (Ar(OH)_n) reaksiyonu sonucu Cu(I)-Nc renkli kelatının oluşumu

Bu reaksiyonda, Ar(=O)_n hidroksi grubu içeren antioksidan polifenolden oluşan kinonu ifade etmektedir. Tepkime sonunda iki proton açığa çıkmakta ve Ar(OH)_n yapısında bulunan hidroksil grubu kinon formuna dönüşmektedir(Şekil 4.2). Cu(II)Nc ise 450 nm’de maksimum absorban veren şiddetli renk oluşumuyla birlikte Cu(I)Nc kelatına dönüşmektedir(Şekil 4.2a). Bu reaksiyonda, n-OH grubu içeren antioksidan karakterli bileşikler, 2n-e donörü olarak hareket etmektedir(Apak ve ark 2004). Yöntem hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanlara uygulanabilir.



Şekil 4.2a: A: [Cu(I)-Nc] ve B: [Cu(II)-Nc] kelatının absorpsiyon spektrumu

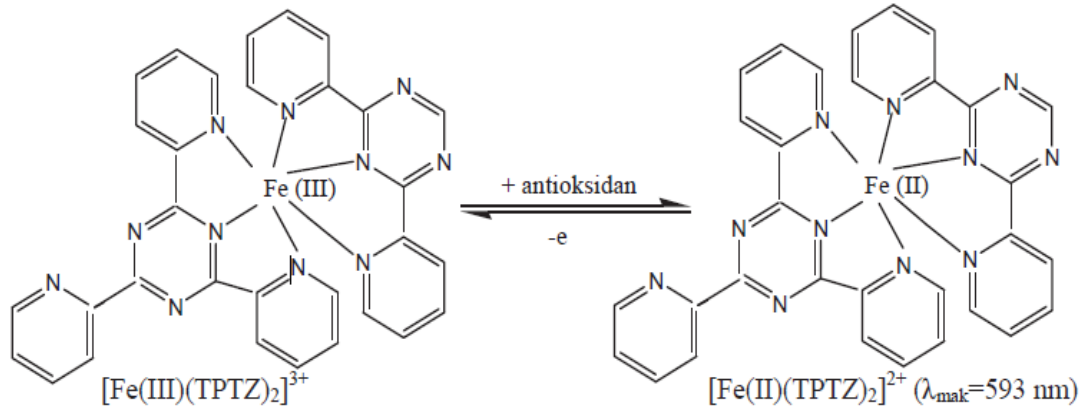
Yöntemin Avantajları:

Bu reaktif seçicidir, çünkü fenantrolin veya tripiridiltriazin türü ligandlarla bağlı demire göre daha düşük redoks potansiyeline sahiptir. FRAP yönteminde girişime neden olan basit şekerler ve sitrik asit, CUPRAC reaktifiyle okside olmaz. CUPRAC reaktifi, tiyol tipi antioksidanları okside etmek için yeterince hızlıdır. FRAP metodu canlı bitki ve hayvan hücresinin önemli düşük molekül ağırlıklı tiyol bileşeni olan glutasyon gibi tiyol tipi antioksidanları ölçmez (Hampsch-Woodill, Ou ve Prior, 2001). Bunun nedeni Fe(III)'ün, kimyasal olarak inert olmasına neden olan yüksek spinli yarı dolu d orbitalleri olabilir. Oysa Cu(II)'nin elektronik yapısı, hızlı kinetiğe imkan verir. Sisteinin Fe(III) ile indirgenme reaksiyonunun 1,10-fenantrolin varlığında yavaş ilerlediği rapor edilmiştir. Fakat bu reaksiyon katalizör olarak Cu(II) kullanılmasıyla hızlandırılmıştır (Katsumata, Teshima, Kurihara, Sakai ve Kawashima, 1999). CUPRAC reaktifi, ABTS ve DPPH gibi, kromojenik radikal reaktiflerden daha kararludur ve daha kolay temin edilebilir. Renkli Cu(I)-Nc şelatı veren redoks reaksiyonu, hava, güneş ışığı, nem ve pH gibi parametrelerden etkilenmez (Apak ve ark., 2004).

Yöntemin Dezavantajları:

CUPRAC yöntemi askorbik asit, ürik asit, gallik asit ve kuersetin için birkaç dakika içinde tamamlanır, fakat daha kompleks moleküller için 30-60 dakika gereklidir. CUPRAC yönteminde kompleks antioksidan karışımında uygun reaksiyon zamanını seçme açısından problemlidir (Prior RL, Wu X, Schaich K, 2005).

4.2.2. FRAP (ferric reducing antioxidant power; demir(III) iyonu indirgeyici antioksidan gücü) yöntemi



Şekil 4.2b: Fe(III)-TPTZ kompleksinin, Fe(II)-TPTZ formuna indirgenmesi

Benzie ve Strain tarafından geliştirilen bu yöntemde demir(III)'in indirgenme kapasitesi yoluyla antioksidanların toplam miktar tayini yapılmaktadır(Şekil 4.2b). FRAP yönteminin avantajı elektron-transfer reaksiyonu olmasıdır.

Basit ve ucuz bir yöntem olan FRAP yöntemi renkli bir bileşik oluşturmak üzere antioksidanların indirgeyebilme yeteneğini ölçmektedir. Burada Fe(III) tuzu, $\text{Fe(III)(TPTZ)}_2\text{Cl}_3$ (TPTZ=2,4,6-tripiridil s-triazin) oksidan olarak kullanılır. Düşük pH'da (pH=3,6) oluşan Fe(III) 'ün, kısa adı TPTZ olan tripiridiltriiazin ile reaksiyonu sonucu oluşan $[\text{Fe(III)-TPTZ}]$ kompleksi antioksidanların etkisiyle Fe(II)-tripiridiltriiazin $[\text{Fe(II)-TPTZ}]$ kompleksine indirgenmektedir. Meydana gelen Fe(II)-TPTZ kompleksinin rengi koyu mavidir ve 593 nm'de maksimum absorbans vermektedir(Benzie ve Strain, 1996).

FRAP metodu antioksidan gücü tayin edebilen dolaylı bir metoddur(Cao ve Prior, 1999). 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 yükseltgenmemesine ve dolayısıyla toplam antioksidan kapasitenin olduğundan düşük bulunmasına yol açabilmektedir.

FRAP sonuçları, analiz zamanına bağlı olarak büyük ölçüde değişebilir. Hızlı reaksiyon veren polifenoller, 4 dakika gibi kısa analiz zamanlarında tayin edilirler. Bununla birlikte, bazı polifenoller daha yavaş reaksiyon verirler ve tayin için daha uzun analiz süreleri gerektirirler (30 dakikadan birkaç saate kadar). Bravo ve arkadaşları, kafeik asit, tannik asit, ferulik asit, askorbik asit ve kersetin gibi polifenoller için absorbansın 593 nm'de yavaş yavaş arttığını saptamışlardır (Bravo, Pulido ve Saura-Calixto, 2000).

Yöntemin Avantajları:

FRAP yöntemi ile hem hidrofilik hem lipofilik antioksidanların tayini yapılabilmektedir. Diğer yöntemlerin aksine FRAP yöntemi basit, hızlı ve ucuzdur, özel aletler gerektirmemektedir. Otomatik, yarı-otomatik ve manuel metotlarla gerçekleştirilebilir (Prior ve ark., 2005).

Yöntemin Dezavantajları:

FRAP yöntemi spesifik değildir. Redoks potansiyeli 0.70 V'dan daha düşük, *in vivo* olarak antioksidan özellik göstermeyen herhangi bir bileşik bile demiri indirgeyebilir (Akesson, Nilsson, Pillai, Onning, Persson ve Nilsson, 2005). Fe^{+3}/Fe^{+2} redoks çiftinin redoks potansiyelinden daha düşük potansiyelli birçok bileşik teorik olarak Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeyebilir. Bu nedenle FRAP değerleri daha yüksek çıkabilir. Bunun nedeni Fe(III)'ün, kimyasal olarak inert olmasına neden olan yüksek spinli yarı dolu d orbitalleri olabilir (Apak ve ark., 2004). Ayrıca diğer bir neden FRAP yöntemi ile fizyolojik olmayan pH'da çalışılmasıdır (Arranz, Perez-Jimenez, Tabernero, Diaz-Rubio, Serrano, Goni ve Saura-Calixto, 2008). Yöntem sadece demir iyonunu temel almaktadır. Bu yüzden mekanik ve fizyolojik olarak antioksidan aktivitesi için uygun değildir.

Çalışılan madde karışımları gıda ekstraktındaki şelatlarla bağlanabilen diğer Fe(III) türlerini içeriyorsa, potansiyel problemler meydana gelir. Bu kompleksler antioksidanlarla reaksiyona girebilir. Sonuçlar FRAP değeri ve antioksidanın verdiği elektron sayıları arasında bir ilişki olmadığını göstermiştir (Garg ve ark., 2006).

4.2.3 Folin ciocalteu yöntemi

Bu yöntem Singleton ve arkadaşları tarafından antioksidanların toplam fenolik içeriğini ölçmek için geliştirilmiştir. Yöntemde kullanılan CuSO_4 (bakır(II)sülfat) alkali ortamda protein veya antioksidanla kompleks yapar (Singleton ve Rossi, 1965; Singleton, Orthofer ve Lamuela-Raventos, 1999). Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) molibdofosfotungstik heteropoliasittir ($3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 13\text{WO}_3 \cdot 5\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$). Varsayılan aktif merkezi Mo(VI) dır. Folin fenol reaktifi (fosfomolibdik-fosfotungstik asit) eklendiğinde, folin reaktifi proteine bağlanır. Protein veya antioksidanla Cu(II) 'nin reaksiyonundan açığa çıkan Cu(I) olasılıkla molibdatotungstat reaktifini heteropoli mavisine indirger ve rengi sarıdan maviye dönüşür.

Reaksiyon tamamlanınca, mavi renkli kompleks oluşumu 750 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür. Standart olarak genellikle gallik asit kullanılır ve sonuçlar gallik asit eşdeğeri olarak (mg/L) ifade edilir.



Bu denemede, ard arda geri dönüşümlü bir veya iki elektron indirgeme reaksiyonları, $\text{P(MoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}$ 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 (Folin Ciocalteu reaktifi) ile sadece bazik ortamlarda reaksiyon verirler. (Sodyum karbonat çözeltisi ile pH=10'a ayarlanır). Fenolik protonun dissosiasyonu, reaktifi indirgeme yeteneği bu nedenle artan fenolat anyonunun oluşumunu sağlar.

Yöntemin Avantajları:

FC yöntemi toplam indirgeyici kapasitenin ölçülmesinde kullanılmaktadır. FC yöntemi ile diğer yöntemler (TEAC ve DPPH) arasında ilişki bulunmaktadır (Andrioli, Lussignoli, Fraccaroli, Brocco ve Bellavite, 1999). FC metodu ve ORAC metoduyla bulunan antioksidan kapasite ölçümleri arasındaki ilişki genellikle iyidir (Prior ve ark., 2005). FC yöntemi, gıdaların antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde basit, tekrarlanabilir ve güvenilir bir yöntemdir. (Huang ve ark., 2005).

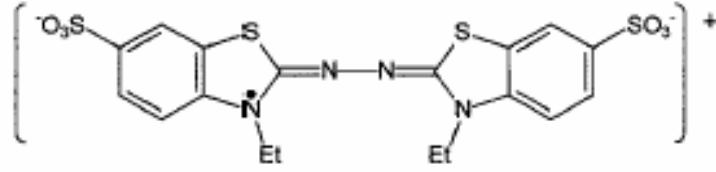
Yöntemin Dezavantajları:

FC yöntemi antioksidan çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Yöntemin uzun zaman alması rutin analizler için uygulanmasını zorlaştırmaktadır. Aynı zamanda sulu fazda gerçekleştirildiği için lipofilik bileşikler için uygulanamamaktadır (Lima, Magalhaes, Segundo ve Reis, 2008, Garg ve ark., 2006, Prior ve ark., 2005). Metotların standardizasyon eksikliği tayin edilen fenollerde farklı değerler elde edilmektedir. FC ayırıcı fenolik bileşikler için spesifik değildir. Fenolik olmayan bir çok bileşik (aromatik aminler, sülfür dioksit, askorbik asit, Cu (I) ve Fe (II) gibi) tarafından indirgenebilir. Bu nedenle “toplam fenolik madde” belirlenmesi için uygun değildir. Son zamanlarda FC yöntemi toplam indirgeyici kapasitenin ölçülmesinde kullanılmaktadır. Folin-Ciocalteu ayırıcı (FCR) temelli yöntem toplam fenolik (ya da fenol) yöntem olarak bilinir. Fakat gerçekte örneğin indirgeyici kapasitesini ölçer. Son absorbans değerleri genellikle reaksiyona giren fenolik hidroksil gruplarının sayısı ile orantılıdır ve molekülün yapısına bağlıdır. (Klejdus, Stratil ve Kuban, 2006).

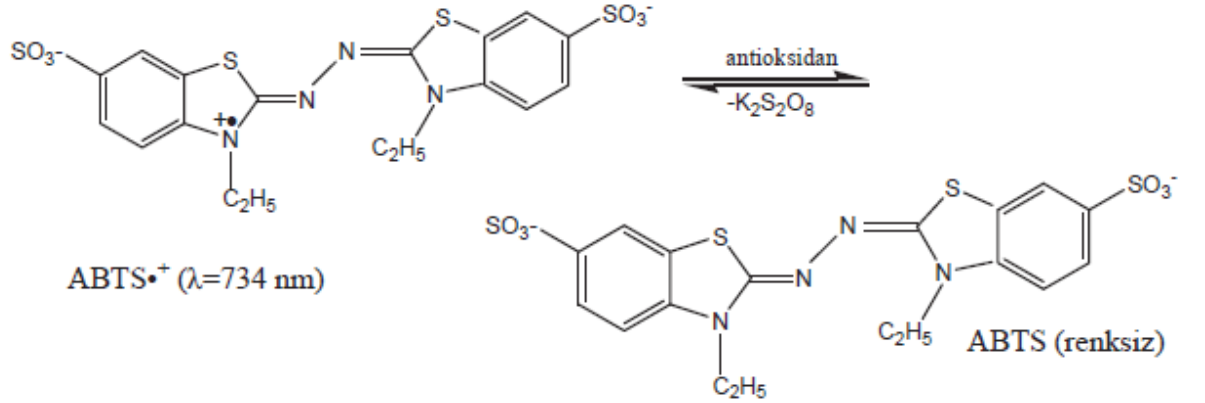
4.2.4. TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity; troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi) / ABTS yöntemi

Troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi olarak ifade edilen TEAC/ABTS yöntemi, ilk olarak Miller ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (Miller ve ark., 1993; Miller ve Rice-Evans, 1994). Bu yöntem; 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit) (ABTS) kromojen radikal katyonunun absorbansının, antioksidanlar

tarafından inhibisyonunu temel alır. (ABTS)'in persülfatla oksidasyonu, $ABTS^{\bullet+}$ radikali oluşturulur (Şekil 4.2c). Bu radikal, toplam radikal süpürme kapasitesini ölçmek için kullanılır. Bu metot antioksidan bileşikler tarafından ABTS'nin rengini kaybetmesi temeline dayanır. Antioksidanlar varlığında $ABTS^{\bullet+}$ radikal katyonunun (Şekil 4.2d) absorbandsında belirli bir süre içindeki azalmadan yararlanarak toplam antioksidan kapasitesi troloks cinsinden bulunur. Bu nedenle bu yöntem “troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi”(ABTS/TEAC) adı da verilir.

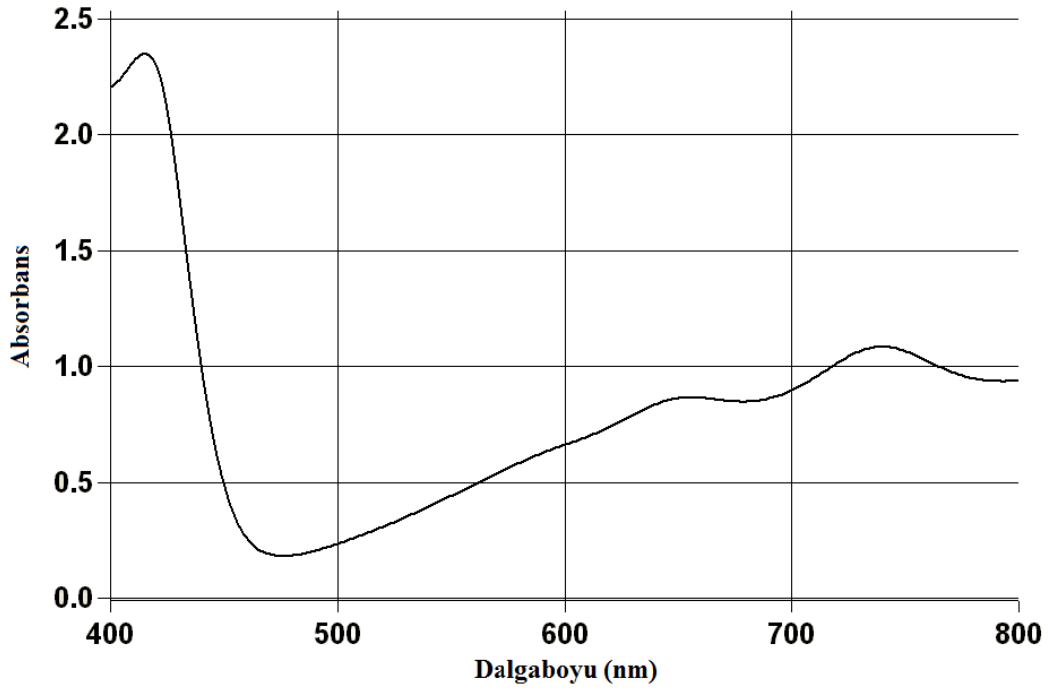


Şekil 4.2c: $ABTS^{\bullet+}$ radikal katyonunun yapısı



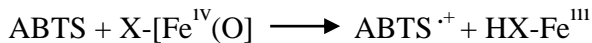
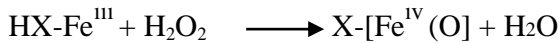
Şekil 4.2d: 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS)'nin persülfatla oksidasyonu

TEAC yönteminde analiz edilen maddenin (antioksidanın) ABTS radikalini indirgeme yeteneği ölçülmektedir. Yöntemde antioksidan varlığında radikal meydana gelmektedir. 660nm, 734nm ve 820 nm’de maksimum veren ABTS^{•+} radikal katyonu metmiyoglobinin H₂O₂ ile aktivasyonu ile üretilen ferrilmiyoglobin radikal türlerinin ABTS ile etkileşiminden meydana gelmektedir (Şekil 4.2e)(Ateş, Erdoğan, Durmaz, Yılmaz ve Seçkin, 2011).



Şekil 4.2e: ABTS^{•+} radikal katyonunun absorpsiyon spektrumu

ABTS^{•+} katyon radikalini oluşturmak için, ABTS; myoglobin ve H₂O₂ ile aşağıdaki reaksiyonlarda görüldüğü gibi inkübe edilir(Girotti, Ferri, Maccagnani, Budini ve Bianchi, 2002).



(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(Miller ve ark., 1994).

Örnek, ABTS⁺ çözeltisi ile karıştırılır ve 6 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletme sonunda absorban ölçülür (Ateş ve ark., 2011). Absorbanstaki azalmadan yararlanılarak örneğin toplam antioksidan kapasitesi troloks cinsinden verilmektedir. Sonuçlar gram örnek başına Troloks eşdeğer antioksidan kapasite cinsinden ifade edilir (TEAC/mg). Antioksidan ve oksidanlar arasındaki reaksiyon hız farklılıkları TEAC değerlerine yansımaz. Çünkü TEAC yöntemi bir bitiş noktası yöntemidir (Huang ve ark., 2005).

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

Yöntemin Avantajları:

Uygulamasının kolay olması nedeniyle, TEAC yöntemi antioksidan kapasiteyi araştırmak için sıklıkla kullanılmıştır. Yöntem geniş bir pH aralığında kullanılabilir. Bu yüzden antioksidan mekanizma üzerine pH etkisini çalışmak için kullanılabilir (Prior ve ark., 2005; Lima ve ark., 2008). ABTS radikali hem sulu hem de lipit fazlarda kullanılabilir ve dolayısıyla lipofilik ve hidrofilik bileşiklerin antioksidan kapasitesini ölçmek için kullanılabilir (Osman, Wong, Hill ve Fernyhough, 2006).

Yöntemin Dezavantajları:

TEAC reaksiyonunun bitiş noktasına ulaşması zaman alabilir. Bu yüzden, kısa süreli bir bitiş noktasının kullanılması (4-6 dakika), reaksiyon tamamlanmadan önce okuma yapılmasına ve daha düşük TEAC değerleri bulunmasıyla sonuçlanabilir (Prior ve ark., 2005).

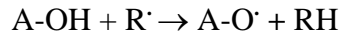
4.3. Antioksidan Kapasiteye Etki Eden Faktörler

Antioksidanlar radikalleri hidrojen atom transfer (HAT) ve elektron transfer (ET) gibi iki temel mekanizmaya göre etkisiz hale getirirler. Bu mekanizmayı antioksidanın yapısı, özellikleri, sistemin çözücüsü ve dış faktörler (sterik etki, polimerizasyon vb.) etkilemektedir. Bu faktörlere bağlı olarak antioksidan kapasitede değişimler meydana gelmektedir.

4.3.1. Yapısal etki

En önemli antioksidan sınıflarından flavonoidlerin ve metabolitlerinin antioksidan aktivitesi halkalı çekirdeksel yapılarındaki fonksiyonel grupların yerleşmesine bağlıdır. Flavonoidlerin yapılarındaki süstitüentlerin yerleşimi, flavan iskeletinin tek başına göstermiş olduğu antioksidan aktiviteyi yükseltebilmektedir. Birçok polifenolik antioksidan birbirleriyle karşılaştırıldığında, hem konfigürasyonun, hem de toplam hidroksil grupları sayısının antioksidan aktiviteyi büyük oranda etkilediği görülmüştür(Cao, Sofic ve Prior, 1997; Pannala, Chan, O'brien ve Rice-Evans, 2001; Burda ve Oleszek, 2001).

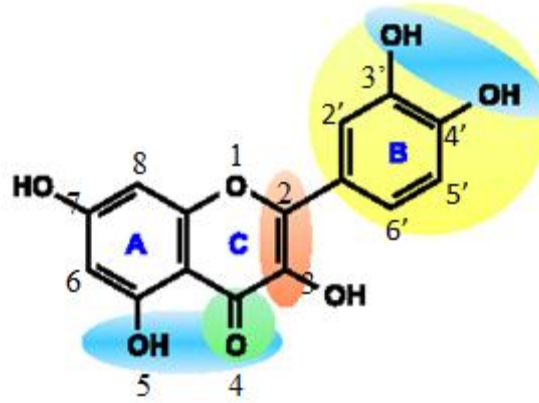
Serbest radikal süpürme kapasitesinin hidroksil süstitüentlerinin yüksek reaktivitesine bağlı olduğu aşağıdaki reaksiyonda görülmektedir:



Flavonoidlerin yapılarına bağlı olarak antioksidan kapasitelerinin farklılaşmasında kapasite değerlerini belirleyen birkaç husus vardır (Şekil 4.16):

- 1) B halkasındaki *o*-dihidroksi yapısı (1-e veren flavonoidin ariloksi radikal formunun yüksek kararlılığını sağlayan ve elektron delokalizasyonuna katılan)
- 2) 2. ve 3. karbon atomları arasındaki çifte bağ (C halkasında 4. karbon atomunda keto grubu oluşturan ve radikalın B halkasından elektron delokalizasyonunu arttıran)
- 3) C ve A halkalarındaki 3. ve 5. pozisyondaki hidroksil grupları (maksimum radikal-süpürme potansiyeli için gerekli olan)(Shadidi ve ark., 1992).

Bu özelliklerden bir ya da daha fazlasına sahip flavonoidler oldukça yüksek antioksidan etki gösterirler(Miller ve ark., 1996). Flavonoidler tarafından serbest radikallerin süpürülme yeteneği, en çok serbest 3-OH grubunun varlığına bağlıdır. Şekil 4.3'de, çok güçlü bir antioksidan olan kuersetinin kimyasal yapısı üzerinde antioksidan kapasitesini belirleyen özellikleri incelediğimizde, bu özelliklerden en önemlisi daha önce belirtildiği gibi sarı renkle gösterilen kateşol veya ortodihidroksillenmiş B halkasıdır. Diğer önemli özellikler; C halkasında kırmızı renkle gösterilmiş olan doymamış yapı, yeşil renkle gösterilen 4-okso fonksiyonunun varlığıdır. Kateşol grubu ve diğer fonksiyonlar (mavi renkli) demir ve bakır gibi transizyon metalleri kelatlamaya yeteneği sağlar(Williams, Spencer ve Rice-Evans, 2004).



Şekil 4.3: Flavonoidlerin antioksidan kapasitelerini belirlemede önemli olan özellikleri gösteren kimyasal yapı

a) Hidroksil gruplarının sayısı;

A ve B halkalarında polihidroksillenmiş yapıların önemi, kuersetin, mirisetin, (+)-kateşin, morin ve fisetinin, apigenin, hesperetin, hesperidin, naringenin, naringine 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 ile (özellikle C-3' konumunda) artar ve hidroksil grupları sayısının azalmasıyla hızlı bir şekilde azalır.

b) 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.

c) C halkasındaki 3. karbon atomu üzerinde hidroksil grubunun varlığı;

Bu yapıya sahip fisetin, (+)-kateşin, kuersetin, mirisetin ve morin; lipid peroksidasyonunu, C-3. karbon atomu üzerinde hidroksil grubu taşımayan apigenin, hesperetin ve naringenine göre daha kuvvetli inhibe eder.

d) 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 ariloksi radikallerini stabilize edeceğinden sonuçta antioksidan aktiviteyi artırırlar.

4.3.2. Çözücü etkisi

Antioksidan bileşiklerin kimyasal davranışları üzerinde çözücü etkisi temel bir parametredir. Hidrofilik ve lipofilik ortamlarda antioksidanlar benzer antioksidan aktivite göstermezler aksine çözücü ortamının değişmesiyle gösterdikleri antioksidan özellik farklılık gösterir. Çözücü türü ve polaritesi antioksidan kapasite ölçümlerinde önemli olan hidrojen atomu ve elektron transferini etkilemektedir(Perez-Jimenez ve Saura-Calixto, 2006; Finotti ve Majo, 2003). Polar çözücülerde, hidrojen atomu bağlanması fenolik antioksidanların H-atom donör aktivitelerinde önemli değişikliklere neden olmakta ve ölçülen antioksidan kapasitesini etkilemektedir(Pinelo, Manzocco, Nunez ve Nicoli, 2004; Pedrielli, Pedulli ve Skibsted, 2001). Hidrojen atom transferi reaksiyonu esasına göre çalışan antioksidan kapasite yöntemleri çözücüden ve pH'dan bağımsızdır. Ayrıca reaksiyon hızlı olup genellikle saniye veya dakika mertebesinde tamamlanmaktadır(Prior ve ark., 2005).

Antioksidan kapasite üzerine çözücü etkisi ile ilgili literatürde birçok çalışma mevcuttur. ORAC, ABTS, FRAP ve DPPH gibi sıkça kullanılan yöntemlerde çözücü etkisi mevcut olmakla birlikte çözücünün cinsi ve özellikleri her yöntemi farklı şekilde etkilemektedir. Jimenez ve Saura-Calixto farklı solventlerde gallik asit-kateşin karışımı için sulu çözeltide gözlenen kapasitenin metanol-su içerisinde gözlenene oranla % 40 daha yüksek olduğunu, metanol-su karışımlarında su oranı arttıkça kapasitede artış olduğunu gözlemişlerdir(Perez-Jimenez ve ark., 2006).

FRAP yönteminde ise sulu çözelti ile metanollü çözelti arasında çok fark olmadığı ancak metanol-su karışımlarında su oranı yükseldikçe kapasitenin tek sulu çözeltiye göre arttığı görülmüştür. Yani genel olarak çözücü polaritesindeki artışa bağlı olarak antioksidan kapasitede artış görülmektedir. Ancak bu sonuç % 100 geçerliliği olan bir sonuç olmamakla birlikte yöntemlerin çalışma mekanizmasına, kullanılan antioksidan bileşiklerin kimyasal yapılarına ve çözücü özelliklerine birebir bağlıdır. Jimenez ve Saura-Calixto'nun yaptıkları çalışmada elde edilen sonuçlara göre ORAC yönteminde solvent etkisi çok yüksek iken DPPH yönteminde bu etki minimum bulunmuştur. Çözücü polaritesi azaldıkça ORAC değeri yükselme eğilimi göstermiştir. Farklı çözücüler arasında gözlenen tüm bu farklılıklar, standart antioksidan ve karışımlarına oranla besin veya diğer kompleks matrikslerde daha fazla olacaktır. Bu nedenle antioksidan kapasiteleri karşılaştırırken aynı çözücülerle hazırlanan çözeltiler veya ekstratlar ölçülmelidir. Aksi takdirde sonuçlar çok farklı olabilir ve direkt olarak yöntemleri karşılaştırmak anlamlı olmaz(Perez-Jimenez ve ark., 2006).

Foti ve arkadaşları bazı flavonoidlerin, kateşol türevlerinin, hidrokinon ve monofenollerin antioksidan etkinliği üzerine polar (asetonitril ve *ter*-butil alkol) ve apolar (sikloheksan) çözücülerin etkisini araştırmışlardır(Foti ve Ruberto, 2001).

4.3.3. Sinerjik etki

Günlük diyetle antioksidanların birçoğu bir arada alınmaktadır. Bu sebeple, antioksidanların beraber oluşturacakları etki merak konusu olmuş ve bu yönde birçok araştırma yapılmıştır. Gıda kaynaklı antioksidanların büyük bir kısmını protein ve fenolik yapıdaki antioksidanlar oluşturmaktadır ve tek başlarına yüksek antioksidan

aktivitesine sahiptirler. Fakat bu maddeler birbirleriyle veya insan vücudundaki bir takım yapılarla (enzim, membran, vs) etkileşimde bulunabilmekte, dolayısıyla antioksidan aktivitelerinde ve etkileştikleri maddelerin biyolojik rollerinde önemli değişimlere yol açabilmektedirler. Bu durum, etkileşmenin nasıl olduğu, aktivitelerinin ne durumda olduğu ve muhtemel sonuçlarının ne olacağı sorularını gündeme getirmektedir. Daha önemli olarak insan vücudu baz alınıp hücre düzeyinde olaylara bakıldığında; enzim, hücre membranı ve bazı büyüme faktörleriyle olabilecek etkileşimler olumlu veya olumsuz önemli metabolik değişimlere yol açabilmektedir(Demirbüker Kavak, 2010).

Antioksidanların gıda ortamında beraber bulunmaları sonucunda antioksidan kapasite üç farklı şekilde yorumlanabilir:

- Fenolik ve protein yapıdaki antioksidanlar bir arada bulunarak toplam antioksidan aktiviteyi her ikisinin toplam etkisi şeklinde zenginleştirirler.
- Birbirleriyle antioksidan aktiviteyi arttırıcı yönde etkileşerek pozitif bir sinerjik etki yaratırlar.
- Birbirleriyle antioksidan aktiviteyi azaltıcı yönde etkileşerek negatif bir sinerjik etki (antagonistik etki) yaratırlar(Pinelo ve ark., 2004).

4.3.4. Polimerizasyon etkisi

Polimerizasyon kısaca otooksidasyonun ilerlemesi ile parçalanma ve yeni moleküllerin oluşumu olarak tanımlanabilir. Özellikle yağlarda karşımıza çıkan bu olay sonucu meydana gelen oluşumlar; aldehitler, ketonlar, organik asitler ve bunların hidroksi türevleri gibi bileşiklerdir. Bazı flavonoidlerin polimerizasyon reaksiyonlarına gösterdiği yatkınlık sonucunda yapılarının değiştiği ve bunun sonucu olarak da radikal süpürme özelliklerinde değişimler olduğu bildirilmiştir(Pinelo ve ark., 2004).

Flavonoidlerin nükleer yapısının polimerleşmesi, konjügasyon ve elektron delokalizasyonu vasıtasıyla daha kararlı olan flavonoid radikalini sağlayarak antioksidan aktiviteyi arttırmaktadır(Heim, Tagliaferro ve Bobilya, 2002). Kateşinler ve antosiyaninler üzerinde polimerizasyon, yapıya galloil ve şeker gruplarının

bağlanmasının etkisi ile ilgili yapılan çalışmada, kateşinlerin monomerden trimere doğru yani polimerizasyon arttıkça antioksidan etkisinin arttığı ve buna karşılık olarak yağ fazında ise antioksidan aktivitenin polimerizasyonla azaldığı belirtilmiştir(Plumb, Pascual-Teresa, Santos-Buelga, Cheynier ve Williamson, 1998).

4.4. Kocayemiş'in (*Arbutus unedo* L.) İÇeriği ve Sağlık Üzerindeki Etkileri

Kocayemiş ülkemizde Akdeniz, Ege, Marmara, Karadeniz kıyılarındaki maki alanları içinde yetişmektedir. Çiçeklenme eylül'den mart ayına kadar devam eder. Bununla birlikte çiçekler kasım-aralık aylarında yoğun bir şekilde görülürler. Meyvelerinin büyüklüğü ortalama 15-25 mm çapında ve 4-8 g ağırlığındadır. Meyveler kırmızı renkte, yuvarlak veya yassıdır. Yaz sonunda yeşilden sarıya dönen meyveler yenilebileceği zaman kırmızı bazen de pembe veya portakal rengine dönuşür ve kokuludurlar. Meyveler olgunlaşmalarını 1 yılda tamamlarlar. Toplu halde bulunan meyveler sonbaharda olgunlaşmaya başlar ve uzun süre ağaç üzerinde kalırlar(Şeker, Yücel ve Nurdan, 2004).



Şekil 4.4 : Kocayemiş meyvesi

Kırmızı rengi alan meyveler iyi birer antioksidan kaynağıdırlar ve yüksek miktarda şeker içerirler. Kocayemiş insan sağlığı için önemli bir meyve türüdür. Meyveleri mineral elementler ve özellikle C vitamini (150-280 mg) bakımından oldukça zengindir(Özkan ve Haciseferoğulları, 2007). Yaprakları sakkaroz ve tanen, arbutin, metilarbutin ve urson gibi fenolik maddeler taşıır. AĞaç kabuğu ve köklerinde tanen (%45) içermektedir(Yaltırık ve Erdinç, 2002). Kocayemişin meyveleri ve yaprakları pek çok hastalığa iyi gelmektedir. Yaprakları ishali önler ve idrar yolları antiseptiği olarak faydalıdır. Meyveleri vücudu kuvvetlendirir, mikroplara karşı korur.

Böbrek ve mesane yolları iltihaplarının iyileşmesini sağlar, bağırsak kurtlarını döker, karaciğer yetmezliğine iyi gelir, diş taşlarını eritir, safra taşlarının

dökülmesine yardımcı olur, sinirleri kuvvetlendirir. Meyveleri haşlanıp elde edilen sıvı içilirse kızamığa iyi gelir, idrar söktürür, öksürük ve bronşite iyi gelir, yüksek tansiyonu düşürür, damar sertliğini giderir, romatizma ve mafsalsal iltihabına iyi gelir, ateşi düşürür, cilde tazelik ve güzellik verir. Kocayemişin kullanım alanı oldukça geniştir. Yemiş olarak değerlendirilmekte, tıpta ve ilaç sanayisinde kullanılmaktadır.

Kocayemiş meyvesi hem iyi bir antioksidandır hem de C vitamini kaynağıdır. Antioksidanlar vücuttaki serbest radikalleri tutabilme özelliğine sahiptirler. Antioksidan ve vitamin eksikliğinin metabolizmada önemli rahatsızlıklara yol açabileceği düşünüldüğünde antioksidan aktivitelerinin ve düzeylerinin belirlenmesi ile ortaya çıkacak sonuçlar değerlendirilip, sağlıklı beslenmeye ilave olarak vitamin takviyesi ile vücuttaki serbest radikallerin zararlarının önlenebileceği düşünülmektedir.

4.5 Kocayemiş ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Medina Carnicer ve ark. yem olarak kullanılabilen 7 farklı çalı türünün taze ve kuru materyallerinde karoten içeriğini ölçmüşler; 88,5 mg/kg ile en yüksek karoten değerini *Arbutus unedo* L.'nin kuru materyallerinden elde ettiklerini bildirmişlerdir(Carnicer, Berrocal, Lozano, Castro, Blanco ve Lucena, 1973).

Arbutus andrachne L.'nin yapraklarında yaz mevsimi boyunca fosfor birikimini ve pigment (klorofil a ve b, karoten) içeriğini belirledikleri bir çalışmada hava ve toprak neminin optimumun altında olması durumunda fosfat içeriğinin arttığını buna karşın kurak şartların devam etmesi sonucunda bitki metabolizmasının ve büyümesinin geciktiğini, fosfat içeriğinin de azaldığını tespit etmişlerdir(Ivantsova ve Evmenenko, 1978).

Arbutus unedo L. yapraklarından afzal, juglanin, avikularin, kuarsitrin ve hiparin flavonoidlerini elde etmişlerdir. Bu flavonoidler sürgün, çiçek ve meyvelerde nispeten daha az miktarlarda belirlenmiştir(Dauguet ve Foucher, 1982).

Yunanistan'ın Parnis dağından toplanan *Arbutus unedo* L. yaprak, gövde kabuğu ve meyvesinin astringent, diuretik ve antiseptik özelliklere sahip olduğu için ilaç yapımında ticari önem taşıdığı belirtilmiştir(Karıkas, Euerby ve Waigh, 1986).

Arbutus unedo L. yapraklarında fenolik glikozitlerden arbutin ve piceoside bulunduğunu, ayrıca yapraklarında ve gövdesinde pek çok bileşik olduğunu; *Arbutus unedo* L.'nin astringent, diuretik ve antiseptik özellikleri için kullanıldığı bildirilmiştir(Karıkas ve Giannitsaros, 1990).

Alarco-E-Silva ve ark. meyvenin niasin, A ve C vitaminlerince zengin olduğunu, yüksek şeker kapasitesine (% 42) sahip ve asit kapasitesinin % 8.62 olduğunu, bu asit kapasitesinin meyvenin şeker kapasitesine uygun olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca kuinik asit ve insan vücudunda değişime uğrayan hippurik asit, tanen ve yüksek oranda fenolik bileşiklere sahip olduğunu ve fenolik bileşiklerin güçlü bir antioksidant etkiye sebep olduğunu belirtmişlerdir(Alarco-E-Silva, Leitao, Azinheira ve Leitao, 2001).

Arbutus unedo L.'nin yapraklarının etanol ve metanol ekstraktlarında fenol glikozitler, vitamin E, flavanol glikozitler ve tanenleri tespit etmişler ve yaprakların antioksidant etkisinin bulunduğunu bildirmişlerdir(Pabuçcuoğlu, Kıvçak, Baş ve Mert, 2003).

Samsun çevresinden topladıkları *Arbutus unedo* L. meyvelerinin bileşiminde fenolik asitler, uçucu olmayan asitler ve eriyebilir şekerleri belirlemiş ve bunların meyve tadına katkıda bulduklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar *Arbutus unedo* L.'nin meyvelerinde fenolik asitlerden en fazla gallik ve gentisik asit olmak üzere protokateşik asit, p-hidroksibenzoik asit, vanilik asit ve m-anisik asit; uçucu olmayan asitlerden en fazla malik ve fumarik asit olmak üzere laktik, suberik ve sitrik asit; şekerlerden en fazla fruktoz ve glikoz olmak üzere sukroz ve maltoz bulunduğunu tespit etmişlerdir(Ayaz, Küçükislamoğlu ve Reunanen, 2000).

Pinelo ve arkadaşları bitki matriksinde en çok bulunan kuersetinin antioksidan kapasitesi üzerinde çözücü etkisini incelemek için kuersetinin etanol, metanol ve etanol/su (1:9,v/v) çözeltilerini hazırlayarak DPPH yöntemini uygulamışlardır. Çözücüler farklı kimyasal özelliklerine göre seçilmişlerdir. Su ve etanolün seçilmesi kuersetin içeren meyve ve sebze türlerinin hepsinde bol miktarda bulunmasıdır. Metanol bu ortamlarda sık bulunmamasına rağmen, özellikleri açısından su ve etanolün arasında yer aldığından temel koşullar altında antioksidan aktivitenin

değerlendirilmesi hakkında ipuçları verebilecek bir çözücü olduğu için seçilmiştir. Yazarlar aynı konsantrasyonda kuersetin için çözücü polaritesi değişikçe antiradikal aktivitenin arttığını tespit etmişlerdir(Pinelo ve ark., 2004).

Park ve arkadaşları tarafından, etilen ve hava akımı ile muamele edilmiş kivi meyvesi örneklerine ABTS/TEAC, DPPH, CUPRAC yöntemleri uygulanmıştır. Etilenle muamele edilmiş kivilerde total polifenolik bileşik miktarı ile ABTS/TEAC, DPPH, CUPRAC yöntemleri ile ölçülen antioksidan kapasitelerinin korelasyon katsayıları sırasıyla, 0,74; 0,93; 0,98 olarak bulunmuş olup havaakımı ile muamele edilmiş kivi örnekleri için ise bu değerlerin 0,72; 0,88; 0,97 olduğu gözlenmiştir (Park, Jung, Kang, Heo, Arancibia-Avila, Toledo, Drzewiecki, Namiesnik ve Gorinstein, 2008).

Apak ve arkadaşları Malatya bölgesindeki kayısılar üzerinde antioksidan aktivitesi CUPRAC, ABTS/ TEAC ve folin yöntemlerini kullanarak karşılaştırmışlardır. ABTS/ TEAC ve folin metotlarının CUPRAC metoduyla uyumlu olduğu görülmüştür ve saf flavonoidlerin kalibrasyon eğrileriyle, kayısı ekstralarına iç standart ilavesiyle elde edilen kalibrasyon eğrileri paralellik göstermiştir(Apak ve ark., 2006).

Gil ve arkadaşları nar sularının antioksidan aktivitesini dört farklı yöntemle (ABTS, DPPH, DMPD ve FRAP) ile tayin edip kırmızı şarap ve yeşil çay ile karşılaştırmışlardır. Ticari nar suları kırmızı şarap ve yeşil çaya nazaran 3 kat daha fazla antioksidan aktivite gösterdiği görülmüştür (Gill, Tomas-Barberan, Hess-Pierce, Holcroft ve Kader, 2000).

Kim ve arkadaşları, elmadaki başlıca flavonoidleri ve bunların toplam antioksidan kapasitesine olan etkilerini araştırmışlardır. Altı farklı elma çeşidinin antioksidan kapasitelerini ABTS yöntemi ile C vitamini eşdeğeri cinsinden hesaplamışlardır. En önemli flavonoidler; kuarsetin ve glikozidleri, prosiyanidin, klorojenik asid, epikateşin ve C vitamindir. Fenolik bileşiklerle C vitamini arasında toplam antioksidan kapasiteleri ve konsantrasyonları bakımından yüksek bir lineer ilişki saptamışlardır. C vitamini eşdeğeri cinsinden fenolik bileşiklerin antioksidan kapasiteleri, kuersetin için 3,06; epikateşin için 2,67; prosiyanidin için 2,36; C vitamini için 1,00 ve klorojenik asit için 0,97 olarak elde edilmiştir (Kim ve ark., 2003).

Koleva ve arkadaşları, metanolde hazırlanmış DPPH çözeltisi kullanarak kompleks karışımlardaki (bazı bitki türleri) radikal süpürücü bileşenleri belirlemek için hızlı bir on-line yöntem geliştirmişlerdir. HPLC kolonunda ayrılan bileşenler kolon sonrası reaksiyon modülünde DPPH çözeltisiyle tepkimeye girmekte ve radikalın süpürücü bileşenler tarafından süpürülmesi 517 nm’de negatif pikler şeklinde belirlenebilmektedir(Koleva, Niederlander ve Van Beek, 2000)

Stewart ve arkadaşları ise yeşil ve siyah çaydaki fenolik bileşiklerin antioksidan aktivite tayini için on-line HPLC-ABTS yöntemini uygulamışlardır. Her bir çay bileşeninin antioksidan potansiyeli kantitatif olarak belirlenmiş ve galletlanmış kateşinlerin radikal süpürme aktivitesinin en yüksek olduğu gözlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre siyah çayın toplam antioksidan kapasitesinin sadece %20’lik kısmının RP-HPLC ile belirlenen bileşenler tarafından oluşturulduğu görülmüştür(Stewart, Mullen ve Crozier, 2005)

Ulusoy, “Türkiye’nin bazı yörelerinden kestane ve çiçek ballarının antioksidan aktiviteleri ve mineral içeriklerinin karşılaştırılması” isimli çalışmasında, birçok farklı bal numunesinin antioksidan aktiviteleri üzerinde çalışmıştır ve DPPH radikali süpürme aktivitesi, toplam fenolik madde miktarı gibi parametreler hakkında bilgi vermiştir(Ulusoy, 2005).

Orak ve arkadaşları, *Arbutus unedo* L. meyvesinin kurutularak ve dondurularak bazı besin bileşenlerini ve antioksidan aktivite özelliklerini değerlendirmişlerdir. Antioksidan aktivitelerinin tayini için DPPH radikali temizleme aktivitesi ve β -karoten ağartma yöntemini kullanmışlar ve dondurularak yapılan kocayemiş meyvesi analizlerinin besin değerlerinin antioksidan aktivitelerinin daha iyi sonuç verdiği görülmüştür(Orak, Aktaş, Yağar, İşbilir, Ekinci ve Şahin, 2012)

5.GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada kullanılan cihazlar; kimyasal madde ve bitki örneklerini tartmak için Libror AEX-2006 analitik terazi, ekstraksiyon işlemleri ve kimyasal maddelerin çözünmesine yardımcı olmak için Ultrasonic LC 30 ultrasonik banyo, çözeltileri karıştırmak için Kika labortechnik FS125 basic karıştırıcı, meyve örneklerinin dondurularak saklanması için Arçelik A+ freze-dryer, bidistile su temini için Millipore Simpak 1 Synergy 185 bidistile su sistemi, absorbans ölçümleri ve spektrum çizimleri için Shimadzu(UV-1601) UV-Vis spektrofotometre kullanılmıştır.

5.2.Kullanılan Kimyasallar

Bileşimin Adı	Bileşimin Formülü	Firma
Asetik Asit	CH ₃ COOH	Merck
Sodyum Karbonat	Na ₂ CO ₃	Merck
Bakırsülfat tetrahidrat	CuSO ₄ .5H ₂ O	Merck
Demir(III)klorür hegzahidrat	FeCl ₃ .6H ₂ O	Merck
Sodyumasetat trihidrat	CH ₃ COONa.3H ₂ O	Sigma-Aldrich
TPTZ	2,4,6-tripiridil s-triazin	Sigma-Aldrich
Potasyumsodyumtartarat tetrahidrat	NaKC ₄ H ₄ O ₆ .4H ₂ O	Sigma-Aldrich
Sodyum bikarbonat	NaHCO ₃	Merck
Troloks	6-hidroksi2,5,7,8tetrametilkroman-2 karboksilik asit	Aldrich
Folin-Ciocalteu reaktifi	3H ₂ O.P ₂ O ₅ .13WO ₃ .5MoO ₃ .10H ₂ O	Merck
Ferulik asit	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	Fluka
Bakır(II)klorür dihidrat	CuCl ₂ .2H ₂ O	Merck
Amonyum asetat	CH ₃ COONH ₄	Merck
Neocuproin	2,9-dimetil-1,10-fenantrolin	Aldrich
ABTS	2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat]	Sigma
Potasyum persülfat	K ₂ S ₂ O ₈	Sigma-Aldrich
% 96'lık etanol	CH ₃ CH ₂ OH	Merck
Metanol	CH ₃ OH	Merck
% 37'lik hidroklorik asit	HCl	Merck

5.2.1. Çözeltilerin hazırlanması

Cu(II)klorür çözeltisi, 0,01 M olacak şekilde bakır(II)klorürdihidrat'tan ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,4262 g tartım alınıp su ile 250,00 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Amonyum asetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) tamponu, 1,00 M (pH=7) olacak şekilde $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 'dan 19,27 g tartım alınıp su ile 250,00 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Neocuproine çözeltisi, 0,0075 M olacak şekilde (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin)'den 0.039 g tartım alınıp %96'lık etilalkolle 25,00 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

ABTS'den 0,1920 g tartım alınıp su ile 50,00 mL'ye tamamlanarak 7,00 mM ABTS çözeltisi hazırlandı. ABTS stok çözeltisi içine, son konsantrasyonu 2,45 mM olacak şekilde 0,0331 g $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ilave edildi. Elde edilen ABTS radikal çözeltisi, 12-16 saat boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletildikten sonra kullanıma hazır hale gelmektedir.

FRAP çözeltileri; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 'den son konsantrasyonu 0,02 M olacak şekilde tartım alınıp 1,00 mL 1,00 M HCl içinde çözülerek H_2O ile 50,00 mL'ye tamamlandı. TPTZ çözeltisinin son konsantrasyonu 0,01 M olacak şekilde 0,0625 g tartım alınarak 50,00 mL'ye % 96'lık etil alkol ile tamamlandı. FRAP reaktifini hazırlamak için sırasıyla 0,30 M $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ tamponu (pH:3,6), 0,02 M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ve 0,01 M TPTZ reaktifi 10:1:1 oranında karıştırılarak hazırlandı.

Folin Ciocalteu; Lowry A: % 2'lik Na_2CO_3 (0.10 M NaOH içerisinde), Lowry B: 0,50 M CuSO_4 (%1'lik $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ içerisinde), Lowry C: 50,00 mL Lowry A + 1,00 mL Lowry B, Folin-Ciocalteu reaktifi H_2O ile 1:3 oranında seyreltildi.

5.3 Kocayemiş Bitkisinin Analize Hazırlanması

5.3.1. Kocayemiş bitkisinin temin edilmesi

Meyve ve yapraklar Yalova ili Termal ilçesi Üvezpınar Mahallesinden Kasım-Aralık ayı olan hasat zamanlarında bizzat toplanarak temin edildi.

Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilimdalı Başkanı Prof. Dr. Ertan TUZLACI tarafından teşhis edilmiş olup Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'nda (MARE 15675) bulunmaktadır.

5.3.2. Kocayemiş bitkisinin kurutulması ve saklanması

Kocayemiş meyveleri dalından toplandıktan sonra -20°C 'de muhafaza edilmiştir. Kocayemiş yaprakları ise; dallarından tek tek ayrılarak bir alana serilerek kuruması beklenmiştir. Kuruduktan sonra havanda dövülerek toz haline getirilip, oda sıcaklığında güneş almayan kapalı bir kutuda saklanmıştır.

5.3.3. Bitki ekstralarının hazırlanması

Antioksidan kapasiteleri belirlenecek olan bitki ekstraları günlük olarak hazırlandı. İlk ekstraksiyon % 0,5 hidroklorik asit içeren %80 metanol (80,00 mL metanol+ 19,50 mL destile su+ 0,50 mL hidroklorik asit) ve diğeri %80 metanol (80,00 mL metanol+ 20,00 mL destile su) çözeltileri ile yapıldı. Dondurulan meyve oda ısısında çözüldükten sonra her bir deneme için yaklaşık 1,30 g ve kurutulan yapraktan 0,50 g tartılıp; önce 1. kademe olarak çözücünün 10,00 mL'si ile 15 dakika, 2. kademe olarak çözücünün 10,00 mL'si ile 15 dakika ve 3. kademe olmak üzere çözücünün 5,00 mL'si ile 15 dakika olmak üzere ekstraksiyon aşaması 3 kademeli olarak toplam 45 dakikada, ultrasonik banyoda ve ağzı kapalı erlenler içinde gerçekleştirildi. Ekstraksiyon sonunda yapılan süzme işlemlerinden sonra hepsi birleştirilip son hacimler 25,00 mL'ye tamamlandı. Elde edilen ekstralara belirli oranlarda seyreltmeler yapıldı.

5.4.Uygulanan Yöntemler

5.4.1. Spektrofotometrik yöntemler

5.4.1.1. CUPRAC yöntemi

5.4.1.1.A. Normal metod

Bir cam tüp içerisine 1,00'er mL Cu(II) klorür çözeltisi, neokuproin çözeltisi ve amonyum asetat (pH=7 tamponu) karışım çözeltisi ve toplam antioksidan kapasitesi ölçülmek istenen MeOH/H₂O (8:2; v/v) ve MeOH/ H₂O/HCl (8:1,95:0,05; v/v/v) çözücü ortamında hazırlanmış antioksidan bileşik (x) mL ve (1-x) mL H₂O ilave edilip iyice çalkalandı. Toplam hacim 4,00 mL olacak şekilde çözeltiler hazırlandı. Oluşan Cu(I)-Nc kelatının renginin karakteristik dalgaboyu olan 450 nm'de absorbans değerleri süre sonunda içinde örnek bulunmayan referans çözeltiliye karşı ölçüldü(Apak, Güçlü, Özyürek ve Çelik, 2005). Asidik örneklerle, nötr ortamın bozulmaması için her bir tüpe 0,168 g NaHCO₃ ilave edildi.

CUPRAC yönteminin uygulanışı şu şekildedir:

1,00 mL Cu(II) + 1,00 mL Nc + 1,00 mL NH₄Ac + x mL antioksidan + (1-x) mL çözücü

$$V_{\text{TOPLAM}} = 4 \text{ mL}$$

pH=7 tamponu varlığında Cu(II)-Nc kompleksinin bulunduğu ortama farklı hacimlerde (x mL) çözücü ortamında hazırlanan çözeltiden ilave edildi. Üzerine (1-x) mL çözücü eklenip girdap karıştırıcıda karıştırıldı. Tüplerin ağzı kapalı bir şekilde Cu(II)-Nc ile antioksidan arasında meydana gelen redoks reaksiyonunun tamamlanması için oda sıcaklığında 30 dakika boyunca bekletildi. Süre sonunda 450 nm'de absorbans değerleri kaydedildi. Absorbans değerleri ile konsantrasyon arasında çizilen kalibrasyon eğrilerinin doğru denklemleri, lineer çalışma aralıkları(çözeltinin ilk ve son konsantrasyonunun arasındaki değerler) ve TEAC katsayıları (Şekil 6.3, Şekil 6.4) hesaplandı.

5.4.1.2. ABTS yöntemi

Kullanıma hazır hale gelen mavi-yeşil renkli ABTS radikal çözeltisi etil alkolle 1:50 oranında seyreltildi. 1,00 mL ABTS^{·+} çözeltisi üzerine 4 mL EtOH ilave edilip 734 nm’de 1. ve 6. dakika sonundaki absorbans değerleri kaydedildi. 1:10 oranında seyreltilmiş ABTS^{·+} radikal katyonunun 734 nm’deki absorbansı $0,96 \pm 0,04$ ’dür. Daha sonra x mL örnek üzerine 2,00 mL ABTS^{·+} çözeltisi ve (1-x) mL çözücü ilave edilip aynı dalga boyunda 6. dakika sonundaki absorbans değerleri ölçüldü(Re, Pellegrini, Proteggente, Pannala, Yang ve Rice-Evans, 1999).

Radikalın absorbans değerinden örneğin bulunduğu çözeltinin absorbansı çıkarılarak ΔA değerleri elde edildi. Bu yöntemin sonunda örneklerin çalışma eğrileri çizildi (Şekil 6.5, Şekil 6.6).

ABTS yönteminin uygulanışı şu şekildedir:

2,00 mL ABTS reaktifi + x mL örnek + (1-x) mL çözücü
 $V_{\text{TOPLAM}}: 3,00 \text{ mL}$

5.4.1.3.FRAP yöntemi

Hazırlanan FRAP reaktifinden 3,00 mL alınıp üzerine (0,4-x) mL H₂O eklendi. Ardından x mL örnek çözeltisi ilave edildi. 6. dakika sonunda örneklerin, referans çözeltiliye karşı 595 nm’de absorbans değerleri ölçüldü. Sonuçlara göre örneklerin kalibrasyon eğrileri çizildi(Şekil 6.7, Şekil 6.8)

FRAP yönteminin uygulanışı şu şekildedir:

3,00 mL FRAP reaktifi + x mL örnek + (0,4-x)mL çözücü
 $V_{\text{TOPLAM}}: 3,40 \text{ mL}$

5.4.1.4. Folin ciocalteu yöntemi

Her bir antioksidan çözeltisinden x mL alınıp üzerine (2-x) mL H₂O ilave edildi. Ardından 2,50 mL Lowry C eklenip 10 dakika bekletildi. Süre sonunda karışıma 0,25 mL Folin reaktifi ilave edilip oluşan mavi rengin stabil kalabilmesi için 30 dakika beklendi. 750 nm'de referans çözeltiliye karşı absorbans değerleri kaydedildi. Bu yöntemle örneklerin kalibrasyon eğrileri çizildi(Şekil 6.9).

Folin-Ciocalteu yönteminin uygulanışı şu şekildedir:

x mL örnek + (2-x) mL H₂O +2,50 mL Lawry C + 0,25 mL Folin reaktifi

V_{TOPLAM}: 4,75 mL

VERİLER

CUPRAC yöntemi;

Kocayemiş'in (MeOH/H₂O) ve (MeOH/H₂O/HCl) çözücülerindeki 450nm'de absorbans değerleri;

V (mL)	A (MeOH/H ₂ O)	A (MeOH/H ₂ O/HCl)	C ₂ (mol/L)
0,20	0,0477	0,1122	5,00x10 ⁻⁶
0,40	0,1337	0,2217	1,00x10 ⁻⁵
0,60	0,2089	0,3274	1,50x10 ⁻⁵
0,80	0,2917	0,4485	2,00x10 ⁻⁵
1,00	0,3698	0,5409	2,50x10 ⁻⁵

Çözücü ortamında tüm antioksidan bileşiklerin molar absorplama katsayıları (ϵ) molar konsantrasyon-absorbans arasındaki kalibrasyon eğrilerinin eğimleri hesaplanarak elde edildi.

C₁: 1,00x10⁻⁴ mol/L (Troloks ilk konsantrasyon)

V₁: (0,20 -0,40 -0,60 -0,80 -1,00) mL (İlk hacim)

V₂: 4 mL (Cuprac yöntemi son hacim)

C₂: mol/L (Son konsantrasyon)

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Yukarıdaki denklem yerine değerler yazılarak her bir hacim için son konsantrasyon C₂ hesaplanmıştır.

Analizler için yaklaşık;

Kocayemiş meyvesi (MeOH/H₂O): 1,30 g

Kocayemiş meyvesi (MeOH/H₂O/HCl): 1,30 g

Kocayemiş yaprağı (MeOH/H₂O): 0,50g

Toplam ekstre hacmi; 25,00 mL olarak alınmıştır.

MeOH/H₂O (4:1, v/v) ve MeOH/H₂O/HCl (8:1,95:0,05; v/v/v) çözücü ortamında hazırlanan kocayemiş meyve ekstraları aynı çözücü ile (1:20; 1:10), kocayemiş yaprak ekstresi MeOH/H₂O çözücüsü ile (1:100) oranında seyreltilip her bir ekstradan farklı hacimlerde örnek alınarak ayrı ayrı CUPRAC yöntemi uygulandı, denemeler 5'er kez tekrarlandı.

CUPRAC, ABTS, FRAP yöntemleri için toplam antioksidan kapasiteleri aşağıda verilen hesaba göre belirlendi.

$$TAC_{\text{mmol/g}} = \frac{\text{Absorbans}}{\epsilon_{\text{TR}}} \times \frac{\text{Toplam hacim}}{\text{Alınan örnek hacmi}} \times \text{seyrelme oranı} \times \frac{\text{Toplam ekstre hacmi (mL)}}{\text{Bitki miktarı (g)}}$$

ABTS yöntemi

Kocayemiş'in (MeOH/H₂O) ve (MeOH/H₂O/HCl) çözücülerindeki 734nm'de absorbans değerleri;

V (mL)	A (MeOH/H ₂ O)	A (MeOH/H ₂ O/HCl)	C ₂ (mol/L)
0,10	0,0795	0,1039	3,33x10 ⁻⁶
0,30	0,2924	0,3125	1,00x10 ⁻⁵
0,50	0,5226	0,5127	1,66x10 ⁻⁵
0,70	0,7395	0,7005	2,33x10 ⁻⁵
0,90	0,9696	0,9056	3,00x10 ⁻⁵

Analizler için yaklaşık;

Kocayemiş meyvesi (MeOH/H₂O): 1,30 g

Kocayemiş meyvesi (MeOH/H₂O/HCl): 1,30 g

Kocayemiş yaprağı (MeOH/H₂O): 0,50 g

tartım alınmıştır.

MeOH/H₂O (4:1, v/v) ve MeOH/H₂O/HCl (8:1,95:0,05; v/v/v) çözücü ortamında hazırlanan kocayemiş meyve ekstraları aynı çözücü ile (1:20; 1:20), kocayemiş yaprak ekstresi MeOH/H₂O çözücüsü ile (1:100) oranında seyreltilip her bir ekstradan farklı hacimlerde örnek alınarak ayrı ayrı ABTS yöntemi uygulandı, denemeler 5'er kez tekrarlandı.

FRAP yöntemi

Kocayemiş'in (MeOH/H₂O) ve (MeOH/H₂O/HCl) çözücülerindeki 595nm'de absorbans değerleri;

V (mL)	A (MeOH/H ₂ O)	A (MeOH/H ₂ O/HCl)	C ₂ (mol/L)
0,10	0,1454	0,1133	2,94x10 ⁻⁶
0,20	0,2846	0,2592	5,88x10 ⁻⁶
0,30	0,4246	0,3948	8,82x10 ⁻⁶
0,40	0,5686	0,5236	1,18x10 ⁻⁵

Analizler için yaklaşık;

Kocayemiş meyvesi (MeOH/H₂O): 1,30 g

Kocayemiş meyvesi (MeOH/H₂O/HCl): 1,30 g

Kocayemiş yaprağı (MeOH/H₂O): 0,50 g

tartım alınmıştır.

MeOH/H₂O (4:1, v/v) ve MeOH/H₂O/HCl (8:1,95:0,05; v/v/v) çözücü ortamında hazırlanan kocayemiş meyve ekstraları aynı çözücü ile (1:10; 1:10), kocayemiş yaprak ekstresi MeOH/H₂O çözücüsü ile (1:50) oranında seyreltilip her bir ekstradan farklı hacimlerde örnek alınarak ayrı ayrı FRAP yöntemi uygulandı, denemeler 5'er kez tekrarlandı.

Folin-Ciocalteu yöntemi

Kocayemiş (MeOH/H₂O) çözücüsündeki 750nm’de absorbans değerleri;

V (mL)	A	C (mol/L)
0,2	0,1243	4,21x10 ⁻⁶
0,4	0,2503	8,42x10 ⁻⁶
0,6	0,3637	1,26x10 ⁻⁵
0,8	0,4791	1,68x10 ⁻⁵
1,0	0,6172	2,11x10 ⁻⁵

Analizler için yaklaşık;

Kocayemiş meyvesi (MeOH/H₂O): 1,30 g

Kocayemiş meyvesi (MeOH/H₂O/HCl): 1,30 g

Kocayemiş yaprağı (MeOH/H₂O): 0,50 g

tartım alınmıştır.

MeOH/H₂O (4:1, v/v) ve MeOH/H₂O/HCl (8:1,95:0,05; v/v/v) çözücü ortamında hazırlanan kocayemiş meyve ekstraktları aynı çözücü ile (seyreltme yok), kocayemiş yaprak ekstresi MeOH/H₂O çözücüsü ile (1:5) oranında seyreltilip her bir ekstraktan farklı hacimlerde örnek alınarak ayrı ayrı Folin-Ciocalteu yöntemi uygulandı, denemeler 5’er kez tekrarlandı.

Folin-Ciocalteu yöntemi için toplam antioksidan kapasiteleri aşağıda verilen hesaba göre belirlendi. Standart olarak Gallik asit kullanılmıştır.

C₁: 1x10⁻⁴ mol/L (Gallik asitin ilk konsantrasyon)

V₁: (0,20 -0,40 -0,60 -0,80 -1,00) mL (İlk hacim)

V₂: 4,75 mL (Folin-Ciocalteu yöntemi son hacmi)

C₂: mol/L (Son konsantrasyon)

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Yukarıdaki denklem yerine değerler yazılarak her bir hacim için son konsantrasyon C_2 hesaplanmıştır.

$$TAC_{\text{mmol/g}} = \frac{\text{Absorbans}}{\epsilon_{\text{gallikasit}}} \times \frac{\text{Toplam hacim}}{\text{Alınan örnek hacmi}} \times \frac{\text{Toplam ekstre hacmi(mL)}}{\text{Örnek miktarı (g)}} \times \text{seyrelme oranı}$$

Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemlerinin Standart Sapma Hesapları;

Cuprac Yöntemi;

Deney no	Meyve(A)	Asitli Meyve(A)	Yaprak(A)
1	0,5570	0,4830	0,3030
2	0,5560	0,4970	0,3210
3	0,5565	0,4900	0,3140
4	0,5500	0,4860	0,3160
5	0,5630	0,4940	0,3090
Ortalama	0,5565	0,4900	0,3126
Standart Sapma	±0,0046	±0,0057	±0,0069

ABTS yöntemi;

Deneme no	Meyve (A)	Asitli Meyve(A)	Yaprak(A)
1	0,4520	0,5062	0,4420
2	0,450	0,5104	0,4384
3	0,4468	0,5095	0,4398
4	0,4610	0,5110	0,4412
5	0,4580	0,5073	0,4401
Ortalama	0,4536	0,5088	0,4403
Standart Sapma	±0,0052	±0,0018	±0,0012

FRAP yöntemi;

Deneme no	Meyve(A)	Asitli Meyve(A)	Yaprak(A)
1	0,6250	0,7100	0,4220
2	0,6350	0,7170	0,4410
3	0,6060	0,7120	0,4410
4	0,6210	0,7140	0,4310
5	0,6230	0,7145	0,4235
Ortalama	0,6220	0,7135	0,4315
Standart Sapma	±0,0093	±0,0024	±0,0080

Folin-Ciocalteu yöntemi;

Deneme no	Meyve(A)	Asitli Meyve(A)	Yaprak(A)
1	0,7580	0,4100	0,8490
2	0,7480	0,4270	0,8360
3	0,7520	0,4130	0,8420
4	0,7560	0,4250	0,8390
5	0,7525	0,4182	0,8385
Ortalama	0,7533	0,4186	0,8409
Standart Sapma	±0,0035	±0,0066	±0,0045

6. BULGULAR

6.1 Kocayemiş'in (*Arbutus unedo* L.) Antioksidan Kapasitelerine Çözücü Etkisi

6.1.1. Troloksun farklı çözücü ortamlarında CUPRAC, ABTS, FRAP yöntemlerine ve gallik asidin Folin-Ciocalteu yöntemine göre kalibrasyon denklemlerinin belirlenmesi

MeOH/H₂O (4:1, v/v) ve MeOH/H₂O/HCl (8:1,95:0,05, v/v) çözücü ortamlarında 1,0x10⁻⁴ M derişiminde hazırlanmış troloks çözeltisine ayrı ayrı CUPRAC, ABTS, FRAP ve Folin-Ciocalteu yöntemleri uygulanarak konsantrasyon-absorbans arasında çizilen kalibrasyon grafiklerinin doğru denklemleri (y: absorbans, C: derişim) , korelasyon katsayıları (R) ve lineer aralıkları hesaplanmıştır (Tablo 6.1, 6.1a, 6.1b, 6.1c).

Tablo 6.1: Farklı çözücü ortamlarında CUPRAC yöntemine göre troloksun kalibrasyon eğrilerinden elde edilen lineer kalibrasyon denklemleri ve korelasyon katsayıları

Çözücü Ortamı	Lineer Kalibrasyon Denklemi	R	Lineer Aralık (mol/L)
MeOH/H ₂ O (4:1, v/v)	y=16044c-0,0303	0,9997	5,00x10 ⁻⁶ - 2,50x10 ⁻⁵
MeOH/H ₂ O/HCl (8:1,95:0,05, v/v)	y=21684c+0,0049	0,9988	5,00x10 ⁻⁶ - 2,50x10 ⁻⁵

Tablo 6.1a: Farklı çözücü ortamlarında ABTS yöntemine göre troloksun kalibrasyon eğrilerinden elde edilen lineer kalibrasyon denklemleri ve korelasyon katsayıları

Çözücü Ortamı	Lineer Kalibrasyon Denklemi	R	Lineer Aralık (mol/L)
MeOH/H ₂ O (4:1, v/v)	$y=33423c-0,0356$	0,9988	$3,30 \times 10^{-6} - 3,00 \times 10^{-5}$
MeOH/H ₂ O/HCl (8:1,95:0,05, v/v)	$y=29882c+0,0096$	0,9997	$3,30 \times 10^{-6} - 3,00 \times 10^{-5}$

Tablo 6.1b: Farklı çözücü ortamlarında FRAP yöntemine göre troloksun kalibrasyon eğrilerinden elde edilen lineer kalibrasyon denklemleri ve korelasyon katsayıları

Çözücü Ortamı	Lineer Kalibrasyon Denklemi	R	Lineer Aralık (mol/L)
MeOH/H ₂ O (4:1, v/v)	$y=47751c+0,0043$	1,0000	$2,94 \times 10^{-6} - 1,18 \times 10^{-5}$
MeOH/H ₂ O/HCl (8:1,95:0,05, v/v)	$y=46286c-0,0179$	0,9990	$2,94 \times 10^{-6} - 1,18 \times 10^{-5}$

Tablo 6.1c: Farklı çözücü ortamlarında Folin-Ciocalteu yöntemine göre Gallik asidin kalibrasyon eğrilerinden elde edilen lineer kalibrasyon denklemleri ve korelasyon katsayıları

Çözücü Ortamı	Lineer Kalibrasyon Denklemi	R	Lineer Aralık (mol/L)
MeOH/H ₂ O (4:1, v/v)	$y=28813c+0,0031$	0,9991	$4,21 \times 10^{-6} - 2,10 \times 10^{-5}$
MeOH/H ₂ O (4:1, v/v)	$y=28813c+0,0031$	0,9991	$4,21 \times 10^{-6} - 2,10 \times 10^{-5}$

6.1.2. CUPRAC yöntemine göre farklı çözücü ortamlarında molar absorplama katsayıları ve TEAC değerlerinin belirlenmesi

MeOH/H₂O (4:1, v/v) ve MeOH/H₂O/HCl (8:1,95:0,05, v/v) çözücü ortamlarında TEAC değerleri CUPRAC yöntemine göre troloks için belirlenmiş denklemler kullanılarak hesaplanmıştır (Tablo 6.1d).

Tablo 6.1d: Farklı çözücü ortamlarında CUPRAC yöntemine göre belirlenmiş molar TEAC değerleri

Çözücü Oranları	Doğru Denklemi	ϵ	TEAC(mm ol/g)MeOH/H ₂ O (4:1, v/v)	TEAC (mmol/g) MeOH/H ₂ O/HCl (8:1,95:0.05, v/v)
MeOH/H ₂ O (4:1, v/v) (meyve)	y=16044c-0,0303 R=0,9997	1,60x10 ⁴	0,2395	0,1772
MeOH/H ₂ O (4:1, v/v) (yaprak)	y=16044c-0,0303 R=0,9997	1,60x10 ⁴	0,0777	0,0575
MeOH/H ₂ O/HCl (8:1,95:0,05 v/v) (meyve)	y=21684c+0.0049 R=0,9988	2,16x10 ⁴	0,4527	0,3350

6.1.3. ABTS yöntemine göre farklı çözücü ortamlarında molar absorplama katsayıları ve TEAC değerlerinin belirlenmesi

MeOH/H₂O (4:1, v/v) ve MeOH/H₂O/HCl (8:1,95:0,05, v/v) çözücü ortamlarında TEAC değerleri ABTS yöntemine göre troloks için belirlenmiş denklemler kullanılarak hesaplanmıştır (Tablo 6.1e).

Tablo 6.1e: Farklı çözücü ortamlarında ABTS yöntemine göre belirlenmiş molar TEAC değerleri

Çözücü Değerleri	Doğru Denklemi	ϵ	TEAC (mmol/g) MeOH/H ₂ O (4:1, v/v)	TEAC (mmol/g) MeOH/H ₂ O/HCl (8:1,95:0.05, v/v)
MeOH/H ₂ O (4:1, v/v) (meyve)	$y=36388c-0,093$ R=0,9990	$3,63 \times 10^4$	0,0936	0,1047
MeOH/H ₂ O (4:1, v/v) (yaprak)	$y=36388c-0,093$ R=0,9990	$3,63 \times 10^4$	0,0472	0,0506
MeOH/H ₂ O/HCl (8:1,95:0,05 v/v) (meyve)	$y=29882c+0,0096$ R=0,9997	$2,98 \times 10^4$	0,1058	0,1183

6.1.4. FRAP yöntemine göre farklı çözücü ortamlarında molar absorplama katsayıları ve TEAC değerlerinin belirlenmesi

MeOH/H₂O (4:1, v/v) ve MeOH/H₂O/HCl (8:1,95:0,05, v/v) çözücü ortamlarında TEAC değerleri FRAP yöntemine göre troloks için belirlenmiş denklemler kullanılarak hesaplanmıştır (Tablo 6.1f).

Tablo 6.1f: Farklı çözücü ortamlarında FRAP yöntemine göre belirlenmiş molar TEAC değerleri

Çözücü Değerleri	Doğru Denklemi	ϵ	TEAC (mmol/g) MeOH/H ₂ O (4:1, v/v)	TEAC (mmol/g) MeOH/H ₂ O/HCl (8:1,95:0.05, v/v)
MeOH/H ₂ O (4:1, v/v) (meyve)	$y=47751c+0,0043$ R=1,0000	$4,77 \times 10^4$	0,2805	0,2893
MeOH/H ₂ O (4:1, v/v) (yaprak)	$y=47751c+0,0043$ R=1,0000	$4,77 \times 10^4$	0,1016	0,1048
MeOH/H ₂ O/HCl (8:1,95:0,05 v/v) (meyve)	$y=46286c-0,0179$ R=0,9990	$4,62 \times 10^4$	0,3252	0,3355

6.1.5. Folin-Ciocalteu yöntemine göre farklı çözücü ortamlarında molar absorplama katsayıları ve GAE değerlerinin belirlenmesi

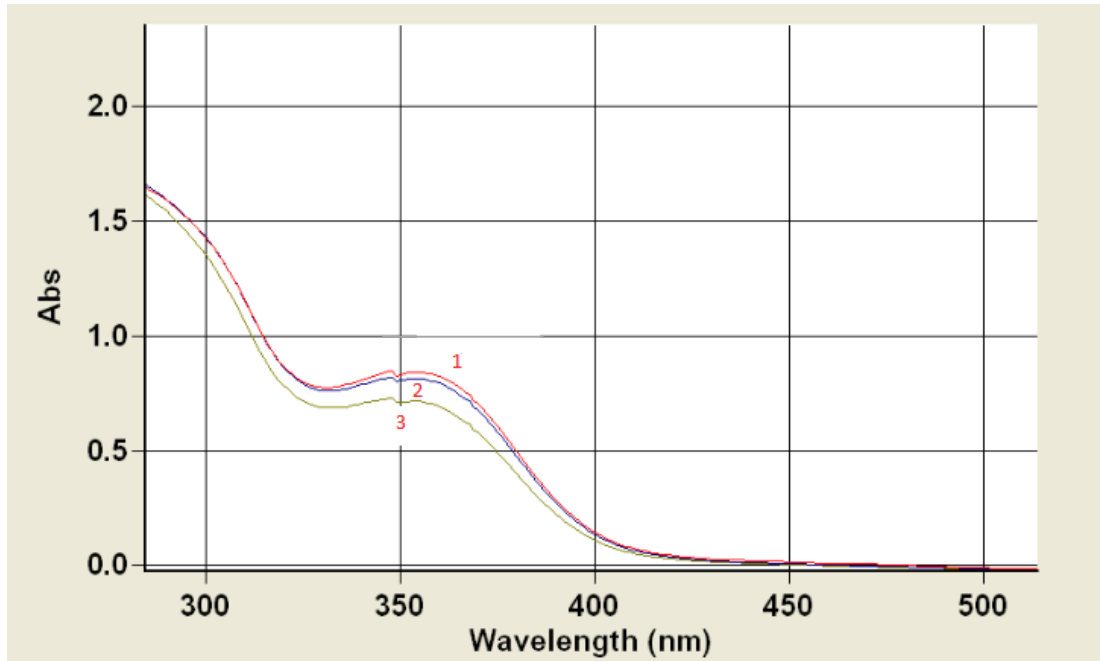
MeOH/H₂O (4:1, v/v) ve MeOH/H₂O/HCl (8:1,95:0,05, v/v) çözücü ortamlarında GAE değerleri Folin-Ciocalteu yöntemine göre gallik asit için belirlenmiş denklemler kullanılarak hesaplanmıştır (Tablo 6.1g).

Tablo 6.1g: Farklı çözücü ortamlarında Folin-Ciocalteu yöntemine göre göre belirlenmiş molar GAE değerleri

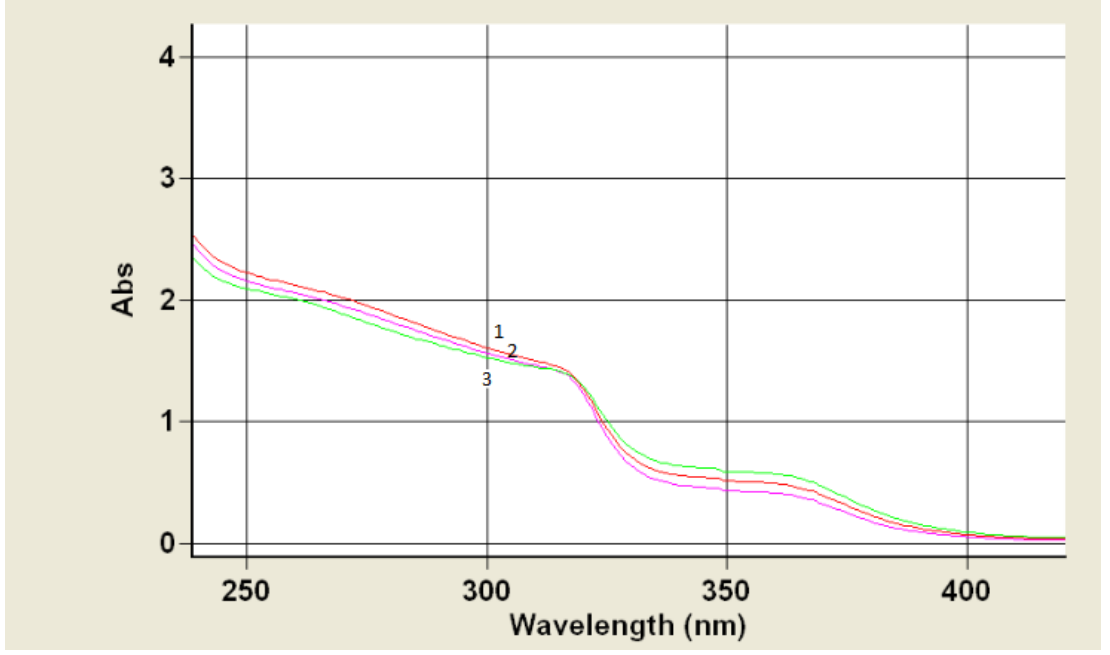
Çözücü Değerleri	Doğru Denklemi	ϵ	TEAC (mmol/g) MeOH/H ₂ O (4:1, v/v)
MeOH/H ₂ O (4:1, v/v) (meyve)	y=28813c+0.0031 R: 0,9991	2,80x10 ⁴	7,9435
MeOH/H ₂ O (4:1, v/v) (yaprak)	y=28813c+0.0031 R: 0,9991	2,80x10 ⁴	4,3918
MeOH/H ₂ O/HCl (8:1,95:0,05 v/v) (meyve)	—	—	4,4176

6.2 Kocayemiş(*Arbutus unedo* L.)'nin Ekstraksiyonu için Uygun Çözücünün Belirlenmesi

Şekil 6.2-6.2a'da farklı çözücülerde ekstrakte edilmiş derişik ve seyreltilmiş kocayemiş meyve ve yapraklarının ekstraktlarının mor ötesi-görünür bölge spektrumları görölmektedir. Bu spektrumlara bakılarak %80 Metanol ve %80 Metanol / %0,5 HCl uygun çözücüler olarak belirlenmiştir.



Şekil 6.2: Kocayemiş ekstraktlarının (1: %80 MeOH, 2: %70 MeOH, 3: %50 MeOH) çözücü ortamlarında alınan mor ötesi-görünür bölge spektrumları

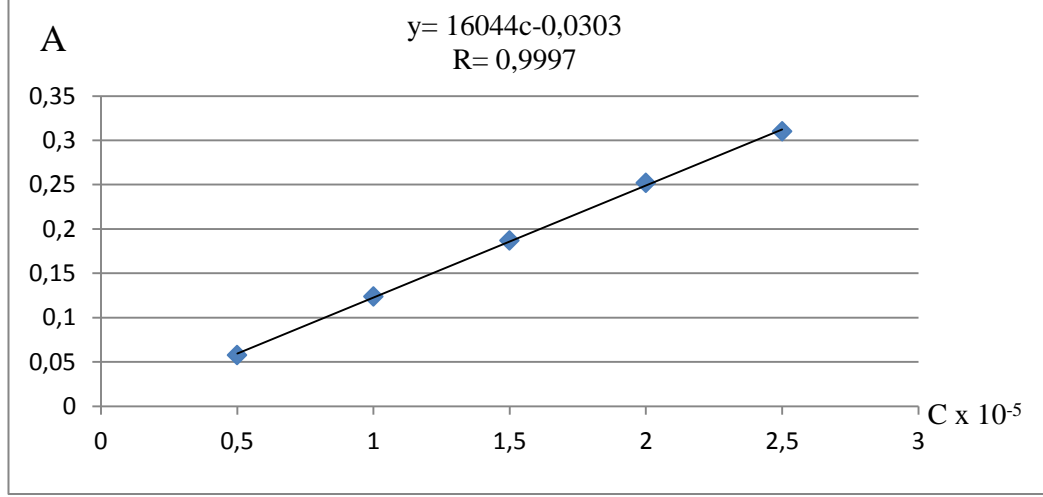


Şekil 6.2a: Kocayemiş ekstraktlarının (1:%0,50 hidroklorik asit içeren %80,00 MeOH, 2: %2,00 hidroklorik asit içeren %80,00 MeOH, 3: %1,00 hidroklorik asit içeren %80,00MeOH) çözücü ortamlarında alınan mor ötesi-görünür bölge spektrumları

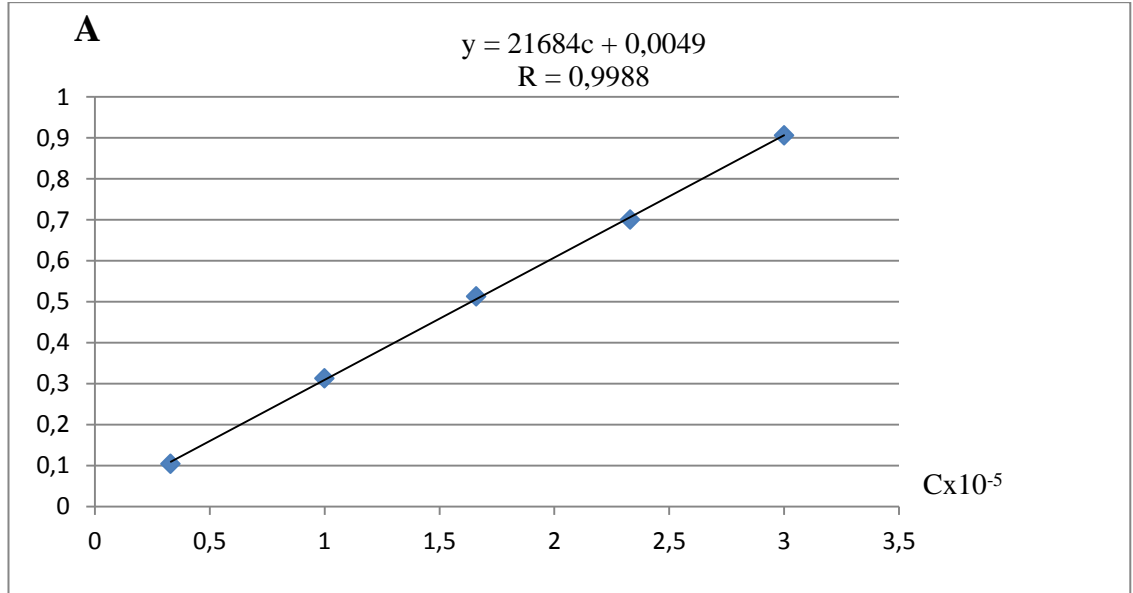
6.3 Toplam Antioksidan Kapasitelerinin Kalibrasyon Eğrileri

Absorbans (A) ile derişim (C) arasında çizilen kalibrasyon eğrileri

6.3.1 Cuprac yöntemine göre kalibrasyon grafikleri

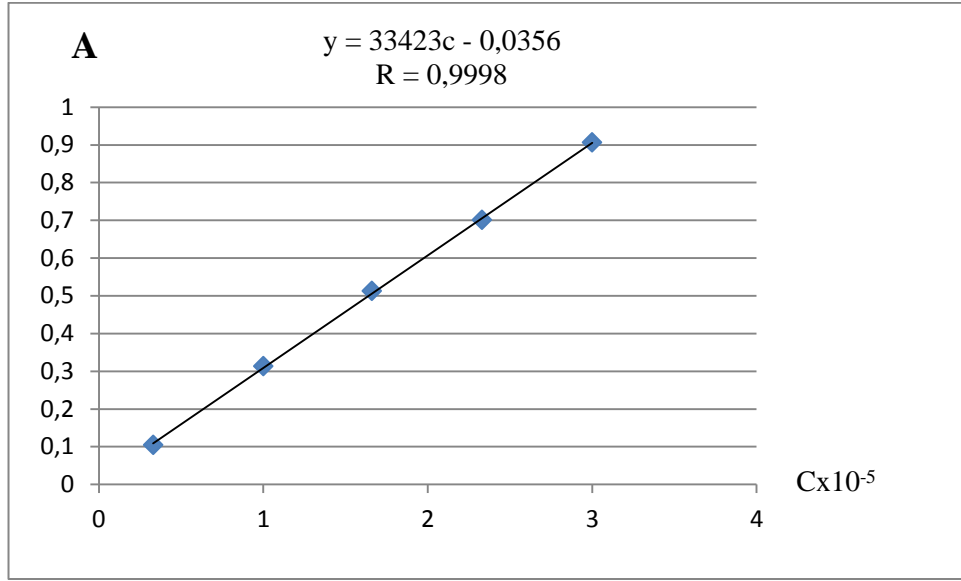


Şekil 6.3: Cuprac Yöntemi MeOH/H₂O (4:1) Çözücüleri için Troloks Eşdeğeri Kalibrasyon Eğrisi

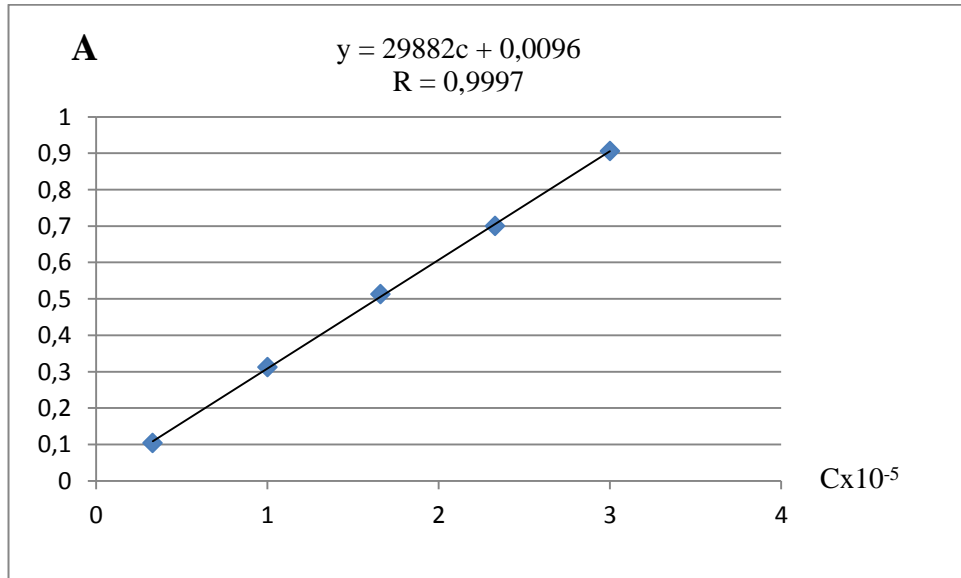


Şekil 6.3a: Cuprac Yöntemi MeOH/H₂O/HCl (8:1,95:0,05, v/v) Çözücüleri için Troloks Eşdeğeri Kalibrasyon Eğrisi

6.3.2. ABTS yöntemine göre kalibrasyon grafikleri

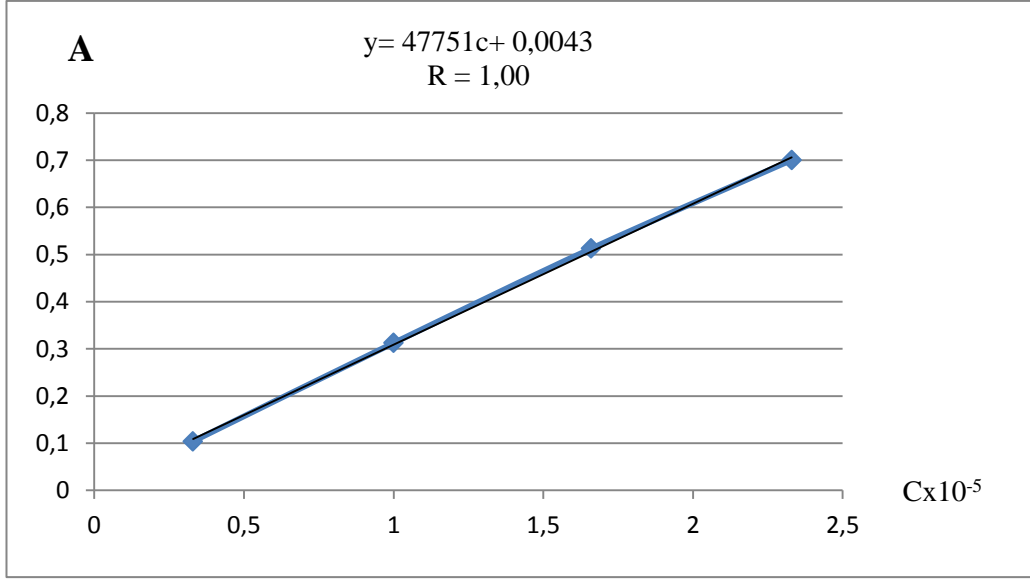


Şekil 6.3b: ABTS Yöntemi MeOH/H₂O (4:1) Çözücüleri için Troloks Eşdeğeri Kalibrasyon Eğrisi

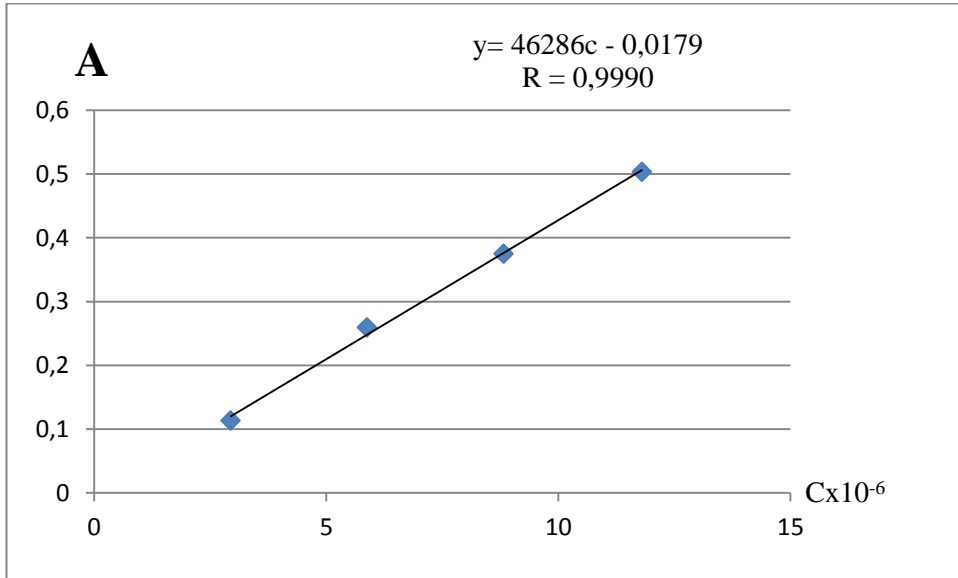


Şekil 6.3c: : ABTS Yöntemi MeOH/H₂O/HCl (8:1,95:0,05, v/v) Çözücüleri için Troloks Eşdeğeri Kalibrasyon Eğrisi

6.3.3. FRAP yöntemine göre kalibrasyon grafikleri

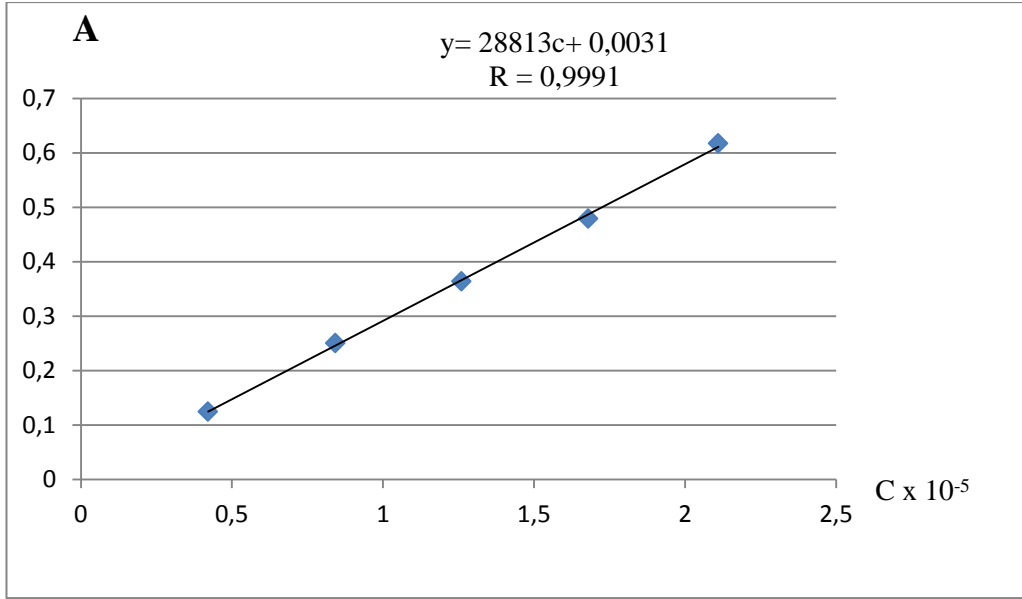


Şekil 6.3d: FRAP Yöntemi MeOH/H₂O (4:1) Çözünürleri için Troloks Eşdeğeri Kalibrasyon Eğrisi



Şekil 6.3e: FRAP Yöntemi MeOH/H₂O/HCl (8:1,95:0,05, v/v) Çözünürleri için Troloks Eşdeğeri Kalibrasyon Eğrisi

6.3.4. Folin-ciocalteu yöntemine göre kalibrasyon grafikleri



Şekil 4.3f: Folin-Ciocalteu Yöntemi MeOH/H₂O (4:1) Çözücüleri için Gallik Asit Eşdeğeri Kalibrasyon Eğrisi

7.TARTIŞMA VE SONUÇ

Antioksidanlar radikal oluşumunu sınırlandıran, radikal reaksiyonlarını sona erdiren ve oluşan radikalleri etkisiz hale getiren moleküllerdir. Antioksidanlar, yiyecekte ve vücutta düşük konsantrasyonlarda bulunduğu zaman, oksidasyonu önemli derecede engelleyen veya geciktiren maddelerdir (Aeschbach ve ark., 1995). Bu yüzden yiyeceklerde ve biyolojik sistemlerde doğal olarak oluşan radikallerin antioksidan aktivite etkisine artan ilgi vardır.

Antioksidan aktivite ve antioksidan kapasite terimleri birbiri yerine kullanılsalarda farklı anlamlara sahiptirler. Aktivite, spesifik bir antioksidan ve oksidan arasındaki reaksiyonun hız sabitini kapsar. Kapasite, bir numune tarafından süpürülen belirli bir serbest radikalın miktarının ölçüsüdür. Antioksidan kapasite ölçümleri, örneğin toplam süpürme kabiliyetini belirleyen, heterojen bir antioksidan karışımının miktarını verir. Her bir bileşenin ayrı ayrı antioksidan kapasitesini ölçmez (Garg ve ark., 2006).

Antioksidan kapasite üzerine çözücü etkisi ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. ORAC, ABTS, FRAP ve DPPH gibi sıkça kullanılan yöntemlerde çözücü etkisi mevcut olmakla birlikte çözücünün cinsi ve özellikleri her yöntemi farklı şekilde etkilemektedir. Perez-Jimenez ve Saura-Calixto farklı solventlerde gallik asit-kateşin karışımı için sulu çözeltide gözlenen kapasitenin metanol-su içerisinde gözlenene oranla %40 daha yüksek olduğunu, metanol-su karışımlarında su oranı arttıkça kapasitede artış olduğunu gözlemişlerdir. Yani genel olarak çözücü polaritesindeki artışa bağlı olarak antioksidan kapasitede artış görülmektedir. Bu nedenle antioksidan kapasiteleri karşılaştırırken aynı çözücülerle hazırlanan çözeltiler veya ekstraler ölçülmelidir. Aksi takdirde sonuçlar çok farklı olabilir ve direkt olarak yöntemleri karşılaştırmak anlamlı olmaz (Perez-Jimenez ve ark., 2006).

Antioksidan kapasitenin ölçümü için literatürde verilen yirmiden fazla yöntem vardır. Bitkilerin antioksidan kapasitelerinin tayini söz konusu olduğunda literatürdeki sonuçlar açıkça göstermektedir ki antioksidan aktivite seçilen tayin yöntemine son derece bağımlıdır ve gözlenen antioksidan aktivite (veya kapasite) ile bitki ekstralerinin total fenolik içeriği arasında tam bir korelasyon gözlenmeyebilir (Dorman ve ark 2003, Trouillas ve ark., 2003; Miliauskas ve ark., 2004).

Tüm yöntemlerin bir bitkinin antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde kullanılması mümkün olmakla birlikte, örnekteki antioksidan maddelerin moleküler çeşitliliği bu yöntemler arasında her zaman doğrusal ilişki oluşmasını engelleyebilir. Bu nedenle tek bir yöntem kullanarak bitkinin antioksidan kapasitesi hakkında karar vermek uygun olmayabilir. Ölçümlerde kullanılan analitik metodlar ve analizin olduğu koşullarda aynı gıda türü için, farklı sonuçlara neden olabilir (Büyüktuncel, 2013).

Polifenoller için CUPRAC değerleri TEAC değerleriyle benzerdir. CUPRAC reaktifi, ABTS ve DPPH gibi, kromojenik radikal reaktiflerden daha kararlıdır ve daha kolay temin edilebilir. Renkli Cu(I)-Nc şelatı veren redoks reaksiyonu, hava, güneş ışığı, nem ve pH gibi parametrelerden etkilenmez (Apak ve ark., 2004).

CUPRAC yöntemi ile elde edilen TEAC katsayılarının metanollü çözeltilerde asitli ortama göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bunun nedeni, anyon (fenolat) solvasyonu yapabilen iyonlaşabilir çözücülerde e- transferinin kolaylaşmasından kaynaklanır ki metanol iyonizasyonu en iyi sağlayan alkoldür.

Kırmızı rengi alan kocayemiş meyveleri iyi birer antioksidan kaynağıdır ve yüksek miktarda şeker içerirler. Antioksidan ve vitamin eksikliğinin metabolizmada önemli rahatsızlıklara yol açabileceği düşünüldüğünde antioksidan aktivitelerinin ve düzeylerinin belirlenmesi ile ortaya çıkacak sonuçlar değerlendirilip, sağlıklı beslenmeye ilave olarak vitamin takviyesi ile vücuttaki serbest radikallerin zararlarının önlenebileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada toplam antioksidan kapasite tayini için, spektrofotometrik olarak CUPRAC, ABTS ve FRAP yöntemleri seçilmiş, sonuçları karşılaştırılmıştır (Tablo 7.1). Kocayemiş bitkisinde ki toplam fenolik madde miktarları ise Folin-Ciocalteu yöntemi ile belirlenmiş olup değerleri tablo 7.1a' da verilmiştir.

Çeşitli metanol-su yüzdeleri ile yapılan ön denemeler sonucunda kocayemiş yaprakları için %80 metanol çözeltisi ile meyveleri için % 0,5 HCl içeren % 80 metanol çözeltisi ile 25 dakika ekstraksiyon işlemi uygulamanın uygun olduğuna

karar verilmiştir. Hazırlanan bütün örnekler filtrelerden süzöldükten sonra ve gerektiği durumlarda seyreltme yapılarak kullanılmıştır.

Yapılan analizler sonucunda kocayemiş örnekleri ekstraktlarında CUPRAC yöntemi ile belirlenmiş olan toplam antioksidan kapasite sıralaması;

Meyve+ asit+MeOH çözeltisi > Meyve + MeOH çözeltisi > Yaprak +MeOH çözeltisi

ABTS yöntemine göre belirlenmiş olan antioksidan kapasite sıralaması;

Meyve + asit+MeOH çözeltisi > Meyve+ MeOH çözeltisi > Yaprak +MeOH çözeltisi

FRAP yöntemine göre belirlenmiş olan antioksidan kapasite sıralaması ;

Meyve+ asit+MeOH çözeltisi > Meyve + MeOH çözeltisi > Yaprak +MeOH çözeltisi

Folin-Ciocalteu yöntemi ile belirlenmiş olan toplam fenol derişimleri sıralaması;

Meyve + MeOH çözeltisi > Meyve+ asit+MeOH çözeltisi > Yaprak +MeOH çözeltisi

olarak elde edilmiştir.

Tablo 7.1: Kocayemiş bitkisiyle yapılan toplam antioksidan kapasite sonuçları

	(mmol TR/g)		
	CUPRAC	ABTS	FRAP
Toplam Antioksidan Kapasite (TAC)	0,2395±0,0046	0,0936±0,0052	0,2805±0,0093
	0,1772±0,0046 (meyve+MeOH çözeltisi)	0,1047±0,0052 (meyve+MeOH çözeltisi)	0,2893±0,0093 (meyve+MeOH çözeltisi)
MeOH/H₂O (4:1, v/v)	0,4527±0,0057	0,1058±0,0018	0,3252±0,0024
	0,3350±0,0057 (Meyve+asit+ MeOH çözeltisi)	0,1183±0,0018 (Meyve+asit+ MeOH çözeltisi)	0,3355±0,0024 (Meyve+asit+ MeOH çözeltisi)
MeOH/H₂O/HCl (8:1,95:0,05, v/v)	0,0777±0,0069	0,0472±0,0012	0,1016±0,0080
	0,0575±0,0069 (Yaprak +MeOH çözeltisi)	0,0506±0,0012 (Yaprak +MeOH çözeltisi)	0,1048±0,0080 (Yaprak +MeOH çözeltisi)

Tablo 7.1a: Kocayemiş bitkisinin ekstraktlarında toplam fenol çalışmalarının sonuçları

(mg GAE/g)	
Folin-Ciocalteu	
Toplam Fenol Miktarı	7,9435±0,0035 (Meyve+MeOH çözeltisi)
	4,4176±0,0066 (Meyve+ asit+MeOH çözeltisi)
	4,3918±0,0045 (Yaprak +MeOH çözeltisi)

İncelenen yöntemlerden kocayemiş meyve örnekleri ile yapılan çalışmalar karşılaştırıldığında $TEAC_{CUPRAC}$ ile $TEAC_{FRAP}$ miktarlarının metanol ve metanol+ asit çözeltilerinde pozitif ilişki, yaprak örneklerinde ise negatif ilişki gösterdiği bulunmuştur. $TEAC_{CUPRAC}$ ve $TEAC_{FRAP}$ miktarları, $TEAC_{ABTS}$ ile karşılaştırıldığında her iki ortamda da meyveler için TEAC miktarlarının negatif ilişki, yapraklarda $TEAC_{CUPRAC}$ ve $TEAC_{ABTS}$ pozitif, $TEAC_{FRAP}$ ve $TEAC_{ABTS}$ miktarlarının ise negatif ilişki göstermiştir.

Sonuç olarak Kocayemiş Strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) ile yapılan in vitro antioksidan aktivite tayini çalışmamıza göre bitkinin meyve ve yapraklarının antioksidan özellik gösterdiği literatürlere göre uygun olarak bulunmuştur. Kullanılan yöntemler kendi aralarında karşılaştırıldığında tek bir tayin metodunun antioksidan gücü hakkında sınırlı bilgi vereceği, bu nedenle birkaç tanesinin birlikte kullanılmasının gerektiği önerilmektedir.

8.KAYNAKLAR

Abu-Amsha R, Croft KD, Puddey IB, Proudfoot JM, Beilin LJ. 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*. 1996; 91: 449-458.

Aeschbach R, Halliwell B, Löliger J, Aruoma OI. The characterization of antioxidants, *Food and Chemical Toxicology*. 1995; 33: 601-617.

Akesson B, Nilsson J, Pillai D, Onning G, Persson C, Nilsson A. Comparison of the 2,2'-azinobis-3-ethylbenzotiazoline- 6-sulfonic acid (ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) methods to assess the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables. *Molecular Nutrition Food Research*. 2005; 49: 239-46.

Alarco-E-Silva, Leitao AEB, Azinheira HG, Leitao MCA. The Arbutus Berry: Studies on its Color and Chemical Characteristics at Two Mature Stages. *Journal of Food Composition and Analyses*. 2001; 14: 27-35.

Alonso-Salces E, Korta A, Barranco LA, Berrueta B, Gallo F, Vicente. Pressurized liquid extraction for the determination of polyphenols in apple. *Journal of Chromatograph A*. 2001; 933: 37-43.

Ames BN, Woodall AA. Diet and oxidative damage to DNA: The importance of ascorbate as an antioxidant, *Vitamin C in Health and Disease*, Markel Dekker, New York. 1997; 193-203.

Andrioli G, Lussignoli S, Fraccaroli M, Brocco G, Bellavite P. A microplate-based colorimetric assay of the total peroxy radical trapping capability of human plasma. *Analytical Biochemistry*. 1999; 269: 38-44.

- Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004; 52: 7970-81.
- Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Çelik SE. Spectrophotometric determination of ascorbic acid using copper(II)–neocuproine reagent in beverages and pharmaceuticals. *Talanta*. 2005; 65: 5, 1226–1232.
- Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE, Erçağ E. The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas, *International Journal of Food Science and Nutrition*. 2006; 57: 292-304.
- Arnao MB, Cano A, Acosta M. Total antioxidant activity in plant material and its interest in food technology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998; 2: 893-905.
- Arranz S, Perez-Jimenez J, Taberner M, Diaz-Rubio ME, Serrano J, Goni I, Saura-Calixto F. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Res Int*. 2008; 41: 274-85.
- Atak Y, Gönenç A, Orman MN, Şimşek B. Lipid Peroxidation and Antioxidant Systems in Hemodialyzed Patients, Department of Biochemistry. 2002; 31 (2): 88-96.
- Ateş B, Erdoğan S, Durmaz G, Yılmaz I, Seçkin T. Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from Anatolia propolis and their radical scavenging capacities. *Food Chemical Toxicol*. 2011; 49: 1592-7.

- Atkinson CA, Deming DM, Boileau TWM, Heintz KH, Erdman JW. Carotenoids: Linking chemistry, absorption, and metabolism to potential roles in human health and disease. *Process Biochemistry*. 2002; 41: 1773-1778.
- Ayaz FA, Küçükislamoğlu M, Reunanen M. Sugar, non-volatile and phenolic acids composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L. var. *ellipsoidea*) fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2000; 13: 171-177.
- Bendich A. Vitamin C safety in humans. In: Packer L, Fuchs J, eds. *Dekker' Vitamin C in Health and Disease*. New York: 1997; p: 367-379.
- Benzie IFF, Strain JJ. Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996; 239: 70-76.
- Bravo L, Pulido R, Saura-Calixto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agr Food Chem*. 2000; 48: 3396-402.
- Brune M, Rossander L, Hallberg L. Iron absorption and phenolic compound: Importance of different phenolic structures, *European Journal of Clinical Nutrition*. 1989; 43: 547-558.
- Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants. Lipid peroxidation, tocopherol, and ascorbate, *Archives Biochemistry and Biophysics*. 1993; 300: 535-543.
- Buettner GR, Jurkiewicz BA. (1996). Catalytic metals, ascorbate and free radicals: Combinations to avoid, *Radiation Research*. 1996; 145: 532-541.
- Burda S, Oleszek W. Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. *J. Agric. Food Chemical*. 2001; 49 (6): 2774–2779.

- Büyüktüncel E. Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler. *Marmara Pharmaceutical Journal*. 2013; 17: 93-103.
- Cadenas E, Packer L. *Handbook of Antioxidants*, Marcel Dekker, New York-Basel. 2002; 0-8247-0547-5.
- Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships, *Free Radical Biology and Medicine*.1997; 22 (5): 749–760.
- Cao G, Prior RL. In vivo antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999; 27: 1173-1181.
- Carnicer M, Berrocal RJ, Lozano ZM, Castro GAG, Blanco MM, Lucena PE. The shrub flora of the Mediterranean and its evaluation. 3. Contribution on the carotene contents of some species. *Archivos de Zootecnia*.1973; 22 (86): 169-174.
- Chinnici F, Bendini A, Gaiani A, Riponi C. Radical scavenging activities of peels and pulps from cv. Golden Delicious apples as related to their phenolic composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004; 52 (15): 4684-9.
- Cook NC, Samman S. Flavonoids –Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *Nutritional Biochemistry*. 1996; 7: 66-76.
- Dauguet JC, Foucher JP. *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) flavonoids. *Plantes Medicinales et Phytotherapie*. 1982; 16 (3): 185-191.

- Demirbüker Kavak D.(2010). Antioksidan Etkileşimleri: Polifenol-Protein Etkileşimleri, Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi. 2010;5 (3): 9-16.
- Diplock AT, Landvik SV, Packer L. Efficacy of α -tokoferol in human health and disease. *Journal of Clinical Pathology*.1998; 121: 1123-1137.
- Dorman HJD, Peltoketo A, Hiltunen R, Tikkanen MJ. Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chemistry*.2003; 83 (2): 255–262.
- Dziedzic SZ, Hudson BJB. Polyhydroxychalcones and flavanones as antioxidants for edible foods, *Food Chemistry*.1983; 12: 205-212.
- Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. Regulation of physiological systems by nutrients. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2002; 18 (10): 872–879.
- Finotti E, Majo D. Influence of solvents on the antioxidant property of flavonoids. *Molecular Nutrition Food Research*. 2003; 47 (3): 186–187.
- Forkmann G, Heller W. Biosynthesis of flavonoids, *The flavonoids: Advances in Research since 1986*, Chapman & Hall, London.1993; 499-535.
- Foti M, Ruberto G. Kinetic Solvent Effects on Phenolic Antioxidants Determined by Spectrophotometric Measurements. *J. Agric. Food Chem*. 2001; 49 (1): 342–348.
- Fry SC, Wallace G. Phenolic components of the plant cell wall, *International Review of Cytology*. 1994; 151: 229-267.

- Gaddis AM, Ellis R, Currie GT. Carbonyls in oxidizing fats. V. The composition of neutral volatile mono carbonyl compound from autoxidized oleate, linoleate, linolenate esters and fats. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 1961; 38: 371.
- Garg ML, MacDonald-Wicks LK, Wood LG. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: A review. *J. Sci. Food. Agr.* 2006; 86: 2046-56.
- Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical view and experimental data. *Free Radical Bio Med.* 2000; 29: 1106-14.
- Gill MI, Tomas-Barberan FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000; 48(10): 4581-4589.
- Girottia S, Ferria E, Maccagnania L, Budinia R, Bianchi G. Plasma antioxidant capacity determination: comparative evaluation of chemiluminescent and spectrophotometric assays. *Talanta*. 2002; 56: 407-414.
- Halliwel B. How to characterise a biological antioxidant, *Free Radical Research Communication*. 1990; 9: 1-32.
- Halliwel B. Vitamin C: Antioxidant or pro-oxidant in vivo, *Free Radical Research*. 1996; 25: 439-454.
- Halliwel B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species: Its mechanisms and measurement in mammalian systems, *FEBS Letters*. 1991; 281: 9-19.

- Hampsch-Woodill M, Ou B, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001; 49: 4619-26.
- Harborne JB. Comparative biochemistry of the flavonoids. Correlations between flavonoid pigmentation and systematics in the family primulaceae. *Phytochemistry*. 1968; 7 (8): 1215-1230.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2002; 13 (10): 572–584.
- Herrmann K. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods, *Critical Review Food Science and Nutrition*. 1989; 28: 315-347.
- Horvat RJ, McFadden WH, NG, H, Lane WG, LE, A, Lundin RE, Scherer JR, Shephard AD. Identification of some acids from autoxidation of methyl linoleate. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1969; 46, 94.
- Huang DJ, Ou BX, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agr Food Chem*. 2005; 53: 1841-56.
- Ivantsova ZV, Evmenenko LS, Accumulation of organophosphoric substances and content of pigments in the leaves of *Arbutus andrachne*. *Journal Article, Plant Biochemistry*. 1978; 108: 56-58.
- Jones MA, Wheeler GL, Smirnoff N. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants, *Nature*. 1988; 393: 365-369.

- Kandaswami C, Middleton E. The impact of plant flavanoids on mammalian biology: Implications for immunity, in flammation and cancer, *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*, Chapman and Hall, London. 1993; 0-412-48070-0.
- Karikas GA, Euerby MR, Waigh RD. Constituents of the stems of *Arbutus unedo* L. *Planta Medica*.1986; 53 (2): 223-224.
- Karikas GA, Giannitsaros A. Phenolic glucosides of *Arbutus unedo* L. leaves. *Plantes medicinales et phytotherapie*. 1990; 24 (1): 27-30.
- Katsumata H, Teshima N, Kurihara M, Sakai T, Kawashima T. Flow-injection determination of copper(II) based on its catalysis on the redox reaction of cysteine with iron(III) in the presence of 1,10-phenanthroline. *Talanta*. 1999; 50: 41-7.
- Kim YJ, Lee KW, Kim D, Lee HJ, Chun Y. Major phenolics in the apple their contribution to the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.2003; 51: 20-6516.
- Klejdus B, Stratil P, Kuban V. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables - Evaluation of spectrophotometric methods. *J Agr Food Chem*. 2006; 54: 607-16.
- Koleva II, Van Beek TA, Linssen JPH de Groot A, Evstatieva LN. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*.2002; 13: 8–17.
- Koleva II, Niederlander HAG, Van Beek TA. An on-line RP-HPLC method for detection of radical scavenging compounds in complex mixtures, *Analytical Chemistry*.2000; 72: 2323-2328.

- Lima JLFC, Magalhaes LM, Segundo MA, Reis S. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal Chim Acta*. 2008; 613: 1-19.
- Lopez-Alarcon C, Lissi E. Interaction of pyrogallol red with peroxy radicals. A basis for a simple methodology for the evaluation of antioxidant capabilities. *Free Radical Research*. 2005; 39(7): 729-736.
- Miller NJ, Rice-Evans CA. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Met. Enzym*. 1994; 234: 279-293.
- Miller NJ, Rice Evans CA, Davies MJ, Gopiathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clinical Science*. 1993; 84: 407-412.
- Miller NJ, Rice-Evans CA, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*. 1996; 20: 933 -956.
- Miliauskas G, Venskutonis PR, Van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*. 2004; 85: 231-237.
- Naczki M, Shadidi F. Food phenolics, Phenolics in Food and Nutraceuticals, Sources, Chemistry, Effect, Applications, Technomic Publishing Company Inc., Lancaster PA. 1995; 231-245.
- Ong ASH. Natural sources of tocotrienols, *Vitamin E in Health and Disease*, Marcel Dekker, New York. 1993; 3-8.

- Orak HH, Aktaş T, Yağar H, İşbilir SS, Ekinçi N, Şahin FH. Effects of hot air and freeze drying methods on antioxidant activity, colour and some nutritional characteristics of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruit. *Food Sci. Technol Int.* 2012; 18 (4): 391-402.
- Osman AM, Wong KKY, Hill SJ, Fernyhough A. Isolation and the characterization of the degradation products of the mediator ABTS-derived radicals formed upon reaction with polyphenols. *Biochem Bioph Res Co.* 2006; 340: 597-603.
- Özkan MM, Haciseferoğulları H. The Strawberry (*Arbutus unedo* L.) fruits: Chemical composition, physical properties and mineral contents. *Journal of Food Engineering.* 2007; 78 (3): 1022–1028.
- Pabuçcuoğlu A, Kıvçak B, Baş M, Mert T. Antioxidant activity of *Arbutus unedo* L. leaves. *Fitoterapia.* 2003; 74 (6) :597-599.
- Pallauf K, Rivas-Gonzalo JC, Del Castillo MD, Cano MP, De Pascual-Teresa SC. Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *Journal of Food Composition and Analysis.* 2008; 21: 273-281.
- Pannala AS, Chan TS, O'brien PJ, Rice-Evans CA. Flavonoid B-Ring Chemistry and Antioxidant Activity: Fast Reaction Kinetics. 2001; 282 (5): 1161–1168.
- Park YS, Jung ST, Kang SG, Heo BG, Arancibia-Avila P, Toledo F, Drzewiecki J, Namiesnik J, Gorinstein S. Antioxidants and proteins in ethylene-treated kiwifruits. *Food Chemistry.* 2008; 107: 640-648.
- Pedrielli P, Pedulli GF, Skibsted LH. Antioxidant Mechanism of Flavonoids. Solvent Effect on Rate Constant for Chain-Breaking Reaction of Quercetin and Epicatechin in Autoxidation of Methyl Linoleate. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49 (6): 3034–3040.

- Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, Brighenti F. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *Journal of Nutrition*. 2003; 2133 (9): 2812-9.
- Pennington JAT, Sheppard AJ, Weihrauch JL. Analysis and distribution of vitamin E in vegetable oils and foods, *Vitamin E in health and disease*, Markel Dekker, New York. 1993; 9-31.
- Perez-Jimenez J, Saura-Calixto F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays, *Food Research International*. 2006; .39 (7): 791–800.
- Pinelo M, Manzocco L, Nuñez MJ, Nicoli MC. Interaction among Phenols in Food Fortification: Negative Synergism on Antioxidant Capacity. *J. Agric. Food Chem*. 2004; 52 (5): 1177–1180.
- Plumb GW, Pascual-Teresa SD, Santos-Buelga C, Cheynier V, Williamson G. Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: Effect of polymerisation, galloylation and glycosylation. 1998; 29 (4): 351-358.
- Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agr Food Chem*. 2005; 53: 4290-302.
- Re RN, Pellegrini A, Proteggente A, Pannala M, Yang C, Rice-Evans. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic al Biology & Medicine*. 1999; 26: 1231-1237.

Shahidi F. Natural Antioxidants, Chemistry, Health Effects and Applications, AOCS Press, Champaign- Illinois. 1996; 0-935315-77-2.

Shahidi F, Wanasundara PKJ. Phenolic antioxidants, Critical Review of Food Science and Nutritional. 1992; 32: 67-103.

Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Viticult. 1965; 16: 144-158.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods in Enzymology. 1999; 299: 152-178.

Stewart AJ, Mullen W, Crozier A. On-line high-performance liquid chromatography analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in green and black tea, Molecular Nutrition & Food Research. 2005; 49: 52-60.

Şeker M, Yücel Z, Nurdan E. "Çanakkale yöresi doğal florasında bulunan Kocayemiş (*Arbutus unedo* L.) populasyonunun morfolojik ve pomolojik özelliklerinin incelenmesi." Tarım Bilimleri Dergisi. 2004; 10(4) : 422-427.

Trouillas P, Calliste CA, Allais DP, Simon A, Marfak A, Delage C, Duroux JL. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. Food Chemistry. 2003; 80 (3): 399–407.

Ulusoy E. Türkiyenin bazı yörelerinden kestane ve çiçek ballarının antioksidan aktiviteleri ve mineral içeriklerinin karşılaştırılması. K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2005, Trabzon (Yrd. Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI).

Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules. *Free Radic. Biol. Med.* 2004; 36: 838-849.

Yaltrık T, Erdinç S. "Ağaçlar, Türkiye Erozyonla Mücadele." Ağaçlandırma ve Doğal Varlıkları Koruma Vakfı Yayını, 2002; 39.

9.ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	TUĞBA	Soyadı	UYSAL
Doğum Yeri	YALOVA	Doğum Tarihi	01.11.1988
Uyruğu	T.C	TC Kimlik No	14055049716
E-mail	tugbasilahtaroglu@windowlive.com	Tel	0533 439 98 70

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	İstanbul Üniversitesi	2011
Lise	Yalova Anadolu Lisesi	2006

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	iyi	iyi	iyi

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	78.289	78.168	64.993
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft office	iyi

