



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAZI İÇECEKLERİN ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN
TAYİNİNDE YENİ BİR YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ**

**Mustafa ÖZYÜREK
Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı**

**Danışman
Prof.Dr. Reşat APAK**

Haziran, 2005

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAZI İÇECEKLERİN ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN
TAYİNİNDE YENİ BİR YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ**

**Mustafa ÖZYÜREK
Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı**

**Danışman
Prof.Dr. Reşat APAK**

Haziran, 2005

İSTANBUL

Bu çalışma/....../ 2003 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından
Anabilim Dalı programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul
edilmiştir.

Tez Jürisi

Danışman Adı (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Jüri Adı
Üniversite
Fakülte

Jüri Adı
Üniversite
Fakülte

Jüri Adı
Üniversite
Fakülte

Jüri Adı
Üniversite
Fakülte

ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı çok değerli hocam Prof.Dr.Reşat APAK'a en içten dileklerle teşekkür ederim. Sevgili hocamın, hem bilimsel olarak dünya platformunda ön sıralarda yer alan duruşuyla hem de kişisel özellikleriyle bizlerin gelişmesinde çok büyük katkıları bulunmaktadır.

Tez çalışmalarımın her kademesinde büyük bir özveri göstererek bana yardımcı olan sevgili hocam Yard.Doç.Dr. Kubilay GÜÇLÜ'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım olan Saliha Esin KARADEMİR, Burcu BEKTAŞOĞLU ve öğrenci asistanı Tuncay ÖRNEK'e bütün katkılarından dolayı içtenlikle teşekkür ederim.

Tezin yazım aşamasında büyük yardımları olan Araş.Gör.Baki TÜRKKAN'a,

Referans numarası T-331/03112003 olan yüksek lisans tez projemde bana destek sağlayan İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği'ne teşekkür ederim.

Haziran, 2005

Mustafa ÖZYÜREK

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ	vi
SEMBOL LİSTESİ	vii
ÖZET	viii
SUMMARY	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. ANTİOKSİDANLARIN SINIFLANDIRILMASI	3
2.1.1. Sentetik Antioksidanlar	3
2.1.1.1. BHA (Bütillenmiş hidroksianisol) ve BHT (Bütillenmiş hidroksitoluen)	3
2.1.1.2. TBHQ (Tersiyer bütihidrokinon)	4
2.1.1.3. Gallatlar	4
2.1.2. Doğal Antioksidanlar	5
2.1.2.1. Karotenoidler.....	5
2.1.2.2. E -Vitamini (α -tokoferol)	6
2.1.2.3. C-Vitamini (L-askorbik asit)	7
2.1.2.4. Flavonoidler.....	8
2.1.2.5. Fenolik Antioksidanlar	12
2.2. LİTERATÜRDE YER ALAN, TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİNİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER	16
2.2.1. Prooksidanların Kullanılmadığı Yöntemler.....	17
2.2.1.1. TEAC (Trolox Eşdeğer Antioksidan Kapasite) Yöntemi	17
2.2.1.2. FRAP (Demir(III) İndirgeme Antioksidan Gücü) Yöntemi	18
2.2.1.3. DPPH Yöntemi	20
2.2.1.4. Döngülü Voltametik Yöntem (CV).....	21
2.2.1.5. Oksidan Olarak Cu(II)'nin Kullanıldığı Toplam Antioksidan Kapasite Yöntemi	21
2.2.2. Prooksidanların Kullanıldığı Yöntemler.....	23
2.2.2.1. ORAC (Oksijen Radikali Absorbans Kapasitesi) Yöntemi	23
2.2.2.2. TRAP (Toplam Radikal Tutma Parametresi) Yöntemi	24

2.3. MEYVE SUYU TANIMLARI VE ÖZELLİKLERİ	26
2.3.1. Meyve Suyu Tanımları.....	26
2.3.2. Meyve Suyunun Özellikleri	28
2.3.3. Meyve Sularının Faydaları.....	29
2.3.4. Meyve Suyu Ve Beslenmede Dikkat Edilecek Hususlar	32
2.3.5. Meyve Sularında Ambalajın Önemi	33
2.3.6. Meyve Suyu Ve Konsantresi Türkiye'nin Dış Ticareti, İhracat	33
2.3.7. Enerji İçecekleri	34
2.4. ÇAYLAR	35
2.4.1. Çayın Sınıflandırılması	35
2.4.2. Çayın Bileşenleri	36
2.4.2.1. Çay Katesinleri.....	36
2.4.2.2. Çay Flavonolleri.....	36
2.4.2.3. Theaflavinler ve Thearubiginler	36
2.4.3. Çayda Bulunan Flavanoidlerin Başlıca Antioksidatif Etkileri.....	37
2.5. BAZI İÇECEKLERDE TOPLAM ANTIÖKSİDAN KAPASİTE TAYİNİ İLE İLGİLİ SON YILLARDA YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	38
3. MALZEME VE YÖNTEM	43
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR	43
3.2. KULLANILAN İÇECEKLER.....	43
3.2.1. Meyve Suları	43
3.2.2. Nektarlar	43
3.2.3. Kolalı İçecekler	44
3.2.4. Poşet Çaylar.....	44
3.2.5. Bitki Çayları	44
3.3. KULLANILAN KİMYASALLAR.....	44
3.4. TROLOKS, ASKORBİK ASİT ve α -TOKOFEROL'E UYGULANAN YÖNTEMLER ..	45
3.4.1. Normal CUPRAC Yöntemi (Oda Sıcaklığında).....	45
3.4.2. İnkübasyonlu CUPRAC Yöntemi (T=50 °C).....	45
3.4.3. Hidrolizli CUPRAC Yöntemi (T=80 °C)	45
3.4.4. Hidrolizli ve İnkübasyonlu CUPRAC Yöntemi (T=50 °C)	46
3.5. İÇECEKLERİN HAZIRLANMASI.....	46
3.5.1. Cappy Portakal Suyuna TR ve AA Standart Katkı Uygulanması.....	46
3.6. ÇAY EKSTRAKTLARININ HAZIRLANMASI.....	47
3.6.1. Bitkisel Poşet Çay Ekstraktlarının Hazırlanması.....	47
3.6.2. Bitkisel Çay Ekstraktlarının Hazırlanması	47

3.7. BAZI İÇECEKLERE GELİŞTİRİLEN NORMAL CUPRAC YÖNTEMİNİN UYGULANMASI.....	47
3.8. BAZI İÇECEKLERE ABTS YÖNTEMİNİN UYGULANMASI	47
3.9. BAZI İÇECEKLERE FOLİN YÖNTEMİNİN UYGULANMASI.....	48
3.10. BAZI İÇECEKLERİN 1,10-FENANTROLİN YÖNTEMİ İLE ASKORBİK ASİT İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ.....	48
4. BULGULAR	49
4.1. TROLOKSUN CUPRAC YÖNTEMİ İLE ANALİZ SONUÇLARI	49
4.2. ASKORBİK ASİTİN CUPRAC YÖNTEMİ İLE ANALİZ SONUÇLARI.....	53
4.3. E-VİTAMİNİNİN CUPRAC YÖNTEMİ İLE ANALİZ SONUÇLARI.....	55
4.4. İÇECEKLERDE CUPRAC YÖNTEMİ İLE TAC TAYİNİ.....	59
4.4.1. Portakal Suyuna Cuprac Yönteminin Uygulanması.....	59
4.4.2. Meyve Sulari, Nektarlar Ve Enerji İçeceğine CUPRAC, ABTS ve Folin Yöntemlerinin Uygulanması.....	65
4.4.3. Meyve Sulari, Nektarlar Ve Enerji İçeceğinin 1,10-Fenantrolin Yöntemi İle Toplam AA İçerisinin Belirlenmesi.....	67
4.4.4. Yeşil Çaya CUPRAC Yönteminin Uygulanması	71
4.4.5. Bazı Çaylara CUPRAC Yönteminin Uygulanması.....	73
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	76
KAYNAKLAR	81
ÖZGEÇMİŞ	89

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1	: BHA ve BHT'nin kimyasal yapıları.....	3
Şekil 1.2	: TBHQ'nun kimyasal yapısı.....	4
Şekil 1.3	: PG'nin kimyasal yapısı	5
Şekil 1.4	: β -karotenin kimyasal yapısı	6
Şekil 1.5	: α - tokoferol, δ - tokoferol ve γ -tokoferolün kimyasal yapısı	7
Şekil 1.6	: L-Askorbik asitin kimyasal yapısı.....	8
Şekil 1.7	: Flavonoidlerin genel yapısı	9
Şekil 1.7.1	: Flavonoid grubuna ait alt sınıflara ait kimyasal yapılar	11
Şekil 1.8	: ABTS ile persulfat arasındaki reaksiyon neticesinde oluşan ABTS radikalinin antioksidan bileşik ile etkileşimi.....	18
Şekil 1.9	: FRAP reaktifi ile antioksidan bileşik arasındaki etkileşim	19
Şekil 1.10	: DPPH reaktifi	20
Şekil 1.11	: Cu(II) reaktifi ile antioksidan bileşik arasındaki reaksiyon	22
Şekil 4.1	: Değişik derişimlerdeki TR'nin absorbans ile derişim arasında çizilen kalibrasyon grafiği	50
Şekil 4.2	: Farklı derişimlerde TR'nin oluşturduğu Cu(I)-Nc spektrumları	51
Şekil 4.3	: Farklı derişimlerde AA'nın oluşturduğu Cu(I)-Nc spektrumları	53
Şekil 4.4	: Değişik derişimlerdeki AA'nın absorbans ile derişim arasında çizilen kalibrasyon doğrusu	54
Şekil 4.5	: Farklı derişimlerde TOC'nin oluşturduğu Cu(I)-Nc spektrumları.....	55
Şekil 4.6	: Değişik derişimlerdeki TOC'nin absorbans ile derişim arasında çizilen kalibrasyon grafiği	56
Şekil 4.7	: 50 μ L 1mM AA, 50 μ L 1mM TR ve 50 μ L 3 mM TOC'nin ayrı ayrı normal CUPRAC yöntemiyle zamana göre absorbans değişimini gösteren eğriler.....	57
Şekil 4.8	: 1:15 oranında seyreltilmiş portakal suyuna çeşitli derişimlerde AA standart katkısının oluşturduğu Cu(I)-Nc spektrumlar	59
Şekil 4.9	: Başlangıç absorbansı 0.20 olan 1:15 oranında seyreltilmiş portakal suyunda AA'nın kalibrasyon grafiği.....	60
Şekil 4.10	: 1:15 oranında seyreltilmiş olan portakal suyuna çeşitli derişimlerde TR standart katkısının oluşturduğu Cu(I)-Nc spektrumlar	61
Şekil 4.11	: Başlangıç absorbansı 0.22 olan 1:15 oranında seyreltilmiş portakal suyunda TR'nin kalibrasyon grafiği.....	62
Şekil 4.12	: Değişik oranlarda portakal suyunun seyreltilmesi sonucu beklenen CUPRAC kapasite ile bulunan CUPRAC kapasite arasındaki grafik ($r=0.999$)	63
Şekil 4.13	: Cappy portakal suyunun CUPRAC yöntemine göre presizyon (ölçüm tutarlılığı) (gün içi ve günler arası değişimler).....	64
Şekil 4.14	: Bütün meyve sularının CUPRAC yöntemi ile ölçülen toplam antioksidan kapasiteleri ile FOLİN yöntemi ile ölçülen toplam fenolik içerikleri arasındaki korelasyon ($r=0.93$)	68

Şekil 4.15	: Bütün meyve sularının ABTS yöntemi ile ölçülen toplam antioksidan kapasiteleri ile FOLİN yöntemi ile ölçülen toplam fenolik içerikleri arasındaki korelasyon ($r=0.90$).....	69
Şekil 4.16	: Bütün meyve sularının ABTS ve CUPRAC yöntemi ile ölçülen toplam antioksidan kapasiteleri arasındaki korelasyon ($r=0.994$).....	70
Şekil 4.17	: 3:100 oranında seyreltilmiş olan yeşil çay infüzyonuna TR standart katkısının oluşturduğu Cu(I)-Nc spektrumları.....	71
Şekil 4.18	: Başlangıç absorbansı 0.2043 olan yeşil çay ekstraktında TR'nin kalibrasyon doğrusu.....	72
Şekil 4.19	: Etil alkolün CUPRAC reaktifine etkisi.....	75
Şekil 5.1	: Bis(2,9-dimetil)-1,10-fenantrolin- Bakır(I) kelatı.....	79

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1	: Fenolik antioksidan sınıfları, bu sınıflara ait antioksidanlar ve bu antioksidanların yaygın olarak buldukları meyve kaynakları.....	14
Tablo 1.2	: Türkiye'nin Yıllar İtibariyle Meyve Suyu ve Konsantresi İhracatı (Miktar:kg, Değer:ABD\$).....	34
Tablo 1.3	: Bazı popüler enerji içeceklerinin ve soft içeceklerin (meşrubatların) kafein miktarları.....	35
Tablo 4.1	: Geliştirilen spektrofotometrik yöntemle tayin edilen TR'in farklı derişimlerde $\lambda=450$ nm'de spektrofotometrede okunan absorbens değerleri.....	49
Tablo 4.2	: ABTS yöntemine göre TR analizi.....	52
Tablo 4.3	: FOLİN yöntemine göre TR analizi.....	52
Tablo 4.4	: Geliştirilen spektrofotometrik yöntemle tayin edilen AA'in farklı derişimlerde $\lambda=450$ nm'de spektrofotometrede okunan absorbens değerleri.....	53
Tablo 4.5	: Geliştirilen spektrofotometrik yöntemle tayin edilen TOC'in farklı derişimlerde $\lambda=450$ nm'de spektrofotometrede okunan absorbens değerleri.....	55
Tablo 4.6	: Başlangıç konsantrasyonu 1 mM olan TR, AA, TOC'nin geliştirilen CUPRAC yöntemine göre elde edilen etkin molar absorptivite değerleri ve lineer aralıkları.....	58
Tablo 4.7	: TR, AA, TOC'nin 4 farklı CUPRAC yöntemi prosedürüne göre bulunan TEAC katsayıları	58
Tablo 4.8	: 1.15 oranında seyreltilmiş olan portakal suyuna (12.2 μ M + 61.0 μ M) AA arasında değişen derişimlerde standart katkılar.....	59
Tablo 4.9	: 1.15 oranında seyreltilmiş olan portakal suyuna (12.2 μ M+ 61.0 μ M) TR arasında değişen derişimlerde standart katkılar.....	61
Tablo 4.10	: Bazı içeceklerin CUPRAC ve ABTS yöntemlerinin uygulanmasıyla bulunan TEAC antioksidan kapasite değerleri ve bu içeceklerin Folin yöntemiyle bulunan toplam fenolik içerikleri (n=3).....	65
Tablo 4.11	: Bazı içeceklerin CUPRAC yöntemi ile AA cinsinden toplam antioksidan kapasitesi ile bu içeceklerin fenantrolin yöntemiyle bulunan toplam AA içerikleri (n=3).....	67
Tablo 4.12	: Yeşil çay ekstraktına TR standart katkısı.....	71
Tablo 4.13	: CUPRAC yöntemi ve ABTS yöntemine göre poşet ve normal çayların bulunan toplam antioksidan kapasiteleri ile bu çayların FOLİN yöntemine göre ölçülen toplam fenolik kapasiteleri.....	73
Tablo 4.14	: Meyve sularının antioksidan kapasitesinin tayininde değişik türlerin interferans(girişim) etkileri.....	74

SEMBOL LİSTESİ

AA	: Askorbik asit
ABTS	: 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt
BHA	: Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	: Bütillenmiş hidroksitoluen
CV	: Döngülü Voltametik Yöntem
DCFH-DA	: Diklorofloresceyn-diasetat
DPPH	: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
FRAP	: Ferric Reducing Antioxidant Power
GSH	: Glutasyon
HPLC	: High-performance liquid chromatography
LDL	: Low density lipoprotein
LOD	: Limit of detection (Belirtme sınırı)
ORAC	: Oksijen Radikali Absorbans Kapasitesi
PE	: Phycoerythrin
PG	: Propil gallat
RON	: Reaktif azot türleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
TAC	: Toplam antioksidan kapasite
TBHQ	: Tersiyer bütihidrokinon
TEAC	: Trolox Eşdeğer Antioksidan Kapasite
TOC	: α -Tokoferol
TOSC	: Toplam Oksiradikal Uzaklaştırma Kapasitesi
TPTZ	: Tripridilriazin
TRAP	: Total Radical Trapping Parameter
TR	: Troloks

ÖZET

BAZI İÇECEKLERİN ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN TAYİNİNDE YENİ BİR YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

Meyve suları, meyve nektarları ve diğer bazı içeceklerin sağlık açısından en önemli özellikleri, içermiş oldukları antioksidan bileşikler yardımıyla insan vücudunu hücresele oksidasyon reaksiyonlarının istenmeyen etkilerine karşı korumasıdır. İçeceklerin toplam antioksidan kapasitesinin (TAC) belirlenmesi amacıyla kullanılacak olan kromojenik redoks reaktifinin, kolaylıkla ulaşılabilir, dayanıklı, seçici, kimyasal yapısı ile su veya organik çözücülerdeki çözünürlüğüne bakılmaksın bilinen tüm antioksidan maddelere karşı cevap vermesi gibi özelliklere sahip olması gerekmektedir. Ayrıca redoks reaksiyonu hızlı bir şekilde gerçekleşmeli ve oluşan son çözelti rengi makul bir süre zarfı içerisinde stabil olmalıdır. Yukarıda belirttiğimiz amaçlara uygun fotometrik bir reaktif olan bis(neokuproin)-bakır(II) klorürü kullanan ve TAC tayini için yeni geliştirilen CUPRAC yöntemi (CUPRAC: Bakır(II) indirgeyici antioksidan kapasite) öncelikle saf antioksidan (Troloks, askorbik asit, α -tokoferol vb.) bileşiklerine başarıyla uygulandı. Bu yöntemde sırasıyla Cu(II) klorür çözeltisi, sanayide kullanılan %96'lık etil alkolde (TS 1810) hazırlanmış neokuproin çözeltisi, amonyum asetat tamponu (pH=7) ilavelerinden sonra belirli oranlarda seyreltilmiş içeceklerden son çözelti hacmi 4.1 mL olacak şekilde alınan hacimler ilave edilip oda sıcaklığında ½ h süre sonunda 450 nm'de reaktif körüne karşı absorbans değerleri ölçülmektedir. Bu çalışmada bazı meyve sularının, meyve nektarlarının, asidik kolalı içeceklerin ve çayların TAC'ı normal CUPRAC yöntemiyle tayin edildi. TAC değerleri troloks ekivalenti olarak verildi. İçeceklerde en yüksek TAC değeri nar suyunda elde edildi (5.98 \pm 0.08 mM TR). Asli kıyas yöntemi olarak seçilen ABTS yöntemi ile CUPRAC yöntemi ile bulunan TAC'lar arasındaki korelasyon (r=0.99) olarak bulundu. Bu içeceklerin toplam fenolik kapasiteleri Folin yöntemi ile belirlenmiştir ve CUPRAC yöntemi ile Folin yöntemi arasındaki korelasyon (r=0.93)'dir. İçeceklerin askorbik asit (AA) kapasitesi 1,10-fenantrolin yöntemiyle tayin edildi.

SUMMARY

DEVELOPMENT OF A NOVEL METHOD FOR DETERMINING THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SOME BEVERAGES

One of the most important health benefits of fruit juices, nectars, and other soft beverages is their protective role against cellular hazards of oxidation reactions by the aid of their antioxidant content. The chromogenic redox reagent that will be used for measuring the total antioxidant capacity (TAC) of beverages should be easily accessible, stable, selective, and should react with all kinds of antioxidant compounds irrespective of their chemical structure or hydrophilicity. The redox reaction of concern should take place fairly rapidly, and the resulting colour should be stable for a reasonable period of time. A spectrophotometric reagent fitting the above purposes, bis(neocuproine) copper(II) chloride, has been recently developed for TAC assay, and named as the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) method. The method was applied to pure antioxidant compounds such as trolox, ascorbic acid, and α -tocopherol by reacting their aqueous solution with an ethanolic solution of neocuproine(2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline) at pH 7 using an ammonium acetate buffer. The absorbance of the resulting solution was read against a reagent blank at 450 nm after $\frac{1}{2}$ h. In this work, the TAC of fruit juices, nectars and acidic cola beverages were measured with the CUPRAC assay, and the results were reported as trolox (TR) equivalent antioxidant capacity (TEAC). The highest TAC among juices was found with pomegranate (5.98 ± 0.08 mM TR). The TAC measurements with CUPRAC were correlated to those found with the ABTS assay as the standard reference method, and a high linear correlation coefficient ($r=0.99$) was achieved. The total phenolics content of these beverages was measured with the Folin assay, and again, CUPRAC correlated linearly with Folin ($r=0.93$). The ascorbic acid (AA) contents of beverages were found with the 1,10-phenanthroline method.

1. GİRİŞ

Yüksek aktiviteye sahip bileşikler olan serbest radikaller, kirli havada, sigara dumanında, radyasyonla indüklenmiş olarak (ışınım), bitki koruma ilaçlarında, bozulmuş gıdalarda ve normal vücut metabolizmasında (metabolik süreçte) bulunurlar. Dengelenmemiş serbest radikal saldırısı ve hücre zarının tahribatı oksidatif stres olarak adlandırılır. Oksidatif stres (gerginlik); oksidatif lezyonlara, doku hasarına, mutasyonlara ve hücre ölümlerine yol açabilen reaktif oksijen ve reaktif azot türlerinin – çoğunlukla serbest radikallerin- aşırı üretimiyle tetiklenir. Oksidatif stres, kendini çeşitli kalp damar patolojileri (arterioskleroz ve hipertansiyon), diyabet, nörodejeneratif prosesler (özellikle Alzheimer ve Parkinson hastalıkları), hücre yıpranması ve yaşlanma, kıkırdak iltihabından gelen patoloji, solunum yolu hastalıkları (sistik fibroz ve astım), Down sendromu ve kanser gibi çeşitli insan hastalıklarında hissettirir [1]. Oksidatif strese karşı günümüzde tıp alanında büyük ölçüde sınıma-yanılma yöntemiyle bazı tedaviler önerilmekte ise de aslında terapötik yaklaşımların moleküler mekanizmalara (yani moleküler tıba ve biyokimyaya) dayandırılması gittikçe önem kazanmaktadır. Bu da gerek hastaların ve gerekse sağlıklı insanların diyetlerinin koruyucu ve tedavi edici hekimlik bağlamında doğal ve yapay antioksidanlarla takviye edilmesini gerekli kılmaktadır.

Antioksidanlar, yükseltgenebilen substratlara göre daha düşük derişimlerde, substratın prooksidanlarla başlatılan oksidasyonunu ciddi ölçüde engelleyen ya da geciktiren maddelerdir. Prooksidanlar (bir başka deyişle reaktif türler) ise lipidler, proteinler ve nükleik asitlere oksidatif hasar oluşturabilen ve bunun sonucunda patolojik olaylara ve hastalıklara yol açabilen zehirli maddelerdir. Antioksidanlar, hücrelere zarar veren prooksidanları (yani reaktif oksijen ve azot türlerini, serbest radikalleri) etkinlikle indirgeyerek toksik olmayan ürünlere dönüştürürler [2].

Gıdalardaki antioksidanların tesirleri, serbest radikal oluşmasını engelleyici veya var olan serbest radikalleri tesirsiz hale getirici bir özellikle olmalarından kaynaklanır. Serbest radikal, kimyasal olarak üzerinde ortaklanmamış bir elektron bulunan atom veya moleküldür. Bunlar oldukça aktif moleküller olduklarından diğer moleküllere göre

çok hızlı reaksiyona girip ortamda zincirleme olarak hızlı bir şekilde çoğalır. Bu moleküllere ortamda bulunan oksijen hemen bağlanır ve yağlardan peroksit denilen bileşikler üretilir. Bunlardan bir seri zararlı oksidasyon ürünleri meydana getirilir. Bunlar, hem gıda maddesi, hem de bu gıdayı tüketen insanlar için zararlıdır. İşte antioksidanların yapısındaki bir hidrojen, elektronu ile beraber serbest radikallere verilir ve böylece zincir şeklinde devam eden bozulma reaksiyonu önlenir. Nasıl bazı hastalıklarda belli bir safhadan sonra tedavi fayda vermiyorsa, serbest radikal moleküllerinin çok fazla meydana geldiği safhadan sonra, dışarıdan antioksidan ilâvesi de gıdayı bozulmaktan kurtaramaz.

Meyve sularında mevcut ve insan vücudunu zararlı serbest radikallerden koruyan başlıca doğal antioksidanlar; esas olarak vitaminler (özellikle askorbik asit: C-vitamini ve α -tokoferol: E-vitamini [3,4]), karotenoidler (ve A-vitamini), flavonoidler [5,6] ve oligomerik proantosiyanidinlerin de içinde bulunduğu polifenollerden oluşmaktadır. Bunlar çeşitli sebze ve meyve sularında bolca bulunurlar. Meyve suları, yapısındaki bol miktarda bulunan bu doğal antioksidanlar ile serbest radikal kaynaklı hastalıklara karşı koruyucu rol üstlenmektedir.

Meyve suları sadece meyve konsantresi ve sudan oluşmakla birlikte nektarlar ise %35 ile %50 arasında meyve içeren, su oranı fazla olan ve şeker de ilave edilen içeceklerdir. Türkiye’de yılda toplam 160 bin ton nektar ve meyve suyu tüketilmektedir.

Meyve suları, sebze çorbaları, çeşitli şifalı bitki özütleri (ekstraktları), başta şarap olmak üzere alkollü içecekler ve alkolsüz içecekler gibi sıvı gıdalarda toplam antioksidan kapasite (TAC) tayini doğrudan yapılmaktadır. TAC tayini için geçerli yöntemler esas olarak UV-görünür alan spektrofotometri, floresans ve kemilüminesans yöntemleri, yüksek performans sıvı kromatografi (HPLC) ve siklik voltametridir [2].

Bu çalışmanın amacı; hızlı, kolay uygulanabilir yeni bir spektrofotometrik TAC ölçüm yöntemi olan CUPRAC (CUPRAC: Bakır(II) indirgeyici antioksidan kapasite) yöntemi ile bazı içeceklerin TAC değerlerini belirlemek ve irdelemek, CUPRAC yöntemine göre bulunan TAC değerlerini yaygın olarak kullanılan ABTS ve Folin yöntemleri ile bulunan TAC değerleri ile kıyaslayarak yöntemler arasındaki korelasyonu göstermektir.

2. GENEL KISIMLAR

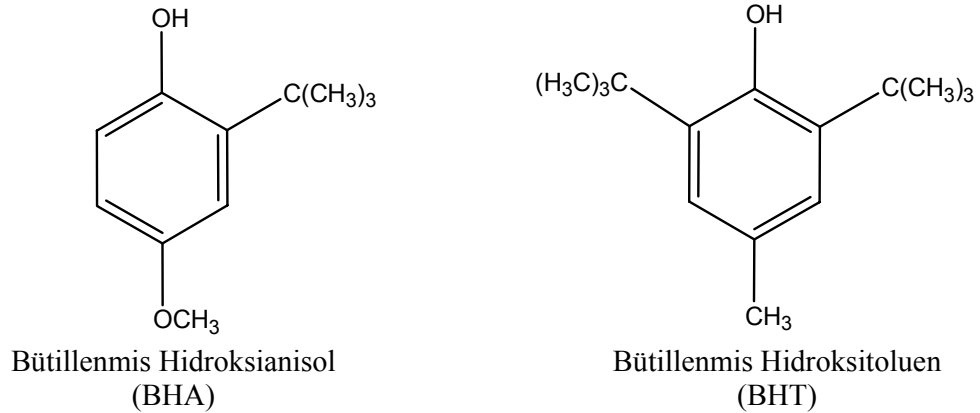
2.1. ANTİOKSİDANLARIN SINIFLANDIRILMASI

2.1.1. Sentetik Antioksidanlar [7]

2.1.1.1. BHA (Bütillenmiş hidroksianisol) ve BHT (Bütillenmiş hidroksitoluen)

BHA, kimyasal olarak iki izomerin karışımıdır (3-terciyer butil-4-hidroksianisol ve 2-terciyer butil-4-hidroksianisol) ve beyaz mumsu parçacıklar halindedir. BHT ise, beyaz kristal görünümündedir. İki bileşik de, yağda çözünür fakat suda çözünmezler. BHA'nın gıda içinde taşınması BHT'den daha iyidir. Genellikle gıdanın yağ muhtevasının ağırlığı üzerinden, tek başına veya antioksidan karışımı olarak %0.02 (200 ppm) oranında kullanılırlar. BHA özellikle uçucu yağların renk ve tat-kokularının korunmasında, bilhassa kısa zincirli yağ asitlerinin oksidasyonunu kontrol etmede etkilidir. Genellikle tahıl ve şekerli ürünlerde de kullanılır. BHA ve BHT birlikte kullanıldığında sinerjik etkiden bahsedilmektedir.

Bu antioksidanların fazla tüketimi, vücutta aşırı hassasiyete ve alerjiye yol açabilmektedir. Günümüzde kanserojenik etkileri üzerinde de araştırma yapılmaktadır. İkisinin de , National Research Council, Food Additive Committee'nin verilerine göre gıdalarda kullanımında 1970'den beri azalma olmasına rağmen, halen 23 büyük gıda kategorisinde en fazla kullanılan antioksidanlar olduğu bilinmektedir.

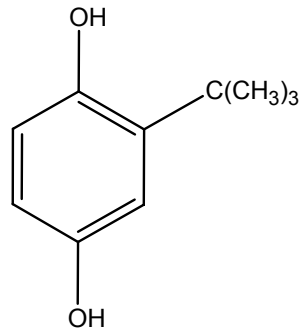


Şekil 1.1: BHA ve BHT'nin kimyasal yapıları

2.1.1.2. TBHQ (Tersiyer bütihidrokinon)

Kızartma yağlarını oksidasyona karşı korumak için en iyi antioksidan olarak bilinmektedir. Kızartma işlemi bitmiş ürünleri de korumaktadır. Bej renkli bir toz olan TBHQ, katı ve sıvı yağlarda çözünür. Propil gallatın tersine, demir ve bakır iyonlarıyla kompleksler meydana getirmez ve kızartma işleminde gıda içinde mükemmel şekilde taşınabilmektedir.

Tek başına veya BHA ve/veya BHT ile kombine olarak kullanım daha uygundur. PG ile birlikte kullanımı, etkiyi azalttığından tavsiye edilmez. Sitrik asit ile karıştırıldığında, stabilize edici özellik kazanmaktadır. Avrupa Birliği ülkelerinde kullanımı yasaklanmıştır. Kullanım sınırı, yağ miktarı üzerinden en fazla %0.02'dir [7].



Tersiyer Bütıl Hidrokinon
(TBHQ)

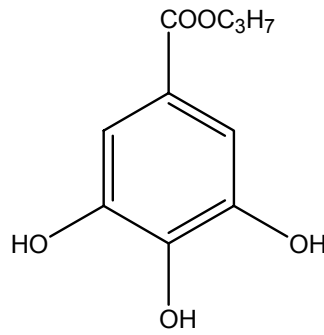
Şekil 1.2: TBHQ'nun kimyasal yapısı

2.1.1.3. Gallatlar

Gallik asitin en fazla kullanılan esterleri, propil gallat (PG), oktil gallat, dodesil gallat ve lauril gallattır. Bunlar suda çözünmezler, yağda yalnız oktil ve dodesil gallatlar iyi çözünür. PG, beyaz kristal toz olarak satılır ve suda çok az çözünür. Erime noktası 148°C olup, bu derecenin üzerinde etkisini kaybeder. FDA'nın izniyle gıdalarda 1947'den beri kullanımı giderek yaygınlaşmış sentetik bir antioksidandır. Ticari olarak gallik asit ile propil alkolün esterifikasyonu ile elde edilir.

PG, özellikle hayvansal yağlar ile bitkisel sıvı yağların stabilizasyonunda işlevseldir. Ancak bitkisel yağlarda TBHQ'dan daha az etkilidir. Özellikle demir iyonları ile koyu

renkli kompleksler oluşturma özelliği, yağda ve substratta istenmeyen mavi-siyah renk değişikliklerine neden olduğundan, PG daima sitrik asitle birlikte kullanılmaktadır. Sitrik asit, demir ve bakır iyonlarının kataliz ettiği prooksidatif reaksiyonları önleyebilmektedir. BHA ve BHT ile iyi sinerjik etki oluşturan PG'nin TBHQ ile kullanımına izin verilmemektedir. Çeşitli et ürünleri, sosis, salamlar ve baharatlarda kullanılabilir. Gallatların kullanılmasında toplum sağlığı ve gıda hijyeni açısından olumsuz hiçbir bilgi ileri sürülmemektedir. Gallatların gıdalarda kullanımı %0.02 oranındadır [7].



Propil gallat

(3,4,5-trihidroksi-benzoik asit propil ester)

Şekil 1.3: PG'nin kimyasal yapısı

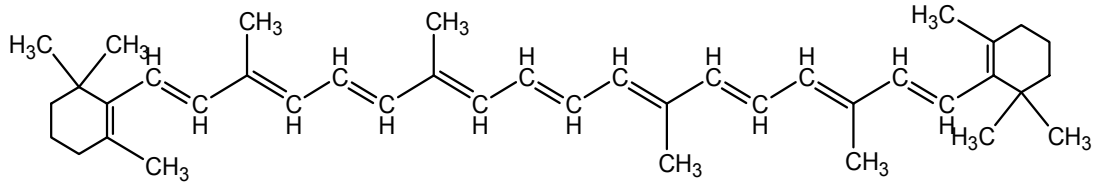
2.1.2. Doğal Antioksidanlar

2.1.2.1. Karotenoidler

Birçok bitki, alg ve küçük organizmalarda bulunan karotenoidler yağda çözünebilen doğal antioksidanlardır. 600'den fazla çeşidinin olduğu bilinmektedir. Karotenoidlerin çoğunun temel yapısı poliizoprenoitten oluşmaktadır [8]. Yapısında bulunan çifte bağlardan dolayı sarı, portakal veya kırmızı renktedirler. Absorpsiyon maksimumu, konjuge çifte bağ sayısına bağlıdır ve 400-500 nm arasında değişmektedir. Sebze ve meyve sularında bulunan başlıca karotenoidler; α -karoten, β -karoten, likopen, lutein, zeaksantin ve β -kriptoaksantindir. Karotenoidler, oldukça etkili ROS (reaktif oksijen

türleri) süpürücüleridir (Özellikle singlet oksijen ve peroksil radikallerini). Karotenoidlerin antioksidan aktivitesi, yapısındaki konjuge çifte bağlardan ileri gelmektedir.

β -karoten hayvansal organizmada enzimatik olarak iki molekül A vitaminine bölündüğünden provitamin A diye adlandırılır. A vitamini oksijen etkisi ile kolayca oksitlenir. Görme, büyüme, üreme, epitel hücre sağlamlığında rol oynar.

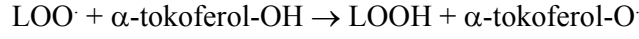


Şekil 1.4. β -karotenin kimyasal yapısı

2.1.2.2. E -Vitamini (α -tokoferol)

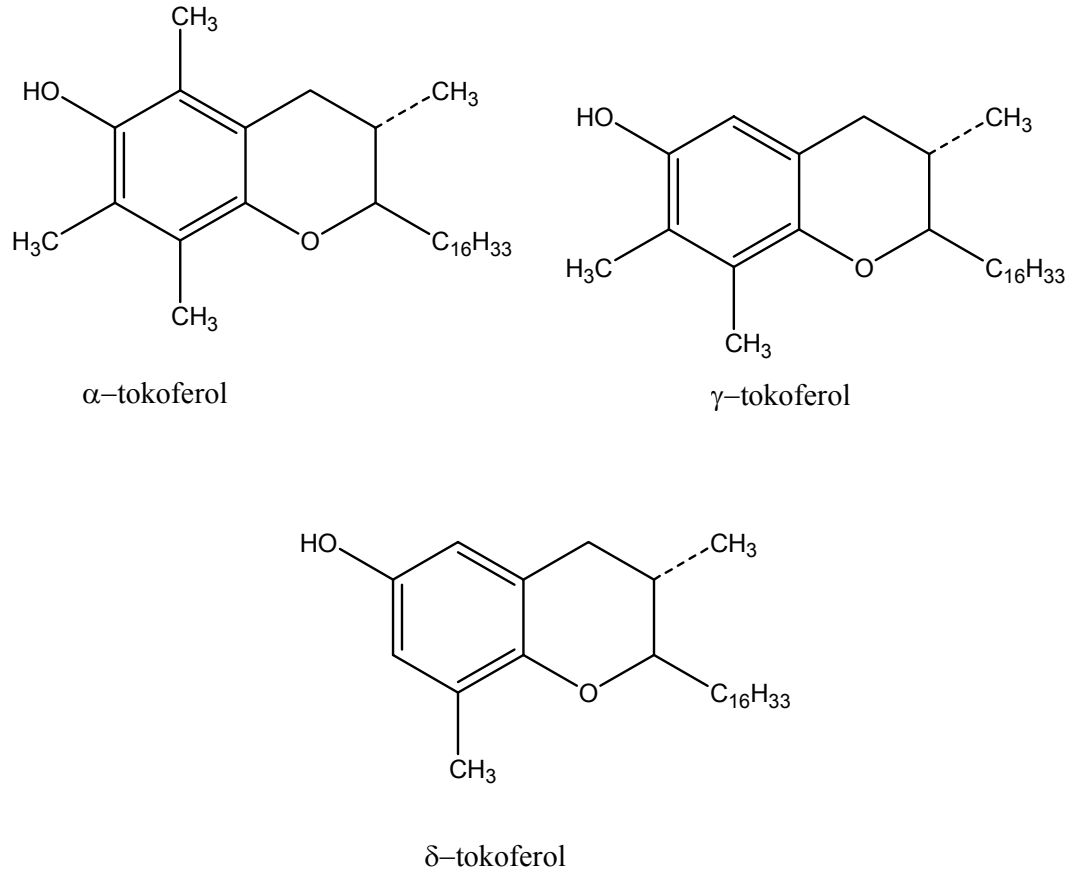
E vitamini, α -, β -, δ -, γ -tokoferoller ve tokotrienollerin oluşturduğu 8 farklı izomerik yapıda doğada bulunmaktadır. Özellikle α -tokoferol, yüksek biyolojik aktivite göstermektedir. α -tokoferol vitaminlerin en güçlüsü ve yiyeceklerde en geniş şekilde yayılmış olanıdır. Antioksidan etkisi en fazla olanı da γ -tokoferoldür [9]. Tokoferollerin yapısında kroman halka sistemi ve bir izoprenoid yan zincir (fitil) bulunur. Bitkisel yağlarda %0.05 kadar bulunurlar. Yapısında bulunan fenolik hidroksil gruplu aromatik halka, vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır.

Çok güçlü bir antioksidan olan E-vitamini hücre membran fosfolipidlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikal etkilerinden koruyucu savunma elemanıdır. Bir molekül vitamin E, 100 molekül yağ asidinin peroksidasyonunu önleyebilir. Vitamin E, O_2^- , $HO\cdot$, singlet O_2 , lipid peroksil ($LOO\cdot$) 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.



(tokoferoksil radikali)

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



Şekil 1.5: α - tokoferol, δ - tokoferol ve γ -tokoferolün kimyasal yapısı

2.1.2.3. C-Vitamini (*L*-askorbik asit)

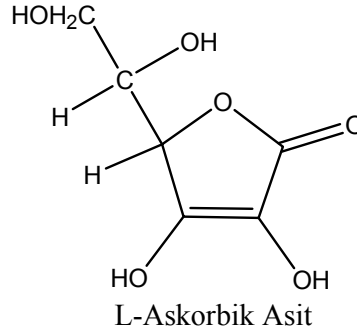
C vitamini bir ketolaktondur. Suda çözünen vitaminlerden olan askorbik asit özellikle taze yeşil sebze, meyve ve turuncgillerde bol miktarda bulunur. Çok güçlü bir indirgeyici ajan olan C-vitamini, süperoksit ve hidroksil radikalleri ile kolayca

reaksiyona girerek onları temizler[10]. C vitamini, tokoferoksil radikalinin tokoferole redüklenmesini de sağlar.

Çeşitli besin maddelerinde acılaşıma, ekşime ve renk değişimini önler. C vitamininin koroner kalp hastalıklarına karşı koruyucu olduğu düşünülür. Çünkü LDL oksidasyonunu önler.

Meyve suları insanlar için önemli askorbik asit kaynağıdır ve son yıllarda tüketimi çokça artmıştır. Ancak meyve sularındaki askorbik asit çabuk yükseltgenir ve saklama koşullarına bağlı olarak kaybolur. Herhangi bir meyve suyunun kalitesi ve C vitamini kaynağı olarak değeri, içeriğine ve bekleme süresindeki kayıp oranına bağlıdır [29].

Askorbik asit meyve sularının içinde doğal olarak bulunabildiği gibi sonradan da ilave edilebilmektedir.



Şekil 1.6: L-Askorbik asitin kimyasal yapısı

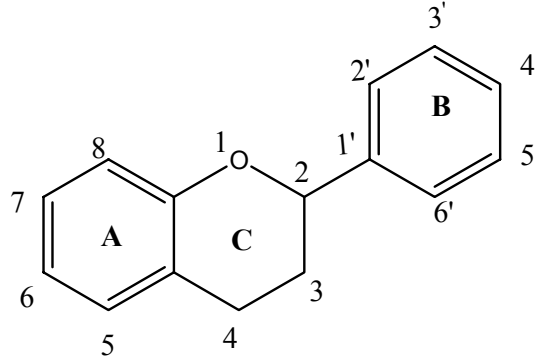
2.1.2.4. Flavonoidler

Flavonoidlerin karbon iskeletini, iki fenil halkasının (A ve B) propan zinciri ile birleşmesinden oluşan ve 15 karbon atomu içeren, difenilpropan (C₆-C₃-C₆) yapısı oluşturmaktadır. Oksidasyon yerindeki farklılıklar ve C halkasındaki substitüsyona göre flavanoidler sınıflandırılmaktadır. Doymuş C halkası flavanları, 4- pozisyonunda keto gurubu içermesi flavonları ve pozitif yüklü tamamen aromatik halka antosiyanidinleri temsil etmektedir.

Temel yapı A ve C halkalarını ve fenil-B halkasını içermektedir. B halkası, C halkasına 2- pozisyonunda bağlanmaktadır (piran oksijenden başlayarak numaralandırılmıştır).

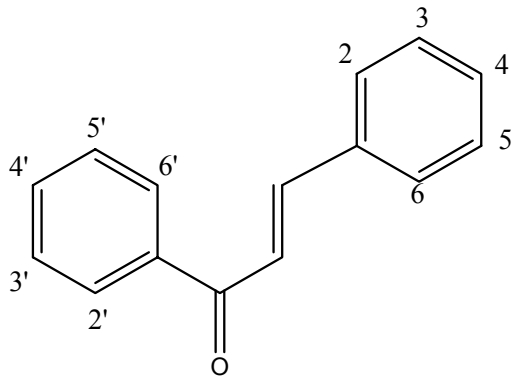
Temel yapıya göre halkalardaki bazı yapısal değişiklikler, flavonoidleri birtakım alt sınıflara ayırmaktadır.

- Flavonoller: (Kuarsetin ve kaemferol), 3-hidroksi piran-4-one-C halkası yapılarındadırlar.
- Flavonlar : (Luteolin, apigenin, krisin) 3-hidroksi grubu içermeyen yapıda yer almaktadırlar.
- Flavanoller : (Kateşin) 2,3 çifte bağı içermeyen ve 4-one-C halkası yapılarındadırlar.
- İzoflavonlar : (Genistein) B halkası, C halkasına 3-pozisyonunda bağlıdır.
- Antosiyanidinler : Flavilyum katyonu içermektedirler.
- Flavanonlar : 2,3 çifte bağı ve 3-hidroksi grubu içermeyen ve 4-one yapısıyla gösterilmektedirler.

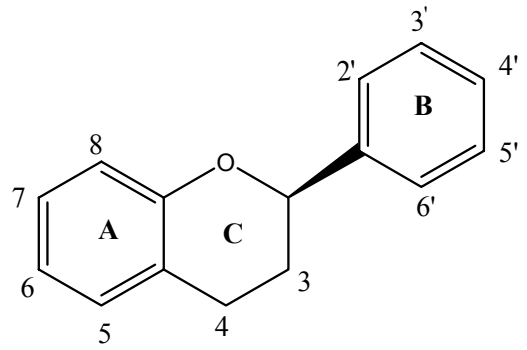


Şekil 1.7: Flavonoidlerin genel yapısı

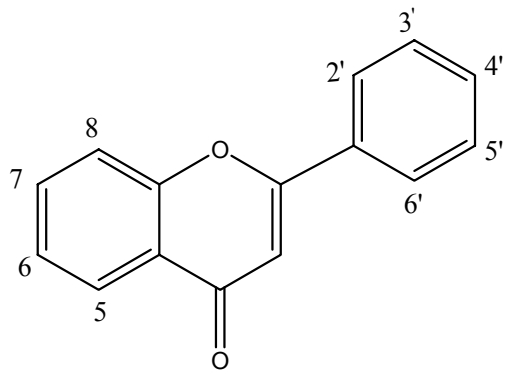
Flavonoidler, 2-fenilbenzopiran iskeleti içermektedirler. Dihidrokalonlar ise 2-fenilbenzopiran iskeleti içermediklerinden temelde flavonoid değildirler. Ancak kimyasal yapısı ve biyosentetik yönden flavonoidlere benzemesi nedeniyle flavonoidlere dahil edilmektedirler.



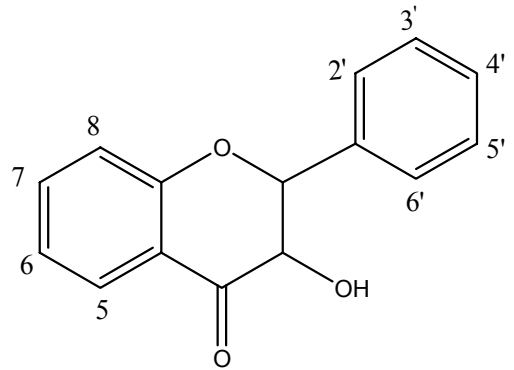
Dihidrochalkonlar



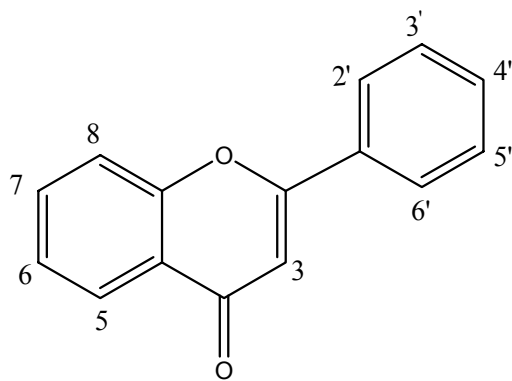
Flavan



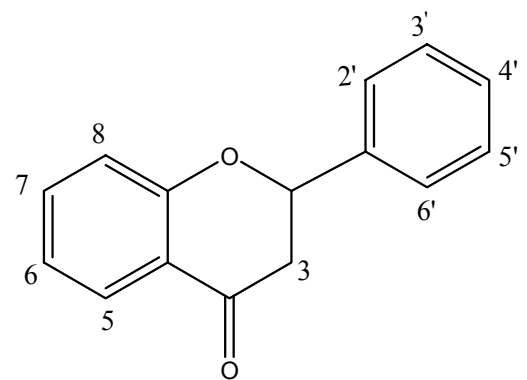
Izoflavonlar



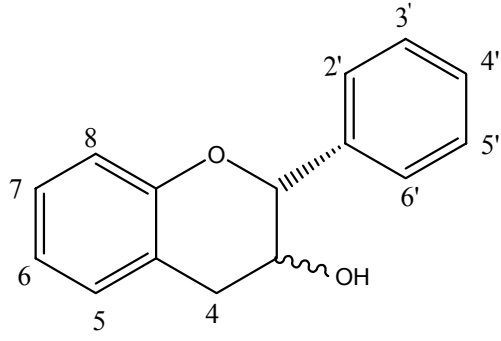
Flavanonoller



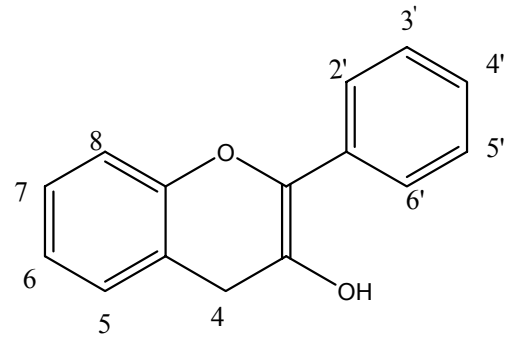
Flavonlar



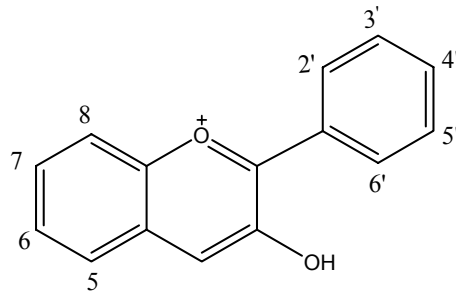
Flavanonlar



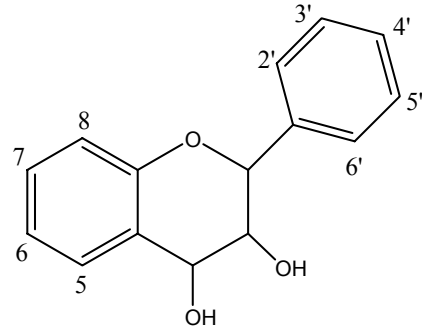
Flavanoller



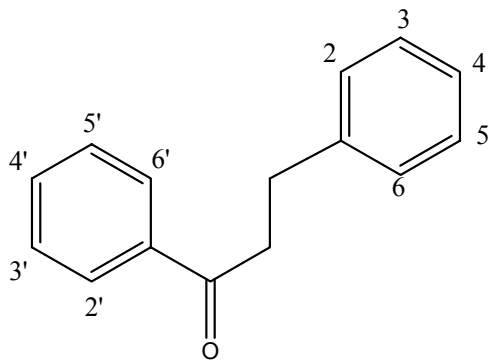
Flavonoller



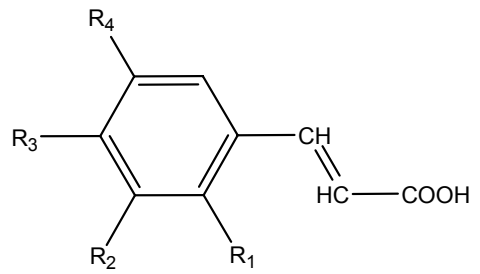
Antosiyanidinler



Flavan-3,4-dioller



Kalkonlar



Sinnamik Asitler

Şekil 1.7.1: Flavonoid grubunun alt sınıflarına ait kimyasal yapılar [11].

2.1.2.5. Fenolik Antioksidanlar

Polifenollerin hidrojen veya elektron vererek göstermiş oldukları kimyasal aktivite aynı zamanda serbest radikal süpürücü olarak hareket etme potansiyelini göstermektedir. Bir antioksidanın aktivitesi:

- Hidrojen veya elektron donör olarak reaktivitesi ile
- Antioksidan radikal türevinin son hali ile
- Diğer antioksidanlarla reaktivitesi ile
- Geçiş metali kelatlama potansiyeli ile belirlenir.

Polifenoller, serbest radikal süpürme aktivitesi için ideal bir yapıya sahiptir. Hatta, E-vitamini ve C-vitamini'ne nazaran oldukça etkili in vitro antioksidan olarak gösterilmektedirler. Puls radyolizi kullanılarak hidroksil radikali, azid radikali, süper oksid anyonu, lipid peroksi radikali ve butil alkoksil radikalleri ile polifenoller arasındaki etkileşim ve antioksidan radikalinin stabilitesi araştırılmıştır. Buna ilaveten, özellikle demir ve bakır ile metal kelat kompleksi oluşturma eğilimi, geçiş metali-katalizlenmiş serbest radikal oluşumunu inhibe etmesi açısından polifenollerin koruyucu antioksidan rolünü desteklemektedir [12].

Flavonoid ve izoflavonoidlerin antioksidan aktiviteleri kimyasal yapılarına bağlı olup antioksidan aktiviteleri serbest radikal süpürme yeteneği şeklinde tanımlanır. Kromojenik bir redoks indikatörü olan ABTS⁺ radikali kullanılarak flavonoidlerin kimyasal yapıları ile antioksidan aktiviteleri arasındaki ilişki belirlenebilir. Kapasiteler suda çözünür E vitamini analogu olan troloksa göre verilmiştir. Bu şekilde ABTS yöntemine göre bulunan TEAC katsayıları söz konusu antioksidan bileşiklerin kimyasal yapıları ile tamamen tutarlıdır.

Yüksek antioksidan aktiviteyi sağlayan kimyasal düzenlemeler:

- B halkasında orto pozisyonunda 3',4'-dihidroksi grubu içeren kateşin, luteolin ve kuersetin
- A halkasında meta 5,7-dihidroksi grubu içeren kaemferol, apigenin, ve krisin
- C halkasında elektron delokalizasyonunu sağlayan 4-keto grubu ile 3-hidroksi grubu arasındaki konjugasyon sonucu 2,3-çifte bağı içeren kuersetin. Aynı

zamanda B halkasında orto-hidroksi grubu içeren yapılar yüksek oranda antioksidan aktivite göstermektedir.

Bununla birlikte, -OH gruplarının kimyasal yapıda yerleşmelerindeki değişiklikler ve bu -OH gruplarının glikolizasyon ile substitue olması neticesinde oluşan flavonoid glikozidleri antioksidan aktiviteyi azaltmaktadır.

Metal kelatasyonunda, geçiş metal iyonları flavonoid moleküllerine B halkasında 3',4'-dihidroksi pozisyonunda orto difenolik gruplarına 2 farklı noktadan bağlanmaktadır. Flavonollerde ise C halkasında keto yapıları olan 4-keto,3-hidroksi veya 4-keto ve 5-hidroksi noktalarından bağlanır. Bununla birlikte muhtemelen metallerin polifenollerle kelatasyonu farklılık göstermektedir. Bu oldukça önemli -OH pozisyonlarında glikolizasyon oluşumu flavonoidlerin antioksidan aktivitesini etkilemektedir.

Yarı-indirgeme pik potansiyeli ($E_{P/2}$) flavonoidlerin süpürme aktivitesinin belirlenmesinde önemli bir parametredir. Bunun temeli elektrokimyasal oksidasyona ve hidrojen donör serbest radikal süpürmeye dayanmaktadır. Elektrokimyasal oksidasyonda fenolik gruplarda O ile H atomu arasındaki bağ kırılır ve fenoksil radikali ve H^+ iyonu oluşur. Böylece, bir flavonoid , yarı-indirgeme potansiyeli düşük olması halinde iyi bir radikal süpürücüdür. Bu potansiyel yükseldikçe flavonoidin ROS ile reaksiyona girmesi zorlaşır.

Yarı indirgeme potansiyelleri ile ABTS yönteminde elde edilen TEAC katsayıları karşılaştırılabilir. (TEAC: troloks eşdeğer antioksidan kapasite) TEAC katsayıları ve $E_{P/2}$ değerleri pH 7.4'de elde edilmiştir. Flavonoidler için etkin radikal süpürme özellikleri TEAC ≥ 1.9 mM ve $E_{P/2} \leq 0.2$ mV değerlerinde görülmüştür. Zayıf radikal süpürme özellikleri ise TEAC ≤ 1.5 mM ve $E_{P/2} \geq 0.3$ mV değerlerinde gözlenmiştir (Kaemferol hariç). Buradan şu sonuç çıkarılabilir: yüksek antioksidan aktivite gösteren polifenoller, B halkasında o-dihidroksi yapısında olanlardır [12].

Tablo 1.1: Fenolik antioksidan sınıfları, bu sınıflara ait antioksidanlar ve bu antioksidanların yaygın olarak buldukları meyve kaynakları [11].

Temel Yapı	Sınıf	Yaygın Meyve Kaynakları	Örnekler
C ₆	Basit Fenoller Benzokinonlar		Kateşol, Hidrokinon, Rezorsinol
C ₆ -C ₁	Fenolik asitler	Geniş olarak bulunmakta	p-hidroksibenzoik asit, salisilik asit
C ₆ -C ₂	Fenilasetik asitler		p-hidroksifenilasetik asit
C ₆ -C ₃	Sinamik asitler	Geniş olarak bulunmakta	Kaffeik asit, ferulik asit
	Fenilpropenler		Eugenol, mirisetin
	Kumarinler	Turunçgiller	Umbelliferon, askuletin, skopolin
	Kromonlar		Eugenin
C ₆ -C ₄	Naftokinonlar	Ceviz	Juglone
C ₆ -C ₁ -C ₆	Ksantonlar	Hint kirazı	Mangostin, mangiferin
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbenler	Üzüm	Resveratrol
	Antrokinonlar		Emodin
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoidler		
	Flavonlar	Tatlı portakal	Sinensetin, nobiletin, tengeretin, izosinensetin, polimetoksilli flavonlar
		Greyfurt	Tangeretin, polimetoksilli, flavonlar
		Limon	Diosmin, luteolin-7-rutinozid
	Flavonoller	Elma	Kuarsetin, kaemferol
		Armut	Kuarsetin, kaemferol
	Flavonol glikozidler	Geniş olarak bulunmakta	Rutin
	Flavanonoller	Üzüm	Dihidrokuersetin ve dihidrokaemferol glikozidler
	Flavanonlar	Genellikle greyfurt, domates, limon ve portakalda bulunur	Hesperitin, naringenin
	Flavanon glikozidler	Turunçgiller	Hesperidin, neoherperidin, narirutin, naringin, eriositrin

Temel Yapı	Sınıf	Yaygın Meyve Kaynakları	Örnekler
		Çilek	Naringin
	Antosiyaninler	Elma	Açillenmiş türevlerini içeren siyanidin glikozidler
		Tatlı portakal	Pelargonidin, peonidin, delfinidin, petunidin glikozidleri
		Üzüm	Siyanidin, peonidin, delfinidin, petunidin, malvinidin glikozidleri
		Armut	Siyanidin glikozidleri
		Kiraz	Siyanidin-3-glukozid ve 3-rutinozid
		Şeftali	Siyanidin glikozidler
		Erik	Siyanidin glikozidleri ve peonidin
		Tatlı kiraz	Siyanidin glikozidleri
	Flavanoller (Kateşinler)	Elma	(+)-kateşin, (-)-epikateşin
		Üzüm	(+)-kateşin, (-)-epikateşin (+)-gallokateşin, (-)-epigalloepikateşin
		Armut	(+)-kateşin, (-)-epikateşin
		Şeftali	(+)-kateşin, (-)-epikateşin
	Kalkonlar	Elma	Floretin türevleri, özellikle floridzin
		Armut	Arbutin, floretin glukozid
		Domates	Kalkonaringenin
(C ₆ -C ₃) ₂	Ligninler		Pinosininol
(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Bioflavonoidler		Agatisflavon

2.2. LİTERATÜRDE YER ALAN, TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİNİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

Prooksidan, lipid, protein ve nükleik asitlerde oksidatif hasara yol açan ve çeşitli patolojik hastalıkların oluşmasını sağlayan toksik bir maddedir. Normal aerobik metabolik prosede oluşan reaktif oksijen ve reaktif azot türevleri (ROS ve RON) prooksidanlara örnek olarak gösterilebilir.

Antioksidanlar etkilerini başlıca iki şekilde gösterirler:

1. Serbest radikal oluşumunun önlenmesi:
 - Başlatıcı reaktif türleri uzaklaştırıcı etki,
 - Oksijeni uzaklaştırıcı veya derişimini azaltıcı etki
 - Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırıcı etki
2. Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi:
 - Süpürücü (scavenging) etki: ROS'lerini etkileyerek onları tutma veya çok daha az reaktif başka bir moleküle çevirme. (Örneğin: Enzimler.)
 - Bastırıcı (quencher) etki: ROS'leri ile etkileşip onlara bir proton ekleyerek aktivite kaybına neden olma (Flavonoidler, vitaminler.)
 - Onarıcı (repair) etki,
 - Zincir kırıcı (chain breaking) etki: ROS'lerini ve zincirleme reaksiyonları başlatacak diğer maddeleri kendilerine bağlayıp zincirlerini kırarak fonksiyonlarını önleyici etki. (Hemoglobin, seruloplazmin, mineraller.)

Toplam antioksidan kapasite tayininde kullanılan yöntemler, oksidan veya yükseltgen olarak prooksidanların kullanıldığı ve kullanılmadığı yöntemler olarak iki temel gruba ayrılmaktadır.

2.2.1. Prooksidanların Kullanılmadığı Yöntemler

2.2.1.1. TEAC (Trolox Eşdeğer Antioksidan Kapasite) Yöntemi

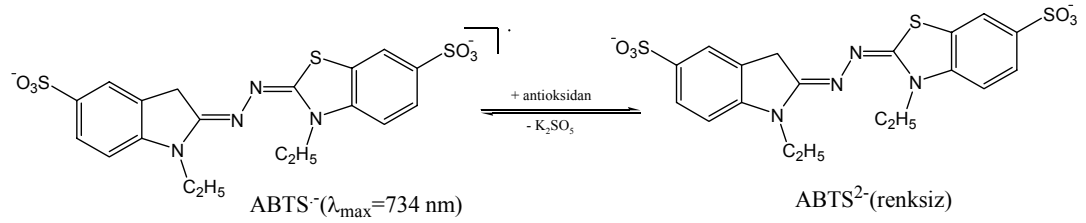
TEAC (Trolox Eşdeğer Antioksidan Kapasite Yöntemi) yöntemi ilk olarak Miller ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Kromojenik bir redoks radikali olan ABTS yüksek bir stabiliteye sahiptir ve sudaki çözünürlüğü oldukça yüksektir. Ayrıca hem suda hem de organik çözücülerde çözüldüğünden hem hidrofilik hem de hidrofobik antioksidan aktivite tayini yapılabilmektedir [13]. Bu radikal H_2O_2 varlığında okside olarak metastabil bir radikale dönüşür. TEAC yöntemi, antioksidan varlığında bu ABTS radikalinin absorbansındaki azalmanın ölçülmesine dayanmaktadır (ΔA). Bu radikal, 645, 734 ve 815 nm'de max. absorpsiyon göstermektedir [14-15]

Orijinal ABTS radikal katyonu, H_2O_2 ile metilmiyoglobinin reaksiyona girmesiyle oluşan ferrilmiyoglobin ile ABTS arasındaki etkileşimden oluşmaktadır. Orijinal TEAC yönteminde, analiz edilen maddenin ABTS radikalini indirgeme yeteneği ölçülmektedir. Ancak analiz edilen bu madde ferrilmiyoglobini de indirgeyebilir. ABTS radikali, oldukça stabil olması nedeniyle, prooksidan değildir.

Re ve arkadaşları tarafından modifiye edilen TEAC yönteminde (ABTS-persulfat) ABTS radikal katyonu, ABTS ile potasyum persülfatın oksidasyonundan oluşmaktadır. Bu radikalın yaklaşık 12-16 h süresince oda sıcaklığında karanlıkta bekletilerek oluşması sağlanmaktadır. Antioksidan bileşikler ABTS radikal çözeltisine ilave edilerek 734 nm'de fark absorpsiyonları ölçülür [16]. Orijinal TEAC yöntemi ile fitokimyasalların antioksidan aktiviteleri hakkında faydalı bilgiler elde edilmiştir. Fakat bazı eksiklikler görülmüştür. TEAC kapasitesi, incelenen antioksidanın 1mM'lık çözeltisinin ABTS radikalinin absorpsiyonunu azaltmada kaç mM trolox çözeltisine eşdeğer davrandığı ile belirlidir.

Uygulanması basit bir yöntem olan TEAC yöntemi birçok araştırma laboratuvarında antioksidan kapasite ölçülmesinde kullanılmıştır ve bir çok bileşiğin ve gıda örneklerinin TEAC değerleri rapor edilmiştir. Saf antioksidan bileşiklerin TEAC katsayıları ile bir antioksidan olarak bu bileşiklerin verebileceği elektron sayısı arasında açık bir korelasyon görülmemektedir. Askorbik asitin TEAC katsayısı (1.05), α -tokoferolünki (0.97), glutatyonun (1.28), ürik asidin ise (1.01) 'dir. Bu değerler yaklaşık olarak aynıdır. Ancak glutatyon normalde okside olurken 1 elektron verebilir. Diğerleri

ise 2-elektron donördür. Ferulik asit (1.90) ve p-kumarik asit (2.00) TEAC katsayılarına sahiptir. Kafeik asit ile ferulik asit benzer kimyasal yapıya sahip olmalarına karşın kafeik asitin TEAC katsayısı (1.00) 'dir. Yine kuarsetin ile kaemferolün benzer yapıda olmalarına karşılık TEAC katsayılarının sırasıyla (3.00)ve (1.00) olması şaşırtıcıdır [17]. Ayrıca ABTS/TEAC yönteminde, ABTS radikal üretimine ve inkübasyon süresine ilişkin stratejilerdeki farklılık nedeniyle farklı araştırmacılar farklı TEAC katsayıları rapor etmişlerdir.



Şekil 1.8: ABTS ile persulfat arasındaki reaksiyon neticesinde oluşan ABTS radikalinin antioksidan bileşik ile etkileşimi

2.2.1.2. FRAP (Demir(III) İndirgeme Antioksidan Gücü) Yöntemi

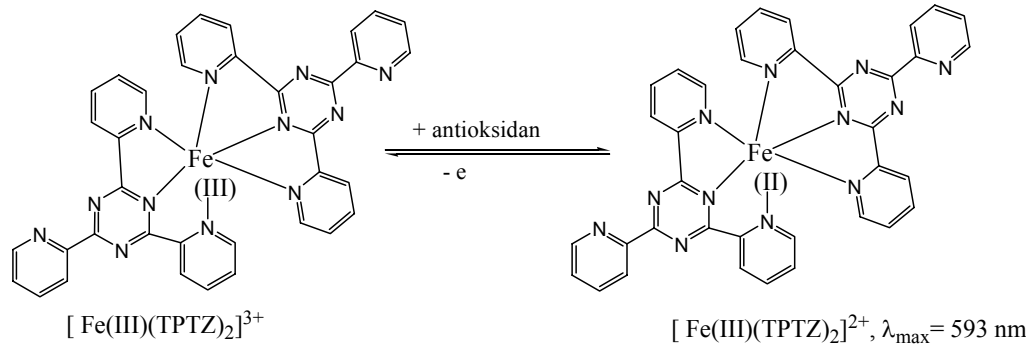
Benzie ve Strain tarafından geliştirilen bu yöntemde, oksidan olarak Fe³⁺ kullanılmaktadır. FRAP yönteminde Fe³⁺'in indirgenmesiyle oluşan Fe²⁺, H₂O₂ ile olan reaksiyonundan dolayı bir prooksidan olabilir. Fe²⁺ ve Fe³⁺ lipid, protein ve nükleik asitlerde direkt oksidatif hasara yol açmaz.

Bu yöntemde Fe³⁺-tripridiltiazin (Fe³⁺-TPTZ) kompleksi, asidik pH ortamında (pH=3.6) indirgen özellik gösteren antioksidan bir madde ile Fe²⁺-tripridiltiazin (Fe²⁺-TPTZ) kompleksine indirgenir. Fe²⁺-TPTZ kompleksi şiddetli bir mavi renk vermektedir. Oluşan bu Fe²⁺-TPTZ kompleksinin 593 nm'de absorbanısı ölçülerek elektron verici antioksidanların indirgeme gücü (ya da kapasitesi) toplam olarak ölçülmektedir [18].

Bir antioksidan prooksidanları indirgeyebilir fakat Fe³⁺'i aynı oranda indirgemeyebilir. Örneğin FRAP yöntemiyle önemli bir in vivo antioksidan olan glutatyon (GSH) ölçülemez [19]. Ayrıca FRAP yöntemi, toplam antioksidan kapasite tayininde kullanılan dolaylı bir testtir.

Orijinal FRAP yönteminde 4 dakika içerisindeki fark absorbans ($\Delta A = A_{4\text{min}} - A_{0\text{min}}$) ölçülmektedir. 1 FRAP birimi, 1 mol Fe(III)'ün Fe(II)'ye indirgenmesi olarak tanımlanmaktadır. Yani TEAC'tan farklı olarak Fe^{2+} -eşdeğer indirgen kapasite kullanılmaktadır. Askorbik asit, α -tokoferol ve ürik asidin FRAP değerleri (2.00)'dir. Bilirubin FRAP değeri askorbik asidinkinden 1 kat daha fazladır. Bu, gerek Vitamin C ve gerekse bilirubin 2 elektron donör olmasıyla çelişmektedir. [20]

Pulido ve arkadaşları bazı polifenollerin (kafeik asit, tannik asit, ferulik asit, askorbik asit ve kuarsetinin) sudaki ve metanoldeki FRAP değerlerini ölçmüşlerdir. Fakat absorpsiyon (A_{593}) 4 dakikada sonlanmamıştır. Yavaş bir şekilde birkaç saat artış sürmüştür [21]. Bu da FRAP yönteminin $-\text{SH}$ bileşiklerine karşı etkisiz kaldığı gözlemiyle birleşince, bazı oksidasyon reaksiyonlarının Fe(III)-TPTZ reaktifi ile tamamlanmadığını düşündürmektedir. Ayrıca FRAP yöntemi, çoğu antioksidanların henüz protonlarını veremediği asidik bir ortamda (pH 3.6'da) yürütüldüğünden, toplam antioksidan kapasitenin bu yöntemle eksik rapor edilmesi olasılığı vardır.



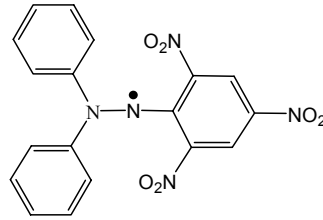
Şekil 1.9: FRAP reaktifi ile antioksidan bileşik arasındaki etkileşim

2.2.1.3. DPPH Yöntemi

Brand-Williams ve arkadaşları tarafından geliştirilen DPPH yönteminde metanol çözeltisi içerisinde stabil bir organik azot radikali olan DPPH[•] (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil) serbest radikali kullanılmaktadır. DPPH yönteminde, antioksidan çözeltisi metanollü DPPH çözeltisine ilave edilir. 515 nm’de absorbans ölçülür. Antiradikal aktivite, başlangıç DPPH[•] radikali konsantrasyonunun %50 oranında azalmasını sağlayan antioksidan madde konsantrasyonu ile verilir (EC₅₀: %50 eşdeğer konsantrasyon)[22]. EC₅₀ konsantrasyon ile kararlı hale (steady state) ulaşmak için gerekli zaman, kinetik eğriden bulunur ve T_{EC50} olarak adlandırılır. DPPH radikali ABTS radikalinden farklı olarak direkt hazırlanır ve sadece alkollü ortamda çözülmektedir. Bu da hidrofilik antioksidanların yorumlanmasında önemli bir kısıtlama getirmektedir [13].

DPPH yöntemi teknik olarak basit olmasına karşın bazı dezavantajları bulunmaktadır. Birçok antioksidan bileşik lipid peroksidasyonunda rol oynayan peroksil radikalleri ile çok hızlı tepkime vermektedir, ancak DPPH ile yavaş tepkime vermektedir. Örneğin askorbik asit ile 1.15 dakika ve rutin ile 103 dakikada tepkime vermektedir. Sonuç olarak antioksidan kapasiteler arasında uygun bir oran yoktur. DPPH ile antioksidan bileşiği arasındaki reaksiyon kinetiği, DPPH konsantrasyonu ile bir lineerlik göstermemektedir [20].

DPPH yöntemi, hidrojen atomu transfer reaksiyonunun olduğu bir yöntem olarak bilinmekteydi. Ancak Foti ve arkadaşları gerçekte elektron transfer reaksiyonu içerdiğini göstermişlerdir. Burada fenoksid anyonundan DPPH’ya hızlı bir elektron transfer prosesi gerçekleşmektedir [23].



Şekil 1.10. DPPH reaktifi

2.2.1.4. Döngülü Voltametrik Yöntem (CV)

Kohen ve arkadaşları tarafından geliştirilen döngülü voltametrik yöntemde düşük molekül ağırlıklı antioksidanların indirgeme gücü tayin edilmiştir [24-25]. Bu yöntemde örnek, üç elektrotlu bir hücre içerisine yerleştirilir. Çalışma elektrodu olarak cam karbon elektrodu, referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrodu ve yardımcı (karşılaştırma elektrodu) elektrot olarak ise platin elektrot kullanılmıştır. Tarama hızı 100mV/s'dir. Tarama süresince potansiyel-akım eğrilerinden voltamogramlar çizilir. Bir örneğin indirgeme gücü (antioksidan gücü) iki parametreden oluşmaktadır.

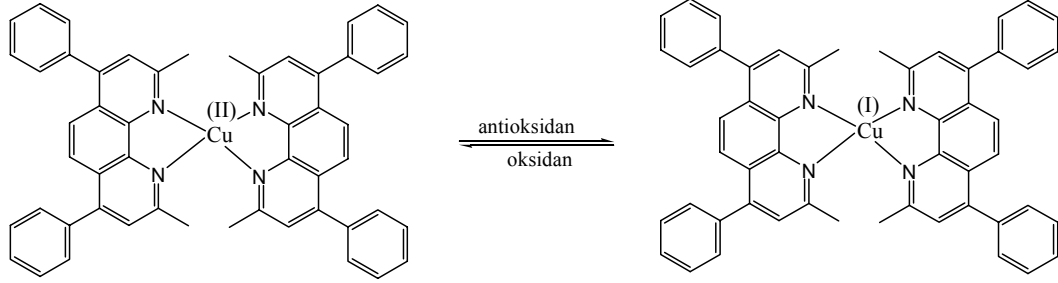
- Pik potansiyeli [$E_{p(a)}$]
- Anodik akım (Anodic current, AC)

$E_{p(a)}$, her bir anodik dalgada (AW) akımın yarısı kadar artması için gerekli potansiyel olarak ölçülür ve $E_{1/2}$ olarak gösterilir. $E_{1/2}$ değeri indirgen maddeler arasındaki korelasyonu göstermektedir. $E_{1/2}$ değerinin düşük olması, test edilen bileşiklerin çalışma elektroduna elektron verme yeteneğinin yüksek olmasını ifade etmektedir. AC ise her bir anodik dalga için y ekseninden ölçülür ve indirgenlerin konsantrasyonları ile ilişkilidir.

Ancak bu yöntemde, bütün antioksidan bileşikler çalışma elektrodu olan cam karbon elektroda yeterli hızda elektron veremez. Örneğin tiyol bileşiklerinden GSH cam karbon elektrot ile dedekte edilemez. GSH tayini için çalışma elektrodu olarak Au/Hg elektrodu gereklidir. CV yönteminde duyarlılık nispeten düşüktür (1-10 μ M) [24].

2.2.1.5. Oksidan Olarak Cu(II)'nin Kullanıldığı Toplam Antioksidan Kapasite Yöntemi

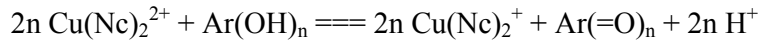
Bu alanda yayınlanmış çok az bilgi vardır. Bir endüstriyel laboratuvar, antioksidan varlığında Cu(II)'nin Cu(I)'e indirgenmesini toplam antioksidan potansiyelin bir ölçüsü olarak değerlendirmektedir [26]. Ancak yöntem, uluslararası bir dergi makalesi olarak yayınlanmamıştır. Bu yöntemde, kromojenik bir reaktif olan batokuproin (2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolin) ile Cu(I) arasındaki 2:1 oranındaki kompleksin absorbansı 490 nm'de ölçülmektedir.



Şekil 1.11: Cu(II) reaktifi ile antioksidan bileşik arasındaki reaksiyon

Cu^{2+} redüksiyon kapasitesine dayalı toplam antioksidan kapasite ölçüm yöntemlerinden güncel ve önemli olanı CUPRAC yöntemidir. Kromojenik bir redoks reaktifi olan bis(neokuproin)-bakır(II) klorürü kullanan CUPRAC yöntemi (CUPRAC: Bakır(II) indirgeyici antioksidan kapasite) ile hem hidrofilik hem de lipofilik TAC kolaylıkla tayin edilebilmektedir. Bu yöntemde sırasıyla Cu(II) klorür çözeltisi, %96'lık etil alkolde hazırlanmış neokuproin çözeltisi, amonyum asetat tamponu (pH=7) ilavelerinden sonra belirli oranlarda seyreltilmiş olan analiz çözeltilerinden son çözelti hacmi 4.1 mL olacak şekilde ilave edilip oda sıcaklığında ½ h süre sonunda 450 nm'de reaktif körüne karşı absorbans değerleri ölçülmektedir.

Yeni geliştirilen CUPRAC yönteminde kullanılan kromojenik oksidasyon reaktifi olan bis(neokuproin)-bakır(II) klorür ile antioksidan polifenol arasındaki reaksiyon aşağıdaki şekilde gerçekleşmektedir.



Bu reaksiyonda, Ar(=O)_n , hidroksi grubu içeren antioksidan polifenolden oluşan kinonu ifade etmektedir. Tepkime sonunda 2 proton açığa çıkmakta ve Ar(OH)_n grubu antioksidan bileşikler kinon formlarına dönüşmektedir. Cu(II)-Nc ise 450 nm'de maksimum gösteren şiddetli renk oluşumuyla birlikte Cu(I)-Nc kelatına dönüşmektedir. Bu reaksiyonda, n-OH grubu içeren antioksidan karakterli beleşikler, 2n-e donör olarak hareket etmektedir [27].

İ.Ü. Mühendislik Fakültesi, Kimya Bölümü, Analitik Kimya Anabilim Dalında daha önce biyolojik bakımdan önemli indirgenler [28]; sistein [29], vitamin E [30], vitamin C [31] için geliştirilen spektrofotometrik bakır(II)-neokuproin (2,9-dimetil-1,10-

fenantrolin) reaktifi, tek tek bileşikler için değil bir toplu tayin reaktifi şeklinde güncel ve önemli bir TAC ölçüm yöntemi olan CUPRAC yönteminde kullanılarak literatürdeki diğer yöntemlerin meydana getirdiği açığı büyük oranda kapatmıştır. Bu reaktif hem suda, hem de yağda çözünen antioksidan bileşikleri fizyolojik pH koşullarında indirgeyerek renkli bakır(I)-neokuproin kelat kompleksine dönüşebilmektedir.

2.2.2. Prooksidanların Kullanıldığı Yöntemler

2.2.2.1. ORAC (Oksijen Radikali Absorbans Kapasitesi) Yöntemi

Orijinal ORAC yöntemi Cutler ve Cao tarafından geliştirilmiş ve ilk versiyonunda β -phycoerythrin (β -PE, floresan protein) prob olarak kullanılmıştır [32]. Peroksil radikal üretici olarak AAPH veya hidroksil radikal üretici olarak Cu^{2+} - H_2O_2 kullanılmıştır. β -PE'nin floresansındaki azalma β -PE'nin peroksil radikaliyle reaksiyonunun bir göstergesidir. Sonuç olarak bu floresansdaki azalma ölçülerek toplam antioksidan kapasite ölçülmektedir.

Huang ve arkadaşları yöntemi modifiye ederek probu değiştirmiş ve Fluorescein (FL) kullanmıştır. Trolox ile FL çözeltileri karıştırılıp 37 °C'de inkübe edilir ve AAPH ilavesiyle reaksiyon başlatılır. Floresans şiddeti [485 nm(ex)/525 nm(em)] 35 dakikaya kadar her bir dakika için ölçülür. Reaksiyon süresince FL tükenir ve floresans şiddeti azalır. ORAC yönteminde eğri altındaki alan (AUC) ve net AUC ($\text{AUC}_{\text{örnek}} - \text{AUC}_{\text{boş}}$) hesaplanır. Troloks konsantrasyonu ile net AUC arasında grafik çizilir ve standart eğri kullanılarak örneğin trolox ekivalenti olarak aktivitesi hesaplanır. ORAC yönteminde AUC tekniği kullanılarak gecikme zamanından kaynaklanan deneysel hatalar giderilmiştir [33].

ORAC yöntemi birçok farklı laboratuarda kullanılmaktadır. Bu yöntemle değişik biyolojik örneklerin, melatoninin, dopaminin, flavonoidlerin, çay, meyve sebzeler gibi kompleks matrislerin, herbal karışımların ve hayvan dokularının antioksidan kapasitesi hakkında önemli bilgiler edinilmiştir.

2.2.2.2. TRAP (Toplam Radikal Tutma Parametresi) Yöntemi

Toplam antioksidan kapasite yöntemlerinin çoğunda bir prooksidan hatta oksitlenebilir bir substrat kullanılmaktadır. Prooksidanlar substratta oksidatif hasara yol açmaktadır. Antioksidan aktivite, patolojik önemi olan prooksidan ve reaktif türlerinin bir madde tarafından indirgenme yeteneğidir. Wayner ve arkadaşları tarafından geliştirilen TRAP yönteminde 2,2'-azobis-(2-amidinopropan) diklorür ve plazma veya diğer biyolojik sıvılara ilave edilen peroksitlenebilir maddelerden oluşan peroksil radikalleri kullanılır [34]. Plazmaya AAPH ilave edildikten sonra, reaksiyon süresince tüketilen oksijenin ölçülmesiyle oksitlenebilir maddelerin oksidasyonu tayin edilir. İndüksiyon periyodunun uzunluğu (lag phase) bir iç standart olan Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) ile karşılaştırılır ve kantitatif olarak plazmanın antioksidan kapasitesi troloks eşdeğeri cinsinden hesaplanır.

Wayner ve arkadaşları tarafından yöntem modifiye edilerek; peroksil radikali ile oksidasyon başlamadan önce plazmaya linoleik asit ilave edilmiştir. Fakat bu yöntemde oksijen elektrodu stabilitesini koruyamamaktadır [35].

- *Luminol Yöntemi*

Alho ve Leinonen'in geliştirmiş olduğu bu yöntemin temelini kemilüminesans-TRAP yöntemi oluşturmaktadır. AAPH bileşiğinden elde edilen peroksil radikalleri substrat olarak kullanılan luminol ile oksidasyonu sonucu ışık yayan luminol radikalleri oluşur. Oluşan bu ışık luminolmetre denilen cihazlarla ölçülür. Örnekteki antioksidanlar kemilüminesans ışımalarının oluşumunu belli bir zaman için engeller (gecikme zamanı). Gecikme zamanı örnekteki toplam antioksidan potansiyeli ile doğru orantılıdır ve elde edilen bu sonuçlar troloks ekivalenti cinsinden hesaplanmaktadır [36].

- *DCFH-DA (Diklorofloresin-diasetat) Yöntemi*

Valkonen ve Kuusi'nin geliştirdiği yöntemin temelini TRAP yöntemi oluşturmaktadır [37]. Bu yöntemde, AAPH peroksil radikali üreticisi olarak kullanılmakta ve DCFH-DA ise yükseltgenebilir substrat olarak kullanılmaktadır. Peroksil radikali ile DCFH-DA arasındaki oksidasyon reaksiyonu sonucu oluşan DCF (Diklorofloreseyn) yüksek

floresans özelliğe sahiptir. DCF, 480 nm'de uyarılıp 526 nm'de emisyon yapmaktadır. Ayrıca 504 nm'de maksimum absorpsiyon göstermektedir. Hem floresans yöntemi hem de spektrofotometrik yöntem kullanılarak DCF miktarı ve buna bağlı olarak değişen toplam antioksidan kapasite hesaplanır. Bu yöntemde toplam antioksidan kapasite şu şekilde hesaplanmaktadır. İlk olarak örnek içerisindeki antioksidanların kapasitesi gecikme cinsinden hesaplanır. Daha sonra aynı örnek üzerine troloks çözeltisi ilave edilir. İlave edilen troloks miktarı serbest radikaller tarafından tüketildikten sonra 2. gecikme zamanı hesaplanır. Bu iki gecikme arasındaki farktan yararlanılarak troloks cinsinden toplam antioksidan kapasitesi hesaplanır [37].

- *TOSC (Toplam Oksiradikal Uzaklaştırma Kapasitesi) Yöntemi*

Winston ve arkadaşları tarafından geliştirilen bu yöntemde AAPH'tan oluşan peroksil radikalleri, α -keto- γ -metilbutirik asiti (KMBA) etilene yükseltger. Head space cihazında toplanan etilen gazı, gaz kromatografisi ile ölçülür [38]. Oluşan etilen gazının örnekteki antioksidan miktarına bağlı olarak azalışı ölçülür ve örneğin toplam antioksidan kapasitesi aşağıdaki şekilde hesaplanır.

$$TOSC=100- (\int SA/ \int CA \times 100)$$

SA: Örnek reaksiyon alanı,

CA: Kontrol reaksiyon alanı

Burada KMBA'nın aşırısı kullanılmalıdır ki antioksidanlar tüketildikten sonra doğrusal bir artış gözlemlensin.

- *Fikoeritrin (PE) Yöntemi*

Ghiselli ve arkadaşlarının geliştirdiği bu yöntemde yine AAPH, peroksil radikal üretici olarak, Cu^{2+} -askorbat bileşiği ise hidroksil radikal üreticisi olarak kullanılmıştır. Yükseltgenabilir substrat olarak B-PE ve R-PE kullanılmıştır [39].

Bu iki bileşiğin peroksil veya hidroksil radikalinin varlığında göstermiş olduğu floresansın zamanla lineer olarak değiştiği gözlenmiştir. Bir örnekteki antioksidanların, peroksil veya hidroksil radikallerine karşı sağladığı toplam koruma süresi trolox cinsinden sağladığı toplam koruma süresi ile kıyaslanarak toplam kapasite hesaplanır.

Ghiselli'nin yapmış olduğu çalışmada R-PE floresansındaki azalmanın, başlangıç floresansının %80'i sönüme uğrayana kadar zamanla lineer olarak azaldığı gözlemlenmiştir.

- *Krosin Yöntemi*

Tubaru ve arkadaşlarının geliştirdiği bu yöntemde kinetik parametreler kıyaslanarak plazma içerisindeki antioksidan kapasite ölçülür [40]. Bu yöntemin temeli AAPH bileşiğinden elde edilen peroksil radikalleri ile krosinin yükseltgenme reaksiyonuna dayanmaktadır. Krosinin, peroksil radikalleri ile antioksidan bileşikler olmadığı durumdaki reaksiyon hızı (V_0) ve antioksidan bileşikler olduğu durumdaki hızı (V) 10 dakika süresince ölçülür. Bu ölçülen hızların oranı (V_0/V) absis eksenini, $[A]_{\text{Antioksidan}}/[C]_{\text{Krosin}}$ ordinat eksenini oluşturacak şekilde grafik çizilir. Bu grafiğin eğimi k_a/k_c hız sabitleri oranıdır. Bulunan k_a/k_c oranları troloksun hesaplanan k_a/k_c oranına bölünerek troloks cinsinden antioksidan aktivite hesaplanır.

Troloks, askorbik asit gibi bazı antioksidanlar varlığında krosinin peroksil radikaliyle etkileşim süresi tam olarak hesaplanamamaktadır. Ayrıca bu yöntemde askorbik asitin troloks eşdeğeri (7.70) bulunmuştur. Bu da diğer yöntemlerle elde edilen sonuçlardan çok yüksektir.

2.3. MEYVE SUYU TANIMLARI VE ÖZELLİKLERİ [41]

(Türk Gıda Kodeksi Alkolsüz İçecekler Tebliği, Resmi Gazete:11.08.2001-24490, Tebliğ No: 98/24)

2.3.1. Meyve Suyu Tanımları

- **Gazlı içecek;** karbondioksit ile gazlandırılmış olan meyveli, aromalı, kola, tonik gibi içeceklerdir.
- **Meyveli içecek;** meyve suyu, meyve püresi veya bunların konsantresinden içilebilir özellikteki su, şeker, diğer bileşenler ve izin verilen katkı ve aroma maddeleri ile tekniğine göre gazlı veya gazsız olarak hazırlanan içecektir. Gazlı olanları, meyveli gazoz olarak da adlandırılabilir.

- **Aromalı içecek;** içilebilir özellikteki su, Şeker, diğer bileşenler ve izin verilen katkı ve aroma maddeleri ile veya aromalı Őurubun sulandırılması ile tekniğine göre gazlı veya gazsız olarak hazırlanan ve ihtiva ettiği aroma veya aroma karışımı ile adlandırılan içecektir. Gazlı olanı aromalı gazoz olarak da adlandırılabilir.
- **Kola içeceği;** içilebilir özellikteki su, Şeker, kafein, diğer bileşenler ve izin verilen katkı maddeleri ve kendine özgü aroma maddeleri ile tekniğine göre hazırlanan ve karbondioksit ile gazlandırılmış olan içecektir.
- **Tonik içeceği;** içilebilir özellikteki su, Şeker, kinin ve/veya narincin, diğer bileşenler ve izin verilen katkı ve aroma maddeleri ile tekniğine göre hazırlanan ve karbondioksit ile gazlandırılmış olan içecektir.
- **Meyveli Őurup;** meyve suyu, meyve pulpu veya bunların konsantresinden Şeker, diğer bileşenler, izin verilen katkı ve aroma maddeleri ile tekniğine göre hazırlanan ve su ile seyreltilerek meyveli içecek hazırlanmasında kullanılan konsantre üründür.
- **Aromalı Őurup;** Şeker, diğer bileşenler, içilebilir özellikteki su, izin verilen diğer katkı ve aroma maddeleri veya aroma maddeleri ve meyve suyu karıŐımları ile hazırlanan ve aromalı içecek hazırlanmasında kullanılan koyu kıvamlı üründür.
- **İçecek tozu;** Şeker, meyve suyu, diğer bileşenler, izin verilen katkı ve aroma maddeleri ile tekniğine göre hazırlanan ve su ile seyreltilerek veya infüze edilerek meyveli veya aromalı içecek hazırlanmasında kullanılan toz üründür.

2.3.2. Meyve Sularının Özellikleri

Bu Tebliğ kapsamındaki ürünlerin özellikleri aşağıdaki gibidir:

- Alkolsüz içecekler tiplerine özgü tat, koku, renk ve görünüşte olmalı, yabancı tat ve koku içermemelidir.
- Gazlı içeceklerin karbondioksit miktarı en az 2 g/L olmalıdır.
- Kola içeceğinde kafein miktarı en çok 150 mg/L, tonik içeceğinde kinin miktarı (sülfat tuzu olarak) en çok 90 mg/L olmalıdır.
- Meyveli şurupta refraktometrik katı madde miktarı en az % 60 ve tüketime hazır durumdaki ürünün özellikleri meyveli içeceğin özelliklerine uygun olmalıdır.
- Aromalı şurupta refraktometrik katı madde miktarı en az % 60 ve tüketime hazır durumdaki ürünün özellikleri aromalı içeceğin özelliklerine uygun olmalıdır.
- İçecek tozu soğuk veya sıcak suda çözülmeli, tüketime hazır durumdaki ürünün özellikleri meyveli veya aromalı içeceğin özelliklerine uygun olmalıdır.
- Sofra içeceğindeki mineral madde miktarı en çok 2 g/L, yapay sodadaki mineral madde miktarı en az 600 mg/L olmalıdır.
- Alkolsüz içeceklerin hazırlanmasında şeker olarak sakkaroz, glukoz, fruktoz, glukoz şurubu, fruktoz şurubu veya invert şeker şurubu kullanılabilir.
- Alkolsüz içeceklerin hazırlanmasında şeker yerine veya şeker ile birlikte tatlandırıcı kullanılabilir.
- Alkolsüz içecekler; vitamin, mineral ve diğer besin öğeleri ile zenginleştirilebilir.
- Alkolsüz içeceklerde etil alkol miktarı en çok 5.0 g/L, laktik asit miktarı en çok 0.6 g/L, uçucu asit miktarı en çok 0.4 g/L olmalıdır.
- Meyveli gazozda meyve suyu veya püresi ağırlıkça en az % 4, gazsız meyveli içeceklerde ise en az % 10 olmalıdır [41]

2.3.3. Meyve Sularının Faydaları

Meyve suları ve nektarlar elde ediliş yöntemlerine ve elde edildikleri meyvenin özelliklerine bağlı olarak farklı oranlarda besin bileşenleri içerirler. Elde edilen meyvenin tipik renk, tat, koku özelliklerini gösterirler. Bu nedenle meyve suyu ve nektarlar, meyveli içeceklere kıyasla daha doygunluk verir.

Meyve suları doğal olarak fruktoz denilen meyve şekeri içerirken nektar ve meyveli içeceklerde sonradan eklenmiş şeker bulunur. Eklenen şeker miktarına bağlı olarak meyve suları nektar ve meyveli içeceklerin 1 porsiyonundaki kalori miktarları farklı olabilir.

Meyve suları, nektar ve meyveli içeceklerin besin değerleri, elde edildikleri meyveye bağlantılı olarak değişebilir. Meyve suları fitokimyasallar açısından da zengindir. Fitokimyasallar sağlığın korunması ve devamlılığı üzerine olumlu etkide bulunan besin bileşenleridir. Örneğin portakal suyunun doğal olarak 60'dan fazla fitokimyasal içerdiği bilinmektedir. Bu öğelerin çoğu fenolik bileşikleridir. Fenolik bileşikler turunçgiller, elma, armut, üzüm, şeftali, çilek, kiraz, vişne ve erikte bulunur.

Fenolik bileşiklerin sağlık üzerine olumlu etkilerinin antioksidan etkinliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Besin bileşeni olarak fenolik bileşikler, insan sağlığı açısından işlevleri, tat ve koku oluşumundaki etkileri, renk oluşumu ve değişimine katılmaları, antimikrobiyal ve antioksidatif etki göstermeleri gibi bir çok açıdan önem taşımaktadır [42].

- **Elma Suyu**

Yüzde yüz elma suları ilave şeker içermez, bu nedenle enerji değerleri daha düşüktür. Potasyumdan zengindir. Flavanoidlerden kuarsetin gibi güçlü bir antioksidanı içermektedir. Araştırmalarda kuarsetin ve diğer flavanoidlerin hücrel oksidatif hasarı önleyici potansiyel bir etkisi olduğu, bu etkinliği ile ekosanoid biyosentezini modifiye ettiği (antiprostanoid ve aniinflammatuar yanıt), LDL oksidasyonunu önlediği (aterosklerotik plak oluşumunu engelleyici etki), platelet agregasyonunu önleyici (antitrombotik etki), antihipertensif ve antiaritmik etki gösterdiği ileri sürülmüştür. Ayrıca flavonoidlerin antikanser ve antiviral özellikler gösterdiği de belirtilmiştir.

- **Portakal Suyu**

C vitamini açısından çok zengindir. Portakal suyundaki flavanoidlerin C vitaminiyle birlikte bağışıklık sistemini güçlendirdiği belirtilmiştir. Bir bardak portakal suyu 132 kcal içerir ve günlük C vitamini gereksiniminin %30'unu karşılar. Potasyum ve folik asit için iyi bir kaynaktır. Yapılan çalışmalar portakal suyunun oksidatif stresi azalttığını, LDL-kolesterol ve platelet agregasyonunun aterosklerotik modifikasyonunu önlediğini, HDL-kolesterol derişimi yükselttiğini göstermektedir.

- **Kayısı suyu**

Kayısı suyu potasyum, folik asit ve A vitaminine dönüşebilen karotenoidlerden özellikle beta karoten açısından zengindir. Bir bardak kayısı suyu 117 kcal içerir ve günlük A vitamini gereksiniminin 1/3'ünü karşılar. Havuç, şeftali ve mango suları da karotenoidlerden zengindir.

Yapılan çalışmalar, karotenoidlerin antioksidan özellikler gösterdiğini, lipid peroksidasyonu, ateroskleroz, DNA oksidasyonu ve kansere karşı potansiyel koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir.

- **Üzüm Suyu**

Bir bardak üzüm suyu 125 kcal içerir. Potasyum, C vitamini, folik asit ve polifenollerden zengindir. Üzüm suyu polifenoller; flavonoidler ve antosiyaninlerdir. Yapılan çalışmalar bu bileşiklerin yüksek antioksidan etkinliklerine bağıntılı olarak LDL oksidasyonunu azalttığını göstermektedir.

- **Nar suyu**

Nar suyu, yüksek oranda hidrolizlenebilen tanninleri (özellikle ellacitaninler:gallik asit ve ellacik asit) içermektedir. Ayrıca yapısında antosiyaninler (siyanidin, delfinidin, pelargodin) ve fenolik asitler (ellacik asit, kaffeik asit ve klorojenik asit) fazla miktarda bulunmaktadır. Düzenli olarak günlük nar suyu tüketimi CAS (carotid artery stenosis) açısından insanlar için yararlıdır. Nar suyu LDL oksidasyonunu azaltarak ve PON 1(lipid peroksidazları indirgeyebilen, dolayısı ile oksidatif stresi azaltan HDL-bağıntılı bir enzimdir) aktivitesini artırmak suretiyle yüksek antioksidan aktivite göstermektedir. Nar suyunun, tüketimini izleyen bir yıl süre sonunda sitolik kan basıncını da önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur [43].

- **Vişne suyu:**

Vişne suyunda bol miktarda A ve C vitaminleri ile elma ve limon asitleri bulunur. Ferahlatıcı ve serinletici etkisi çok yüksek olan bir meyve suyudur. Ateşli hastalıklardan sonra asitleşen kanı temizler. Susuzluğu giderdiği gibi, vücutta biriken fazla suyun dışarı atılmasında da etkin rol oynar. Mide ve karaciğerin düzenli olarak çalışmasını sağlar.

- **Şeftali suyu:**

A, B ve C vitaminleriyle, β -karoten içeren şeftali suyu, sağlıklı beslenme alışkanlığına sahip olan insanların tercih ettiği temel gıdalardan biridir. Vücutta A vitaminini oluşturan temel madde olan β -karoten, şeftalide çok miktarda bulunur. Gribe karşı vücudun savunma mekanizmasını güçlendirir. Antioksidan özelliğiyle toksik maddelerin vücuda vereceği zararları önler. Sinir sistemi üzerinde olumlu etki yapar, uykusuzluğu giderir. Doğal yollarla hazmı kolaylaştırarak sindirim sistemine yardımcı olur. Gece körlüğünü önleyici özelliğe sahiptir.

- **Limon suyu:**

Limon suyunun bileşiminde organik asitler (sitrik asit), şekerler, pektin, C vitamini (100g özsuda 60-65 mg) A, B1 ve B2 vitaminleri bulunur. Suyunda bolca bioflavonid bulunur ve vücuttan toksinlerin atılmasında en önemli rolü oynar. Her gün limon suyu içmek isteyenler için 220 g veya yarım limon suyu yeterlidir. Böbrek tıkanıklığını giderir, böbrek taşlarının düşmesine yardım eder. Kanı temizler ve sulandırır. Tansiyonu düşürür. Kalbi kuvvetlendirir, içe ferahlık verir. Mideyi kuvvetlendirerek, hazmı kolaylaştırır. Mide barsak ve idrar yollarını temizler. Baş dönmesini durdurur. Bir su bardağı kahve içine sıkılan bir limon suyu içilebilir. Mide bulantısını keser, ağız kokusunu giderir. Karaciğer için çok yararlıdır. Harareti ve ateşi önler. Sıcak içilirse ter söktürür. Romatizma ve ishalde kullanılır. Spazmlara karşı koruyucudur. Gıda zehirlenmelerini önler. Zehir birikimini dağıtır. Zehirli hayvan sokmalarına karşı panzehirdir. Kabukları veya çekirdeği yenir. Diş etlerini kuvvetlendirir; dişleri beyazlatır.

2.3.4. Meyve Suyu ve Beslenmede Dikkat Edilecek Hususlar

Çocuklar ve gençlerde meyve suyu tüketimini; günde her biri 180 g olan 2 porsiyonla (360 g) veya önerilen günlük meyve tüketiminin yarısıyla sınırlandırmak uygun olur. Posa alımının yararı düşünüldüğünde, meyve tüketimi de teşvik edilmelidir.

Aşırı miktarda meyve suyu tüketimi ve ona bağlı olarak ortaya çıkan enerji alımı, obeziteye neden olabilir. Bir araştırmada, günde 360 g'dan fazla meyve suyu içilmesiyle obezite arasında bir bağ olduğu bulunmuş, ancak başka araştırmalarda bol miktarda meyve suyu tüketen çocukların daha az meyve suyu tüketen çocuklardan daha uzun boylu oldukları ve beden kitle indekslerinin düşük olduğu ortaya çıkarılmıştır, ya da büyüme parametreleriyle meyve suyu tüketimi arasında bir bağ bulunmamıştır. Bu ilişkinin tanımlanabilmesi için daha ileri çalışmalar yapılması önerilmiştir.

- Meyve suyu, 6 aydan küçük bebeklere hiçbir besleyici yarar sağlamaz.
- Meyve suyu katılmış içecekler, besin değeri açısından meyve suyunun eşdeğeri değildir.
- Meyve suyu ve meyve suyundan elde edilen içeceklerin, dehidrasyon ya da diyare tedavisi için kullanılması uygun değildir.
- Meyve suyunun aşırı tüketimi, malnütrüsyonla (aşırı beslenmeyle ya da yetersiz beslenmeyle) ilişkilendirilebilir.
- Meyve suyunun aşırı tüketimi; diyare, diş çürümesiyle ilişkilendirilebilir.
- Pastörize edilmemiş meyve suyu, ciddi rahatsızlıklara neden olabilen patojenler içerebilir.
- Çocuğun yaşına uygun miktarda verilen çeşitli meyve suları, herhangi bir belirgin klinik semptomu neden olmaz.
- Kalsiyumla zenginleştirilmiş meyve suları ve/veya meyveli içecekler, vücut tarafından iyi kullanılabilir bir kalsiyum kaynağıdır, ama anne sütünde, bebek maması formülünde ya da inek sütünde bulunan başka besleyicileri içermez.

2.3.5. Meyve Sularında Ambalajın Önemi

Günümüzde hızlı bir şekilde gelişen ambalaj teknolojisi özellikle gıda sektörü için son derece önem arz etmektedir. Gıdaların çevresel etkiler altında kolayca bozunması, raf ömürlerinin çok kısa olması, ambalajların gıdayı koruyucu, raf ömrünü uzatan özelliklere sahip olmasını gerektirmektedir.

Market raflarında gördüğümüz meyve sularının bir kısmı, son derece hijyenik modern bir üretim teknolojisi kullanılarak içine salmonella, e-coli, listeria gibi hastalık yapan patojen mikroorganizmaların sızmasını önleyerek bir yıla kadar raf ömrü sağlayan, aseptik ambalajlarda tüketiciye ulaştırılmaktadır.

Aseptik paketlenme, paketlenme malzemesinin önceden sterilize edilerek üzerinde muhtemel tüm mikroorganizmaların yok edilmesi, sterilize edilmiş bu paketlerin içine pastörize edilmiş meyve suyunun, yine sterilize bir ortamda doldurulması ve dolu seviyesinin altında ambalajların kapatılması olarak tanımlanır.

Yaklaşık 30 s süreyle 98 dereceye kadar sıcaklığa tabi tutulan (pastörize edilen) ve hemen ardından 20 dereceye soğutulan meyve suyu, nektar ya da meyveli içecek, ışık, hava ve bakterilerden arındırılmış , steril ortamlarda ambalajlara doldurulur. Bu sade ürünün içindeki besin değerlerini ve doğallığını kaybetmeden uzun süre korunması sağlanmış olur.

Aseptik paketlenme sayesinde ürünün içine mikroorganizmaların sızması, üremeye neden olan oksijenin girişi de engellenmektedir.

Aseptik ambalajın en önemli özeliği, ileri teknolojiyle üretilmiş 6 ince tabaka ve bu tabakaların oluşturduğu katmanlı yapının, ambalajın içindeki ürünü ışığın ve havanın olumsuz etkilerine karşı korumasıdır. Işık ve hava etkisinin ortadan kaldırılması meyve suları, gıdalar içinde bulunan C vitamini, B2 vitamini gibi besin öğelerinin korunması için çok önemlidir.

2.3.6. Meyve Suyu ve Konsantresi Türkiye'nin Dış Ticareti, İhracat

Türkiye, sahip olduğu üretim alanı ve ekolojik yapısı itibariyle yaş meyve üretiminde dünyanın önde gelen ülkelerinden biri konumundadır. Bu durum, Türk meyve suyu sektörü için de önemli avantajlar sağlamaktadır. Türkiye'nin meyve suyu ve konsantresi ihracatı 1970 yılında 6 ton gibi sembolik bir miktarla başlamış ve hızlı bir artışla 2003

yılında en yüksek seviyesi olan 84,8 bin tona ulaşmıştır. 2003 yılı ihracatı değer olarak bir önceki yıla göre %100 oranında artış göstermiştir [44].

Tablo 1.2: Türkiye'nin Yıllar İtibariyle Meyve Suyu ve Konsantresi İhracatı (Miktar: kg, Değer: ABD \$)

ÜRÜN	2001 M	2001 D	2002 M	2002 D	2003 M	2003 D
Dond.Portakal Suyu	375498	275563	212682	150087	76055	36397
Diğer Portakal Suları	1579029	704785	2224592	1021777	7360562	3247621
Greyfurt Suyu	600	432	15342	24000	31035	22333
Diğer Narenciye	568364	298236	831115	483404	911661	682705
Ananas Suyu	42637	17646	120357	47072	268703	124481
Domates Suyu	332790	215381	732635	448163	761458	499169
Üzüm Suyu	1570736	817963	981522	623152	2157027	1021638
Elma Suyu	48943902	30812996	32707137	22264675	42924731	33701963
Diğer Meyve ve Sebze Suları	17205419	12237813	15767391	10451634	27645350	31765504
Karışık Meyve Suları	723780	446513	1684855	806286	2670733	1482366
TOPLAM	71342755	45827328	55277628	36320250	84808115	72584177

Kaynak: DTM EBİM Kayıtları

Türkiye'nin meyve suyu ve konsantresi ihracatında en önemli kalem elma suyudur. Elma suyunun, 2002 yılı toplam meyve suyu ve konsantresi ihracatındaki payı %61 düzeyindeyken, 2003 yılında bu pay %46.4 düzeyinde olmuştur. Elma suyu başta Almanya olmak üzere Hollanda, Avusturya ve İtalya gibi çeşitli ülkelere ihraç edilmektedir. Türkiye'nin elma suyu ihracatındaki en büyük pay AB ülkelerine aittir.

2.3.7. Enerji İçecekleri

Enerji içecekleri fiziksel direnç ve fiziksel performansı artırmak amacıyla içilen içeceklerdir. Bazı enerji içecekleri elit atletler için üretilmekte, ancak büyük bir çoğunluğu normal halk için üretilmekte ve satılmaktadır. Enerji içeceklerinin ana bileşenleri: kafein, taurin ve glukuronolaktondur. Bazı yeni içecekler ise opium poppy

seed ekstraktı veya efedrin içermektedir. Enerji içecekleri yüksek oranda kafein içermesi nedeniyle tüketiminde dikkat edilmesi gerekli olan içecekler arasında yer almaktadır. Kafein özellikle bağışıklık sistemini olumsuz yönde etkilemektedir [45].

Tablo 1.3: Bazı popüler enerji içeceklerinin ve soft içeceklerin (meşrubatların) kafein miktarları [45]

İçecek (250mL)	Kafein içeriği
Impulse	88 mg
Red Bull	80 mg
Naughty boy	80 mg
“ V “	78 mg
Coca cola	48.75 mg
Diet coke	48 mg
Diet coke caffeine- free	2 mg
Pepsi	40 mg
Diet pepsi	44 mg
Pepsi max	44 mg

2.4. ÇAYLAR

Dünyada en popüler içecek olan çay *Camelia sinensis* yapraklarından hazırlanmaktadır. Çayın bileşenleri mevsimle, yaprağın yaşıyla, iklimle ve yetiştirme tarzıyla değişir [46].

2.4.1. Çayın Sınıflandırılması [47]

Çay ilk olarak Çin’de keşfedilmiştir. Çaylar başlıca üç şekilde sınıflandırılır: yeşil (mayalanmış), oolong (yarı mayalanmış), siyah (tamamen mayalanmış). Yeşil çay, kateşinlerin enzimatik oksidasyonunu önlemek için ya yakılarak ya da buharlama işlemiyle enzimlerin inaktive olması sonucu oluşur. Siyah çay, taze yaprak

kateşinlerinin oksidasyonunu katalizleyen polifenol oksidaz enzimiyle yapılır. Bu fermentasyon işlemi, siyah çaya tipik renk, sertlik ve acımsı tadı veren kompleks moleküllere sahip basit polifenollerin oksidasyonu ile olur. Oolong çayı, yaprakların kısaca yumak haline getirilmesinden sonra yakılarak hazırlanır. Sonra kurutulur. Yakma işlemiyle oksidasyon biter. Oolong çayının özellikleri siyah çay ile yeşil çay arasındadır.

2.4.2. Çayın Bileşenleri

Flavonoidler, flavon, izoflavon, flavanol, flavanon ve antosiyaninler olarak sınıflandırılır. Bunlar ana molekülün heterosiklik oksijen halkası (C halkası) konformasyonuna ve yapısına bağlıdır. Çayın genel komponentleri genelde kateşin olarak bilinen ve flavonoid ailesine ait bir grup bileşiği temsil eden polifenollü bileşiklerdir.

2.4.2.1. Çay kateşinleri

Çay kateşinleri yeşil çayın kuru ağırlığının %20-30'unu oluşturur. Bunların 6 büyük kategorisi : Kateşin, epikateşin, epigallokateşin, epigallokateşin gallat, kateşin gallat ve epikateşin gallattır. Güçlü antioksidan olan kateşinler renksizdir. Yeşil çay demine sertlik ve acı veren, suda çözünen bileşiklerdir. Üretilen çayın tat, renk, aroma gibi özelliklerinin hemen hepsi kateşinlerin modifikasyonu ile ilgilidir.

2.4.2.2. Çay Flavonolleri

Çayın başlıca flavonolleri kuarsetin, kaemferol ve mirisetindir. Çayın suda çözünen ekstraktının %2-3'ünü oluşturur. Flavonoller genellikle glikozitler halinde bulunurlar.

2.4.2.3. Theaflavinler ve Thearubiginler

Siyah çay üretiminde, lezzet ve tipik rengin oluşması için kateşinler yüksetgenmelidir. Siyah çay pigmentleri; basit kateşin ve gallokateşinden türemiş kinonlar arasındaki reaksiyondan oluşan portakal renkli theaflavinler ve belli molekül ağırlığına sahip (700-40000Da) heterojen fenolik pigmentler olan kahve renkli thearubiginlerdir. Güçlü antioksidan olan theaflavinler siyah çayın kuru ağırlığının %0.3-2'si iken, thearubiginler siyah çayda kuru madde oranının %10-20'sini oluşturur.

2.4.3. Çayda Bulunan Flavonoidlerin Başlıca Antioksidatif Etkileri

Yeşil çayın yararlı ve kansere karşı koruyucu bir madde olmasının yanı sıra, kanser hücrelerinin büyümesine engel olması ve polisiklik aromatik hidrokarbonların oluşumunu azaltması gibi etkileri vardır. Yeşil çayın üretildiği Japonya'da mide, akciğer ve karaciğer kanserlerine yakalanma oranının yeşil çay tüketimi olmayan toplumlara göre oldukça düşük olduğu görülmüştür. Japonya'da yapılan araştırmalarla, çayın serumda kolesterol seviyesini ve sistoloik kan basıncını düşürme gibi farmasötik yararlarına sahip olduğu ispatlanmıştır.

Çaydaki flavonoid bileşikleri serbest radikal süpürme aktivitesine sahiptir. Kateşinler α -tokoferol tüketimini sınırlar ve membran yüzeyine yakın olan sulu peroksi radikallerini söndürürken α -tokoferollerin hücre membranı içerisinde söndürücü olarak davranmasına olanak sağlar.

Çoğu doğal polifenol ve flavonoidin vitaminlerden daha iyi antioksidan oldukları bulunmuştur. Toplam fenol alımı 200-300 mg/gündür. Bu doz günlük C, E vitamini ve β -karoten alımı olan 70mg/günden daha yüksektir.

En önemli flavonol olan kuersetin, 5-20 μ M konsantrasyonda, süperoksit ve peroksiti söndürmede etkili olurken, kateşinler 500-1000 μ M konsantrasyonda etkilidir.

Çay ekstraktları salgın virüs enfeksiyonlarını önlemede kullanılır. 0.01-0.02 μ g/mL konsantrasyonlarında ECG ve EGCG polifenolleri kullanılarak AIDS virüsünün %50 oranında engellendiği saptanmıştır. Siyah çaydan ekstrakte edilen theaflavinler de benzer şekilde AIDS virüsü üzerinde etkilidir.

Çay polifenollerinin yan etkilerine bakıldığında ise bu bileşiklerin çözünmeyen kompleksler oluşturarak demir absorpsiyonunu önlediği ile ilgili kaygılar vardır. Yani çay tüketildikçe demirden yararlanma azalmaktadır [47].

2.5. BAZI İÇECEKLERDE TOPLAM ANTIOKSİDAN KAPASİTE TAYİNİ İLE İLGİLİ SON YILLARDA YAPILAN ÇALIŞMALAR

Günümüzde yapılan epidemiyolojik çalışmalara göre çeşitli sebze ve meyve suları yapılarındaki antioksidan bileşikleri ile kansere, koroner kalp hastalıklarına ve felce karşı koruyucu bir rol üstlenmektedir. Bu koruyucu role E vitamini, C vitamini , β -karotenin yanında aynı zamanda fenolik antioksidanlar da önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. Meyve suları, meyve ve sebzelere nazaran koruyucu fitokimyasalların organizma tarafından sindirimi açısından daha uygun besin ürünleridir. Antioksidanları içeren biyoaktif bileşikler, bitki dokularından daha çok meyve sularından kolaylıkla absorbe edilebilmektedir [48].

Turunçgil meyve suları en yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir. Ancak her üç yöntemle de bu sıra değişim göstermektedir. Turunçgil meyve sularının diğer soft içeceklere göre daha yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu van der BERG ve diğerleri (36) tarafından gözlemlenmiştir. Diğer meyve suları orta düzeyli TAC değerlerine sahiptir ve bu değerler FRAP yöntemine göre 5.01 ile 8.76 mmol Fe^{2+} /L , TRAP yöntemine göre 1.59 ile 2.19 mmol Troloks/L ve TEAC yöntemine göre ise 1.50 ile 2.56 mmol Troloks/L arasında değişmektedir. Cola içeceği en düşük antioksidan kapasiteye sahiptir ve TRAP yöntemi ile ölçülememektedir. Sonuçta soft içeceklerin FRAP ve TEAC yöntemi ile ölçülen TAC değerleri arasında ($r=0.941$) gibi bir korelasyon gözlemlenmiştir. (elma suyu, limon suyu, kayısı suyu, greyfurt suyu, limon ice tea, karışık meyve suyu, portakal suyu, ananas suyu, armut suyu, şeftali suyu ve tropikal su). Yeşil çayın antioksidan kapasitesi siyah çaya nazaran daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla 6.01, 3.60 mmol TR/L). Çaylardaki bu durum fermantasyon prosesinde meydana gelen değişikliklerden ileri gelmektedir [49].

Rice-Evans ve arkadaşları portakal suyu, elma suyu ve frenk üzümü suyunun TAC (Toplam antioksidan kapasite) ve antioksidan bileşimini çalışmışlardır. Bu çalışmada TAC ferrilmyoglobin/ABTS yöntemi ile toplam C vitamini içeriği ise ferrozin denemesi ile tayin edilmiştir. Bu meyve sularındaki fenolik antioksidanların kapasiteleri orijinal TEAC katsayılarından faydalanılarak hesaplanmıştır. Elma suyunun TAC'sının büyük

bir kısmını klorojenik asit ve floretinler oluşturmaktadır. Portakal suyunda ise hesperidin ve narirutinin TAC'ya katkısı en fazladır. Frenk üzümü suyunda ise antosiyaninlerin TAC ya katkısı C vitaminin yanında oldukça düşüktür ve bu içecekte hesaplanan TAC ile ölçülen TAC arasında belirgin bir fark bulunmaktadır. Bu meyve sularının C vitamini bileşimi belirlendikten sonra oksidasyona tabi tutulup askorbattaki düşüş sırası tespit edilmiştir (elma > portakal > frenk üzümü suyu). Ayrıca bu çalışmada fenolik antioksidanların C vitaminini oksidatif bozulmaya karşı koruduğu gözlenmiştir. Frenk üzümünde C vitamini içeriği en yüksek bulunmuştur [50].

İspanyol diyetinin TDAC'ı (Toplam besinsel antioksidan kapasitesi) FRAP yöntemine göre 6014 $\mu\text{mol TR}$, ABTS yöntemine göre ise 3549 $\mu\text{mol TR}$ olarak bulunmuştur. TDAC'ın % 68'i içeceklerden % 20'si sebze ve meyvelerden, geri kalan az bir kısmı ise tahıllardan ileri gelmektedir. Bitkisel yiyeceklerin ve içeceklerin in vitro LDL oksidasyonunu azaltma (inhibe etme) kapasitesi onların antioksidan kapasitesi ile uyum içerisinde. Günlük alınması tavsiye edilen C ve E vitamini miktarı TDAC'nın yaklaşık %10'nu kadardır. Folin-Ciocalteu yöntemine göre kişi başına günlük alınması gerekli toplam fenolik madde miktarı ise 1171 mg gallik asit ekivalentidir. Portakal suyu kapasitesi FRAP yöntemi ile 515 $\mu\text{mol TR/g}$, ABTS yöntemi ile 249 $\mu\text{mol TR/g}$ olarak bulunmuştur [51].

Ticari meyve sularının askorbik asit içeriği ve bu askorbik asitin bozunma hızı depolama zamanı ve sıcaklığına bağlıdır. Ticari meyve sularının diklorofenol indofenol yöntemine göre bulunan askorbik asit derişimi 2.4 ile 43 mg/100 mL meyve suyu arasında değişim göstermektedir. Kapalı kaplarda 4 ay süresince saklanan ticari meyve sularının askorbik asit miktarı %29 ile %41 arasında azalmaktadır. Açık kaplardaki ticari portakal suyu buzdolabında 1 ay boyunca bekletildiğinde askorbik asit kaybı %60 ile %67 arasındadır [52].

Arena ve arkadaşları, taze sıkılmış portakal suları ile sarı portakal sularını içeren toplam 17 portakal suyunun toplam antioksidan kapasitesini ölçmüşlerdir. Taze sıkılmış portakal suyunun ortalama askorbik asit derişimi 518 mg/L ve TEAC'ı ise 4.18 mmol/L olarak bulunmuştur. Ticari sarı portakal suyunun askorbik asit derişimi ve TEAC'ı ise sırasıyla 262-350 mg/L ve 2.19-2.97 mmol/L olarak bulunmuştur [53].

İlkay Tosun ve arkadaşları, Samsun marketlerinde satılan portakal, kayısı, şeftali ve vişne nektarlarının toplam antioksidan kapasitesini, toplam fenolik içeriğini, askorbik asit derişimini ve toplam karotenoid miktarlarını analiz etmişlerdir. Toplam antioksidan kapasite ölçümünde FRAP yöntemini kullanmışlardır. Portakal nektarının FRAP değerini 6.54, vişne nektarının 8.01, kayısı nektarının 5.68 ve şeftali nektarının ise 5.19 olarak bulmuşlardır [54].

Bir başka çalışmada, farklı tipteki çayların in vitro antioksidan kapasiteleri karşılaştırılmıştır. 25 tip taze hazırlanmış çay demlerinin toplam antioksidan kapasiteleri FRAP yöntemi ile belirlenmiştir. Sonuçlara göre farklı tipteki çaylar farklı antioksidan güce sahip olmakla birlikte TAC ile toplam fenolik kapasite arasında yüksek korelasyon gözlenmiştir ($r= 0.956$). Sonuçlar $\mu\text{mol TR/g}$ çay yaprağı olarak verilmiştir. Siyah çaylar (fermante edilmiş) 132-654 $\mu\text{mol TR/g}$, oolong çaylar (yarı fermante edilmiş) 233-532 $\mu\text{mol TR/g}$, yeşil çaylar (fermante edilmemiş) 272-1144 $\mu\text{mol TR/g}$ arasında değişen aktiviteler göstermişlerdir. 1 fincan çay 150 mg AA ile aynı antioksidan potansiyele sahiptir [55].

Ruch ve arkadaşları, yeşil çayın antioksidan ve antikanser etkileri ile ilgili olarak, çay bileşenlerinin reaktif oksijen türleri (ROS), hidrojen peroksit ve süperoksite karşı antioksidatif etki gösterdiği, oksijen radikalleri ve hidrojen peroksitin neden olduğu sitotoksikliği ve hücre kültürlerinde hücreler arası etkilenmeyi önlediğini belirtmişlerdir[56].

Sánchez-Moreno ve arkadaşları, İspanya'da bulunan ticari portakal sularının karotenoid, flavanoid ve C-vitamini içeriklerini HPLC yöntemini kullanarak belirlemişlerdir. Portakal suyundaki biyoaktif bileşenlerin sağlık açısından özellikleri antioksidan aktivitelerine bağlıdır. Bu meyve sularının antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikali kullanılıp meyve sularının antioksidan potansiyelleri ile taze sıkılmış portakal sularının antioksidan potansiyelleri karşılaştırılmıştır. Farklı biyoaktif bileşenlerin toplam antioksidan potansiyele katkısı belirlenmiş olup bu bileşenler içerisinde C vitamini diğer flavonoidlere ve β -karotene nazaran daha büyük bir katkı sağlamıştır. Askorbik asit ve β -kriptoksantin derişimi ile serbest radikal süpürme parametresi arasında iyi bir korelasyon gözlenmiştir. Ayrıca pastörize edilmiş

ticari portakal sularının TAC'sı ile taze sıkılmış portakal sularının TAC'sı arasında belirgin bir fark olmadığı gözlenmiştir [57].

Lichtenthäler ve arkadaşları, modifiye edilmiş TOSC yöntemini kullanarak Avrupa'da bulunan 14 farklı sebze ve meyve sularının (elma, pancar, çilek, havuç, limon, multivitamin, portakal, greyfurt ve domates suları vb.) antioksidan kapasitelerini belirlemişlerdir. Bütün meyve ve sebze suları ROS (Reaktif oksijen türleri) yani hidroksil, peroksil ve peroksinitrit radikallerini süpürme aktivitelerine göre sıralanmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde konsantrasyon ile antioksidan aktivite arasındaki non-lineer korelasyonlar kullanılmıştır. Ayrıca sonuçlar literatürde yeralan sonuçlarla çok az uyum göstermektedir. TOSC ile üç farklı serbest radikal süpürme aktivitelerine bakıldığında lingonberry meyve suyu yüksek aktivite göstermektedir [58].

Bir başka çalışmada, beyaz üzüm suyu ile onun yeni bir hibridi olan Jaffa Sweeties'in antioksidan aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Toplam fenolik içerikleri Folin-Ciocalteu reaktifi ile, fenolik asitler HPLC ile, ve TAC ise ABTS yöntemi ile tayin edilmiştir. Trans-hidroksisinnamik asitler (kaffeik asit, p-kumarik asit, ferulik asit ve sinapik asit) yeni hibride göre daha çok beyaz üzüm suyunda bulunmaktadır. Fakat, taze tartılmış miktarları üzerinden üzüm suyu hibridi hem yüksek toplam fenolik kapasite, hem de yüksek TAC göstermektedir. TAC ile antosiyanin içeriği arasındaki korelasyon ($R^2=0.8068$), TAC ile flavonoid içeriği arasındaki korelasyon ($R^2=0.9320$), TAC ile toplam fenolik kapasite arasındaki korelasyon ($R^2=0.9446$) olarak bulunmuştur. Meyvelerin yüksek derişimde doğal antioksidanlar içermesi sadece yüksek antioksidan aktiviteye değil aynı zamanda iyi bir antioksidan kaliteye sahip olduğunu da göstermektedir [59].

Karakaya ve arkadaşları, bir başka çalışmada Türkiye'de tüketilen katı ve sıvı gıdaların toplam fenolik içeriklerini FOLİN yöntemi ile, toplam antioksidan kapasitelerini ise ABTS yöntemi ile belirlenmişlerdir. Buna göre, sıvı gıdalar için toplam fenolik içeriği 68-4162 mg/L arasında, katı gıdalar için ise 735-3994 mg/kg arasında değişmektedir. Katı ve sıvı gıdaların TAC'sı ise sırasıyla 0.61-6.78 mM ve 0.63-8.62 mM arasında bulunmuştur. TAC ile toplam fenolik içerik arasında iyi bir korelasyon gözlenmiştir ($r^2=0.95$). Toplam fenolik içeriklerine göre sıvı gıdalar, siyah çay > hazır kahve> kola >

kırmızı şarap > viyole havuç suyu > kayısı nektarı> Türk kahvesi > üzüm pekmezi > ada çayı > beyaz şarap > ıhlamur şeklinde sıralanmıştır [60].

LDL oksidasyon modeli kullanılarak fenolik içecekler olan çay, kahve ve kakaonun antioksidan aktiviteleri bir fincana göre belirlenmiştir. Lag time (gecikme süresi) ile bu içeceklerin antioksidan aktiviteleri, kahve için 292-948 dk, kakao için 217-444 dk, yeşil çay için 186-338 dk, siyah çay için 67-277 dk bulunmuştur. Robusta yeşil kahve çekirdeği Arap kahvesinden 2 kat daha fazla antioksidan aktivite göstermektedir. Fakat kavurmadan sonra bu fark ortadan kalkmaktadır. İçecekler içerisinde en yüksek aktivite gösteren kahve olarak bulunmuştur [61].

Wang ve arkadaşları, 12 taze meyve 5 ticari meyve suyunun TAC'sını ORAC yöntemi ile tayin etmişlerdir. Hem kuru hem de yaş ağırlık üzerinden en yüksek antioksidan aktivite gösteren meyve çilek olarak bulunmuştur. Meyvelerin antioksidan kapasitelerinin büyük bir kısmı sulu kısımdan ileri gelmektedir. Meyvelerin et kısmının antioksidan aktivitesinin TAC'ya katkısı %10'dan azdır. Ticari meyve suları içerisinde üzüm suyu en yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. Diğerleri ise greyfurt suyu > domates suyu > portakal suyu > elma suyu şeklinde sıralanmıştır [62].

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 göstermektedir [63].

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Çözeltilerin hazırlanmasında SHIMADZU AX200 model analitik terazi, çözeltilerin hazırlanması sırasında ultrasonik banyo, çözeltilerin pH'sının ayarlanmasında METROHM E512 model pH-metre, spektrofotometrik ölçümler için Cary 1E Varian UV-Vis spektrofometre cihazı ve kuvarz küvetler kullanılmıştır.

3.2. KULLANILAN İÇECEKLER

3.2.1. Meyve Suları

Nar suyu (%100, Elite Natural Gıda Mad. San. ve Tic. A.Ş.); Doğanay limon sosu (Doğanay Gıda A.Ş.); Wesergold oranen portakal suyu (%100), Cappy gold mini portakal suyu (%100), (The Coca Cola Company); Sunpride C-MIX (portakal-greyfurt-mandalina) (%100), (FRİGO Pak Gıda Maddeleri San. ve Tic. A.Ş.); Sunpride elma suyu (%100), (FRİGO Pak Gıda Maddeleri San. ve Tic. A.Ş.); Kavaklıdere pastörize beyaz üzüm suyu (KAVAKLIDERE Şarapları A.Ş.); Kavaklıdere pastörize siyah üzüm suyu (KAVAKLIDERE Şarapları A.Ş.); Power Ball enerji içeceği (Doğala özdeş karışık meyve aroması, ORBİTAL Kimya ve Gıda San. Tic. A.Ş.); Capri-sun portakallı içecek (%100), TAT Konserve San. A.Ş.); Pınar elma suyu (%100), (PINAR Süt. Mam. San. A.Ş.); Netto elma suyu (%100), (KIZIKLI Gıda San. ve Tic. A.Ş.); DİMES extra elma suyu (%100), (DİMES Gıda San. ve Tic. A.Ş.).

3.2.2. Nektarlar

Halk narita vişne nektarı (%35), (Ak Gıda San. ve Tic. A.Ş.); Ülker içim vişne nektarı (%35), (ÜLKER A.Ş.); Ersu vişne nektarı (%35), (ERSU meyve ve Gıda San. A.Ş.); Piyale vişne nektarı (%35), (GIDASA); Golden vişne aromalı içecek (Golden Meyve Suyu ve Gıda San. A.Ş.); Golden portakal aromalı içecek (Golden Meyve Suyu ve Gıda San. A.Ş.); Pınar portakal nektarı (%50), (PINAR Süt. Mam. San. A.Ş.); Ersu portakal nektarı (%50), (ERSU meyve ve Gıda San. A.Ş.); Halk narita portakal nektarı (%50), (Ak Gıda San. ve Tic. A.Ş.); Pınar kayısı nektarı (%40), (PINAR Süt. Mam. San. A.Ş.); Halk narita kayısı nektarı (%40), (Ak Gıda SAN. ve Tic. A.Ş.); Pınar şeftali nektarı

(%45), (PINAR Süt. Mam. San. A.Ş.); Piyale remix karışık meyve nektarı (portakal, ananas, kayısı, limon, elma, şeftali) (%50), (GIDASA).

3.2.3. Kolalı İçecekler

Coca cola ; Coca cola light; Pepsi; Pepsi light; Colaturka

3.2.4. Poşet Çaylar

İngiliz kahvaltılık çayı (Lipton, Trakya Sanayi ve Ticaret A.Ş.); Ceylon harmanlanmış çay (ECE Gıda San. ve Tic. Ltd.Ş.); Limonlu yeşil çay (%100), (Doğa Bitkisel Ürünler San. ve Tic. A.Ş.); Yeşil çay (Doğadan A.Ş.) İhlamur (%100 ihlamur çiçeği), (TEMA VAKFI); Altın harmanlanmış çay (ÇAYKUR A.Ş.)'dan satın alınmıştır.

3.2.5. Bitki Çayları

Yeşil çay, Malatya Pazarı A.Ş'den temin edilmiştir. Turkish Rize Ordinary Tea ÇAYKUR A.Ş'den, Turkish Blended Ordinary Tea BALKÜPÜ A.Ş.'den alınmıştır.

3.3. KULLANILAN KİMYASALLAR

Metanol (Merck, 1.06007), Sodyum karbonat (Merck, 1.06392), E-vitamini (Aldrich, 25.802-4), Malonik asit (Aldrich, M129-6), L-Askorbik asit (Aldrich, 25,556-4), Troloks (Aldrich, 39,191-3), Neokuproine (Sigma, N1501), ABTS (Fluka, 11557), Folin-Ciocalteu fenol reaktifi, 2N (Sigma, F9252), Bakır(II) klorür dihidrat (Merck, 1.02733), Amonyum asetat (Merck, 1.06462), Sodyum hidroksit (Merck, 1.06462), Amonyum demir(II) sülfat heksahidrat (Merck, 1.03791), 1,10-fenantrolin monohidrat (Riedel-de-Haen, 33510), Hidroklorik asit (Merck, 1.00314), Potasyum persülfat (Sigma-Aldrich, 379824), Bakır(II) sülfat (Riedel-de-Haen, 12582), Sitrik asit (Fluka, 27485), PTFE syringe filtre, Sodyum potasyum tartarat, Etil alkol.

3.4. TROLOKS, ASKORBİK ASİT VE A-TOKOFEROL'E UYGULANAN CUPRAC YÖNTEMLERİ

3.4.1. Normal CUPRAC Yöntemi (Oda sıcaklığında):

Troloks ve askorbik asit çözeltileri %96'lık etil alkolde konsantrasyonları 1×10^{-3} M olacak şekilde hazırlandı. α -tokoferol çözeltisi ise %96'lık etil alkolde 3×10^{-3} M olarak hazırlandı. Bir cam tüp içerisine 10^{-2} M bakır(II) çözeltisi, $7,5 \times 10^{-3}$ M neokuproinin (2,9 dimetil 1-10 fenantrolin) %96'lık etil alkoldeki çözeltisi ve 1 M amonyum asetat tamponundan (pH=7) sırasıyla 1'er mL eklendi. Üzerine (x) mL örnek çözeltisi ve (1-x) mL H₂O ilave edilip iyice çalkalandı. Toplam hacim 4.1 ml olacak şekilde çözeltiler hazırlandı. Tüpler oda sıcaklığında ağzı kapalı olarak 1/2 saat boyunca bekletildi. Bu süre sonunda içinde örnek bulunmayan referans çözeltiliye karşı 450 nm'de absorban değerleri ölçüldü. Bu yöntemle TR, AA ve TOC'nin çalışma eğrileri çizildi. Bu maddelerin absorban-konsantrasyon ilişkisinin lineer olduğu aralık tespit edildi ve her bir bileşiğin molar absorplama katsayısı bulundu.

1mLCu(II) + 1mL Nc + 1mL tampon + x mL antioksidant çöz. + (1.1 - x)mL H₂O
V_{top}=4.1 mL

3.4.2. İnkübasyonlu CUPRAC Yöntemi (t=50 °C):

Normal prosedüre göre cam tüplerde hazırlanan çözeltiler, tüplerin ağızları kapatılarak 20 dakika boyunca 50 °C'lik su banyosunda bekletildi. 20 dakika sonunda tüpler su banyosundan çıkarılıp musluk suyu altında soğutuldu ve beklemeden referansa karşı 450 nm'de absorbanları ölçüldü.

3.4.3. Hidrolizli CUPRAC Yöntemi (t=80 °C) :

TR ve AA bileşiklerinin derişimleri 1×10^{-3} M ve TOC'nin derişimi 3×10^{-3} M olacak şekilde ayrı ayrı tartımlar alındı. Her bir bileşik bir miktar % 50'lik metanol çözeltisi içinde çözüldü; üzerlerine 5'er mL 1.2 M HCl ilave edilip 100 ml'lik balon jodede aynı metanol çözeltisi ile hacme tamamlandı. Elde edilen her bir çözelti bulunduğu balon jodelerden içerisine kaynama taşı konulmuş balonlara dekante edildi. Balonların ağızlarına geri soğutucu yerleştirilip 2 saat süresince 80°C'de reflüks işlemi yapıldı. Tüm

metanollü çözeltiler reflüks edildikten sonra balonlar musluk suyu altında soğutuldu. Hidrolizatlar daha sonra 6.5 mL 1 M NaOH ile nötrleştirildi. Hidrolizatlara normal CUPRAC prosedürü uygulanıp beklemeden 450 nm’de absorbanslar ölçüldü.

3.4.4. Hidrolizli ve İnkübasyonlu CUPRAC Yöntemi (t=50 °C) :

Elde edilen hidrolizat çözeltilerine inkübasyonlu metot uygulandı. Tüplerin ağzı kapatılıp 50 °C’lik su banyosunda 20 dakika boyunca bekletildi. İşlem bitince tüpler musluk suyu altında soğutuldu. Ardından 450 nm’de absorbans değerleri okundu.

3.5. İÇECEKLERİN HAZIRLANMASI:

Meyve suları 1:15 oranında su ile seyreltikten sonra direkt olarak CUPRAC yöntemi ile analiz edildi. (Cappy portakal suyu, enerji içeceği, nar suyu 1:10 seyreltildi).

Meyve nektarları 1:15 oranında su ile seyreltikten sonra adi süzgeç kağıdından 2 kez ard arda süzüldü. Daha sonra 0.45 µm gözenek çaplı PTFE filtre ile süzülerek berrak bir çözelti elde edildi. Elde edilen bu süzüntüye daha sonra CUPRAC yöntemi uygulandı.

Asidik kola içeceklerinin başlangıç pH değeri yaklaşık olarak 2.5 civarında olduğundan 6-7 mL 0.1 N NaOH ilavesiyle pH 7 yapıldı ve bu nötral çözeltilere CUPRAC yöntemi uygulandı.

3.5.1. Cappy Portakal Suyuna TR ve AA Standart Katkı Uygulanması

1:10 oranında su ile seyreltilmiş cappy portakal suyunun CUPRAC yöntemine göre başlangıç absorbansı yaklaşık olarak 0.20 olacak şekilde seyreltik portakal suyundan 0.25 mL alındı. Daha sonra üzerine ayrı ayrı TR ve AA ilave edilerek ilaveli kalibrasyon doğruları çizildi. Bu bileşiklerin meyve suyu içindeki çalışma doğruları, tek başlarına oldukları durumdaki çalışma doğrularıyla kıyaslandı.

3.6. ÇAY EKSTRAKTLARININ HAZIRLANMASI

3.6.1. Bitkisel Poşet Çay Ekstraktlarının Hazırlanması

Tartımları 1.4 – 2.25 g arasında değişen poşet çaylar, içerisinde 250 mL taze kaynamış su bulunan beherlerde 2 dakika daldırıp çıkararak, 3 dakika bekletilerek toplam 5 dakika boyunca demlendi. Soğumaya bırakılan çaylar ardından siyah band süzgeç kağıdından süzüldü. Elde edilen süzüntülere CUPRAC yöntemine göre 450 nm’de absorbansları 0.2 olacak şekilde su ile seyreltmeler yapıldı. Seyreltilmiş örneklere sırayla CUPRAC, FOLİN ve ABTS yöntemleri uygulandı. Hazırlanan bitkisel çay ekstraktları 48 h. boyunca 4°C’de muhafaza edilebilmektedir.

3.6.2. Bitkisel Çay Ekstraktlarının Hazırlanması

Çayların yapılacağı bitkilerden yaklaşık 1.5 g tartım alınıp kolay süzülebilmeleri için ince gözenekli polimer malzemedan yapılan süzme keselerine konuldu. İçerisinde 250 mL taze kaynamış su bulunan beherler içerisine konulup 5 dakika boyunca demlenmeleri sağlandı. Ardından oda sıcaklığında soğutulup siyah band süzgeç kağıdından süzüldü. Elde edilen süzüntülere CUPRAC yöntemine göre 450 nm’de absorbansları 0.2 olacak şekilde su ile seyreltmeler yapıldı. Seyreltilmiş örneklere sırayla CUPRAC, FOLİN ve ABTS yöntemleri uygulandı.

3.7. BAZI İÇECEKLERE GELİŞTİRİLEN NORMAL CUPRAC YÖNTEMİNİN UYGULANMASI

10^{-2} M CuCl_2 (suda), 7.5×10^{-3} M neocuproine (alkolde), 1 M NH_4Ac (suda) çözeltileri hazırlandı. Bir tüp içerisinde sırasıyla 1 mL CuCl_2 , 1 mL Nc ve 1 mL NH_4Ac konulup çalkalandı. Üzerine x mL içecek ilave edilip $(1.1 - x)$ mL H_2O ile hacme tamamlandı. Tekrar çalkalanıp 450 nm’de referans çözeltisine karşı absorbans ölçümü yapıldı.

3.8. BAZI İÇECEKLERE ABTS YÖNTEMİNİN UYGULANMASI

7 mM ABTS (suda) çözeltisi hazırlandı. ABTS stok çözeltisi içine, son konsantrasyonu 2.45 mM olacak şekilde $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ilave edildi. Mavi-yeşil bir çözelti elde edildi. $\text{ABTS}^{\cdot+}$ radikal çözeltisi 12-16 h. boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletildikten sonra kullanılabilir. Kullanıma hazır hale gelen radikal çözeltisi etil alkolle 1:10

oranında seyreltilmiştir. 1:10 seyreltilmiş ABTS⁺ radikal katyonunun 734 nm'deki absorpsansı 1.28 ± 0.04 'dür. x mL örnek üzerine 1 mL 1:10 seyreltilmiş ABTS⁺ çözeltisi ve (4-x) mL EtOH ilave edilip 1 ve 6 dakika sonundaki absorpsans değerleri kaydedilmiştir. 6. dakikadaki fark absorpsans değerlerine göre kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur.

3.9. BAZI İÇECEKLERE FOLİN YÖNTEMİNİN UYGULANMASI

Lowry A: %2 Na₂CO₃ (0.1 M NaOH içerisinde)

Lowry B. % 0.5 CuSO₄ (%1'lik NaKC₄H₄O₆ içerisinde)

Lowry C: 50 mL Lowry A + 1 mL Lowry B

Folin reaktifi 1.3 oranında su ile seyreltilir.

Her bir içecekten (x mL) alınıp üzerine (2-x) mL H₂O ilave edildi. Ardından 2.5 mL Lowry C eklenip 10 dakika bekletildi. Süre sonunda karışıma 0.25 mL Folin reaktifi ilave edilip oluşan mavi rengin stabil kalması için 30 dakika beklendi. 750 nm'de referans çözeltiye karşı absorpsanslar ölçüldü.

3.10. BAZI İÇECEKLERİN 1,10-FENANTROLİN YÖNTEMİ İLE ASKORBİK ASİT İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ

1,10-fenantrolin'den 0.1983 g tartım alınır, az suda çözülür. NH₄Fe(SO₄)₂ 'dan 0.16 g tartım alınır, 2 mL 1 M HCl'de çözülür. Daha sonra bu iki çözelti karıştırılır ve su ile 100 mL'ye tamamlanır. Seyreltik meyve suyu ve nektar örneklerinden 0.5 mL alınıp üzerine 1 mL hazırlanan 1,10-fenantrolin reaktifinden ilave edilir ve hızlı bir şekilde su ile 25 mL son hacme tamamlanır. Son çözeltinin absorpsansı 1 dakika sonunda 510 nm'de ölçülür.

4. BULGULAR

4.1. TROLOKSUN CUPRAC YÖNTEMİ İLE ANALİZ SONUÇLARI

Toplam antioksidan kapasite tayini için geliştirilen spektrofotometrik yöntem 12.2-61.0 μM derişim aralığında standart troloks çözeltilerine uygulanmış olup maksimum absorpsiyonun olduğu 450 nm dalga boyunda yapılan ölçümler sonucunda şu değerler elde edilmiştir.

Tablo 4.1: Geliştirilen spektrofotometrik yöntemle tayin edilen TR'in farklı derişimlerde $\lambda=450$ nm'de spektrofotometrede okunan absorbans değerleri

C_{TR} (μM)	$A_{450 \text{ nm}}$
12.2	0.17
24.4	0.37
36.6	0.58
48.8	0.77
61.0	0.99

Troloks için 12.2-61.0 μM arasında 5 farklı derişimde elde edilen kalibrasyon doğru denklemi şöyle ifade edilir:

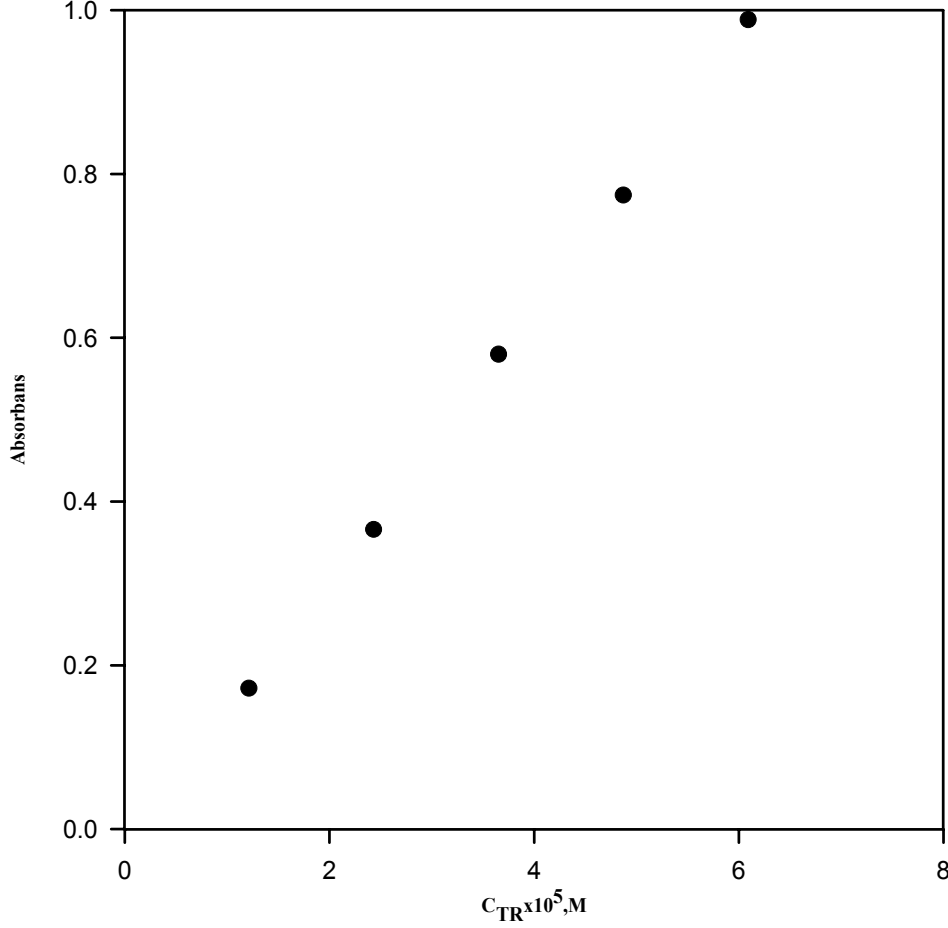
$$A_{450} = 1.67 \times 10^4 C_{\text{TR}} - 3.72 \times 10^{-3} \quad (\text{Normal yöntem})$$

$$r = 0.9997$$

$$\epsilon_{\text{TR}} = 1.67 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

C_{TR} , TR'nin başlangıç çözeltilisinin M cinsinden derişimidir. Çözeltide TR analizi için LOD = 4.31 μM 'dir.

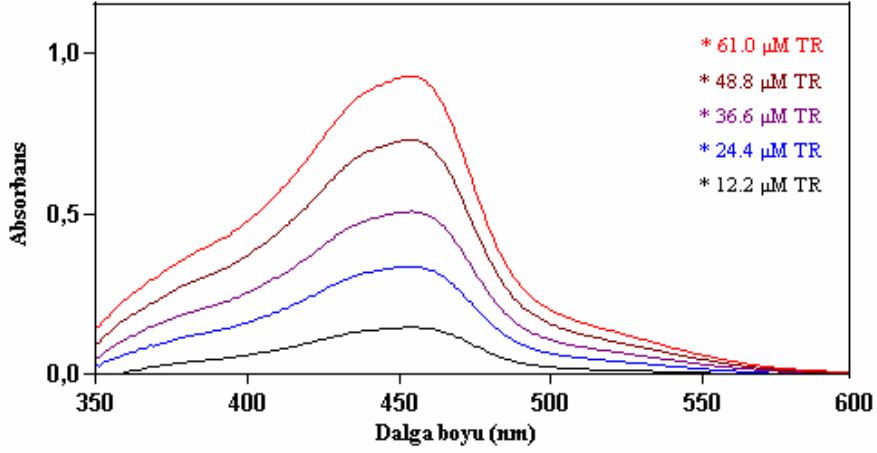
Bu değerler kullanılarak kalibrasyon grafiği çizilirse Şekil 4.1 elde edilir.



Şekil 4.1: Değişik derişimlerdeki TR'nin absorbans ile derişim arasında çizilen kalibrasyon grafiği

Spektrumların detaylı verilmesi bazı olasılıkları bertaraf etmek için önemli olabilir. Örneğin, CUPRAC yönteminde son ürün olan Cu(I)-Nc prooksidan olarak hareket edebilir. Bazı polifenollerin oksidasyon ürünleriyle veya reaksiyona girmeyen (artan polifenollerle) etkileşerek tekrar Cu(II)-Nc'e dönüşebilir veya hava oksijeni ile okside olarak da Cu(II)-Nc'e dönüşebilir. Bu dönüşümlerin gerçekleşmesi durumunda Cu(I)-Nc spektrumunda absorbans azalması ve/veya pik kayması görülebilirdi. Ancak spektrumda değişiklik gözlenmemesi Cu(I)-Nc'in yeterince stabil olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.2’de 12.2-61.0 μM derişim aralığında TR’nin CUPRAC yöntemine göre görünür alandaki spektrumları görölmektedir.



Şekil 4.2: Farklı derişimlerde TR’nin oluşturduğu Cu(I)-Nc spektrumları

Troloksun inkübasyon, hidroliz ve hidroliz + inkübasyon yöntemlerine göre elde edilen kalibrasyon doğru denklemleri ve etkin molar absorptiviteyi ise şöyledir:

$$A_{450} = 1.85 \times 10^4 C_{\text{TR}} + 1.56 \times 10^{-3} \quad (\text{İnkübasyonlu yöntem})$$

$$r = 0.9996$$

$$\epsilon = 1.85 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$A_{450} = 1.64 \times 10^4 C_{\text{TR}} - 3.1 \times 10^{-2} \quad (\text{Hidroliz yöntemi})$$

$$r = 0.9999$$

$$\epsilon = 1.64 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$A_{450} = 1.71 \times 10^4 C_{\text{TR}} + 4 \times 10^{-2} \quad (\text{Hidroliz + İnkübasyonlu yöntem})$$

$$r = 0.9986$$

$$\epsilon = 1.71 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

Bazı polifenolik bileşikler için etkin molar absorptiviteyi yükseltmede yararlı olan kombine CUPRAC yöntemi (hidroliz ve inkübasyon) askorbik asit için olumlu sonuç vermemiştir. Bu amaçla oda sıcaklığında uygulanan CUPRAC yöntemi yeterlidir.

25 μM TR'nin etil alkoldeki çözeltisine ABTS yöntemi uygulandığında 734 nm'deki absorbans değerleri aşağıda yer almaktadır.

Tablo 4.2: ABTS yöntemine göre TR analizi

V/(μL)	C/(M)	ΔA 1 min	ΔA 6 min
10	5×10^{-6}	0.12	0.13
20	1×10^{-5}	0.25	0.26
30	1.5×10^{-5}	0.39	0.40
40	2×10^{-5}	0.51	0.52

Bu değerlere göre kalibrasyon doğru denklemi ve etkin molar absorptivite ise;

$$A = 2.6 \times 10^4 C_{\text{TR}} - 8 \times 10^{-3}$$

$$r = 0.9995$$

$$\epsilon_{\text{TR}} = 2.6 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

10 μM TR'nin etil alkoldeki çözeltisine Folin yöntemi uygulandığında 750 nm'deki absorbans değerleri aşağıda yer almaktadır.

Tablo 4-3. FOLİN yöntemine göre TR analizi

V/(mL)	C/(M)	A_{750}
0.1	2.66×10^{-5}	0.11
0.2	5.33×10^{-5}	0.22
0.3	7.98×10^{-5}	0.35
0.4	10.64×10^{-5}	0.48

Bu değerlere göre kalibrasyon doğru denklemi ve etkin molar absorptivite ise;

$$A = 4.7 \times 10^3 C_{\text{TR}} - 1.56 \times 10^{-2}$$

$$r = 0.9993$$

$$\epsilon_{\text{TR}} = 4.7 \times 10^3 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

4.2. ASKORBİK ASİTİN CUPRAC YÖNTEMİ İLE ANALİZ SONUÇLARI

Tablo 4.4: Geliştirilen spektrofotometrik yöntemle tayin edilen AA'nın farklı derişimlerde $\lambda=450$ nm'de spektrofotometrede okunan absorbans değerleri

C_{AA} (μM)	$A_{450 \text{ nm}}$
12.2	0.18
24.4	0.35
36.6	0.58
48.8	0.76
61.0	0.95

AA için 12.2-61.0 μM arasında 5 farklı derişimde elde edilen kalibrasyon doğru denklemini şöyle ifade edilir:

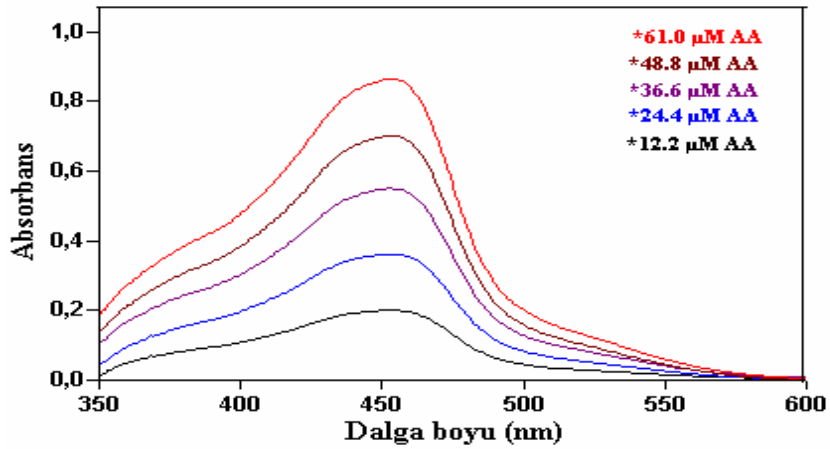
$$A_{450} = 1.59 \times 10^4 C_{AA} - 1.8 \times 10^{-2} \quad (\text{Normal yöntem})$$

$$r = 0.9990$$

$$\epsilon_{AA} = 1.59 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

C_{AA} , AA'nın başlangıç çözeltisinin M cinsinden derişimidir.

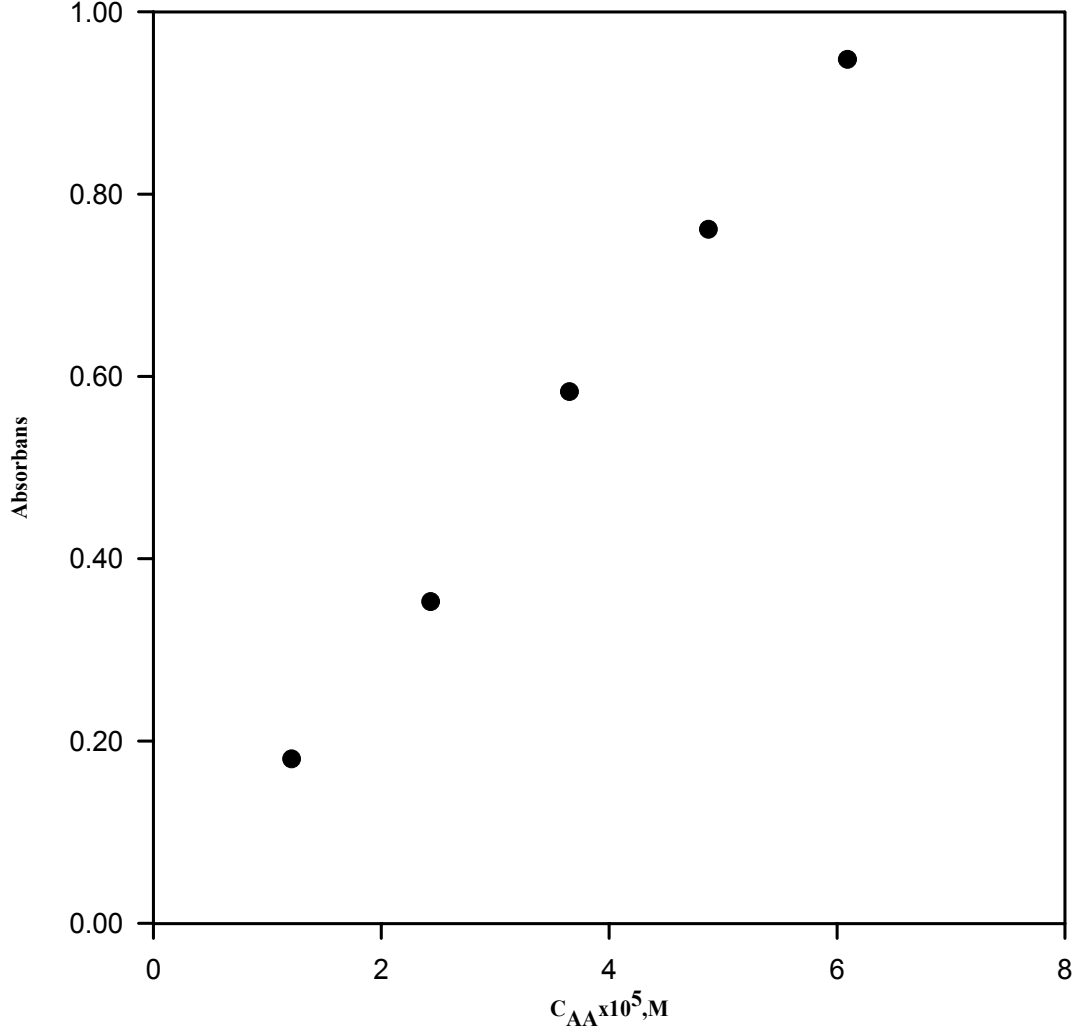
Şekil 4.3.'de 12.2-61.0 μM derişim aralığında AA'nın CUPRAC yöntemine göre spektrumları görölmektedir.



Şekil 4.3: Farklı derişimlerde AA'nın oluşturduğu Cu(I)-Nc spektrumları

Çözeltide AA analizi için LOD = 4.52 μM 'dir.

Bu değerler kullanılarak kalibrasyon doğrusu çizilirse Şekil 4.4. elde edilir.



Şekil 4.4: Değişik derişimlerdeki AA'nın absorbans ile derişim arasında çizilen kalibrasyon grafiği

4.3. E-VİTAMİNİNİN CUPRAC YÖNTEMİ İLE ANALİZ SONUÇLARI

Tablo 4.5: Geliştirilen spektrofotometrik yöntemle tayin edilen TOC'in farklı derişimlerde $\lambda=450$ nm'de spektrofotometrede okunan absorbans değerleri

C_{TOC} (μM)	$A_{450 \text{ nm}}$
14.2	0.20
28.4	0.44
42.6	0.72
56.8	0.99
71.0	1.23

AA için 14.2-71.0 μM arasında 5 farklı derişimde elde edilen kalibrasyon doğru denklemi şöyle ifade edilir:

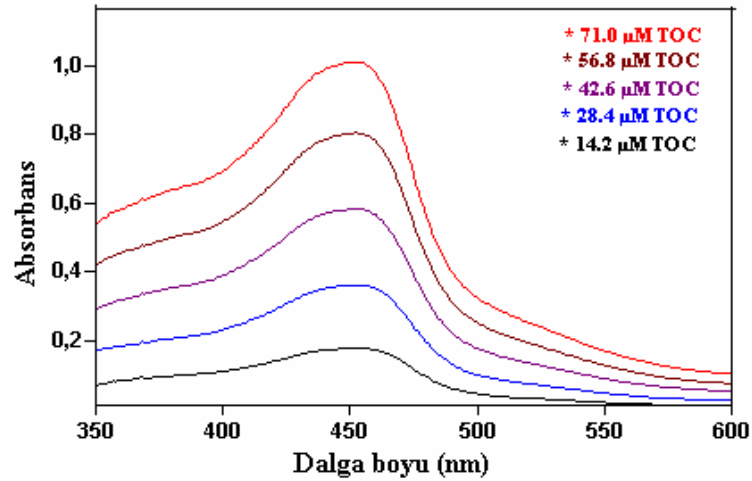
$$A_{450} = 1.85 \times 10^4 C_{\text{TOC}} - 6.2 \times 10^{-2} \quad (\text{Normal yöntem})$$

$$r=0.9996$$

$$\epsilon_{\text{TOC}} = 1.85 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

C_{TOC} , TOC'nın başlangıç çözeltilisinin M cinsinden derişimidir.

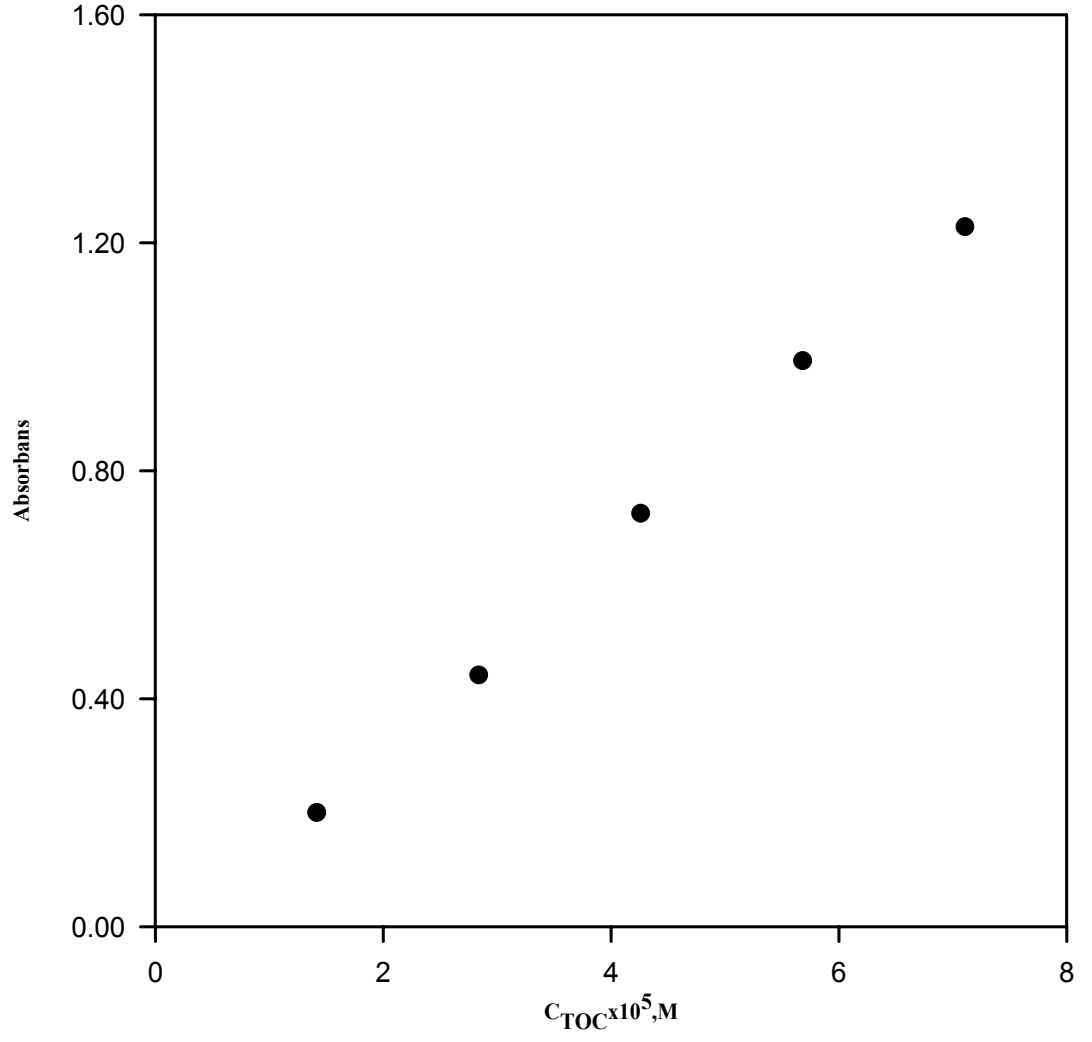
Şekil 4.5.'de 14.2-71.0 μM derişim aralığında TOC'nın CUPRAC yöntemine göre spektrumları görölmektedir.



Şekil 4.5: Farklı derişimlerde TOC'nin oluşturduğu Cu(I)-Nc spektrumları

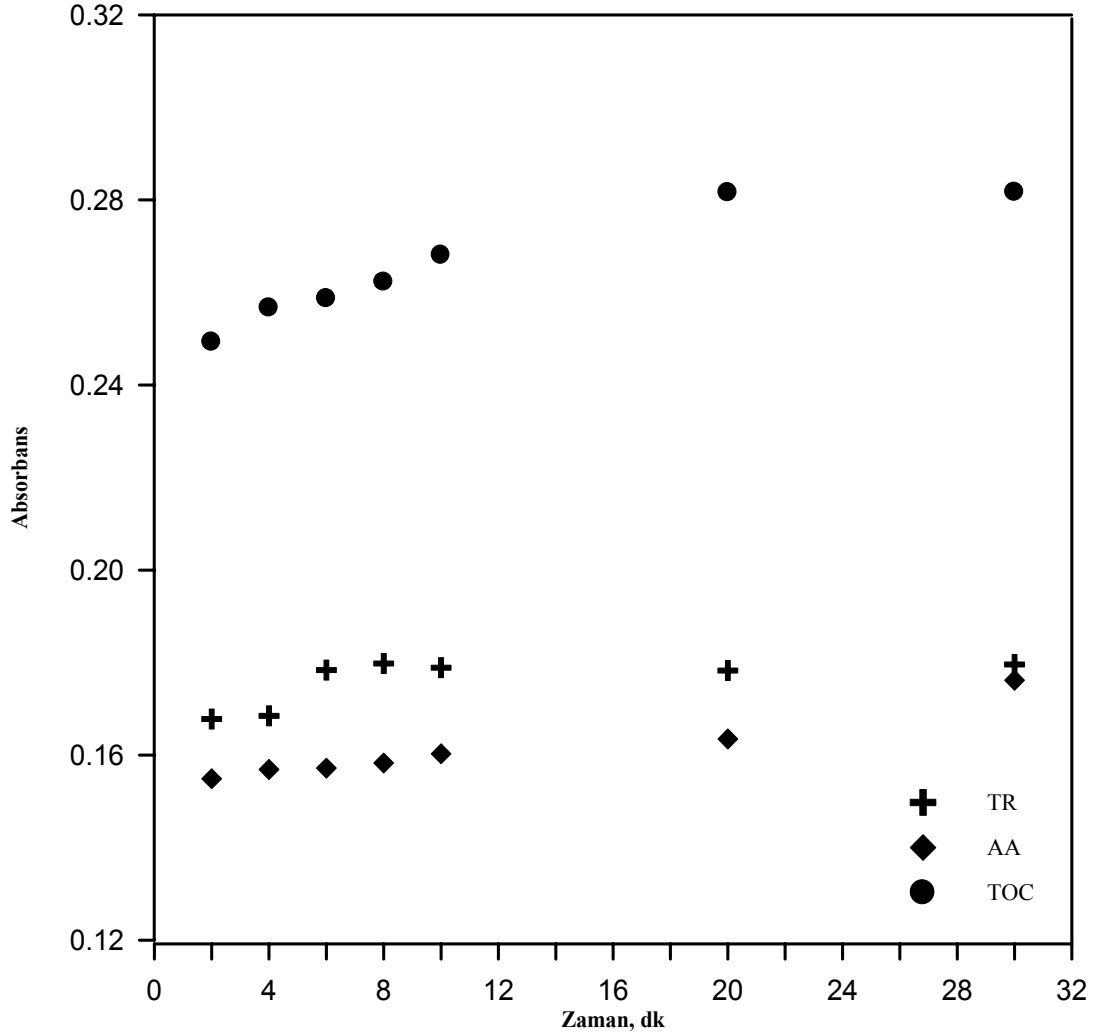
Çözeltide TOC analizi için LOD = 3.94 μM 'dir.

Bu değerler kullanılarak kalibrasyon doğrusu çizilirse Şekil 4.6. elde edilir.



Şekil 4.6: Değişik derişimlerdeki TOC'nin absorbans ile derişim arasında çizilen kalibrasyon grafiği

1 mM TR, 1mM AA ve 3mM TOC'den ayrı ayrı 50 μ L alınarak CUPRAC yöntemi uygulanarak zamana göre her bir antioksidan bileşiğin absorbansındaki değişimler gözlenmiştir. Yaklaşık olarak 30 dk sonunda CUPRAC yöntemi ile elde edilen renk stabil olmaktadır.



Şekil 4.7: 50 μ L 1mM AA, 50 μ L 1mM TR ve 50 μ L 3 mM TOC'nin ayrı ayrı normal CUPRAC yöntemiyle zamana göre absorbans değişimini gösteren eğriler

CUPRAC yönteminin 4 farklı prosedürüne göre 1mM TR, AA ve TOC'nin etkin molar absorptivite ve her bir antioksidan bileşiğin lineer aralıkları aşağıdaki tabloda yer almaktadır.

Tablo 4.6: Başlangıç konsantrasyonu 1 mM olan TR, AA, TOC'nin geliştirilen CUPRAC yöntemine göre elde edilen etkin molar absorptivite değerleri ve lineer aralıkları

Antioksidan ismi	ϵ_N	ϵ_{ink}	ϵ_{hid}	ϵ_{hi+ink}	Lineer Aralık
TR	1.67×10^4	1.85×10^4	1.64×10^4	1.71×10^4	
TOC	1.86×10^4	1.90×10^4	1.65×10^4	1.61×10^4	$6.1 \times 10^{-6} - 7.7 \times 10^{-5}$
AA	1.59×10^4	-	-	-	$5.6 \times 10^{-6} - 8.5 \times 10^{-5}$

Bu bileşiklerin $TEAC_{CUPRAC}$ katsayıları ise CUPRAC yöntemine göre referans olarak seçilen TR'nin $TEAC_{CUPRAC}$ değeri 1.00 alınmak suretiyle TOC ve AA'nın etkin molar absorptivitesinin TR'nin etkin molar absorptivitesine bölünmesiyle elde edilen orandır.

Tablo 4.7: TR, AA, TOC'nin 4 farklı CUPRAC yöntemi prosedürüne göre bulunan TEAC katsayıları

Antioksidan ismi	$TEAC_N$	$TEAC_{ink}$	$TEAC_{hid}$	$TEAC_{hi+ink}$
Troloks (TR)	1.00	1.00	1.00	1.00
α -Tokoferol (TOC)	1.11	1.02	1.01	0.95
Askorbik asit (AA)	0.95	-	-	-

4.4. İÇECEKLERDE CUPRAC YÖNTEMİ İLE TAC TAYİNİ

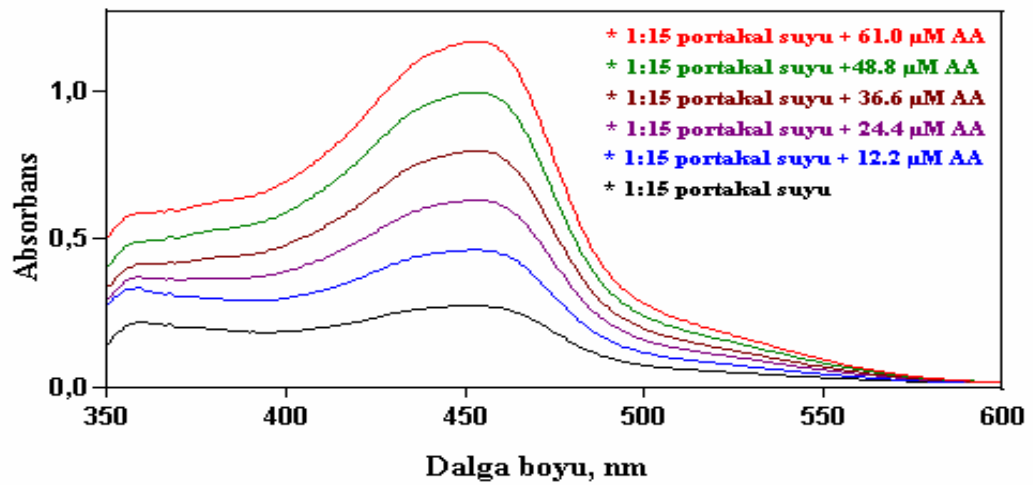
4.4.1. Portakal Suyuna CUPRAC Yönteminin Uygulanması

Cappy portakal suyu 1:15 oranında su ile seyreltikten sonra 0.25 mL örnek alınıp CUPRAC yöntemi uygulandığında absorbans 0.20 olarak bulundu. Daha sonra bu portakal suyu üzerine AA standart katkısı yapıldığında katkılı çalışma doğrusu ile AA'nın yalnız başına olan çalışma doğrusu paralellik göstermiştir.

Tablo 4.8: 1:15 oranında seyreltilmiş olan portakal suyuna (12.2 μM + 61.0 μM) AA arasında değişen derişimlerde standart katkılar

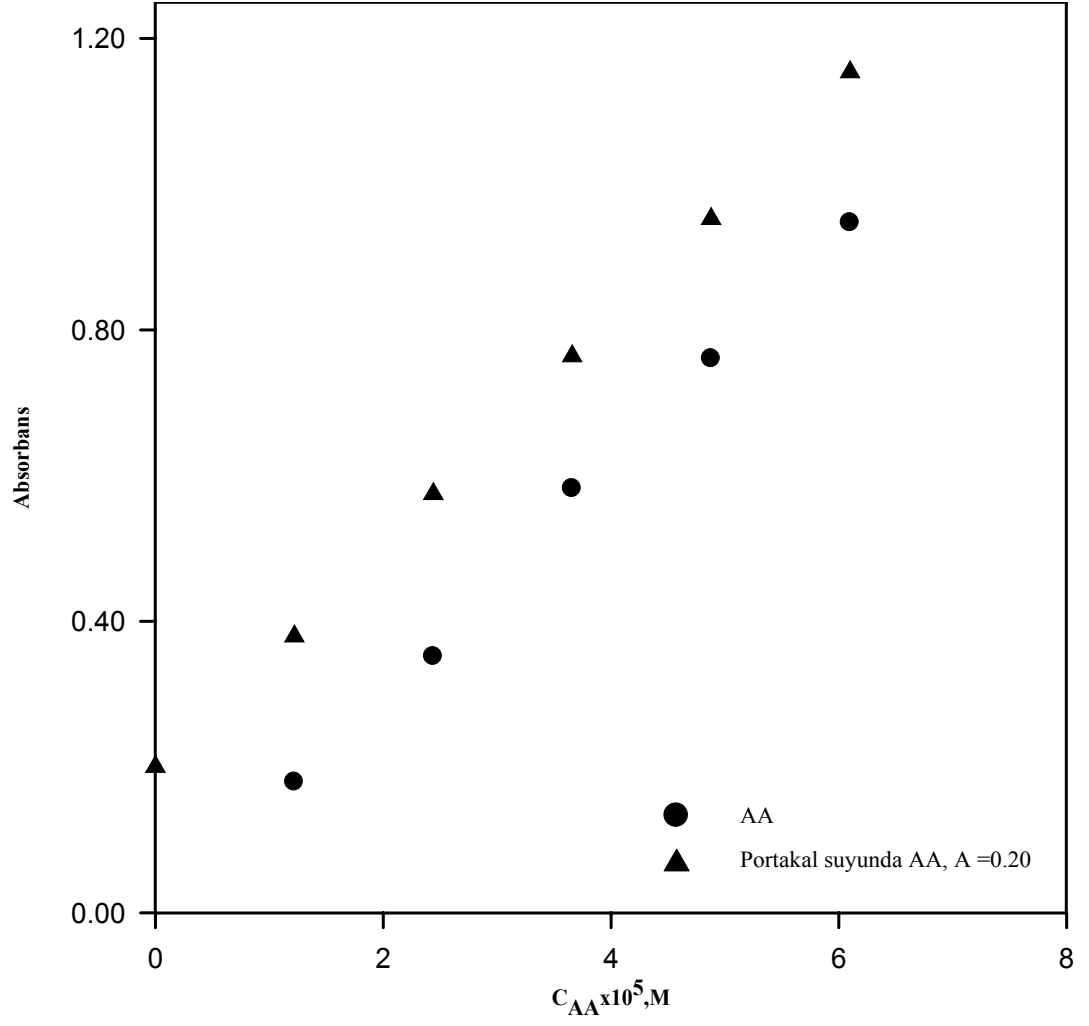
Örnek Hacmi + İlave AA derişimi	$A_{450\text{ nm}}$
0.25 mL 1:15 portakal suyu	0.20
0.25 mL 1:15 portakal suyu + 12.2 μM AA	0.38
0.25 mL 1:15 portakal suyu + 24.4 μM AA	0.58
0.25 mL 1:15 portakal suyu + 36.6 μM AA	0.77
0.25 mL 1:15 portakal suyu + 48.8 μM AA	0.96
0.25 mL 1:15 portakal suyu + 61.0 μM AA	1.16

Portakal suyunda AA standart katkısının görünür alandaki spektrumları ise aşağıdaki gibidir.



Şekil 4.8: 1:15 oranında seyreltilmiş portakal suyuna çeşitli derişimlerde AA standart katkısının oluşturduğu Cu(I)-Nc spektrumlar

Bu değerler kullanılarak kalibrasyon doğrusu çizilirse Şekil 4.6. elde edilir.



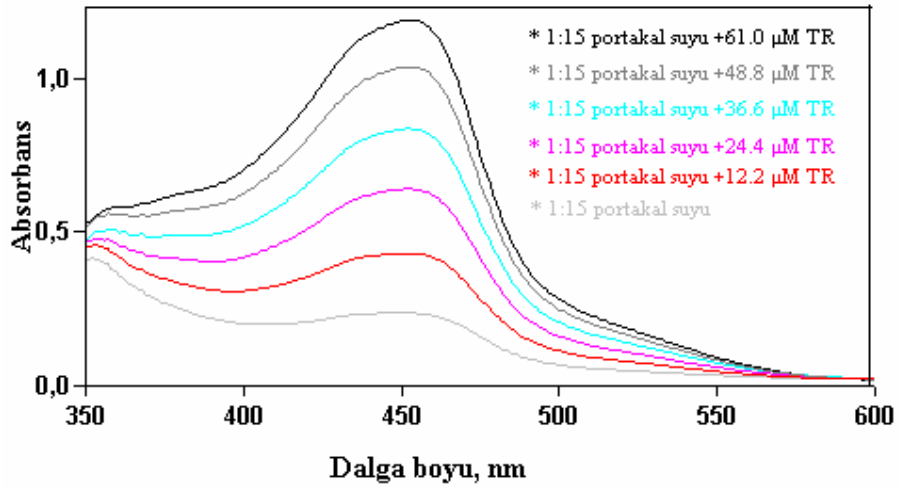
Şekil 4.9: BaŐlangiç absorbansı 0.20 olan 1:15 oranında seyreltilmiş portakal suyunda AA'nın kalibrasyon grafiği

Aynı portakal suyuna TR katkısı yapıldığında aşağıdaki sonuçlar elde edildi.

Tablo 4-9: 1:15 oranında seyreltilmiş olan portakal suyuna (12.2 μM + 61.0 μM) TR arasında değişen derişimlerde standart katkıları

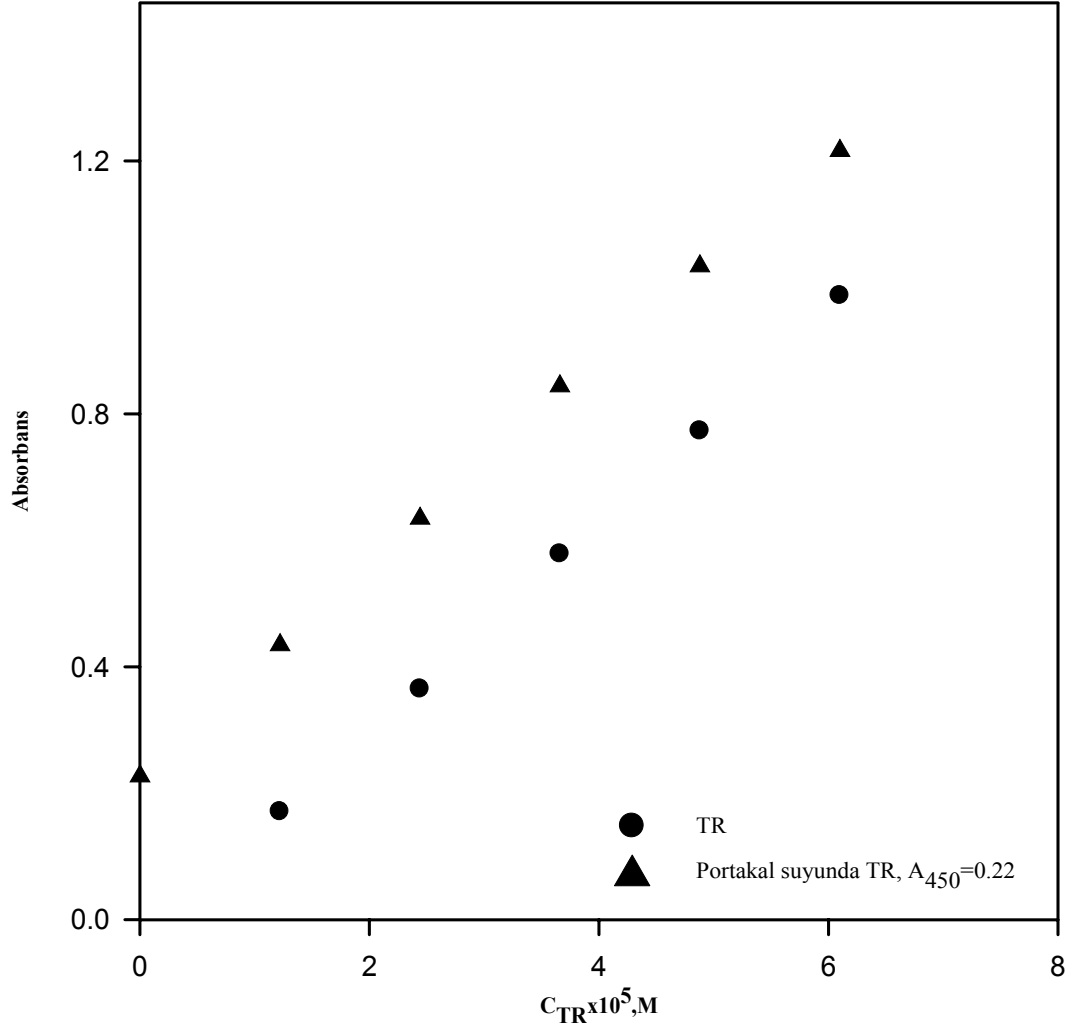
Örnek Hacmi + İlave TR derişimi	A _{450 nm}
0.25 mL 1:15 portakal suyu	0.22
0.25 mL 1:15 portakal suyu + 12.2 μM TR	0.44
0.25 mL 1:15 portakal suyu + 24.4 μM TR	0.64
0.25 mL 1:15 portakal suyu + 36.6 μM TR	0.85
0.25 mL 1:15 portakal suyu + 48.8 μM TR	1.04
0.25 mL 1:15 portakal suyu + 61.0 μM TR	1.22

1:15 portakal suyuna TR standart katkısının görünür alandaki spektrumları ise aşağıdaki gibidir.



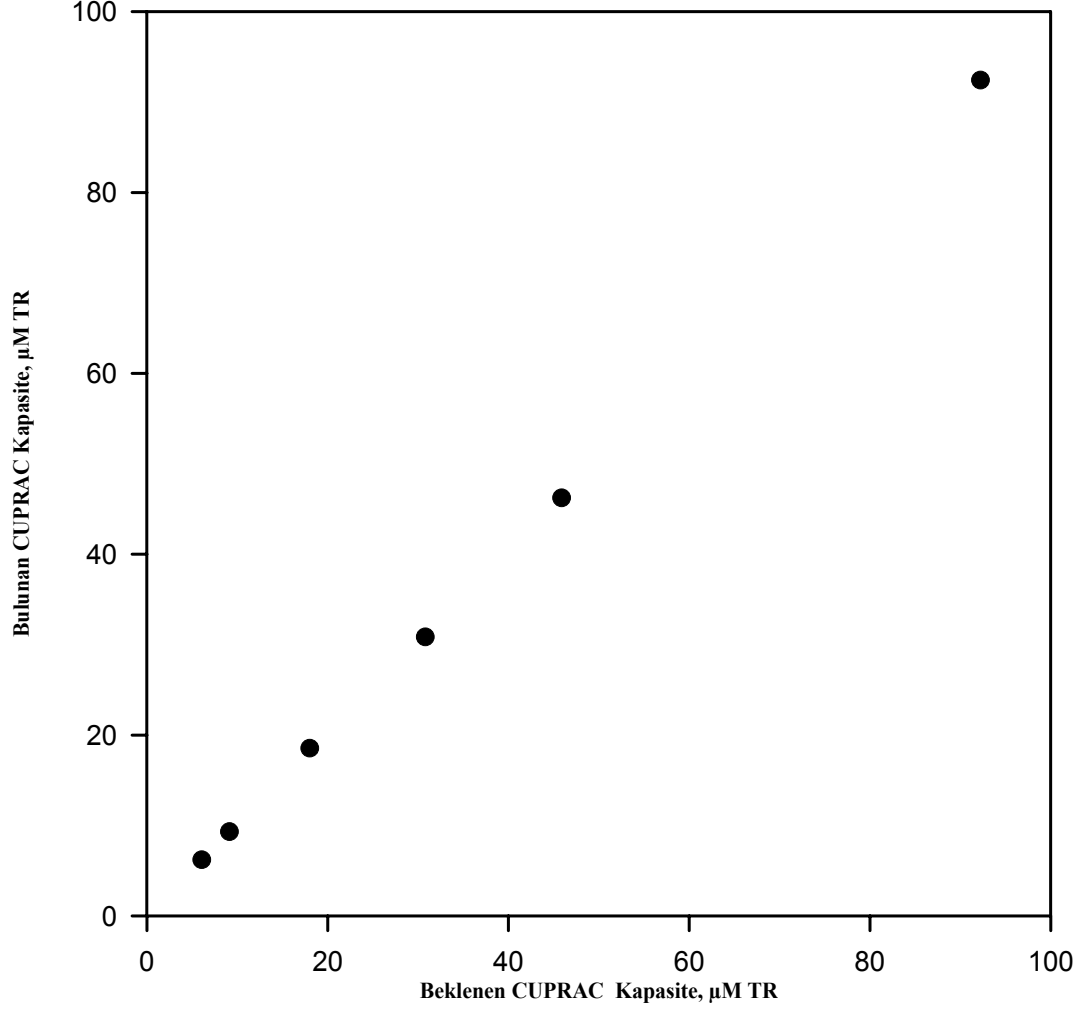
Şekil 4.10 : 1:15 oranında seyreltilmiş portakal suyuna çeşitli derişimlerde TR standart katkısının oluşturduğu Cu(I)-Nc spektrumları

1 :15 oranında seyreltilmiş olan aynı portakal suyuna başlangıç absorbansı 0.22 olacak şekilde TR standart katkıları yapılarak TR'nin yalnız başına olan çalışma doğrusu ile portakal suyuna yapılan TR katkılı çalışma doğruları arasında paralellik gözlenmiştir.



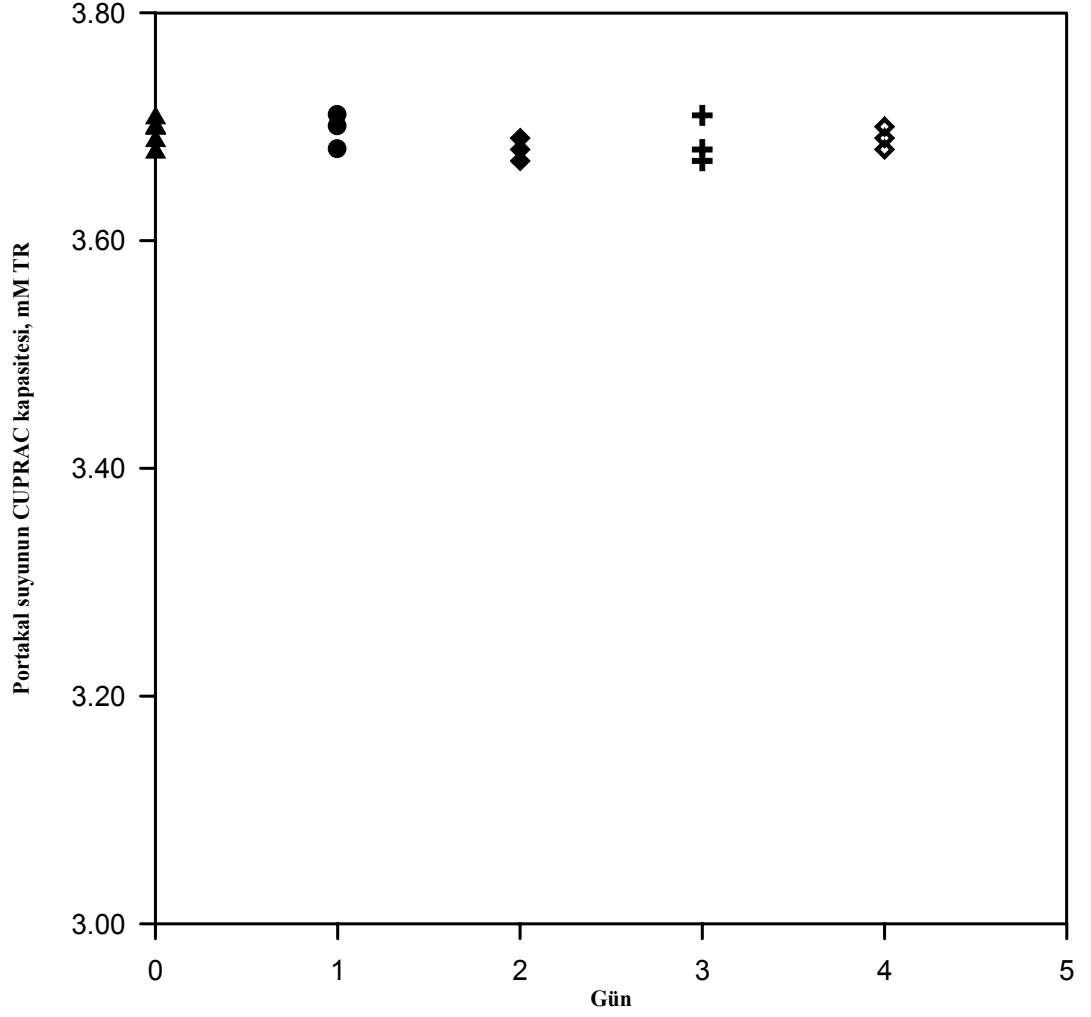
Şekil 4.11 : Başlangıç absorbansı 0.22 olan 1:15 oranında seyreltilmiş portakal suyunda TR'nin kalibrasyon grafiği

Portakal suyununun değişen oranlarda seyreltilmesi sonucu CUPRAC yöntemine göre beklenen ve bulunan kapasiteler arasındaki korelasyon ($r=0.99$) olarak bulunmuştur.



Şekil 4.12: Değişik oranlarda portakal suyunun seyreltilmesi sonucu beklenen CUPRAC kapasite ile bulunan CUPRAC kapasite arasındaki grafik ($r=0.999$)

5 gün süresince her gün taze hazırlanan 1:15 oranında seyreltilen portakal suyunun TAC'larını CUPRAC yöntemi ile belirlenerek gün içi ve günler arası değişimler belirlenmiştir.



Şekil 4.13: Cappy portakal suyunun CUPRAC yöntemine göre prezisyon (ölçüm tutarlılığı)
(gün içi ve günler arası değişimler)

4.4.2. Meyve Suları, Nektarlar ve Enerji İçeceğine CUPRAC, ABTS ve Folin Yöntemlerinin Uygulanması

Tablo 4.10 : Bazı içeceklerin CUPRAC ve ABTS yöntemlerinin uygulanmasıyla bulunan TEAC antioksidan kapasite değerleri ve bu içeceklerin Folin yöntemiyle bulunan toplam fenolik içerikleri (n=3)

İçecek Adı	TEAC _{CUPRAC} (mM TR)	TEAC _{ABTS} (mM TR)	TEAC _{Folin} (mM TR)
Sunpride elma suyu	3.06 ±0.04	2.97 ±0.03	9.90 ±0.07
Netto elma suyu	2.20 ±0.05	2.04 ±0.04	8.80 ±0.09
Dimex elma suyu	2.18 ±0.01	2.11 ±0.04	8.81 ±0.01
Pınar elma suyu	1.45 ±0.12	1.46 ±0.01	6.24 ±0.13
Kavaklıdere beyaz üzüm suyu	1.12 ±0.04	1.06 ±0.04	6.24 ±0.05
Kavaklıdere siyah üzüm suyu	2.44 ±0.08	2.50 ±0.05	9.95 ±0.08
Cuprisun portakallı içecek	1.44 ±0.04	1.52 ±0.05	6.18 ±0.07
Cappy portakal suyu	3.71 ±0.13	3.94 ±0.11	11.3 ±0.12
Pınar portakal suyu	1.28 ±0.05	1.12 ±0.05	6.84 ±0.11
Halk portakal suyu	2.07 ±0.09	2.12 ±0.07	6.39 ±0.09
Ersu portakal suyu	2.05 ±0.15	2.10 ±0.07	7.44 ±0.13
Golden portakal suyu	0.54 ±0.01	0.52 ±0.01	1.81 ±0.03
Wesergold Orangen soft	3.03 ±0.07	3.11 ±0.01	9.2 ±0.05
Sunpride C-mix	2.13 ±0.05	2.04 ±0.03	7.69 ±0.13
Piyale remix	1.71 ±0.03	1.60 ±0.09	5.62 ±0.08
Golden vişne nektarı	0.26 ±0.07	0.23 ±0.02	1.64 ±0.10
Ersu vişne nektarı	0.82 ±0.05	0.72 ±0.05	4.02 ±0.03
Ülker vişne nektarı	1.87 ±0.02	1.92 ±0.05	9.14 ±0.11
Piyale vişne nektarı	3.28 ±0.04	3.22 ±0.01	10.9 ±0.16
Halk vişne nektarı	3.85 ±0.02	3.90 ±0.02	12.8 ±0.06

İçecek adı	TEAC _{CUPRAC} (mM TR)	TEAC _{ABTS} (mM TR)	TEAC _{FOLIN} (mM TR)
Pınar kayısı nektarı	1.82 ±0.05	1.70 ±0.01	8.19 ±0.08
Halk kayısı nektarı	1.55 ±0.02	1.51 ±0.02	7.71 ±0.13
Pınar şeftali nektarı	2.10 ±0.12	2.01 ±0.03	8.92 ±0.26
Energy power drink	0.41 ±0.02	0.42 ±0.05	2.13 ±0.04
Nar suyu	5.98 ±0.08	5.83 ±0.05	19.2 ±0.11
Limon sosu	0.90 ±0.08	0.94 ±0.11	2.12 ±0.08
Coca cola	0.15 ± 0.02	0.17 ± 0.01	0.25 ± 0.03
Coca cola light	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.02	0.24 ± 0.03
Pepsi	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.27 ± 0.02
Pepsi light	0.14 ± 0.03	0.14 ± 0.03	0.25 ± 0.02
Cola Turka	0.26 ± 0.02	0.28 ± 0.04	0.45 ± 0.04

Cappy portakal suyunun her üç yöntemle göre TEAC değerlerinin hesaplanmasına ait örnekler aşağıda yer almaktadır.

CUPRAC yöntemi için $TEAC_{CUPRAC} = (\text{Örnek absorbanansı}/1.67 \times 10^4) \times (\text{Seyrelme faktörü}) \times (4.1 \text{ mL}/\text{Alınan örnek hacmi})$

Örnek hesaplama: $0.2518/1.67 \times 10^4 \times (15/1) \times (4.1/0.25) = 3.71 \text{ mM TR}$

ABTS yöntemi için $TEAC_{ABTS} = (\text{Örnek Fark Absorbanansı}/ 2.6 \times 10^4) \times (\text{Seyrelme faktörü}) \times (5 \text{ mL}/\text{Alınan örnek hacmi})$

Örnek hesaplama: $(0.6829/2.6 \times 10^4) \times (15/1) \times (5/0.5) = 3.94 \text{ mM TR}$

Folin yöntemi için $TEAC_{Folin} = (\text{Örnek absorbanansı}/ 4.65 \times 10^3) \times (\text{Seyrelme faktörü}) \times (4.75 \text{ mL}/\text{Alınan örnek hacmi})$

Örnek hesaplama: $(1.4749/4.65 \times 10^3) \times (15/1) \times (4.75/2) = 11.3 \text{ mM TR}$

4.4.3. Meyve Suları, Nektarlar ve Enerji İçeceği'nin 1,10-Fenantrolin Yöntemi ile Toplam AA İçeriğinin Belirlenmesi

Tablo 4.11: Bazı içeceklerin CUPRAC yöntemi ile AA cinsinden toplam antioksidan kapasitesi ile bu içeceklerin fenantrolin yöntemiyle bulunan toplam AA içerikleri (n=3)

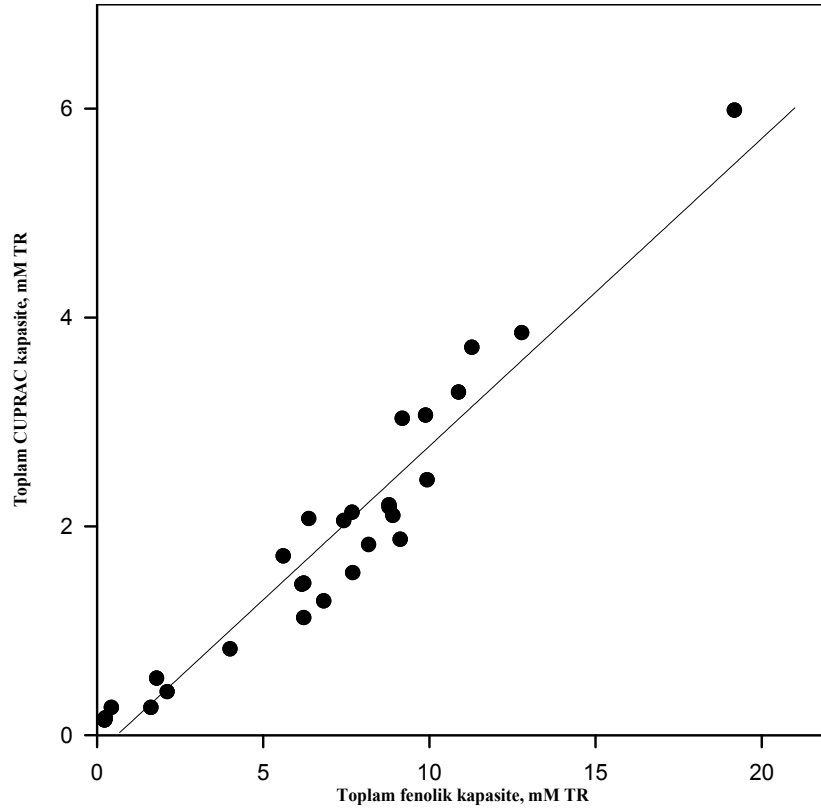
İçecek Adı	TEAC _{CUPRAC} (mM AA)	TEAC _{FENANTROLIN} (mM AA)	% AA/TAC (mM/mM)
Sunpride elma suyu	3.21 ± 0.04	1.12 ± 0.18	35
Netto elma suyu	2.31 ± 0.05	0.93 ± 0.07	40
Dimex elma suyu	2.29 ± 0.01	0.73 ± 0.09	32
Pınar elma suyu	1.52 ± 0.12	0.41 ± 0.05	27
Kavaklıdere beyaz üzüm suyu	1.18 ± 0.04	0.72 ± 0.07	61
Kavaklıdere siyah üzüm suyu	2.56 ± 0.08	0.86 ± 0.08	34
Cuprisun portakallı içecek	1.52 ± 0.04	1.14 ± 0.04	75
Cappy portakal suyu	3.90 ± 0.13	1.55 ± 0.13	40
Pınar portakal suyu	1.35 ± 0.05	0.45 ± 0.09	33
Halk portakal suyu	2.17 ± 0.09	1.06 ± 0.04	49
Ersu portakal suyu	2.15 ± 0.15	1.06 ± 0.03	49
Golden portakal suyu	0.57 ± 0.01	0.14 ± 0.04	25
Wesergold Orangen soft	3.19 ± 0.07	1.86 ± 0.04	58
Sunpride C-mix	2.24 ± 0.05	1.53 ± 0.08	68
Piyale remix	1.80 ± 0.03	1.16 ± 0.09	64
Golden vişne nektarı	0.27 ± 0.07	0.07 ± 0.06	26
Ersu vişne nektarı	0.86 ± 0.05	0.36 ± 0.09	42
Ülker vişne nektarı	1.96 ± 0.02	0.94 ± 0.04	48
Piyale vişne nektarı	3.44 ± 0.04	1.03 ± 0.06	30
Halk vişne nektarı	4.04 ± 0.02	1.30 ± 0.04	32
Pınar kayısı nektarı	1.91 ± 0.05	0.64 ± 0.08	34
Halk kayısı nektarı	1.63 ± 0.02	0.93 ± 0.08	57
Pınar şeftali nektarı	2.21 ± 0.12	0.51 ± 0.08	23
Energy power drink	0.43 ± 0.02	0.09 ± 0.04	21
Nar suyu	6.28 ± 0.08	1.06 ± 0.14	17
Limon sosu	0.95 ± 0.09	0.72 ± 0.11	76

Meyve suları ve meyve nektarlarının toplam AA kapasitesinin belirlenmesinde kullanılan formülasyonlar aşağıdaki gibidir:

CUPRAC yöntemi için $TEAC_{CUPRAC} = (\text{Örnek absorbanısı}/1.6 \times 10^4) \times (\text{Seyrelme faktörü}) \times (4.1 \text{ mL}/\text{Alınan örnek hacmi})$

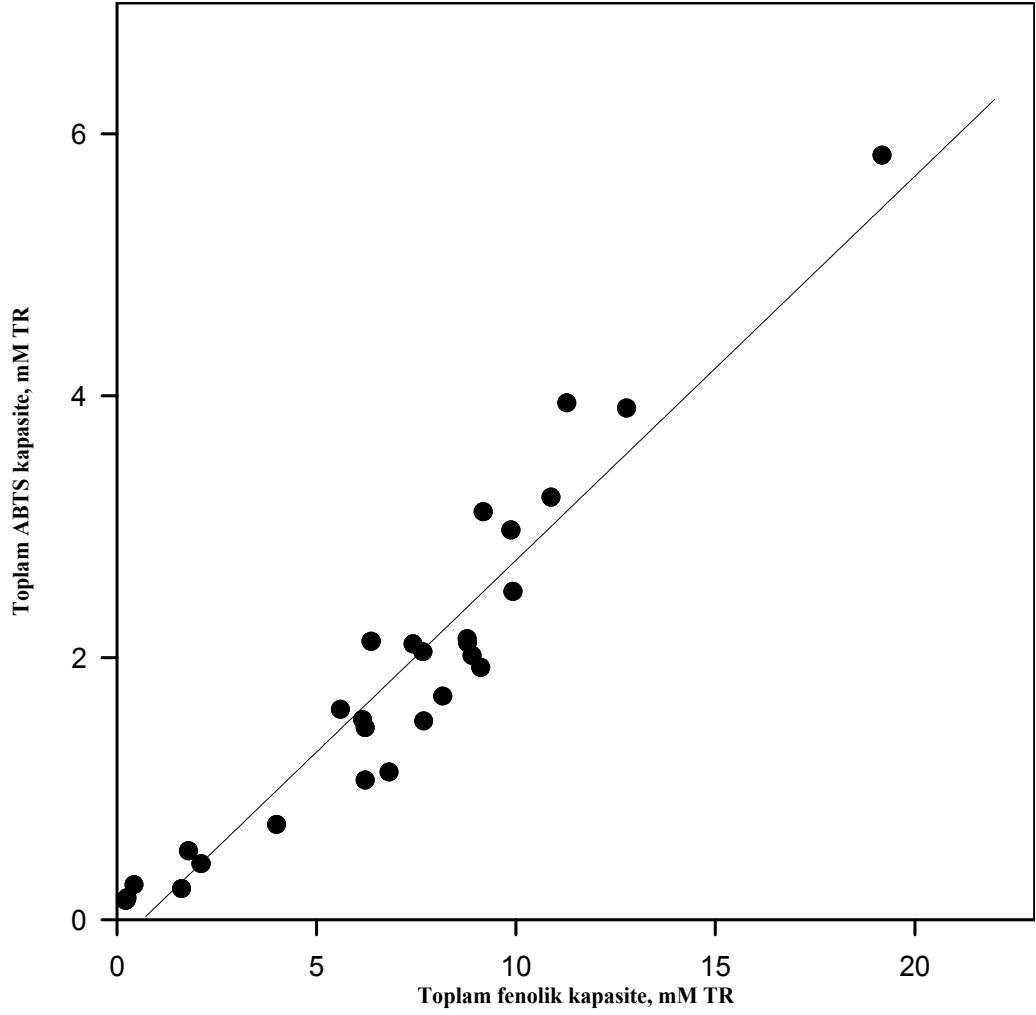
Fe(III) –fenantrolin yöntemi için $= (\text{Örnek absorbanısı}/2.2 \times 10^4) \times (\text{Seyrelme faktörü}) \times (25 \text{ mL}/\text{Alınan örnek hacmi})$

Bütün meyve sularının CUPRAC yöntemine göre bulunan TAC'ları ile Folin yöntemine göre bulunan toplam fenolik içerikleri arasında grafik çizildiğinde yüksek bir korelasyon olduğu gözlemlendi ($r=0.93$)



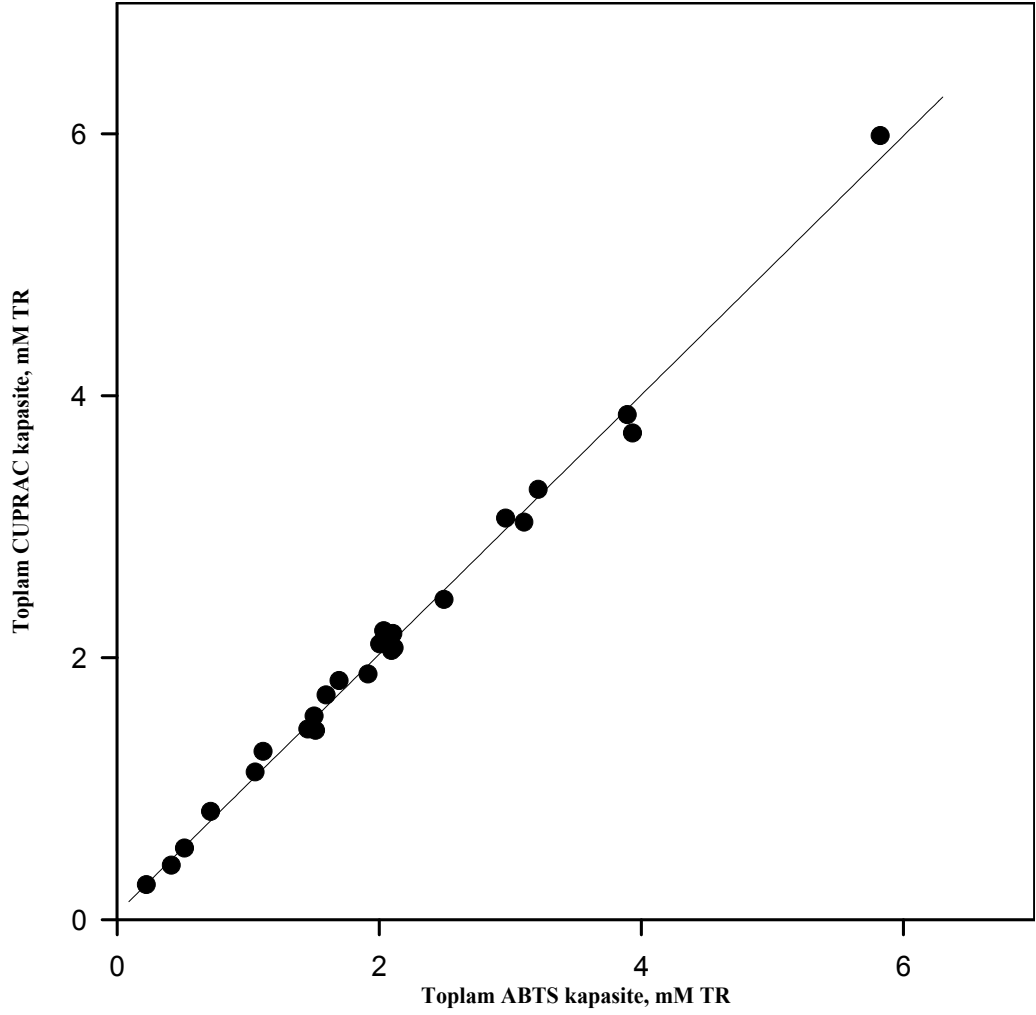
Şekil 4.14: Bütün meyve sularının CUPRAC yöntemi ile ölçülen toplam antioksidan kapasiteleri ile FOLİN yöntemi ile ölçülen toplam fenolik içerikleri arasındaki korelasyon ($r=0.93$)

Bütün meyve sularının asli kıyas yöntemi olarak kullanılan ABTS yöntemi ile ölçülen TAC'ları ile Folin yöntemine göre ölçülen toplam fenolik içerikleri arasında grafik çizildiğinde her iki yöntem bulguları arasındaki korelasyon ($r=0.90$)'dur.



Şekil 4.15: Bütün meyve sularının ABTS yöntemi ile ölçülen toplam antioksidan kapasiteleri ile FOLİN yöntemi ile ölçülen toplam fenolik içerikleri arasındaki korelasyon ($r=0.90$)

Bütün meyve sularının CUPRAC yöntemi ile bulunan TAC'ları ile ABTS yöntemi ile bulunan TAC'ları arasında grafik çizildiğinde her iki yöntem bulguları arasındaki korelasyon ise $r=0.99$ olarak bulundu.



Şekil 4.16: Bütün meyve sularının ABTS ve CUPRAC yöntemi ile ölçülen toplam antioksidan kapasiteleri arasındaki korelasyon ($r=0.994$)

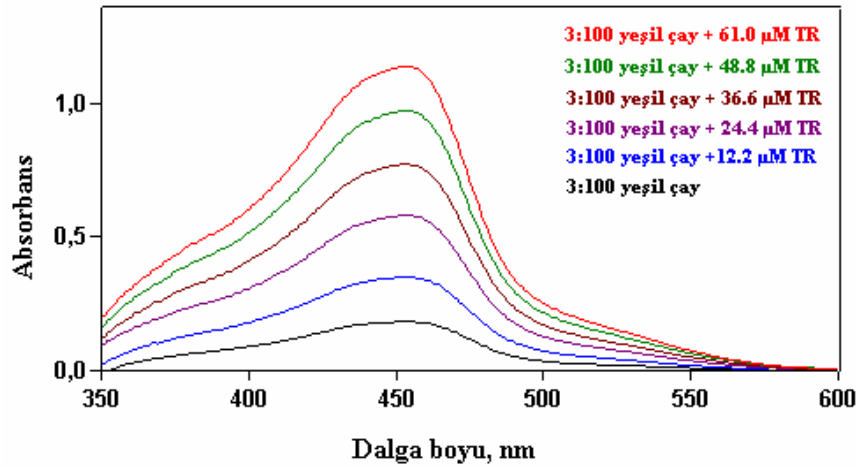
4.4.4. Yeşil Çaya CUPRAC Yönteminin Uygulanması

Poşet Doğa yeşil çay (1.40 g) 250 mL sıcak su içerisinde demlendikten sonra oluşan yeşil çay infüzyonu soğutuldu. Daha sonra 3mL alınarak 100 mL son hacme seyreltildi. Oluşan son çözültiden 0.2 mL alınarak CUPRAC yöntemi ile 450 nm’de absorbansı okundu. Başlangıç çözelti absorbansı 0.20’dir. Daha sonra bu yeşil çay infüzyonuna TR standart katkısı yapılarak çalışma doğruları çizildi.

Tablo 4.12: Yeşil çay ekstraktına TR standart katkısı

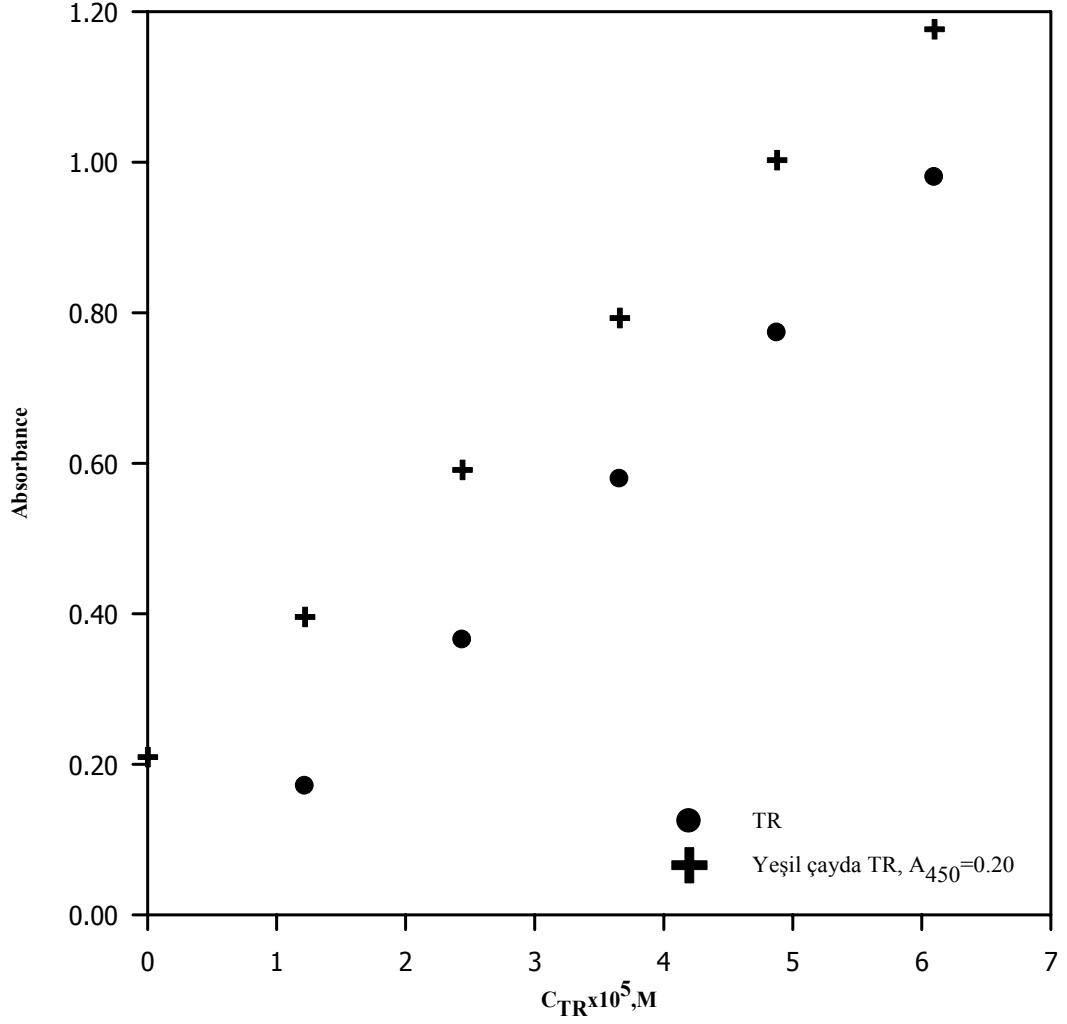
Örnek Hacmi + İlave TR derişimi	A _{450 nm}
0.25 mL 1:100 yeşil çay ekstraktı	0.20
0.25 mL 1:100 yeşil çay ekstraktı + 12.2µM TR	0.40
0.25 mL 1:100 yeşil çay ekstraktı + 24.4µM TR	0.59
0.25 mL 1:100 yeşil çay ekstraktı + 36.6µM TR	0.79
0.25 mL 1:100 yeşil çay ekstraktı + 48.8µM TR	1.00
0.25 mL 1:100 yeşil çay ekstraktı + 61.0µM TR	1.17

Doğa yeşil çay infüzyonunda TR standart katkılarının görünür alandaki spektrumları aşağıdaki gibidir.



Şekil 4.17: 3:100 oranında seyreltilmiş yeşil çay infüzyonuna TR standart katkısının oluşturduğu Cu(I)-Nc spektrumları

Yeşil çay infüzyonu başlangıç absorbansı 0.20 olacak şekilde 3:100 oranında su ile seyreltilmiştir. Daha sonra yeşil çay infüzyonuna TR standart katkısı yapıldığında paralel çalışma doğruları elde edilmiştir.



Şekil 4.18: Başlangıç absorbansı 0.20 olan yeşil çay ekstraktında TR'nin kalibrasyon grafiği

4.4.5. Bazı Çaylara CUPRAC Yönteminin Uygulanması

Bütün çaylar CUPRAC yöntemine göre başlangıç absorbansı 0.20 olacak şekilde seyreltilip bu çay örneklerinden değişen oranlarda alınıp CUPRAC yöntemi, ABTS yöntemi ve Folin yöntemi bu çay infüzyonlarına uygulanmıştır. Çay tartımları 1.4-2 g arasında değişmektedir. Başlangıç çay infüzyonu hacmi ise 250 mL'dir. Buna göre çay infüzyonlarının TAC değerleri mmol Tr/g cinsinden verilmiştir. En yüksek antioksidan kapasiteye sahip çay Ceylon harmanlanmış çaydır (4.41 mmol Tr/g).

Tablo 4.13: CUPRAC yöntemi ve ABTS yöntemine göre poşet ve normal çayların bulunan toplam antioksidan kapasiteleri ile bu çayların FOLİN yöntemine göre ölçülen toplam fenolik kapasiteleri

Çayın Botanik ismi	Çayın ismi	Toplam CUPRAC Kapasite (mmol Tr/g)	Toplam ABTS Kapasite (mmol Tr/g)	Toplam Fenolik Kapasite (mmol Tr/g)
<i>Camellia sinensis</i>	Limonlu yeşil çay (poşet)	1.61	1.74	1.38
<i>Camellia sinensis</i>	Ceylon harmanlanmış çay (poşet)	4.41	4.05	4.06
<i>Camellia sinensis</i>	İngiliz kahvaltı çayı (poşet)	1.26	1.20	1.09
<i>Camellia sinensis</i>	Türk çaykur çayı (poşet)	0.83	0.51	0.61
<i>Camellia sinensis</i>	Yeşil çay	1.07	0.86	1.06
<i>Camellia sinensis</i>	Türk rize çayı	0.42	0.37	0.47
<i>Camellia sinensis</i>	Türk harmanlanmış siyah çay	0.38	0.34	0.42
<i>Camellia sinensis</i>	Yeşil çay (poşet)	0.94	0.62	0.97
<i>Tilia europaea (cordata)</i>	İhlamur	0.18	0.11	0.33

Çayların TAC'larının hesaplanmasında kullanılan formülasyonlar aşağıdaki gibidir:

CUPRAC yöntemi için $TEAC_{CUPRAC} = (\text{Örnek absorbansı}/1.67 \times 10^4) \times (\text{Seyrelme faktörü}) \times (4.1 \text{ mL}/\text{Alınan örnek hacmi}) \times (250/\text{Tartım})$

ABTS yöntemi için $TEAC_{ABTS} = (\text{Örnek Absorbansı}/ 2.6 \times 10^4) \times (\text{Seyrelme faktörü}) \times (5 \text{ mL}/\text{Alınan örnek hacmi}) \times (250/\text{Tartım})$

Folin yöntemi için $TEAC_{Folin} = (\text{Örnek absorbansı}/ 4.65 \times 10^3) \times (\text{Seyrelme faktörü}) \times (4.75 \text{ mL}/\text{Alınan örnek hacmi}) \times (250/\text{Tartım})$

Meyve sularında da yer alan bazı maddelerin interferans (girişim) etkileri, değişen oranlarda mmol interferant /mmol AA olacak şekilde interferant maddelerden alınıp CUPRAC yöntemine göre AA'nın absorbansındaki değişiklikler tespit edilmek suretiyle belirlenmiştir.

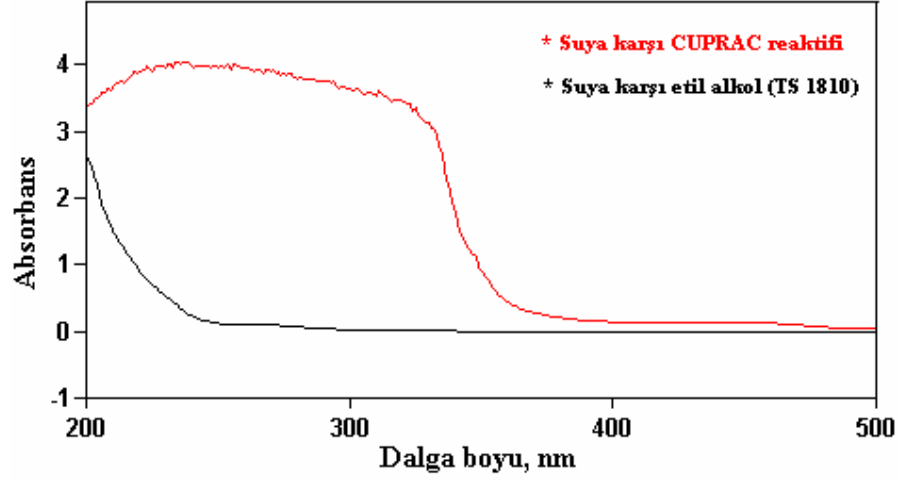
Tablo 4.14: Meyve sularının antioksidan kapasitesinin tayininde değişik türlerin interferans (girişim) etkileri

İnterferant	(mmol İnterferant) / (mmol AA)	CUPRAC yöntemi
Okzalal	1000	-
Tartarat	1000	-
Sitrat	1000	-
Glikoz	1000	-
Tannik asit	10	+
Nitrit	10	-
Asetil salisilik asit	10	-
Glutamik asit	10	+

- : interferans etkisinin olmadığını

+ : interferans etkisi gösterdiğini ifade etmektedir.

Kullanılan etil alkolün özelliğine göre içerisinde bulunan bazı maddelerin interferans etkileri olabilir. Bu özelliği belirlemek için CUPRAC reaktifi ve etil alkolün ayrı ayrı suya karşı spektrumları çizilmiştir.



Şekil 4.19: Etil alkolün CUPRAC reaktifine etkisi

Suya karşı etil alkolün (TS 1810) spektrumuna bakıldığında alkol içerisinde olması beklenen fenollerden kaynaklanan bir pik görülmemektedir. Alkollü neokuproin reaktifinin suya karşı spektrumunda da alkolden gelen bozucu bir etkinin olmadığı gözlenmektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çeşitli gıdalar ve biyolojik sıvılar için toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesi amacıyla geliştirilen spektrofotometrik bir yöntem olan CUPRAC yöntemi, nötral pH'da, bakır(II) klorür ile kromojenik bir ligand olan neokuproinin oluşturduğu Cu(II)-Nc kompleksinin antioksidan bileşikler varlığında Cu(I)-Nc'ye dönüşerek sarı-turuncu arası renk oluşumuna dayalı bir yöntemdir. Geliştirilen bu yöntemle öncelikle TR, AA ve TOC'nin kalibrasyon doğruları çizilerek Beer kanunu uyarınca lineer oldukları aralıklar ve bu yöntemle göre etkin molar absorptivite belirlenmiştir. Bu antioksidan bileşiklerin CUPRAC yöntemi ile elde edilen $TEAC_{CUPRAC}$ değerlerinin literatürde yer alan diğer yöntemlerle elde edilen TEAC değerleri ile uyum gösterdiği gözlenmiştir. AA'nın CUPRAC yöntemi ile $TEAC_{CUPRAC}$ değeri 0.95 iken AA için orijinal ABTS yöntemi ile elde edilen $TEAC_{ABTS}$ değeri 1.0'dır. Genel olarak 1:15 oranında seyreltilmiş olan meyve sularına TR ile AA katkısı yapıp TR ile AA'nın yalnız başına çizilen kalibrasyon doğruları ile katkılı kalibrasyon doğruları arasında oldukça uyumlu paralellikler elde edilmiştir. Bu da meyve suyu antioksidanlarıyla TR veya AA arasında, Beer Kanunu'ndan sapmalara yol açacak bir kimyasal etkileşme olmadığını göstermektedir.

İçeceklerden meyve suları, nektarlar, kolalı asidik içecekler ve bazı bitkisel çaylar ile poşet çaylara normal CUPRAC yöntemi uygulanarak bu bileşiklerin toplam antioksidan kapasiteleri belirlenmiştir. Meyve suları, nektarları ve asidik kolalı içeceklerin CUPRAC yöntemine göre TAC'larının hesaplanmasında aşağıdaki eşitlikten yararlanılmıştır.

CUPRAC yöntemi için $TEAC_{CUPRAC} = (\text{Örnek absorbansı}/1.67 \times 10^4) \times (\text{Seyrelme faktörü}) \times (4.1 \text{ mL}/\text{Alınan örnek hacmi})$

CUPRAC yöntemine göre en yüksek antioksidan kapasite meyve suları içerisinde nar suyunda gözlenmiştir ($5.98 \pm 0.08 \text{ mM TR}$). Gil ve arkadaşları ticari nar sularının TAC'ını diğer meyve suları ve yeşil çaya nazaran daha yüksek bulmuşlardır [59]. Meyve nektarları içerisinde yüksek antioksidan kapasite gösterenler ise halk vişne nektarı ($3.85 \pm 0.02 \text{ mM TR}$), Cappy portakal suyu ($3.71 \pm 0.13 \text{ mM TR}$), Piyale vişne nektarı ($3.28 \pm 0.04 \text{ mM TR}$), Wesergold oranen soft ($3.03 \pm 0.07 \text{ mM TR}$) olarak bulunmuştur. İlkay Tosun ve arkadaşları Samsun marketlerinde satılan portakal

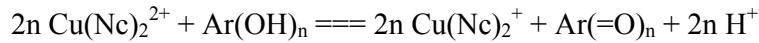
nektarının FRAP değerini 6.54, vişne nektarının 8.01, kayısı nektarının 5.68 ve Şeftali nektarının ise 5.19 olarak bulmuşlardır. FRAP değerlerinin yarısı CUPRAC değerlerine eşit olduğu gözönüne alındığında sonuçlar İlkey Tosun ve arkadaşlarının elde ettiği FRAP verileriyle uyum göstermektedir [54]. Elma suları içerisinde en dşuk TAC, pınar elma suyunda (1.45 ± 0.12 mM TR), en yüksek TAC ise sunpride elma suyunda (3.06 ± 0.04 mM TR) ; zm suları içerisinde aynı markalı beyaz ve siyah üzüm sularının TAC'larına bakıldığında Kavaklıdere siyah üzüm suyu (2.44 ± 0.08 mM TR), Kavaklıdere siyah üzüm suyu ise (1.12 ± 0.04 mM TR) göstermiştir, burada siyah üzüm suyunun yüksek TAC göstermesinde antosiyaninlerin katkısının yüksek olduğu düşünülmektedir. Vişne nektarları içerisinde ise Golden vişne nektarı en dşuk TAA (0.26 ± 0.07 mM TR), Halk vişne nektarı ise en yüksek TAC'yı (3.85 ± 0.02 mM TR) göstermiştir. Pınar Şeftali nektarı orta düzeyde bir TAC (2.10 ± 0.12 mM TR), limon sosu ise buna nazaran daha dşuk bir TAC (0.90 ± 0.08 mM TR) göstermiştir. Asidik kolalı içecekler de CUPRAC yöntemi ile analiz edilmiş ve bu içeceklerin genel olarak dşuk TAC gösterdiği tespit edilmiştir. Coca cola (0.15 ± 0.02 mM TR), pepsi (0.16 ± 0.01 mM TR) TAC'ya sahiptir. Asidik kolalı içecekler içerisinde en yüksek TAC Cola Turka'da gözlenmiştir (0.26 ± 0.02 mM TR). Pellegrini ve arkadaşlarına göre de kolalı içecekler dşuk antioksidan kapasite göstermektedir [49]. Enerji içeceklerinden Energy power drink CUPRAC yöntemi ile dşuk bir TAC göstermiştir (0.41 ± 0.02 mM TR), ancak asidik kolalı içeceklerle kıyaslandığında bu değerin daha yüksek olduğu grlmektedir. Bütün meyve suları, meyve nektarları ve kolalı asidik içeceklerin normal CUPRAC yöntemi ile bulunan TEAC değerleri, asli kıyas yöntemi olarak seçilen ve belirtilen bütün zltilere uygulanan ABTS yöntemi ile elde edilen TEAC değerleri ile yüksek bir uyum göstermektedir ve iki yöntem bulguları arasındaki korelasyon ($r=0.994$) olarak bulunmuştur. CUPRAC yöntemi ile elde edilen TEAC değerleri ayrıca bu içeceklerin FOLIN yöntemi ile belirlenen toplam fenolik içerikleri ile de kıyaslanarak her iki yöntem bulguları arasındaki korelasyonun ($r=0.93$) olduğu tespit edilmiştir. ABTS yöntemi ile elde edilen TEAC ile FOLIN yöntemi ile elde edilen TEAC arasındaki korelasyon ise ($r=0.90$) olarak gözlenmiştir. Burada CUPRAC yöntemi ile FOLIN yöntemi arasındaki korelasyonun ABTS ile FOLIN yöntemleri arasındaki korelasyondan yüksek olduğu gözlenmektedir. Bu yöntemlerin tümü, Huang ve arkadaşlarının sınıflamasına göre elektron transfer esaslı antioksidan ölçüm

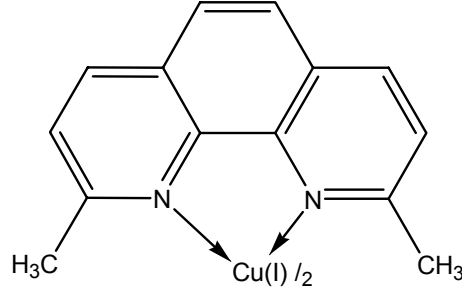
yöntemleri olduğundan bunlar arasındaki korelasyonun yüksek çıkması beklenen bir gelişmedir [20].

Meyve sularının ve meyve nektarlarının 1,10-fenantrolin yöntemi ile bulunan AA kapasitesi ile bu içeceklerin CUPRAC yöntemi ile bulunan TAC'sı arasındaki korelasyona bakıldığında; AA içeriğiyle TAC'ya en yüksek katkı sağlayan meyve suları limon sosu ve cuprisun portakallı içeceklerdir. Limon sosunun CUPRAC yöntemi ile bulunan TAC'sı (0.95 ± 0.09 mM AA) ve 1,10-fenantrolin yöntemi ile bulunan AA kapasitesi ise (0.72 ± 0.11 mM AA) olarak bulunmuştur. AA'nın TAC'ya katkısı %76'dır. Cuprisun portakallı içekte ise TAA (1.52 ± 0.04 mM AA), AA kapasite ise (1.14 ± 0.04 mM AA) ve AA'nın TAC'ya katkısı %75'dir. Diğer içeceklerde ise toplam antioksidan kapasiteye, askorbik asit dışındaki polifenollerin katkısı fazladır.

Çaylarda ise en yüksek TAC değerini Ceylon harmanlanmış çay (poşet) 4.41 mmol TR/g, en düşük TAC değerini ise ıhlamur infüzyonu göstermiştir (0.18 mmol TR/g). Ceylon harmanlanmış çay hariç analiz edilen yeşil çaylar siyah çaylara nazaran daha yüksek TAC değeri göstermektedir. Yeşil çaydaki bazı antioksidanların, siyah çay imalatı sırasında enzimatik oksidasyona uğratıldığı gözönüne alındığında bu durum açıklanabilir [49]. Benzie ve Szeto siyah çayların (fermente edilmiş) $132-654$ μ mol TR/g, oolong çayların (yarı fermente edilmiş) $233-532$ μ mol TR/g, yeşil çayların (fermente edilmemiş) $272-1144$ μ mol TR/g arasında değişen aktiviteler gösterdiğini bulmuşlardır. Genel olarak yeşil çaylar siyah çaylara göre daha yüksek TAC göstermektedir [55].

Yeni geliştirilen CUPRAC yönteminde kullanılan kromojenik oksidasyon reaktifi olan bis(neokuproin)-bakır(II) klorür ile antioksidan bileşik arasındaki reaksiyon aşağıdaki şekilde gerçekleşmektedir.





Şekil 5.1: Bis(2,9-dimetil)-1,10-fenantrolin- Bakır(I) kelatı

Bu reaksiyonda, $Ar(=O)_n$, hidroksi grubu içeren antioksidan polifenolü ifade etmektedir. Tepkime sonunda 2 proton açığa çıkmakta ve $Ar(=O)_n$ grubu antioksidan bileşikler kinon formlarına dönüşmektedir. $Cu(II)-Nc$ ise 450 nm'de maksimum gösteren şiddetli renk oluşumuyla birlikte $Cu(I)-Nc$ kelatına dönüşmektedir. Bu reaksiyonda, n-OH grubu içeren antioksidan karakterli beleşikler, 2n-e donör olarak hareket etmektedir. TR, AA ve TOC de $Cu(II)-Nc$ kelatına karşın 2 elektron donördür.

CUPRAC yönteminin avantajları şu şekilde özetlenebilir.

1. Reaktif, fenantrolin ve tripridiltiazil ligandları ile kompleksleşmiş haldeki $Fe(II)-Fe(III)$ çiftine nazaran daha düşük redoks potansiyeline sahip olması nedeniyle seçicidir. Gıda maddelerinde bolca bulunan basit şekerler ve sitrik asit, CUPRAC yöntemi ile okside olmazlar.
2. Reaktif, kromojenik radikaller olan ABTS ve DPPH'ya nazaran daha stabil, ucuz ve kolay ulaşılabiliridir.
3. Yöntem birçok konvansiyonel laboratuarda standart kolorimetre yardımıyla kolaylıkla kullanılabilir. CUPRAC yönteminde yüksek kalitede operatörlere ve karmaşık cihazlara gerek yoktur.
4. Hava, ışık, nem ve pH'ya aşırı bağımlı DPPH yönteminin tersine bu parametrelere fazlaca bağımlı olmayan bir redoks reaksiyonun neticesinde renkli bir kelat olan $Cu(I)-Nc$ oluşmaktadır.
5. Derişime karşı analitik cevaplar geniş bir aralıkta lineerlik göstermektedir. Diğer yöntemlerin(özellikle kinetik temelli olanlarının) çoğunda polinomial eğriler elde edilmektedir.

6. Redoks reaksiyonu FRAP yönteminde olduğu gibi asidik bir pH olan pH=3.6'dan farklı olarak fizyolojik bir pH olan pH=7'de gerçekleştirilmektedir. Benzer şekilde bir elektron-transfer esaslı yöntem olan Folin yöntemi de yine fizyolojik pH'tan uzak olan pH=10'da gerçekleştirilmektedir. Gerçekçi olmayan pH'larda çalışan antioksidan tayin yöntemlerinde, toplam kapasiteyi olduğundan az veya fazla bulma tehlikesi vardır, çünkü asidik pH'larda çoğu antioksidanlar protonlanmış olduğundan oksidasyonları zordur; bazik pH'larda ise antioksidanlar protonlarını vermiş olduklarından oksidasyonları aşırı kolaylaşmıştır.
7. Bu yöntemle hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanlar tayin edilebilmektedir.
8. Literatürde neredeyse en yaygın TAC ölçüm yöntemi olan ABTS/TEAC ile iyi korelasyon göstermeyen H-atomu transferi esaslı ve kinetik temelli yöntemlerin aksine, CUPRAC yöntemi ABTS ile yüksek korelasyon vermektedir.

KAYNAKLAR

1. GARDES-ALBERT, M., JORE, D., ABEDİNZADEH, Z., REMÍTA, S., ROUSCİLLES, A., UMR 8601-CNRS, Laboratoire de Chimie Physique, Université PARIS 5, 'Oxidative Stress' Expression of Interest for the VI. Framework Programme of the European Commission, Annex 3, Network of Excellence Project, Update 2 May, 2002.
2. PRIOR, R. L., CAO, G., 1999, In vivo total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods, *Free Radical Biol. Medicine*, 27, 1173-1181.
3. L. PACKER, S. U. WEBER, G. RIMBACH, 2001, Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signalling, *J. Nutr.*, 131, 369-373.
4. RICCIARELLI, R., ZINGG, J. M., AZZI, A., 2001, Vitamin E: protective role of a Janus molecule, *FASEB J.*, 15, 2314-2325.
5. HOLLMAN, P. C. H., 2001, Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects, *J. Sci. Food Agric.*, 81, 842-852
6. KRIS-ETHERTON, P., KEEN C. L., 2002, Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health, *Curr. Opin. Lipidol*, 13, 41-49.
7. ÇAKMAKÇI, S., ÇELİK, I., (2000), Gıda katkı maddeleri, (Dördüncü baskı)
8. DEMING, D.M., BOILEAU, T.W.-M., HEINTZ, K.H., ATKINSON, C.A., ERDMAN, J.W., Carotenoids: linking chemistry, absorption, and metabolism to potential roles in human health and disease.
9. LANDVIK, S.V., DIPLOCK, A.T., PACKER.,L., Efficacy of vitamin E in human health and disease.

10. GARDNER, P.T., WHITE, T.A.C., MCPHAIL, D.B., DUTHIE, G.G., (2000), The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices, *Food Chem.*, 68, 471-474.
11. ROBARDS, K., PRENZLER, P.D., TUCKER, G., SWATSITANG, P., GLOVER, W., 1999, Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits, *Food Chem.*, 66, 401-436.
12. RICE-EVANS, C., MILLER, N.J., PAGANGA, G., Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends in Plant Sci.*, 2(4), 152-159.
13. ARNAO, M.B., 2000, Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case, *Trends in Food Sci. Tech.*, 11, 419-421.
14. MILLER, N.J., RICE-EVANS, C., DAVIES, M.J., GOPINATHAN, V., MILNER, A., 1993, A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clin. Sci.*, 84, 407-412.
15. RICE-EVANS, C., MILLER, N.J., 1994, Total antioxidant status in plasma and body fluids, *Meth. Enzymol.*, 234, 279-293.
16. RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., EVANS, R.C., 1999, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic. Biol. Med.*, 26, 1231-1237.
17. Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds, Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board Vitamin C, vitamin E, selenium, and β -Carotene and Other Carotenoids: Overview, Antioxidant Definition, and Relationship to Chronic Disease. In

Dietary Reference Intakes for Vitamin c, Vitamin E, Selenium, and Caretenoid;
National Academy of Science: Washington, DC, 2000, 35-57

18. BENZIE, I.F.F., STRAIN, J.J., 1999, Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration, *Meth. Enzymol*, 299, 15-27.
19. CAO, G., PRIOR, R.L. 1999, The measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples, *Meth. Enzymol.*, 299, 50-62.
20. HUANG, D., OU, B., PRIOR, R.L., 2005, The chemistry behind antioxidant capacity assays, *J. Agric. Food Chem.* 53, 1841-1856.
21. PULIDO, R., BRAVO, L., SAURA-CALIXO, 2000, F, Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by modified ferric reducing/antioxidant power assay, *J. Agric. Food Chem.* 48, 3396-3402.
22. BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E., BERSET, C.,1995, Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm-Wiss.Technol.*,28(1), 25-30.
23. FOTI, M.C., DAQUINO, C., GERACI, C., 2004, Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH radical in alcoholic solutions, *J. Org. Chem.*, 69, 2309-2314.
24. CHEVION, S., BERRY, E.M., KITROSSKY, N.K., KOHEN, R., 1997, Evaluation of plasma low molecular weight antioxidant capacity by cyclic voltammetry, *Free Radic. Biol. Med.*, 22,411-421
25. KOHEN, R., BEIT-YANNAI, E., BERRY, E.M., TIROSH, O., 1999, Overall low molecular weight antioxidant activity of biological fluids and tissues by cyclic voltammetry, *Meth. Enzymol.*, 300, 285-296.

26. Oxiresearch, Inc., Colorimetric , quantitative assay for total antioxidant potential (aqueous samples), 2002.
27. APAK, R., GÜÇLÜ, K., ÖZYÜREK, M., KARADEMİR, S.E., 2004), A novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols, vitamin C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 7970-7981.
28. TÜTEM, E., APAK, R., BAYKUT, F., 1991, Spectrophotometric determination of trace amounts of copper(I) and reducing agents with neocuproine in the presence of copper(II), *Analyst*, 116, 89-94.
29. TÜTEM, E., APAK, R., 1991, Simultaneous spectrophotometric determination of cystine and cysteine in amino acid mixtures using copper(II)-neocuproine reagent, *Anal. Chim. Acta*, 255, 121-125.
30. TÜTEM, E., APAK, R., GÜNAYDI, E., SÖZGEN, K., 1997, Spectrophotometric determination of vitamin E (α -tocopherol) by the copper(II)-neocuproine reagent, *Talanta*, 44 , 249-255.
31. GÜÇLÜ, K., SÖZGEN, K., TÜTEM, E., ÖZYÜREK, M., APAK, R., 2005, Spectrophotometric determination of ascorbic acid using copper(II)-neocuproine reagent, *Talanta*, 65, 1226-1232.
32. CAO, G., ALESSIO, H.M., CUTLER, R.G., 1993, Oxygen-radical absorbency capacity assay for antioxidants, *Free Radic. Biol. Med.*, 14, 303-311.
33. HUANG, D., OU, B., HAMPSCH-WOODILL, M., FLANAGAN, J.A., PRIOR, R.L., 2002, High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 4437-4444.

34. WAYNER, D.D.M., BURTON, G. W., INGOLD, K.U., LOCKE, S., (1985), Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capacity of human blood plasma by controlled peroxidation, *FEBS Lett.*, 187, 33-37.
35. WAYNER, D.D.M., BURTON, G. W., INGOLD, K.U., (1986), The antioxidant efficiency of vitamin C is concentration-dependent, *Biochem. Biophys. Acta*, 884, 119-123.
36. ALHO, H., LEINONEN, J., (1999), Total antioxidant activity measured by chemiluminescence methods, *Meth. Enzymol.*, 299, 3-14.
37. VALKONEN, M., KUUSI, T., (1997), Spectrophotometric assay for total peroxy radical-trapping antioxidant potential in human serum, *J. Lipid Res.*, 38, 823-833.
38. WINSTON, G.W., REGOLI, F., DUGAS, A.J., FONG, J.H., BLANCHARD, K.A., (1998), A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids, *Free Radic. Biol. Med.*, 24, 480-493.
39. GHISELLI, A., SERAFINI, M., MAIANI, G., ASSINI, E., FERRO-LUZZI, A., (1994), A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability, *Free Radic. Biol. Med.*, 18, 29-36.
40. TUBARO, F., GHISELLI, A., PAPUZZI, P., MAIORINO, M., URSINI, F., (1998), Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics, 24, 1228-1234.
41. <http://www.kkgm.gov.tr/Mevzuat/khk560/Kodeks/Tebbligler/98-24.htm>
42. Committee on Nutrition, 2001, American Academy Of Pediatrics: The Use and Misuse of Fruit Juice in Pediatrics, *Pediatrics* ,107, 1210-1213.

43. AVIRAM, M., ROSENBLAT, M., GAITINI, D, et al., 2004, Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clin Nutr.* 23, 423–433.
44. <http://www.meyed.org.tr/turkce/meyvesuyukonsantresi>
45. <http://www.happyvalley.sa.edu.au/newsletter/2004/vol2004.pdf>
46. VINSON, J.A., DABBAGH, Y.A., (1998), Tea Phenols: antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins, *Nutr. Research.*, 18, 1067-1075.
47. WANG, H., PROVAN, J.G., HELLIWELL, K., (2000) Tea flavanoids: their functions, utilisation and analysis, *Trends in Food Sci. Tech.*, 11, 152-160.
48. NETZEL, M., STRASS, G., KAUL, C., BITSCH, I., DIETRICH, H., BITSCH, R., 2002, In vivo antioxidative capacity of a composite berry juice, *Food Res. Int.*, 35, 213-216
49. PELLEGRINI, N., SERAFINI, M., COLOMBI, B., RIVO, D.D., SALVATORE, S., BIANCHI, M., BRIGHENTI, F., 2003, Total antioxidant capacity of plant foods, beverages, and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays, *J. Nutr.* 133, 2812-2819.
50. RICE-EVANS, C., MILLER, N.J., 1997, The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink, *Food Chem.*, 60, 331-337.
51. SAURA-CALIXTO, F., Goni, I., Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet, *Food Chem.*, article in pres.

52. KABASAKALIS, V., SIOPIDOU, D., MOSHATOU, E., 2000, Ascorbic acid content of commercial fruit juices and its rate of loss upon storage, *Food Chem.*, 70, 325-328.
53. ARENA, E., FALLICO, B., MACCARONE, E., 2001, Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juice as influenced by constituents, concentration process and storage, *Food Chem.*, 74, 423-427.
54. TOSUN, İ., ÜSTÜN, N.S., 2003, An investigation about Antioxidant Capacity of fruit nectars, *Pakistan J. Nutr.*, 2(3), 167-169.
55. BENZIE, I.F., SZETO, Y.T., 1999, Total antioxidant power of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay, *J. Agric. Food Chem.*, 47, 633-636.
56. RUCH, R.J., CHENG, S.J., KLAUNIG, J.E., 1989, Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea, *Carcinogenesis*, 10, 1003-1008.
57. SÁNCHEZ-MORENO, C., PLAZA, L., ANCOS, D. B., CANO, M.P., 2003, Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices, *J. Sci. Food Agric.*, 83(5), 430-439.
58. LICHTENTHÄLER, R., MARX, F., 2005, Total Oxidant Scavenging Capacities of Common European Fruit and Vegetable Juices, *J. Agric. Food Chem.*, 53 (1), 103 -110.
59. GORINSTEIN, S., ZACHWIEJA, Z., KATRICH, E., PAWELZIK, E., HARUENKIT, R., TRAKHTENBERG, S., MARTIN-BELLOSO, O., 2004, Comparison of the contents of the main antioxidant compounds and the antioxidant activity of white grapefruit and his new hybrid, *Lebensmittel-Wissenschaft und-Tech.*, 37,337-343

60. KARAKAYA, S., EL S.N., TAS, A.A., 2001, Antioxidant activity of some foods containing phenolic compounds, *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 52(6), 501-508.
61. RICHELLE, M., TAVAZZI, I., OFFORD, E., 2001, Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa, and tea) prepared per cup serving, *J Agric Food Chem.*, 49(7), 3438-3442.
62. WANG, H., CAO, G., PRIOR, R.L., 1996, Total Antioxidant Capacity of Fruits, *J. Agric. Food Chem.*, 44 (3), 701 -705.
63. GIL, M.I., TOMÁS-BARBERÁN, F.A., HESS-PIERCE, B., HOLCROFT, D.M., KADER, A.A., 2000, Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing, *J. Agric. Food Chem.*, 48 (10), 4581 -4589.

ÖZGEÇMİŞ

24.09.1978 tarihinde Ordu'da doğdum. İlk ve orta okulu Yukarıtepe İlköğretim Okulunda devam ettim ve okul birincisi olarak tamamladım. Orta okul sonunda girmiş olduğum Anadolu Öğretmen Lisesi ve Devlet Parasız Yatılı sınavlarını kazandım. Lise öğrenimime Ordu Anadolu Öğretmen Lisesinde parasız yatılı olarak devam ettim. Lise 2'de özel bir dersanenin Ordu genelinde yapmış olduğu seviye tespit sınavına iştirak ederek birinci oldum ve bilgisayar ile ödüllendirildim. Lise öğrenimimi 4.92 dereceyle okul birincisi olarak tamamladım. Sonrasında İ.Ü. Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümünü kazandım. Tübitak MAM'da 30 gün süreyle enstrümantal analiz kısmında staj yaptım. Lisans öğrenimimi 2002 yılında 3.90 dereceyle bölüm birincisi ve aynı zamanda Mühendislik Fakültesi birincisi olarak tamamladım ve İ.Ü. Rektörü tarafından plaketle ödüllendirildim. Aynı sene içerisinde İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Programında yüksek lisans yapmaya başladım ve 15.10.2002 tarihinden itibaren Enstitü bünyesinde Araş.Gör. olarak çalışmaktayım. Şu anda çalışma grubumuzla birlikte tezimin bir bölümünü de içeren "Gıdalarda antioksidan tayini" ile ilgili oldukça geniş kapsamlı araştırma çalışmalarımıza değerli hocam ve danışmanım Prof.Dr.Reşat APAK'ın öncülüğünde devam etmekteyim.

İstanbul Avcılar'da ikamet etmekteyim ve bekarım.

Adres:

Merkez Mah. Fırın Sok.
Özkaya Apt. No:31 D:26
Avcılar/İSTANBUL

Araş.Gör. Mustafa ÖZYÜREK