



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAZI POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN ANTİOKSİDAN
AKTİVİTELERİNİN TAYİNİ**

Saliha Esin KARADEMİR

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Kubilay GÜÇLÜ

Haziran, 2005

İSTANBUL

Bu çalışma .../.../ 2003 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından
Anabilim Dalı programında Doktora / 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

Yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmam boyunca birikimlerini bizlerle paylaşan, ulusal ve uluslararası kimya alanında önemli bir yere sahip olan değerli hocam Prof. Dr. Reşat APAK'a, aynı süre boyunca çalışmalarında desteğini ve yardımını esirgemeyen tez danışmanım sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Kubilay GÜÇLÜ'ye, birlikte birçok çalışmaya imza attığımız dönem ve grup arkadaşım Ar. Gör. Mustafa ÖZYÜREK'e en içten dileklerle teşekkür ederim.

Tezimle aynı ismi taşıyan T-451/25062004 sayılı projeme maddi destek sağlayan İ.Ü. Bilimsel Araştırma Fonu Yürütücü Sekreterliği'ne teşekkür ederim.

Haziran, 2005

Saliha Esin KARADEMİR

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ	vii
SEMBOL LİSTESİ	viii
ÖZET	x
SUMMARY	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. ANTiOKSiDAN NEDİR?	3
2.2. ANTiOKSiDANLARIN YAPILARINA GÖRE SINIFLANDIRILMASI.....	5
2.2.1. Fenolik Antioksidanlar	5
2.2.2. Aromatik Antioksidanlar.....	6
2.2.3. Organik Sülfür Bileşikleri.....	6
2.3. ANTiOKSiDANLARIN ETKİ MEKANİZMALARINA GÖRE SINIFLANDIRILMASI	
2.3.1. Primer Antioksidanlar	7
2.3.2. Sekonder Antioksidanlar	7
2.4. DOĞAL ANTiOKSiDANLAR VE ANTiOKSiDAN AKTİVİTELERİ	7
2.4.1. C - Vitamini.....	7
2.4.2. E - Vitaminleri (tokoferoller).....	8
2.4.3. Polifenolik Bileşikler	8
2.4.3.1. Flavonoidler	9
2.4.3.2. Fenolik asitler.....	17
2.4.3.3. Fenolik Polimerler (Tanenler).....	18

2.4.4. Karotenoidler.....	18
2.5. SENTETİK ANTİOKSİDANLAR.....	19
2.5.1. Butillenmiş Hidroksi Anizol (BHA).....	19
2.5.2. Butillenmiş Hidroksi Toluen (BHT).....	20
2.5.3. Gallatlar.....	20
2.5.4. Tersiyer Butil Hidrokinon (TBHQ).....	20
2.5.5. Nordihidroguareyetik asid (NDGA).....	21
2.6. SPEKTROSKOPİK ANTİOKSİDAN KAPASİTE YÖNTEMLERİ.....	21
2.6.1. FRAP (Demir (III) İndirgeme Antioksidan Gücü) Metodu.....	22
2.6.2. TEAC (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi) / ABTS Yöntemi.....	23
2.6.3. DPPH Yöntemi.....	24
2.6.4. Folin Ciocalteu Yöntemi.....	25
2.6.5. TRAP (Toplam Radikal Tutma Parametresi) Yöntemi.....	25
2.6.6. Luminol Yöntemi.....	25
2.6.7. Diklorofloresin-diasetat (DCFH-DA).....	26
2.6.8. TOSC (Toplam Oksiradikal Uzaklaştırma Kapasitesi) Yöntemi.....	27
2.6.9. Krosin Esaslı Yöntemler.....	27
2.6.10. Fikoeritrin (PE) Esaslı Yöntemler.....	28
2.6.11. ORAC (Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi) Yöntemi.....	28
2.7. LİTERATÜRDE VAROLAN ANTİOKSİDAN KAPASİTE ÇALIŞMALARI.....	29
3. MALZEME VE YÖNTEM	33
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR.....	33
3.2. KİMYASAL MADDELER.....	33
3.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması.....	33
3.3. UYGULANAN YÖNTEMLER.....	34
3.3.1. CUPRAC Yöntemi.....	34
3.3.1.1. Normal Metod.....	34
3.3.1.2. İnkübasyonlu Metod.....	34
3.3.1.3. Hidrolizli Metod.....	35
3.3.1.4. Hidrolizli ve İnkübasyonlu Metod.....	35
3.3.1.5. İkili ve Üçlü Sentetik Karışımların Hazırlanması.....	35
3.3.2. ABTS-Persülfat Yöntemi.....	36
3.3.3. Folin Ciocalteu Yöntemi.....	36
3.4. BİTKİ EKSTRELERİNİN HAZIRLANMASI.....	36
4. BULGULAR	38

4.1. CUPRAC METODUNUN SAF POLİFENOLİK BİLEŞİKLERE UYGULANABİLİRLİĞİ	38
4.1.1. Optimum Deneş Koşullarının Belirlenmesi	38
4.1.2. Bazı Antioksidanların Kalibrasyon Grafikleri ve Görünür bölge Spektrumlarının Eldesi	38
4.1.2.1. Kuersetin (QR)	39
4.1.2.2. Rutin (RT)	40
4.1.2.3. Kateşin (CT)	41
4.1.2.4. Hesperidin (HD)	42
4.1.2.5. Ferulik Asid (FRA)	43
4.1.2.6. Vanilik Asid (VA)	44
4.1.2.7. Gallik Asid (GA)	45
4.1.3. Antioksidanların Molar Absorblama Katsayıları Ve Lineer Aralıklarının Belirlenmesi	46
4.1.4. İkili Ve Üçlü Sentetik Karışımların Elde Edilmesi	48
4.1.4.1. Askorbik Asid (AA) – Gallik Asit (GA) İkili Sentetik Karışımının Kalibrasyon Eğrisi (Komponentlerden birinin sabit miktarları üzerine diğeriinin değişen miktarlarının katılması)	48
4.1.4.2. Askorbik Asit (A) – Kuersetin (QR) İkili Sentetik Karışımının Kalibrasyon Eğrisi	49
4.1.4.3. Üçlü Sentetik Karışımların Beklenen ve Ölçülen TEAC Değerlerinin Eldesi	51
4.1.5. Şifalı Bitki Ekstrelerine Standart Katkı Yönteminin Uygulanması	55
4.1.5.1. Aslan Pençesi (Anagallis Arvensis) Ekstresine Troloks ve Kuersetin Standart Katkı Yönteminin Uygulanması	55
4.1.5.2. Gülhatmi (Althaea Officinalis) Ekstresine Troloks ve Kuersetin Standart Katkı Yönteminin Uygulanması	56
4.1.5.3. Kekik (Thymus Vulgaris) Ekstresine Troloks ve Kuersetin Standart Katkı Yönteminin Uygulanması	58
4.1.5.4. Kısa Mahmut (Teucrium Chamaedrys) Ekstresine Troloks ve Kuersetin Standart Katkı Yönteminin Uygulanması	60
4.1.6. Şifalı Bitki Ekstrelerine CUPRAC, ABTS ve FOLİN Yöntemlerinin Uygulanması	62
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	65
KAYNAKLAR	71
EKLER	77
ÖZGEÇMİŞ	85

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	: Sesamol	6
Şekil 2.2	: Dilauril ditiyopropiyonat.....	6
Şekil 2.3	: C- vitamini.....	8
Şekil 2.4	: α -tokoferolün kimyasal yapısı	8
Şekil 2.5	: Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı.....	9
Şekil 2.6	: Flavonoidlerin temel kimyasal yapıları.....	8
Şekil 1.7	: Flavonoidlerin genel yapısı	10
Şekil 2.7	: Rutin, apigenin, krisin ve luteolin' in kimyasal yapısı.....	11
Şekil 2.8	: Kuersetin, mirisetin, fisetin ve kaempferolün moleküler yapısı	12
Şekil 2.9	: Naringenin, naringin, hesperetin ve hesperidin kimyasal yapıları	12
Şekil 2.10	: Genistein ve daidzeinin kimyasal yapıları.....	13
Şekil 2.11	: Kateşin, epikateşin, epigallo kateşin, epikateşin gallat, epigallokateşin gallatın kimyasal yapıları	13
Şekil 2.12	: Siyanidin, malvidin, apigenidin, delphinidin kimyasal yapıları	14
Şekil 2.13	: Flavonoidlerin klasik antioksidan kapasitelerini belirlemede önemli olan özellikleri gösteren kimyasal yapı.....	16
Şekil 2.14	: Fenolik asitlerin kimyasal yapıları	18
Şekil 2.15	: Fenolik polimerlerin yapısı	18
Şekil 2.16	: β -karotenin yapısı.....	19
Şekil 2.17	: Butillenmiş hidroksi anizolün (BHA) kimyasal yapısı	19
Şekil 2.18	: Butillenmiş hidroksi toluenin (BHT) kimyasal yapısı	20
Şekil 2.19	: Propil, oktil ve dodesil gallatların kimyasal yapıları (R : C ₃ H ₇ , C ₁₂ H ₂₅ , C ₁₈ H ₃₇).....	20
Şekil 2.20	: Nordihidroguayaretik asidin (NDGA) kimyasal yapısı.....	21
Şekil 2.21	: ABTS ⁺ katyonunun yapısı	23
Şekil 2.22	: ABTS radikal katyonunun absorpsiyon spektrumu.	24
Şekil 4.1	: Kuersetin (QR) kalibrasyon eğrisi.....	39
Şekil 4.2	: Kuersetin (QR) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu.....	39
Şekil 4.3	: Rutinin (RT) kalibrasyon eğrisi.....	40
Şekil 4.4	: Rutin (RT) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu	40
Şekil 4.5	: Kateşinin (CT) kalibrasyon eğrisi	41
Şekil 4.6	: Kateşin(CT) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu..	41
Şekil 4.7	: Hesperidin (HD) kalibrasyon eğrisi	42
Şekil 4.8	: Hesperidin (HD) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu.....	42
Şekil 4.9	: Ferulik asidin (FRA) kalibrasyon eğrisi.....	43
Şekil 4.10	: Ferulik asid (FRA) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu.....	43
Şekil 4.11	: Vanilik asidin (VA) kalibrasyon eğrisi	44

Şekil 4.12	:Vanilik asid (VA) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu.....	44
Şekil 4.13	:Gallik asidin (GA) kalibrasyon eğrisi.....	45
Şekil 4.14	:Gallik asid (GA) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu.....	45
Şekil 4.15	:Askorbik asidin (AA) gallik asid (GA) çözeltisi içindeki kalibrasyon eğrisi.....	48
Şekil 4.16	:Gallik asidin (GA) askorbik asit (AA) çözeltisi içinde kalibrasyon eğrisi.....	49
Şekil 4.17	:Askorbik asidin (AA) kuersetin (QR) çözeltisi içindeki kalibrasyon eğrisi.....	50
Şekil 4.18	:Kuersetinin (QR) askorbik asid (AA) çözeltisi içindeki kalibrasyon eğrisi.....	51
Şekil 4.19	:Seyreltilmiş aslan pençesi ekstresi içinde troloksun (TR) kalibrasyon eğrisi.....	55
Şekil 4.20	:Seyreltilmiş aslan pençesi ekstresi içinde kuersetinin (QR) kalibrasyon eğrisi.....	56
Şekil 4.21	:Seyreltilmiş gülhatmi ekstresi içinde troloksun (TR) kalibrasyon eğrisi.....	57
Şekil 4.22	:Seyreltilmiş gülhatmi ekstresi içinde kuersetinin (QR) kalibrasyon eğrisi.....	58
Şekil 4.23	:Seyreltilmiş kekik ekstresi içinde troloksun (TR) kalibrasyon eğrisi.....	59
Şekil 4.24	:Seyreltilmiş kekik ekstresi içinde kuersetinin (QR) kalibrasyon eğrisi.....	60
Şekil 4.25	:Seyreltilmiş kısa mahmut ekstresi içinde troloksun (TR) kalibrasyon eğrisi.....	61
Şekil 4.26	:Seyreltilmiş kısa mahmut ekstresi içinde kuersetinin (QR) kalibrasyon eğrisi.....	62
Şekil 4.27	:Şifalı bitkilerin CUPRAC ve ABTS yöntemlerine göre antioksidan kapasite değerlerinin karşılaştırılması.....	63
Şekil 4.27	:Şifalı bitkilerin CUPRAC ve FOLİN yöntemlerine göre antioksidan kapasite değerlerinin karşılaştırılması.....	64
Şekil E.1	: α -tokoferol (TP) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu.....	77
Şekil E.2	:Troloks (TR) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu.....	77
Şekil E.3	:Askorbik asid (AA) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu.....	78
Şekil E.4	:Kaffeik asid (CFA) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu.....	78
Şekil E.5	:Klorojenik asid (CGA) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu.....	79
Şekil E.6	:Epikateşin gallat (ECG) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu.....	79
Şekil E.7	:Epigallokateşin gallat (EGCG) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu.....	80
Şekil E.8	:Fisetin (FS) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu.....	80
Şekil E.9	:Kumarik asid (CMA) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu.....	81

Şekil E.10	:Morin (MR) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu..	81
Şekil E.11	:Naringenin (NG) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu.....	82
Şekil E.12	:Şiringik asid (SA) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu.....	82
Şekil E.13	:Hesperetin (HT) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu.....	83
Şekil E.14	:Naringin (N) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu.	83
Şekil E.15	:Epikateşin (EC) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu.....	84

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1	:Flavonoidlerin sınıflandırılması, adları, sübstitüsyon modelleri ve besin kaynakları.....	16
Tablo 4.1	:Kuersetinin (QR) hacim-konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.....	39
Tablo 4.2	:Rutin (RT) hacim-konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.....	40
Tablo 4.3	:Kateşinin (CT) hacim-konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.....	41
Tablo 4.4	:Hesperidinin (HD) hacim-konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.....	42
Tablo 4.5	:Ferulik asidin (FRA) hacim-konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.....	43
Tablo 4.6	:Vanilik Asidin (VA) hacim-konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.....	44
Tablo 4.7	:Gallik Asidin (GA) hacim-konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.....	45
Tablo 4.8	:Çeşitli antioksidanların CUPRAC metoduyla elde edilen molar absorptivite ve lineer aralıkları.....	46
Tablo 4.8	:Çeşitli antioksidanların CUPRAC, ABTS ve FOLIN metodlarına göre TEAC değerleri.....	47
Tablo 4.10	:Sentetik karışım çözeltilerinin CUPRAC yöntemine göre mM troloks (TR) cinsinden beklenen ve ölçülen antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması.....	52
Tablo 4.11	:CUPRAC, ABTS ve FOLİN yöntemleriyle şifalı bitki ekstraktlarının mmol TR/g cinsinden antioksidan kapasitelerinin (TEAC) eldesi.....	63

SEMBOL LİSTESİ

TAC	: toplam antioksidan kapasitesi
ROS	: reaktif oksijen türleri
LDL	: düşük yoğunluklu lipoprotein
Cu(II)-Nc	: bakır(II)-neokuproin
Cu(I)-Nc	: bakır(I)-neokuproin
CUPRAC	: bakır(II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi
TEAC	: troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi
R, R'	: yağ molekülü, aktif yağ molekülü
AH, A'	: antioksidan molekülü, antioksidan etkin molekülü
NDGA	: nordihidroguayaretik asid
BHA	: butillenmiş hidroksi anisol
BHT	: butillenmiş hidroksi toluen
TBHQ	: tersiyer butil hidrokinon
TRAP	: toplam reaktif antioksidan potansiyeli
FRAP	: demir(III) indirgeme antioksidan gücü
Fe³⁺-TPTZ	: demir(III)tripridiltriazin
Fe²⁺-TPTZ	: demir(II)tripridiltriazin
ABTS	: 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)
ABTS⁺	: ABTS radikal katyonu
ABAP	: 2,2'-azobis-(2-amidinopropan)HCl
ABTS⁻	: ABTS radikal anyonu
HRP	: horse radish peroxidase
DPPH	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
RNS	: reaktif azot türleri
AAPH	: 2,2'-azobis (2-amido propan) hidroklorür
DCFH-DA	: Diklorofloresin diasetat
DCF	: diklorofloresin
TOSC	: toplam oksiradikal uzaklaştırma kapasitesi
KMBA	: α -keto- γ metiolbutirik asitin
k_a	: antioksidan ve peroksil radikalleri arasındaki reaksiyon hız sabiti
k_c	: krosin ile peroksil radikalleri arasındaki reaksiyon hız sabiti
PE	: Fikoeritrin
ORAC	: oksijen radikal absorbans kapasitesi
TR, QR, AA	: troloks, kuersetin, askorbik asid
CT, GA, FS	: kateşin, gallik asid, fisetin
RT, N, NG	: rutin, naringin, naringenin
FRA, CMA	: ferulik asid, kumarik asid
CFA, CGA	: kaffeik asid, klorojenik asid
TP, MR	: α -tokoferol, morin
HD, HT	: hesperidin, hesperetin
EC, ECG	: epikateşin, epikateşin gallat

EGC, EGCG : epigallo kateşin, epigallokateşin gallat
SA, VA : şiringik asid, vanilik asid

ÖZET

BAZI POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN TAYİNİ

Çeşitli hastalıklara yol açabilen ‘oksidatif stres’le mücadele etmenin en önemli yollarından biri, antioksidan zengin fenolik bileşikler içeren gıdaların mevcut olduğu bir beslenmedir. Fenolik antioksidanlar, tükettiğimiz birçok sebze ve meyvede bol miktarda bulunur. Bu doğal fenolik bileşikler tanımlamak, yapılarına göre sınıflandırmak, antioksidan kapasitelerini belirlemek ve doğal antioksidanların bulunduğu gıdaların toplam antioksidan aktivitelerini tayin etmek için bilim dünyasında kabul gören, basit, kullanışlı, hızlı, ucuz ve duyarlı antioksidan aktivite ölçme yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu kapsamda bu tez çalışmasının amaçları; antioksidan karakterli bazı polifenolik bileşikler için tek tek ve bu antioksidan maddelerin bulunduğu gerçek ve sentetik çözeltiler için toplu analiz yöntemleri geliştirmek ve bu teknikleri standart referans yöntemlerle karşılaştırarak doğruluğunu ispatlamaktır.

Bu çalışmada; kromojenik yükseltgeme aracı olarak kullanılan bakır(II)-neokuproin (Cu(II)-Nc) reaktifi varlığında spektrofotometrik yolla polifenolik bileşiklerin antioksidan kapasiteleri tayin edilmiştir. pH 7 ve üzerinde güvenilir sonuçlar veren Cu(II)-Nc reaktifi ile antioksidan kapasite tayininin optimum deney koşulları (reaktif konsantrasyonu, pH, reaksiyon süresi vb.) belirlenip, polifenolik bileşiklerin Cu(II)-Nc kompleksini 450 nm’de maksimum ışık soğurması gösteren Cu(I)-Nc kompleksine indirgeme yeteneğinden yararlanılarak antioksidan kapasite değerleri hesaplanmıştır. Burada antioksidan polifenoller aynı zamanda indirgen maddeler olduklarından, kromojen bir oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc reaktifini indirgemektedirler. Bu özelliğinden yola çıkılarak geliştirilen yeni antioksidan kapasite yöntemine ‘bakır(II) iyonu indirgeme antioksidan kapasite yöntemi’ denilmiştir ve kısaca CUPRAC metodu olarak adlandırılmıştır.

Bu metod; Cu(II) klorür çözeltisi, neocuproine çözeltisi ve amonyum asetat (pH=7 tamponu) çözeltilerinin karıştırılmasından sonra, üzerine tayin edilecek herhangi bir antioksidan çözeltisi (direkt veya asid hidrolizi sonunda) ilave edilmesi ve bunu takip eden 30 dakika sonunda içerisinde antioksidan bulunmayan referansa karşı 450 nm’de absorbans değerlerinin ölçülmesinden ibarettir. Oksidasyona bağlı renk gelişimi; askorbik asid, gallik asid ve kuersetin gibi antioksidanlar için hızlı oluşurken naringin ve naringenin gibi antioksidanlar için yavaş olur. Bu sebeple; bu bileşiklerin oksidasyon reaksiyonlarının tamamlanması için, 50°C’lik su banyosunda (Cu(II)-Nc reaktifi ilavesinden sonra) 20 dakika boyunca inkübasyon işlemi uygulanmıştır. Flavonoid glikozidleri, antioksidan güçlerini arttırmak amacıyla 1.2 M HCl içeren %50 MeOH içerisinde 2 saat reflüks edilerek aglikonlarına hidrolizlenmiştir. Bazı bileşikler de asid hidrolizi sonunda indirgeme kabiliyetlerini tam olarak göstermek için tekrar inkübasyon

işlemine tabi tutulmuşlardır. Antioksidanların sentetik karışımlarının CUPRAC antioksidan kapasiteleri troloks eşdeğeri cinsinden deneysel olarak ölçülüp, karışımı oluşturan bileşiklerin birbirleriyle hiçbir kimyasal etkileşim göstermediğini varsayan absorbanların toplamsallığı ilkesi kullanılarak elde edilen teorik kapasite değerleriyle karşılaştırılmıştır. CUPRAC metoduyla analiz edilen polifenolik antioksidanların kapasiteleri birbirleriyle kıyaslandığında, kapasitelerinin yapılarındaki hidroksil gruplarının sayısı ve pozisyonuna bağlı olarak farklılaştığı görülmüştür. ABTS ve DPPH radikalik referans yöntemlerde antioksidanların, model bileşik olarak kullanılan serbest radikalleri süpürme kapasiteleri ölçüldüğünden, bu özelliğin hidroksil gruplarının yüksek reaktivitesine bağlı olduğu beklentisine uygun sonuçlar elde edilmiştir.

Bu kapsamda polifenolik antioksidanların CUPRAC kapasiteleri, diğer antioksidan kapasite tayininde kullanılan ABTS/persülfat referans yönteminin bulgularıyla karşılaştırılmıştır. Bu bileşikleri içeren besin maddesi işlevine sahip bazı bitkisel ekstraktlar incelenmiş ve test edilen antioksidanların bu ekstraktlar içindeki kalibrasyon doğruları çizilerek absorbanların toplamsallığı hipotezi kanıtlanmıştır. Bir diğer deyişle kompleks matrikslerdeki antioksidan bileşenler, CUPRAC yönteminde Beer Kanunu'ndan kimyasal sapmalar gösterecek şekilde kendi aralarında etkileşmemektedirler.

SUMMARY

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF SOME POLIPHENOLIC COMPOUNDS

One of the most important ways of combating 'oxidative stress' causing various diseases is nutrition with a diet rich in antioxidant phenolic compounds. Phenolic antioxidants are abundant in many vegetables and fruits of everyday consumption. In order to identify and classify these natural phenolics, and to measure their antioxidant capacity singly or in real matrices; simple, practical, rapid, low-cost, sensitive and widely acceptable methods of total antioxidant capacity (TAC) assay are required. In this regard, the main purpose of this study is to develop novel analytical methods for TAC assay of polyphenols singly, in synthetic mixtures, or in real matrices, and to compare the results with those found with standard reference methods for validation.

The chromogenic redox reagent used for TAC assay was bis (neocuproine) copper(II) chelate. This reagent was useful at pH values greater than or equal to pH 7, and the absorbance of the Cu(I)-chelate formed as a result of redox reaction with reducing polyphenols was measured at 450 nm. The reaction conditions such as reagent concentration, pH, and oxidation time at room and elevated temperature were optimised. The novel method was named as the CUPRAC method, meaning 'cupric ion reducing antioxidant capacity'.

Essentially the method was applied by mixing aqueous CuCl_2 , ammonium acetate buffer (at pH 7) and alcoholic neocuproine (Nc) solutions, adding a suitable aliquot of the unknown antioxidant solution to this mixture, and reading the absorbance at 450 nm against a reagent blank after 30 min. The colour development as a result of oxidation of polyphenol coupled to reduction of the reagent was rapid for ascorbic acid, gallic acid, and quercetin, but slow for naringin and naringenin. For slowly reacting antioxidants, the method was modified so as to carry out the reaction at 50°C for 20 min. The flavonoid glycosides were hydrolyzed with 1.2 M HCl solution in 50 % MeOH for 2h so as to convert to the corresponding aglycones to exert their full antioxidant power. Incubation was repeated when necessary. Assuming the additivity of absorbances of individual antioxidants, the experimental TAC (as trolox-equivalents) of synthetic mixtures of antioxidants were measured, and compared to the theoretically computed TAC value to yield coherent results. When the trolox equivalent antioxidant capacities (as TEAC coefficients) of polyphenols were compared, it was observed that TEAC values varied as a function of the total number and position of hydroxyl groups in the phenolic compound. Since reference methods using radicalic chromogenic reagents such as ABTS and DPPH measure the radical scavenging activity of antioxidants in a certain time period, this antioxidant property showed a hydroxyl groups dependency as expected.

In this regard, the CUPRAC antioxidant capacities of polyphenolic antioxidants were measured singly and in mixtures, and the results were compared with those of ABTS/persulfate assay. The calibration curves of these antioxidants singly and in an aqueous plant extract consumed as food were shown to be parallel lines, again confirming the validity of the additivity principle, meaning that these antioxidant components in complex matrices did not interact among each other so as to cause chemical deviations from Beer's law in the CUPRAC method.

1. GİRİŞ

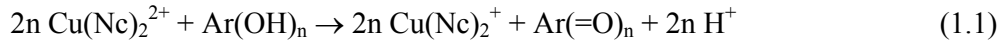
Oksijen, insan vücudunda solunum zinciri içinde süperoksit, singlet oksijen, hidroksil vb. reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturmaktadır. Reaktif oksijen birikimi organizmada mevcut olan veya gıdayla alınan antioksidanlarla dengelenmediği takdirde; oluşan ‘oksidatif stres’ koşulları altında kanser, koroner kalp rahatsızlığı, hücresel yıpranma ve yaşlanma, mutajenizm, bağışıklık sistemi hastalıkları ve lipoprotein (LDL) oksidasyonu ile sonuçlanan, DNA ve hücre membranları gibi duyarlı biyolojik yapıların oksidatif hasarına neden olabilen radikalik zincir reaksiyonları meydana gelmektedir. Antioksidanlar bu serbest radikallerin olumsuz etkilerini önemli ölçüde azaltabilen bileşiklerdir [1].

Bu bileşiklerin sağlık açısından yararlı etkileri olduğundan, polifenollerin antioksidan aktiviteleri hakkında kullanışlı, hızlı, duyarlı ve basit yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Literatürde mevcut olan antioksidan aktivite tayin yöntemlerinin varlığına rağmen kimya alanında çoğu bilim adamının ortak bir karara vardığı, farklı matrikslere uygulanabilecek tek bir toplam antioksidan aktivite yöntemi mevcut değildir. Bu yöntemlerin sahip oldukları problemlere çözüm getirme kapsamında; oksidatif stresle ilgilenen bilim adamlarına yararlı olabilecek nitelikte, çok sayıda fenolik antioksidanın gösterdiği antioksidan aktivitesinin güvenilir ve tekrarlanabilir bir teknikle ölçümü ve antioksidan kapasitelerini kıyaslamak amacıyla nesnel bir indeks geliştirilmesi gerekmektedir. Bu gereksinimden yola çıkarak çalışma konusu; antioksidan özelliğe sahip bazı polifenolik bileşikler için tek tek ve bu antioksidan maddelerin bulunduğu sentetik ve gerçek çözeltiler için antioksidan aktivite indeksi geliştirip, bu indeksi diğer antioksidan aktivite tayin yöntemlerinin bulguları ile karşılaştırmaktır.

Biyolojik sıvıların, saf bileşiklerin ve besin ekstralarının toplam antioksidan kapasitelerini ölçmek için birçok yöntem geliştirilmiştir [2-23]. Bu çalışmada; Anabilim Dalı’nda daha önce biyolojik bakımdan önemli indirgenler [24], sistein [25], vitamin E

[26], vitamin C [27] ve proteinler [28] için geliştirilen spektrofotometrik bakır(II)-neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) reaktifi (Cu(II)-Nc) kullanılarak spektrofotometrik yolla polifenolik bileşiklerin antioksidan kapasitelerinin tayin edilmesi ve genel adı 'bakır(II) iyonu indirgeme antioksidan kapasite tayini' olarak ifade edilen, CUPRAC [29] metodu olarak kısaltılan bu yöntemin bilimsel çevrelerce yaygın bir şekilde kullanılabilen bir referans metod olacak biçimde uygulanması amaçlanmaktadır.

pH 7 ve üzerinde güvenilir sonuçlar veren Cu(II)-Nc reaktifi ile antioksidan kapasite tayininin optimum deney koşulları (reaktif konsantrasyonu, pH, reaksiyon süresi vb.) belirlenerek ve polifenolik bileşiklerin Cu(II)-Nc kompleksini 450 nm'de maksimum ışık soğurması gösteren Cu(I)-Nc kompleksine indirgeme yeteneğinden yararlanılarak antioksidan kapasite değerleri hesaplanmıştır. Aşağıda verilen polifenollerin yükseltgenmesi reaksiyonunda antioksidan polifenoller aynı zamanda indirgen maddeler olduklarından, kromojen bir oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc reaktifini indirgemektedirler:



Elde edilen kapasite değerleri troloks eşdeğeri (TEAC) cinsinden verilmiştir. Bu kapsamda bazı bitkisel ekstratlar incelenmiştir. Sonuçlar; antioksidan kapasite, toplam fenolik madde, askorbik asit ve troloks tayininde kullanılan diğer referans yöntemlerin sonuçlarıyla istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. ANTIOKSİDAN NEDİR?

Bir kimyasalın indirgenmesi, elektron kazanması anlamına gelir. Yükseltgenme ise elektron kaybı anlamına gelir. Redüktan veya redüksiyon aracı elektron verirken, diğer bir reaktanın indirgenmesine neden olur. Oksidan veya oksidasyon aracı da elektron alarak diğer reaktanın yükseltgenmesini sağlar. Yükseltgenme ve indirgenmenin bir arada olduğu kimyasal reaksiyonlara *redoks reaksiyonları* denir. Redoks reaksiyonları, biyolojik oksidasyonların kalbidir. *İndirgen (redüktan)* ve *yükseltgen (oksidan)* kimyasal terim olarak kullanılırken, *antioksidan* ve *prooksidan* terimleri biyolojik sistemlerde kullanılmaktadır.

Antioksidanlar, yükseltgenebilen substratlara göre daha düşük konsantrasyonlarda, substratın prooksidanlarla başlatılan oksidasyonunu ciddi derecede engelleyen ya da geciktiren maddelerdir. Prooksidanlar ise lipidler, proteinler ve nükleik asitlerde oksidatif hasara sebep olan ve bunun sonucunda çeşitli patolojik olaylara ve/veya hastalıklara yol açan toksik maddelerdir. Reaktif türler için kullanılan bir terimdir. Antioksidanlar, hücrelere zarar veren bu prooksidanları (reaktif oksijen ve azot türleri, serbest radikaller) etkin bir şekilde indirgeyerek düşük toksisiteli veya toksik olmayan ürünlere dönüştürürler. Bu tehlikeli bileşiklerin varlığı, sağlıklı bir yaşam için antioksidanları önemli kılmaktadır [30].

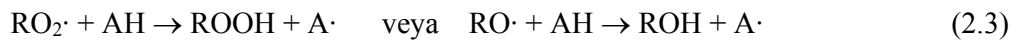
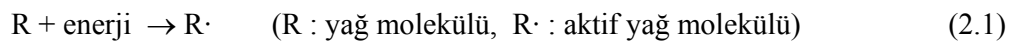
Antioksidanlar; vücut hücreleri tarafından üretildikleri gibi, gıdalar yoluyla da alınabilmektedir. Gıdalarda mevcut olan ve insan vücudunu zararlı serbest radikallerden koruyan başlıca doğal antioksidanlar, esas olarak vitaminler (C, E ve A vitaminleri), flavonoidler, karotenoidler ve polifenollerdir. Çoğu araştırmada meyve ve sebze tüketimi ile belirli kanser ve kalp hastalıklarının oluşumu arasında ters orantılı bir ilişki olduğu saptanmıştır [31].

Antioksidanların en önemlileri polifenoller ve bunların türevleridir. Polifenolik bileşikler; kimyasal yapıları basit bileşiklerden yüksek polimerleşmiş maddelere kadar çeşitlenebilen bitkisel maddelerdir [32]. Bu bileşikler oksidatif düzende farklı şekillerde davranırlar. Örneğin oksijen konsantrasyonunu düşürebilirler veya singlet oksijeni durdururlar. Hidroksil radikalleri gibi birincil radikalleri yutucu özelliğini kullanarak zincir reaksiyonların başlamasını önlerler, metal iyon katalizörlerini bağlarlar [33].

Gıdalarda doğal olarak buldukları gibi, gıda sanayisinde ürünlerin kalitesini korumak ve besinsel değerlerini muhafaza etmek amacıyla sonradan eklenirler. Besinlerin acılaşmasını, çürümesini geciktirici özelliğe sahip bir grup kimyasal maddelerdir. Özellikle yağlarda, havadaki oksijenin sebep olduğu otooksidasyonu yavaşlatmak için kullanılmaktadırlar. Böylelikle yağların, tadını, kokusunu, rengini yani kalitesini ve raf ömrünü uzatırlar. Ortamda pek az miktarda bulunsalar bile etkin olan maddelerdir. Bir antioksidanın, besin maddelerinde kullanılmadan önce sağlığa zararı olmadığı kesin olarak saptanmalıdır.

Zincirleme reaksiyon teorisine göre, oksijen ile otookside olabilen madde, oksijenle birleşmekte ve bu şekilde meydana gelen etkinleşmiş peroksit radikal ve molekülleri, enerjilerini maddenin yükseltgenebilen diğer molekülerine aktarmakta ve bu suretle besinlerdeki otooksidasyon devam etmektedir. Antioksidanlar bu zincir reaksiyonunu koparıcı rolü oynarlar. Yani bu bileşikler aktivasyon enerjisini kabul ederler, ancak bu enerjiyi başka moleküllere aktaramazlar. Bu şekilde, bir antioksidan molekülünün araya girmesiyle otookside olabilen maddenin birçok molekülü yükseltgenmekten kurtulur [32].

Antioksidanların etki mekanizmasını şematik olarak göstermek gerekirse;



(AH : Antioksidan molekülü, A· : antioksidan etkin molekülü)

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

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

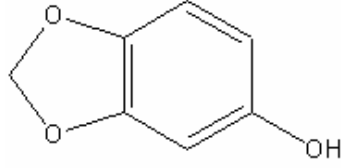
- Radikal süpürme yeteneği
- Hidrojen veya elektron donör aracı olarak göstermiş olduğu reaktivite (redüksiyon potansiyeline bağlı olan)
- Metal kelatlama potansiyeli
- Diğer antioksidanlarla olan etkileşim [31]

2.2. ANTİOKSİDANLARIN YAPILARINA GÖRE SINIFLANDIRILMASI

2.2.1. Fenolik Antioksidanlar

Antioksidanların en önemlileri fenol grubu içerenler ve bunlardan dihidroksi türevleridir. Bunların temel örneği hidrokinon olup tersinir olarak kinona yükseltgenir. Yalnız orto ve para polifenoller antioksidan özelliğe sahiptir. Fenolün kendisi antioksidan değilken yerdeğişimli benzenler, birden fazla benzen halkasını içeren aromatik bileşikler veya heterosiklik bileşikler, yapıları orto ve para hidroksi bileşiklerine benziyorsa antioksidan olabilirler. Örneğin, susam yağında bulunan sesamol bir tek serbest hidroksi grubuna sahip olduğu halde, bu grup oksijenlerden birine göre para pozisyonunda olduğundan, antioksidandır (Şekil 2.1).

Bazı flavonoidler, bitkilerde bulunan fenolik antioksidanlardır. Doğal fenolik antioksidanlardan bir diğer grubu, tokoferoller yani E vitaminleri oluşturur. Antioksidan özelliği en fazla olanı δ -tokoferoldür. Sentetik antioksidanlardan fenolik yapıda olanlar propil gallat, oktil gallat, dodesil gallat, nordihidroguayaretik asid (NDGA), butillenmiş hidroksi anisol (BHA), butillenmiş hidroksi toluen (BHT) ve tersiyer butil hidrokinon' dur (TBHQ) [32].



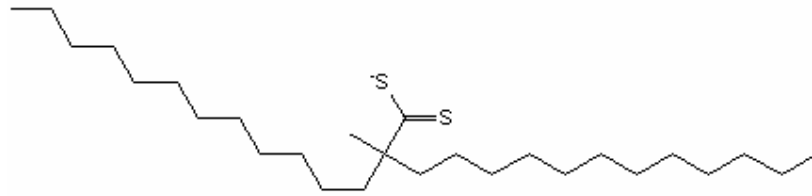
Şekil 2.1: Sesamol

2.2.2. Aromatik Antioksidanlar

Aromatik amino antioksidanlar da genellikle fenollü antioksidanlara benzerler, yalnız hidroksi grupları kısmen veya tamamen amino grupları ile yer değiştirmişlerdir. Bunlardan biri para izo butil amino fenol'dur [32].

2.2.3. Organik Sülfür Bileşikleri

Kuvvetli antioksidanlardan bir grubu da kükürtlü organik bileşikler oluşturur. β , β' -ditiyo propiyonik asid ve esterleri, özellikle dilauril ve distearil ditiyopropiyonatlar çok etkili antioksidanlardır (Şekil 2.2). Özellikle yağlarda % 0,01 oranında kullanılırlar [32].



Şekil 2.2: Dilauril ditiyopropiyonat

2.3. ANTİOKSİDANLARIN ETKİ MEKANİZMALARINA GÖRE SINIFLANDIRILMASI

2.3.1. Primer Antioksidanlar

Birincil ya da zincir parçalayan antioksidanlar; elektron vererek serbest radikal zincir reaksiyonunu kıran ve çoğunlukla fenolik yapıdaki bileşiklerdir. Serbest radikallerle reaksiyona girerek, daha kararlı ürünler oluşturup, hidroperoksit oluşumunu engellerler. Sentetik veya doğal yapıda olabilirler. Tokoferoller, flavonoidler, alkali gallatlar, BHA, BHT ve TBHQ en önemlileridir [32].

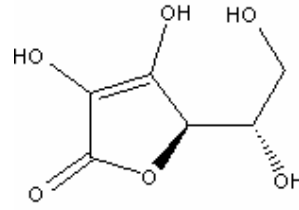
2.3.2. Sekonder Antioksidanlar

Oksidasyon hızını azaltabilen bileşiklerdir. Etki mekanizmaları; metal iyonlarını yakalamak, oksijen molekülünü tutmak, hidroperoksitleri radikal olmayan bileşiklere parçalamak, ultraviyole ışınlarını absorblamak veya oksijen atomunu etkisiz hale getirmek şeklinde olabilir. Bu antioksidanlar 'antioksidan sinerjistler'dir. Tek başlarına buldukları ortamlarda antioksidan etkileri çok düşüktür veya hiç göstermezler. Ancak ortamda iki antioksidan madde bulunursa yalnız olarak gösterdikleri etkiden daha çok etkili olurlar. Bu şekilde antioksidan etkisini arttıran maddelere *sinerjist* denir. Askorbik asid, limon asidi, birçok aminoasid, polifosfatlar ve tartarik asid gibi maddeler fenollü antioksidanların etkilerini arttırlar [32].

2.4. DOĞAL ANTİOKSİDANLAR VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİ

2.4.1. C-Vitamini

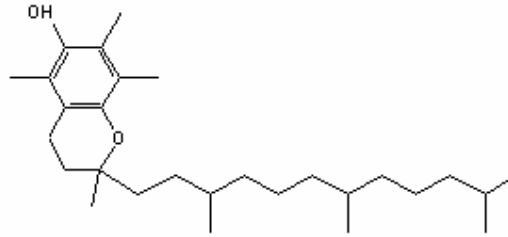
Organizmanın en çok gereksinim duyduğu C-vitamini (Şekil 2.3), diğer adıyla askorbik asid, meyve ve sebzelerde bulunup, suda çözünebilen ve serbest radikalleri doğrudan söndürebilen güçlü bir antioksidan kaynağıdır. Ayrıca çeşitli besin maddelerinde acılaşıma ve ekşimeyi, meyvelerde renk değişimini önler. Doğal kaynaklardan elde edilebildiği gibi kimyasal olarak da sentezlenebilirler [34].



Şekil 2.3: C- vitamini

2.4.2. E-Vitaminleri (tokoferoller)

Doğada 7 farklı izomer yapısında bulunan tokoferoller, başlıca bitkisel ürünlerde mevcuttur. Hayvan organizması pek az miktarda içerir. Özellikle bitkisel yağlarda, yeşil yapraklı sebzelerde, baklagillerde, ceviz, fındık, süt, yumurtada bulunurlar. Tokoferollerin kimyasal yapıları birbirine benzese de, bunların biyolojik etkileri oldukça farklıdır. 3 metil grubu taşıyan α -tokoferol vitamin olarak en etkili olanıdır ve sadece 'E-vitamini' dendiğinde α -tokoferol anlaşılır. β ve γ tokoferoller, α izomerinin yarısı kadar, δ izomeri ise ancak yüzde biri kadar etkilidir. Tokoferoller, monofenolik yapıdaki doğal antioksidanlardır. Antioksidan etkileri vitamin etkilerinin tersine olarak α 'dan γ 'ya doğru artar [32].

Şekil 2.4: α -tokoferolün kimyasal yapısı

2.4.3. Polifenolik Bileşikler

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

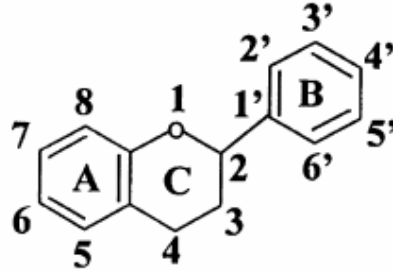
Polifenoller güçlü antioksidanlardır ve aktiviteleri kimyasal yapılarına bağlıdır. Bitki polifenollerini multifonksiyonel bileşikler olup, indirgeme aracı, hidrojen atom-donör antioksidanlar ve singlet oksijen söndürücü olarak, bazıları metal iyonu kelatlama

özelliklerine sahip antioksidanlar olarak davranırlar [11]. Bir polifenolün antioksidan olarak tarif edilebilmesi için iki temel şartı sağlaması gerekir:

- Okside olabilen substratlara oranla düşük konsantrasyonlarda bulduklarında, otooksidasyonu veya serbest radikal merkezli oksidasyonu erteleyebilmeli, geciktirebilmeli veya önleyebilmelidir [35].
- Süpürme sonunda oluşan radikal, oksidasyon zincir reaksiyonunu kesmekte kararlı olmalıdır [36].

2.4.3.1. Flavonoidler

Flavonoidler; önemli antioksidan ve kelatlama özelliğine sahip, düşük molekül ağırlıklı ve en geniş bitki fenolikleri sınıfıdır. 6 karbonlu A, B ve C halkalarından oluşan heterosiklik bileşikler, hetero halkanın yükseltgenme derecesine göre farklılaşırlar. Aromatik halkalar A ve B, hetero halka ise C olarak ifade edilir. Karbon atomları C halkasındaki oksijenden başlayarak, B halkasındaki karbon atomları ise üssü (') rakamlarla numaralandırılır (Şekil 2.5). Doğada, birçoğu yaprak, çiçek ve kökte bulunan 4000'den fazla flavonoid çeşidi mevcuttur. Meyve, sebze, şarap, kakao ve çayda bol miktarda bulunurlar. Antioksidan aktivitelerini belirleyen ve aromatik halkalara bağlı olan birçok fenolik hidroksil grupları içerirler. Metal kelatlama, lipid peroksidasyonunu engelleme, reaktif oksijen türlerini içeren diğer prosesleri azaltma özellikleri vardır. Yiyeceklerde genellikle 3-orto glikozidleri ve polimerleri şeklinde bulunurlar. Glikozit birimi genellikle glukozdur ancak glukoramnoz, galaktoz, arabinoz ve ramnoz da bulunabilmektedir. Bu bileşikler yapılarına bağlanan grupların çeşidi, pozisyonu ve sayısına göre farklı radikal yutma ve kelatlama aktivitesine sahiptirler [37].



Şekil 2.5: Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı [37]

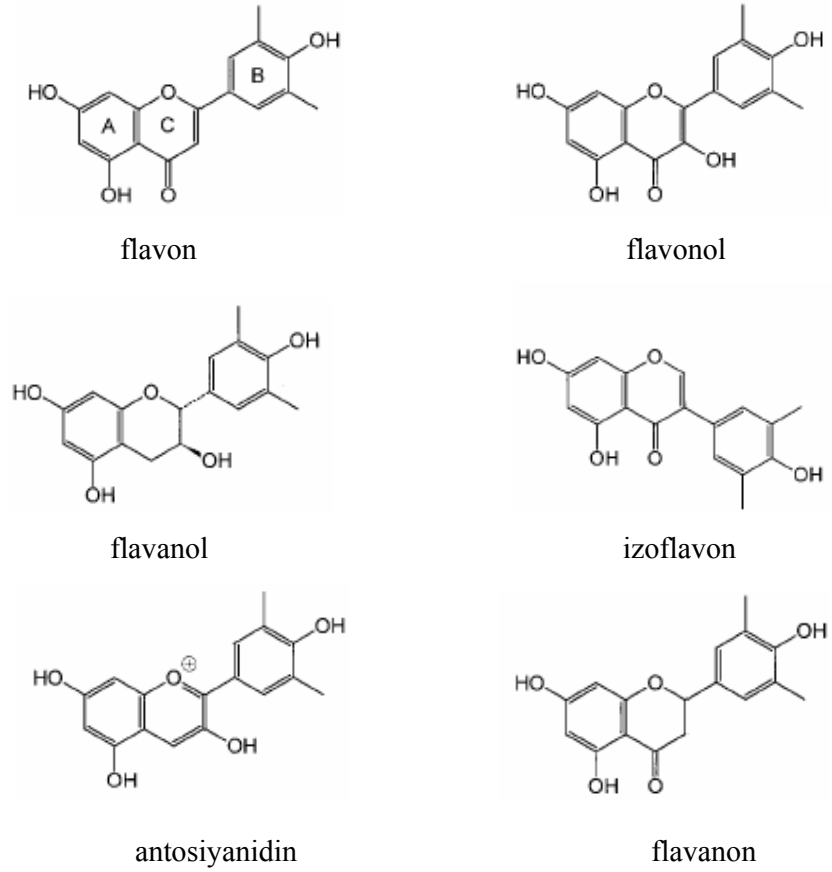
Flavonoidler, fenolik ve furan halkalarından oluşan benzo- γ -furan türevleridir [37]. Bu bileşikler; A, B ve C halkalarından oluşan halka yapısında çeşitli hidroksil, metoksi ve

glikozid yan grupları içerirler. Halkalar arasındaki yapısal değişiklikler flavonoidleri çeşitli sınıflara ayırmaktadır [31]. Bu sınıflardan biri antosiyaninler diğeri antosiyaninlerdir. Antosiyaninler kendi arasında 5 farklı sınıfa ayrılmaktadır:

1. Antosiyaninler

- Flavanoller
- Flavonlar
- Flavonoller
- Flavanonlar
- İzoflavonlar

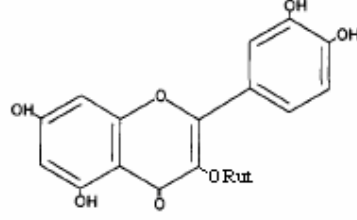
2. Antosiyanin ve antosiyanidinler



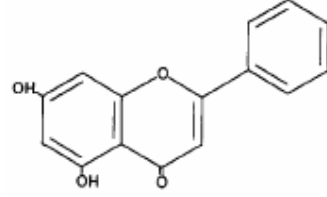
Şekil 2.6: Flavonoidlerin temel kimyasal yapıları

Flavonoidler sınıfının temel maddesi *2-fenil kromon* olan *flavon*'dur. En önemli flavonlar; rutin, apigenin, krisin ve luteolin'dir (Şekil 2.7). Rutin kuersetinin glikozidi

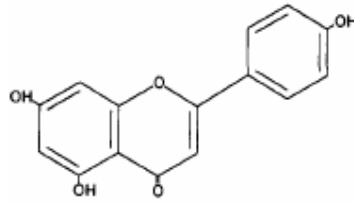
olup kırmızı şarap ve domatestede mevcuttur. Apigenin; maydonoz ve kereviz sapında, krisin; meyve kabuğunda, luteolin ise acı biberde bulunmaktır.



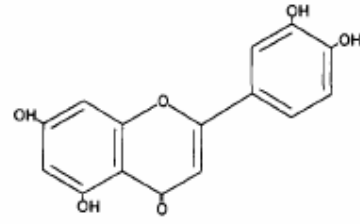
rutin



krisin



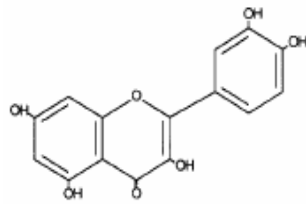
apigenin



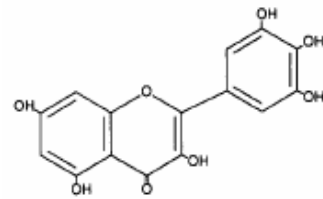
luteolin

Şekil 2.7: Rutin, apigenin, krisin ve luteolin' in kimyasal yapısı

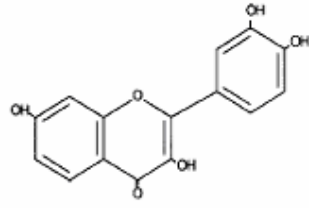
Flavonoller (3-hidroksiflavon), flavonun 3. karbon atomuna bağlı bir hidroksil grubu taşırlar. Flavonoidlerin bitkilerde en yaygın olarak bulunan sınıfıdır. En önemli flavonoller kuersetin, mirisetin, fisetin ve kaempferol'dur. Kuersetin flavonoidlerin en önemli bileşiği ve bitkilerin temel fenolik bileşenidir. Soğanda, elmada ve lahanada bol miktarda bulunur [11].



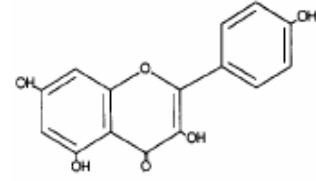
kuersetin



mirisetin



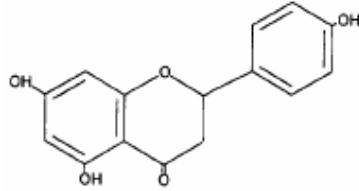
fisetin



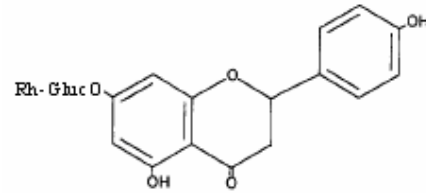
kaempferol

Şekil 2.8: Kuersetin, mirisetin, fisetin ve kaempferolün moleküler yapısı

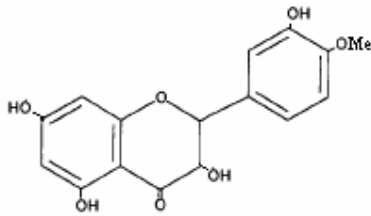
Flavonun dihidroksi türevi *flavanon*'dur. En önemlileri naringenin, naringin, hesperidin ve hesperetin'dir. Naringenin 3-hidroksi flavanon'dur. Greyfurtun karakteristik acılığını veren bileşik naringenin glikozidi olan naringin'dir. Turunçgillerden ekşi portakalda bulunur ve son derece acıdır. Naringenin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



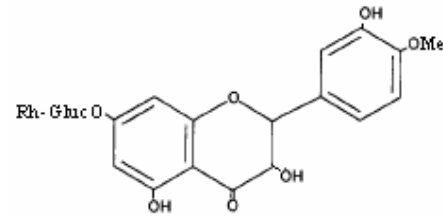
naringenin



naringin



hesperetin

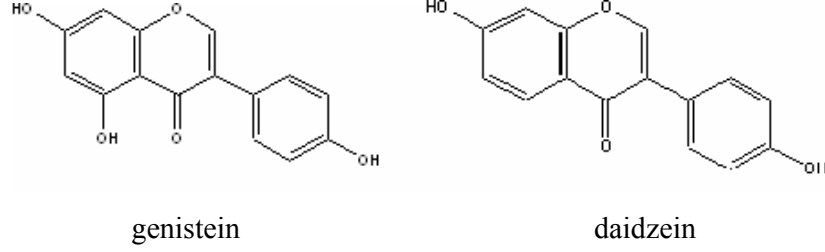


hesperidin

Şekil 2.9: Naringenin, naringin, hesperetin ve hesperidin kimyasal yapıları

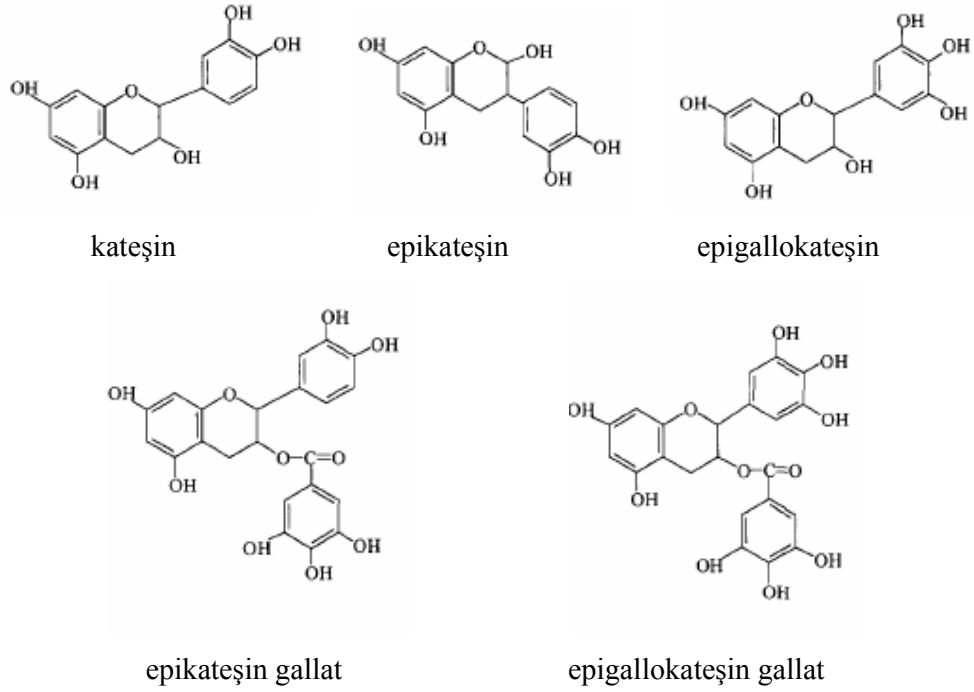
Flavonların izomeri olan *izoflavonlar* ise aromatik B halkasının, C halkasının 3. karbon atomuna bağlanmasıyla oluşur. Genistein, daidzein ve bunların glikozidleri olan

genistin ve daidzin başlıca izoflavonlar olup soya fasulyesi ve soya fıstığında mevcuttur [38].



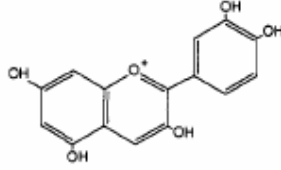
Şekil 2.10: Genistein ve daidzeinin kimyasal yapıları

Flavonollerin C halkasında bulunan çifte bağlı oksijen atomunun yerine $-CH_2$ grubu geldiğinde *flavanol* oluşur. Flavonların indirgenmiş türevleridir. En önemlileri kateşin ve epikateşin' dir. Kateşin ve epikateşinin gallik asitle kombinasyonları sonucu kateşin ve epikateşin gallatlar meydana gelir. Bu bileşikler çoğunlukla yeşil ve siyah çayda, kırmızı ve beyaz şarapta, şeftalide ve elmada bol miktarda bulunurlar [11, 32, 39].

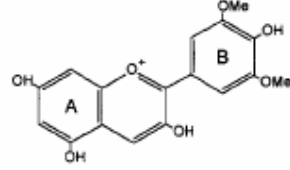


Şekil 2.11 Kateşin, epikateşin, epigallokateşin, epikateşin gallat, epigallokateşin gallatın kimyasal yapıları

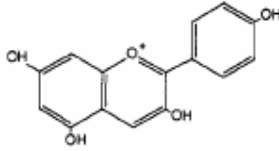
Antosiyaninler, flavanollerin B aromatik halkasına bir hidroksil grubunun bağlanmasıyla meydana gelir. Aglikonları *antosiyandinler*'dir. En önemlileri; apigenidin, siyanidin, malvidin ve delfinidin'dir. Renkli meyvelerde özellikle kırmızı ve mor renkli meyvelerde bol miktarda bulunur [32].



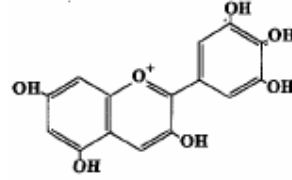
siyanidin



malvidin



apigenidin



delfinidin

Şekil 2.12: Siyanidin, malvidin, apigenidin, delfinidin kimyasal yapıları

Flavonoidlerin ve metabolitlerinin antioksidan aktivitesi halkalı çekirdeksel yapılarındaki fonksiyonel grupların yerleşmesine bağlıdır. Flavonoidlerin yapılarındaki süstitüentlerin yerleşimi flavan iskeletinin tek başına göstermiş olduğu antioksidan aktivitesinden daha yüksek olabilmektedir. Birçok polifenolik antioksidan birbirleriyle karşılaştırıldığında, hem konfigürasyonun hem de toplam hidroksil gruplarının antioksidan aktivitesini büyük oranda etkilediği görülmüştür [40-42].

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



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

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

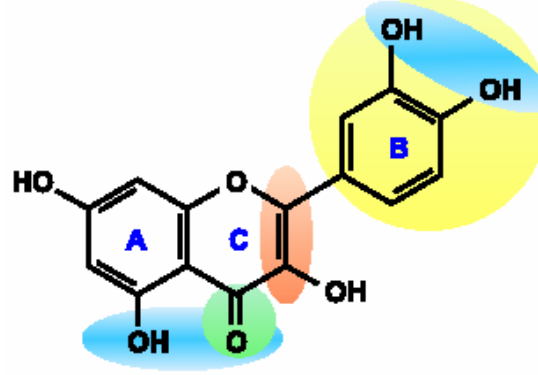
Flavonoidlerin antioksidan etkileri hidroksillenme derecesine göre artarken, yapıya bağlanan şekere ve cinsine göre de azalır [36].

B halkası hidroksil konfigürasyonu; reaktif oksijen (ROS) ve reaktif azot (RNS) türlerinin süpürülmesinde en önemli ögedir. B halkasındaki hidroksil grupları; hidroksil, peroksil ve peroksinitrit radikallerine hidrojen ve elektron vererek onları kararlı hale getirirler [40].

B halkasındaki 3',4'-kateşol yapısı lipid peroksidasyonunu çok kuvvetli şekilde azaltır [43]. Bu yerleşim çoğu antioksidanın en göze çarpan özellikleridir. Örneğin luteolin kaempferol'den daha güçlü antioksidan kapasitesine sahiptir. Her ikisi de benzer hidroksil konfigürasyonuna sahip olmalarına rağmen kaempferol B halkasındaki kateşol yapısından yoksundur (Şekil 2.7, 2.8). Kateşinin radikal süpürme yeteneği çoğunlukla bu kateşol yapısına sahip olmasından kaynaklanır (Şekil 2.11). Kateşol veya pirogallol sistemlerinden yoksun flavonlar kararsız radikaller oluşturur ve zayıf süpürücülerdir [41, 42].

Flavonoidler tarafından serbest radikallerin süpürülme yeteneği, en çok serbest 3-OH grubunun varlığına bağlıdır. 3-OH ve 3',4' kateşol yapısına sahip olan flavonoidler radikallere karşı daha etkilidirler. Örneğin kuersetin, siyanidin ve kateşinin antioksidan kapasiteleri bu özelliklerinden dolayı yüksektir [37]. Şekil 2.13 de, çok güçlü bir antioksidan olan kuersetinin kimyasal yapısı üzerinde antioksidan kapasitesini belirleyen özellikleri incelediğimizde, bu özelliklerden en önemlisi daha önce belirtildiği gibi sarı renkle gösterilen kateşol veya orto-dihidroksillenmiş B halkasıdır. Diğer önemli özellikler; C halkasında kırmızı renkle gösterilmiş olan doymamış yapı,

yeşil renkle gösterilen 4-okso fonksiyonunun varlığıdır. Kateşol grubu ve diğer fonksiyonlar (mavi renkli) demir ve bakır gibi transizyon metallerini kelatlama yeteneği sağlar [44].



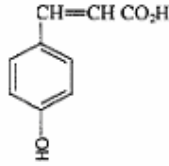
Şekil 2.13: Flavonoidlerin klasik antioksidan kapasitelerini belirlemede önemli olan özellikleri gösteren kimyasal yapı

Tablo 2.1: Flavonoidlerin sınıflandırılması, adları, süstitüsyon modelleri ve besin kaynakları

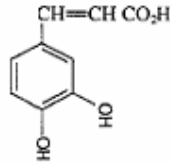
SINIFI	ADLARI	SÜBSTİTÜSYON MODELLERİ	BESİN KAYNAKLARI
Flavanol	(+)-Kateşin	3,5,7,3',4'-OH	Yeşil ve siyah çay
	(-)-Epikateşin	3,5,7,3',4'-OH	Yeşil ve siyah çay
	Epigallokateşin	3,5,7,3',4',5'-OH	Yeşil ve siyah çay
	Epikateşin gallat	3,5,7,3',4'-OH,3-gallat	Yeşil ve siyah çay
	Epigallokateşin gallat	3,5,7,3',4',5'-OH,3-gallat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

2.4.3.2. Fenolik asitler

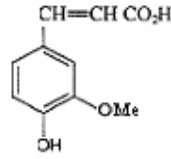
Bitkilerde çok miktarda bulunan fenolik asitler, diğer ismiyle fenil propanoidler, hidroksi sinnamik ve hidroksi benzoik asitleri içeren iki gruptan oluşur. Fenolik asitlerin çoğunu hidroksi sinnamik asitler oluşturur [39]. L- fenil alanin veya L- tirosinden p-kumarik, ferulik, kafeik, sinapik ve klorojenik asit meydana gelir. Yapılarındaki -CH=CH-COOH gruplarının varlığı, hidrojen verebilme yeteneklerini arttırmakla birlikte benzoik asitlere göre radikalleri daha kararlı hale getirebilirler. Benzoatlardan daha etkilidirler. Hidroksi benzoik asitler yapılarındaki hidroksi ve metoksi gruplarının yerleşimi ve sayılarına göre çeşitlenirler. Bunlardan birkaçı; gallik asit, vanilik asit, şiringik asit, resorsilik, protokateşuik asit'dir. Mono hidroksi benzoatlar etkili hidroksil radikal süpürücülerdir çünkü hidroksillenmeye ve hidroksil radikallere yüksek reaktivite göstermeye eğilimlidirler. Fenolik halka ile karboksilat grubu arasında metilen grubu girmesiyle oluşan fenil asetik asitlerde orto ve meta hidroksi türevleri 1 mM'a yakın antioksidan aktivite gösterirler. Dihidroksi benzoik asit türevlerinin antioksidan aktiviteleri hidroksil gruplarının pozisyonlarına bağlı olup, o-p pozisyonlarında aktivite yüksek olurken, m-p pozisyonlarına sahip olanlarda aktivite düşer [11].



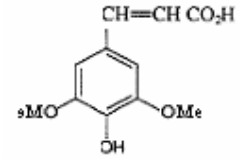
p-kumarik asid



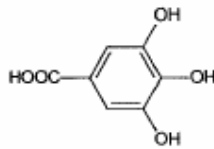
kaffeik asid



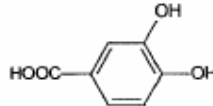
ferulik asid



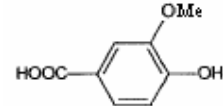
sinapik asid



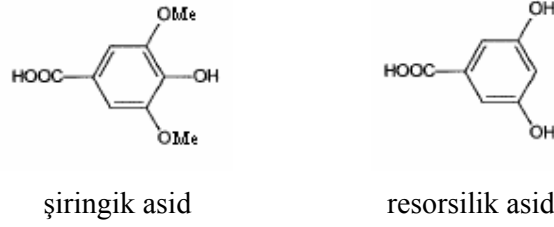
gallik asid



protokateşuik asid



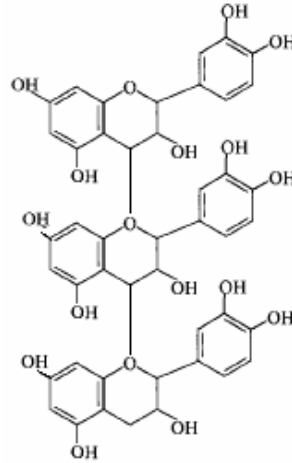
vanilik asid



Şekil 2.14: Fenolik asitlerin kimyasal yapıları

2.4.3.3. Fenolik Polimerler (Tanenler)

Fenolik polimerler, yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Yoğunlaşmış tanenler bu gruba girerler. Bugün besin tanenleri denilince genellikle kateşin ve epikateşinin polimerleri anlaşılmalıdır. Koyu renkli ve tadı buruk bileşiklerdir. Kırmızı ve beyaz şarapta, elma ve nar suyunda mevcuttur [39].

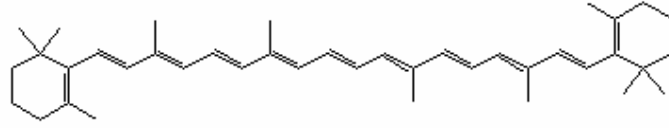


Şekil 2.15: Fenolik polimerlerin yapısı

2.4.4. Karotenoidler

Karotenoidler; bitkilerde sentezlenirler, fakat hayvanlar için önemlidirler. Yüksek derecede doymamış izoprenidlerdendir. Çifte bağların konjuge oluşundan kuvvetli renklidirler. Açık sarıdan kırmızıya kadar renkli, birçok bitki ve hayvanlarda bulunan, azot içermeyen, suda çözünmeyen fakat yağlarda ve organik çözücülerde çözünen pigmentlerdir. Birçok sebze, meyve ve çiçeklerin karakteristik renkleri bunlardan ileri gelir. Havuç, mısır, domates, tereyağı, süt, yumurta sarısı ve birçok meyvede bolca bulunur. En yaygın kullanılanı A-provitamini olarak da bilinen β -karoten'dir. A-

vitamininin kendiliğinden antioksidan özelliği bulunmazken, β -karoten antioksidan aktiviteye sahiptir [32].

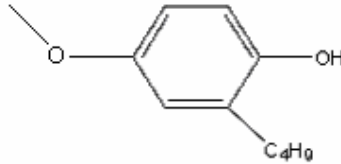


Şekil 2.16: β -karotenin yapısı

2.5. SENTETİK ANTİOKSİDANLAR

2.5.1. Butillenmiş Hidroksi Anizol (BHA)

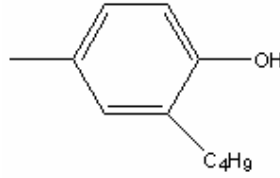
Butillenmiş hidroksi anizol (BHA), bitkisel ve hayvansal yağlarda kolay çözünebilen etkili bir sentetik antioksidandır. Piyasada bulunan BHA başlıca iki izomer olan 3-tertiyer butil-4-hidroksi anizol ve 2-tertiyer butil 4-hidroksi anizol karışımıdır. Zehirli değildir ve katıldığı maddeye hiçbir koku aşmaz. Anizolde benzen halkasındaki yerdeğiştirenlerin, maddenin antioksidan etkisi bakımından rolü büyüktür. Hidroksi grubunu 5. veya 6. karbon atomunda taşıyan bileşikler antioksidan değilken 4 üzerinde taşıyanlar antioksidan özellik gösterir. Bunun haricinde diğer yerdeğiştirenlerin yer ve yapısı da rol oynar. Örneğin; 3-tertiyer butil 4-hidroksi anizol, 3-metil veya 3 n-butil türevlerinden daha etkilidir. Yerdeğiştirenin 3 no'lu karbon atomuna bağlı olması da etkiyi artırır. BHA, gıdalarda % 0,02 oranında kullanılır. Özellikle hayvansal yağlar, bu yağlarla yapılan bisküvi, pasta ve patates cipsinde etkili antioksidan olarak kullanılırlar [32].



Şekil 2.17: Butillenmiş hidroksi anizolün (BHA) kimyasal yapısı

2.5.2. Butillenmiş Hidroksi Toluen (BHT)

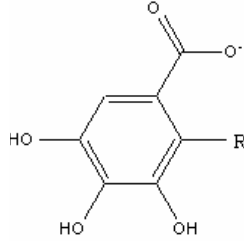
Butillenmiş hidroksi toluen hayvansal yağlarda ve etlerde çok, bitkisel yağlarda az etkilidir. BHA ile benzer özelliklere sahiptir. Gıdalara ilave edilme işlemleri sırasında uygulanan çok yüksek sıcaklıklara dayanıklı değildir. % 0,01 oranında kullanılır [32].



Şekil 2.18: Butillenmiş hidroksi toluenin (BHT) kimyasal yapısı

2.5.3. Gallatlar

Gallatlardan özellikle kullanım alanına sahip olanlar; propil, oktil, dodesil gallatlardır. Yağlar için etkili antioksidanlar olup gallik asidden esterleşme suretiyle (katalizör olarak anorganik asitleri kullanarak) elde edilirler. FDA tarafından yalnız propil gallatın et yağları için kullanılmasına müsaade edilmiştir. Bununla birlikte diğer esterlerin farklı fizyolojik etkiye sahip olacağı pek kesin olarak gösterilmiş değildir. Gallik asid esterleri % 0,01 oranında çok etkilidirler. Yalnız demirle yağa hafif bir menekşe renk verdirtir. Onun için bunun kullanıldığı yağda demir bulunmaması gerekir [32].



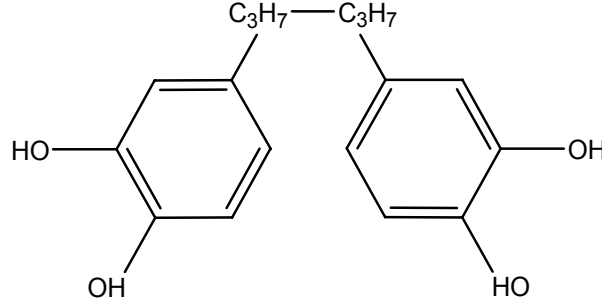
Şekil 2.19: Propil, dodesil ve oktil gallatların kimyasal yapıları (**R**: C₃H₇, C₁₂H₂₅, C₁₈H₃₇)

2.5.4. Tersiyer Butil Hidrokinon (TBHQ)

Diğer sentetik antioksidanların aksine bitkisel yağlar için en etkili sentetik antioksidan tersiyer butil hidrokinon (TBHQ) dur. Yüksek sıcaklıklara dayanıklıdır. Avrupa'da kullanımı yasaklanmıştır. Gıdalara % 0,02 oranında katılır [32].

2.5.5. Nordihidroguareyetik asid (NDGA)

Nordihidroguayaretik asid (NDGA) toksik etkisi yüksek, yağdaki çözünürlüğü az olan bir sentetik antioksidandır. Özellikle domuz yağı için etkili bir antioksidandır. Gıdalara % 0,01 oranında katılır, pişirilmiş besinlerde bile etkisini korur [32].



Şekil 2.20: Nordihidroguayaretik asidin (NDGA) kimyasal yapısı

2.6. SPEKTROSKOPİK ANTİOKSİDAN KAPASİTE YÖNTEMLERİ

Biyolojik sıvıların, saf bileşiklerin, besin ekstraktlarının ve bileşenlerinin toplam antioksidan aktivitesini ölçmek için çok sayıda metod geliştirilmiştir. Literatürde var olan toplam antioksidan aktivite yöntemleri kapsamlı bir literatür çalışmasında ele alınmıştır [45].

Bu yöntemleri birkaç sınıf altında toplayabiliriz:

1. Bir örnekte bulunan tüm antioksidanların tükenmesi için gerekli zamanın ölçümüne dayanan yöntemler. Bu yöntemler, Wayner ve arkadaşları tarafından geliştirilen orjinal TRAP (Toplam Radikal Antioksidan Potansiyeli) yönteminin [6] modifikasyonu sonucu geliştirilmiştir.
2. Tayin edilecek antioksidan bileşiğin serbest radikal bulunan bir ortama ilave edilmesi sonucu radikalın tüketiminin ölçümüne dayanan yöntemler.
3. Verilen bir serbest radikal prosesinin hızının gözlenip analiz edilecek örneğin ilavesinden sonra bu hızın nasıl azaldığının değerlendirilmesine dayalı yöntemler.
4. Toplam antioksidan miktarını örneklerin indirgeme kapasitesiyle bağlantılı kılan yöntemler.

2.6.1. FRAP (Demir (III) İndirgeme Antioksidan Gücü) Metodu

İlk olarak Benzie ve Strain tarafından plazmanın demir (III)'ü indirgeme yeteneğinden yararlanılarak antioksidan gücünü ölçmek için geliştirilen bu methodda, demir(III)tripridiltiazin (Fe(III)-TPTZ) kompleksi antioksidan (indirgen) vasıtasıyla düşük pH ortamında demir(II)tripridiltiazin (Fe(II)-TPTZ) kompleksine indirgenir. Meydana gelen Fe(II)-TPTZ kompleksinin rengi şiddetli mavidir ve 593 nm'de maksimum absorban vermektir [14].

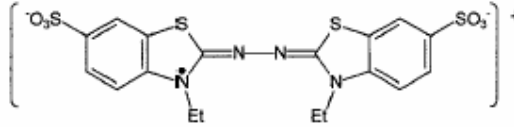
Basit ve ucuz bir yöntem olan FRAP metodu renkli bir bileşik oluşturmak üzere antioksidanların indirgeyebilme yeteneğini ölçmektedir. Fe(III) bir oksidandır ancak bir prooksidan değildir. Fe(II) ise H_2O_2 ile etkileşmesinden dolayı bir prooksidan olabilir. Çünkü etkileşim sonucunda vücutta bulunan en zararlı serbest radikal olan hidroksil radikalleri oluşur. Bu durumda bu yöntemde bir bileşiğin Fe(III)'ü Fe(II)'ye indirgeme yeteneğinin 'antioksidan gücü' olarak ifade edilmesi nasıl olabilir sorusu akla gelmektedir. Bu sorunun cevabı şudur: askorbik asit ve ürik asit gibi bazı antioksidanlar hem reaktif türleri hem de Fe(III)'ü indirgeyebilmektedir ve Fe(III)'ü indirgeme yetenekleri reaktif türleri indirgeme yeteneklerine yansımaktadır. Ancak Fe(III)'ü indirgeyebilen her redüktan antioksidan olamaz. Kısaca, prooksidanları kuvvetli bir şekilde indirgeyebilen bir antioksidan Fe(III)'ü de aynı şiddette indirgemeyebilir.

Bu yöntemin diğer bir özelliği de biyolojik bir örnekte bulunan antioksidanların hem Fe(III)-TPTZ kompleksini Fe(II)-TPTZ kompleksine indirgemesi hem de Fe(II) iyonlarının ortamdaki H_2O_2 ile reaksiyonu sonucu oluşan hidroksil radikalleri ile etkileşmesinden dolayı antioksidan kapasitesinin direkt olarak ölçülememesidir. Diğer bir deyişle, FRAP metodu toplam antioksidan gücü tayin edebilen dolaylı bir methoddur [30]. pH=3.6'da uygulanan FRAP yöntemi fizyolojik pH'larda çalışmadığından bulunan sonuçların insan vücudundaki redoks reaksiyonlarına uyarlanması beklenmemelidir. Yöntemin asidik pH'larda çalışması, protonlarını vermemiş bazı antioksidanların kolay yükseltgenememesine ve dolayısıyla toplam antioksidan kapasitesinin olduğundan düşük bulunmasına yol açabilmektedir. Ayrıca bu yöntemin diğer bir eksikliği, plazma

antioksidanlarını dolaylı olarak ölçerken '*in vivo*' koşullarda önemli bir tiyol (-SH) grubu antioksidanı olan glutatyon ile reaksiyon vermemesidir.

2.6.2. TEAC (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi) / ABTS Yöntemi

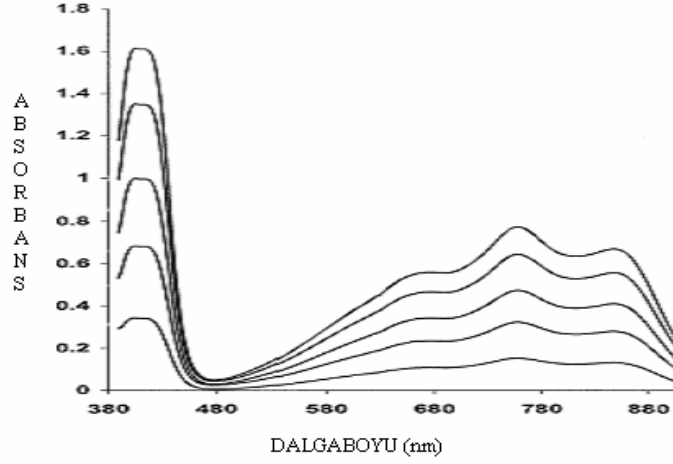
Troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi olarak ifade edilen **TEAC/ABTS** yöntemi, ilk olarak Miller ve diğ. tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem; 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) (ABTS) kromojen radikal katyonunun absorbansının hidrojen verici antioksidanlar tarafından inhibe edilmesine dayanan bir metoddur. Absorbanstaki azalmadan yararlanılarak toplam antioksidan kapasitesi troloks (E vitamini analogu) cinsinden verilmektedir. Aktivitesi ölçülecek bileşiğin 1 mM'lık çözeltisinin aktivitesine eşdeğer olan troloksun milimolar konsantrasyonu (TEAC) aktiviteyi ifade eder. Orjinal metotta ABTS⁺ katyonu (Şekil 2.21) metmiyoglobinin H₂O₂ ile aktivasyonu sonucu meydana gelen ferrilmiyoglobin radikal türlerinin ABTS ile etkileşiminden meydana gelmektedir. ABTS⁺ radikal katyonunun karakteristik uzun dalgaboylu absorpsiyon spektrumu 660, 734 ve 820 nm'de maksimum vermektedir (Şekil 2.22) [2, 12].



Şekil 2.21: ABTS⁺ katyonunun yapısı

Re ve diğ. [17] tarafından modifiye edilen TEAC yönteminde ise ABTS⁺ radikal katyonu ABTS'nin potasyum persülfat ile oksidasyonu sonucu oluşmaktadır. Oluşan radikal katyonu oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 2 gün dayanıklıdır. Geliştirilen metodun orijinal metoddan farkı hem lipofilik hem hidrofilik antioksidanlara uygulanabilmesi ve bir dekolorizasyon (renk giderimi) yöntemi olmasıdır. Yani sisteme antioksidan ilave edilmeden önce radikal katyonu oluşmaktadır. Orijinal metotta ise antioksidan varlığında radikal meydana gelmektedir.

Üçüncü grupta bulunan yöntemlerde kullanılan kromojen radikallerin kararlılığı pek çok etkene bağlıdır ve bu sistemlerde verilen bir bileşik tarafından gerçekleştirilen indirgeme olayının, radikal süpürme yeteneğinden mi yoksa radikal oluşumunun başlangıç hızını azaltmasından mı kaynaklandığı tam olarak belli değildir[45].



Şekil 2.22: ABTS radikal katyonunun absorpsiyon spektrumu.

TEAC metodunun diğer bir modifikasyonu van den Berg ve diğ. tarafından geliştirilmiştir. Bu çalışmada bir azo bileşiği olan 2,2'-azobis-(2-amidinopropan)HCl (ABAP) kullanılarak $ABTS^{\cdot-}$ radikal anyonu oluşturulmuştur. Yöntemde antioksidanlar radikalın oluşmasından önce eklenmektedir. Böylece radikal oluşumuna etki edecek olan bileşiklerin enterferansını önlemektedir. Bu yöntemde de hem hidrofilik hem lipofilik antioksidan kapasitesi ölçülebilmektedir [46]. Diğer bir yenilik Arnao ve diğ. tarafından ortaya konulmuştur. Burada ABTS radikalının oluşumunda HRP (horse radish peroxidase) kullanılmıştır. $ABTS/H_2O_2/HRP$ enzimatik sistem kullanılarak hidrofilik ve lipofilik antioksidan aktivitesi ölçülebilmektedir [47].

2.6.3. DPPH Yöntemi

Bu yöntem; antioksidanların kararlı bir serbest radikal olan DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikalini süpürücü etkilerini ölçmeye dayalı bir yöntemdir. Bu radikal hidrojen donörlerle etkileştiğinde hidrazine indirgenir. Kırmızı renkli DPPH radikali 517 nm'de maksimum absorpsiyon verir. Etanol veya metanollü DPPH çözeltisine antioksidanın ilave edilmesiyle absorbansta düşüş meydana gelir ve antioksidanların varlığıyla radikalın rengi kırmızıdan sarıya döner. Bu yöntem antioksidanların radikal süpürme kabiliyetlerini değerlendiren kolay ve geçerli bir yöntem olarak bilinmektedir

[18]. Ancak doğaldır ki DPPH radikalini süpürme yeteneği, fizyolojik koşullarda etkin olan ROS ve RNS radikallerini süpürme yeteneği ile bire bir bağdaştırılamaz.

2.6.4. Folin Ciocalteu Yöntemi

Bu yöntem Singleton ve diğ. [21-22] tarafından antioksidanların toplam fenolik içeriğini ölçmek için geliştirilmiştir. Yöntemde kullanılan CuSO_4 (bakır(II) sülfat) alkali ortamda protein veya antioksidanla kompleks yapar. Folin fenol reaktifi (fosfo-molibdik-fosfotungstik reaktif) eklendiğinde, folin reaktifi proteine bağlanır. Protein veya antioksidanla Cu(II) 'nin reaksiyonundan açığa çıkan Cu(I) olasılıkla molibdatotungstat reaktifini heteropoli mavisine indirger ve rengi sarıdan maviye dönüşür. Reaksiyon tamamlanınca 750 nm'de örnek absorbansları ölçülür.

2.6.5. TRAP (Toplam Radikal Tutma Parametresi) Yöntemi

Wayner ve diğ. tarafından geliştirilen toplam radikal tutma parametre (TRAP) yöntemi son 10 yıldır plazma veya serumdaki toplam antioksidan kapasitesini ölçmek için kullanılan başlıca yöntemlerden biridir.

Bu metodda; plazma ve diğer biyolojik sıvılarda bulunan peroksitelebilen maddelerden ve 2,2'-azobis (2-amido propan) hidroklorürden (AAPH) meydana gelen peroksil radikalleri kullanılır. Plazmaya AAPH'ün ilavesinin ardından reaksiyon sırasında tüketilen oksijenin ölçülmesiyle yükseltgenebilen maddelerin oksidasyonu gözlenmektedir. Bu oksidasyon indüksiyon periyodu boyunca plazmadaki antioksidanlar tarafından engellenmektedir. İndüksiyon periyodu ölçülerek plazmadaki toplam antioksidan kapasitesi, iç standart olarak kullanılan troloks eşdeğeri cinsinden hesaplanmaktadır [6]. Wayner ve diğ. orijinal TRAP yöntemini modifiye etmişlerdir. Bu yeni yöntemde, peroksil radikalleri tarafından oksidasyon başlatılmadan önce, plazma örneğine linoleik asit ilavesi yapılmıştır [48]. TRAP yönteminin en önemli dezavantajı, oksijen elektrodu ile ilgilidir. Oksijen elektrodu, gereken zaman periyodunda kararlılığını sağlayamamaktadır [12]. Ayrıca TRAP indeksine C ve E vitamini gibi antioksidanların az katkı sağlaması önemli bir sakıncadır.

2.6.6. Luminol Yöntemi

İlk olarak Metsä-Ketelä ve diğ. tarafından 1991'de geliştirilen ve yayımlanan kemiluminesans bazlı TRAP yöntemi, daha sonra Alho ve Leinonen tarafından detaylı

şekilde tanımlanmıştır [19]. AAPH bileşiğinden meydana gelen peroksil radikallerinin yükseltgenbilir substratı (luminol) oksidasyonu sonucu ışık yayan luminol radikalleri oluşmaktadır. Oluşan ışık luminolmetre denilen cihazlarla ölçülmektedir. Antioksidan özelliği olan bir madde, kemiluminesans ışımalarının oluşumunu belli bir zaman (gecikme zamanı) için engeller. Gecikme zamanı bir örnekteki toplam antioksidan potansiyeli ile doğrudan orantılıdır. Elde edilen sonuçlar troloks eşdeğeri cinsinden hesaplanmaktadır.

Whitehead ve diğ. tarafından orijinal luminol yöntemine bazı ilaveler yapılmıştır. Luminol maddesinin hidrojen peroksit veya perborat ile yükseltgenmesinden yararlanır. Reaksiyonun daha hızlı gerçekleşebilmesi için katalizör olarak HRP kullanılmış ve ışık yayılması daha çabuk olmuştur. Normal şartlar altında bu reaksiyon hızla azalan düşük şiddetli bir ışık yayılması olarak gerçekleşir. Reaksiyon ortamına p-iyodofenol ilave edildiği zaman ışık emisyonu daha şiddetli, uzun süreli ve kararlı hale gelir. Işığın luminol radikalleri tarafından yayılması için ortamdaki bütün antioksidanların tüketilmesi gerekmektedir. Bu nedenle bu yöntem antioksidan girişimine karşı duyarlıdır. Bu yöntemin en önemli dezavantajı, incelenen antioksidanların yalnızca AAPH'dan oluşan radikalleri değil luminol radikallerini de indirgemesidir [3].

2.6.7. Diklorofloresin-diasetat (DCFH-DA)

Temelini TRAP yönteminin oluşturduğu bu yöntem, Valkonen ve Kuusi tarafından geliştirilmiştir. Yöntemde AAPH peroksil radikali oluşturmak için, DCFH-DA ise yükseltgenen substrat olarak kullanılmıştır. Peroksil radikali ile DCFH-DA arasındaki oksidasyon reaksiyonu sonucunda oluşan diklorofloresin (DCF) yüksek floresans özelliğe sahiptir. 480 nm'de uyarılıp 526 nm'de emisyon yapmaktadır. 504 nm'de de maksimum absorpsiyon göstermektedir. Yöntemin uygulanması sonucunda DCF miktarı ve buna bağlı olarak toplam antioksidan kapasitesi hesaplanmaktadır. Toplam antioksidan kapasitesi iki aşamada hesaplanmaktadır. İlk aşamada, numune içindeki antioksidanların kapasitesi gecikme zamanı cinsinden hesaplanıp ardından aynı numune üzerine miktarı bilinen troloks çözültüsü ilave edilir. Troloks çözültüsü serbest radikaller tarafından tüketildikten sonra ikinci gecikme zamanı hesaplanır. Bu iki

gecikme zamanı arasındaki farktan yararlanılarak troloks cinsinden toplam antioksidan kapasitesi hesaplanır [15].

2.6.8. TOSC (Toplam Oksiradikal Uzaklaştırma Kapasitesi) Yöntemi

Winston ve diğ. tarafından geliştirilmiş olan bu yöntem; AAPH bileşiğinden meydana gelen peroksil radikalleri tarafından α -keto- γ metiolbutirik asitin (KMBA) etilene okside olmasına dayanır [16].

Kısmen antioksidanlar tarafından engellenen etilen oksidasyonu gaz kromatografisi ile ölçülmektedir. Toplam kapasiteyi elde etmek için kullanılan denklem aşağıda verilmiştir:

$$TOSC = 100 - (I_{SA} / I_{CA} \times 100) \quad (2.6)$$

SA: örnek reaksiyon eğrisi

CA: kontrol reaksiyon eğrisi

Antioksidan veya TOSC değerleri 0-100 arasında verilmiştir. Bu yöntemde kullanılan alan integralleri açık bir sistemdir, çünkü KMBA tarafından oluşan etilen üretimi antioksidanların tüketilmesiyle artar. Uygun değerlerde kullanılan KMBA sınırlayıcı bir faktör değildir. Bu yöntemin plazma antioksidanlarını değerlendiren bir uygulaması mevcut değildir [30].

2.6.9. Krosin Esaslı Yöntemler

Plazma antioksidanlarının antioksidan kapasitelerini ölçmek için Tubaro ve diğ. tarafından geliştirilmiş olan yöntemde kinetik parametreler kullanılmıştır. Bu yöntem; AAPH tarafından meydana gelen peroksil radikalleri sayesinde krosinin yükseltgenmesi (renginin giderilmesi) esasına dayanmaktadır. Krosinin peroksil radikalleri tarafından oksidasyon yani renk giderim hızı, ortamda antioksidan bileşiklerin bulunmadığı haldeki hızı (V_0) ve bulunduğu haldeki hızı (V), 10 dakikalık süre içinde ölçülüp kaydedilir. [A (antioksidan konsantrasyonu) / C (krosin konsantrasyonu)] ile V_0/V arasında çizilen grafiğin eğimi, teorik olarak k_a (antioksidan ve peroksil radikalleri arasındaki reaksiyon hız sabiti) ile k_c (krosin ile peroksil radikalleri arasındaki reaksiyon hız sabiti) arasındaki oranı (k_a/k_c) verir, yani peroksil radikalleri ile etkileşen

bileşimin rölatif kapasitesini belirtir. İncelenen antioksidanın k_a/k_c değeri troloksun k_a/k_c değerine bölünüp sonuçlar troloks eşdeğeri cinsinden ifade edilmektedir [20].

Tubaro ve diğ., bu kinetik yaklaşım sayesinde antioksidan koruma etkinliğinin kesin olarak değerlendirilebileceğine inanmaktadırlar. Ancak bu metod bir antioksidanın diğer bir antioksidana karşı mücadele etme yeteneğini ölçmektedir. Ayrıca kullanılan krosinin konsantrasyonu sabittir fakat analizlenecek olan bileşimin farklı konsantrasyonlarının kullanılması için farklı krosin konsantrasyonları gerekmektedir. Bu yöntemin diğer bir eksikliği, askorbik asid için bulunan troloks cinsinden antioksidan kapasitesinin 7.7 olması ve bu sonucun diğer metodlarla bulunanlardan çok daha yüksek olmasıdır [30].

2.6.10. Fikoeritrin (PE) Esaslı Yöntemler

Ghiselli ve diğ. [5] tarafından 1994 yılında yayınlanan bu yöntemin bir kısmı daha önce Glazer [8] tarafından 1990 yılında ifade edilmiştir. Glazer, peroksil radikallerini oluşturmak için AAPH, hidroksil radikallerini oluşturmak için Cu(II)-askorbat, yükseltgenbilir substrat olarak B- veya R-PE kullanmıştır. B- veya R-PE substratının peroksil veya hidroksil radikalleri varlığında gösterdiği floresansın zamanla lineer olarak azaldığı belirtilmiştir. Bir numunedeki antioksidanların, peroksil veya hidroksil radikallerine karşı sağladığı tam koruma süresi troloksun sağladığı tam koruma süresine oranlanarak troloks eşdeğeri cinsinden verilmiştir.

Yeni bir yöntem olarak yayınlanan Ghiselli' nin yönteminde Glazer' in geliştirmiş olduğu yönteme atıf yapılmamıştır. Ayrıca yapılan çalışmada R-PE floresansındaki azalmanın floresansın %80 tamamlanana kadar zamanla lineer olarak azaldığı belirtilmiştir. Ancak bu çalışma Cao ve diğ. tarafından tekrar yapıldığında aynı sonuçlar alınamamıştır [4, 13].

2.6.11. ORAC (Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi) Yöntemi

ORAC yöntemi [4, 13]; büyük oranda Glazer [8] tarafından geliştirilip yayınlanan çalışmaya dayalı bir yöntemdir. Diğer yöntemden farkı hidroksil radikallerinin oluşturulmasında Cu(II)-H₂O₂ kullanılmasıdır. Oluşturulan serbest radikaller ile yükseltgenir substrat olan β-PE arasındaki oksidasyon reaksiyonu sonucunda fikoeritrinin (phycoerythrin) floresansındaki düşüş ölçülerek toplam antioksidan kapasitesi hesaplanmaktadır. Serbest radikal etkisini inceleyen ve eğri altında kalan alan

tekniklerini miktar tayininde kullanan bu yöntem, antioksidanların serbest radikalleri hem inhibe etme yüzdesini ve hem de süresini tek bir değer olarak ifade edebilen bir yöntemdir [30]. Çeşitli biyolojik örneklerden saf bileşiklere kadar birçok maddeye ORAC yöntemi uygulanıp antioksidan kapasiteleri tayin edilmiştir [10, 49, 50].

ORAC yönteminde prooksidan olarak peroksil ve hidroksil radikalleri kullanılması, yöntemi prooksidan olmayan yükseltgenler içeren yöntemlerden ayırmaktadır. Yöntemde oksidasyon için bir protein substrat (PE) kullanılması da substrat olarak luminol [3, 19] veya krosin [20, 23] kullanılan yöntemlerden ayıran önemli bir farktır [30].

2.7. LİTERATÜRDE VAROLAN ANTIOKSİDAN KAPASİTE ÇALIŞMALARI

Spektroskopik antioksidan kapasite tayininde kullanılan yöntemlerin içecek, şifalı bitkiler, besin ekstraktları ve serum gibi farklı ortamlara uygulandığı birçok çalışma mevcuttur. Bu matrisler içerisinde fenolik bileşiklerin içeriği, antioksidan yetenekleri, etkileri ve toplam kapasiteleri araştırılmıştır. Bu çalışmalardan birkaçını örneklendirmek yöntemlerin en çok uygulandığı alanları belirlemek açısından şüphesiz önemlidir.

Hirano ve diğ. [51] çeşitli flavonoidlerin DPPH radikaline ve LDL oksidasyonuna karşı antioksidan yeteneklerini incelemişlerdir. Çalışmalarında; kateşin, epikateşin, epigallokateşin, epigallokateşin gallat, mirisetin, kuersetin, apigenin, kaempferol ve luteolin flavonoidlerinin DPPH radikalini söndürme kapasitelerini ölçmüşlerdir. 20 dakikalık inkübasyon sonrasında epigallokateşin gallatın etkili, luteolinin ise en zayıf radikal süpürücü olduğu sonucuna varmışlardır.

Flavonol ve glikozidlerinin LDL oksidasyonunu azaltıcı etkilerini araştıran Hou ve diğ. [52] kuersetin, rutin, morin, kaempferol ve glikozidlerinin AAPH ve Cu(II) merkezli peroksidasyona karşı etkili olduklarını saptamışlardır. o-dihidroksi grupları içeren flavonollerin fonksiyonel grup içermeyenlere oranla, aglikonların glikozidlere oranla daha etkili olduklarını belirtmişlerdir.

Lopez ve diğ. [53] doğal antioksidan olarak fenolik bileşiklerinin kapasitelerini tayin etmek için bir floresans yöntem uygulamışlardır. Bu yöntem rutin, kuersetin, resveratrol ve gallik asid için 2,2'-azobis (2-metilpropionamidin) dihidroklorür tarafından peroksidasyon hızının azalmasına bağlı olarak B-fikoeritrin (B-PE) proteininin floresansındaki azalmayı ölçmekten ibarettir. Reaktif türlerin varlığında protein oksidatif hasara uğrar. Fenolik bileşikler tarafından bu reaktif türlerin etkisinin azalması o bileşiklerin reaktif türlere karşı göstermiş oldukları antioksidan kapasitelerinin bir ölçümüdür. Antioksidan kapasitelerini belirlemede kullanılan referans bileşik troloktur. Kuersetin ve rutinin kuvvetli etki gösterdiği saptanmıştır.

Arts ve diğ. [54] yapmış oldukları bir çalışmada, bir antioksidan bileşiğin antioksidan etkinliğini tahmin edebilmek adına TEAC yönteminin uygulanabilirliğini değerlendirmişlerdir. Bu sebeple diğer yöntemlerle bir karşılaştırma yapılmış ve birbirleriyle yapısal benzerlikler taşıyan kateşol, resorsinol ve hidrokinon bileşiklerinin en etkili olanının resorsinol olduğu tespit edilmiştir. Tersine, diğer yöntemlerde resorsinol diğer bileşiklerden daha düşük antioksidan kapasite göstermiştir. Benzer çalışma flavonoidlerden galangin ve krisine uygulanmış ve birbirine yakın sonuçlar vermiştir. Ancak diğer yöntemlerde galanginin daha kuvvetli bir antioksidan olduğu görülmüştür. Krisin ve resorsinolün TEAC yönteminde yüksek kapasite göstermesi, bu bileşiklerin ABTS' radikali ile etkileştikten sonra bazı reaksiyon ürünleri vermesi ve bu reaksiyon ürünlerinin ilgili bileşiklerden daha fazla antioksidan etkisi gösterip radikal ile daha hızlı reaksiyon vermesinden kaynaklanır. Bu nedenden dolayı; kateşol, hidrokinon ve galangin ile oluşan reaksiyon ürünlerinin ABTS' radikali ile etkileşmeyip TEAC değerine bir etkisi olmadığı savunulmuştur.

Plumb ve diğ. [55] yeşil bezelyede kuersetin ve glikozidlerinin varlığını saptayıp en etkili olanını ortaya çıkarmak için bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmaya göre kuersetinin glikozidlerine göre daha yüksek kapasite gösterdiği belirtilmiştir. Aynı grup, çaydaki flavonoid glikozidlerinin antioksidan kapasitelerini incelemiştir [56]. Kuersetin ve glikozidleri arasında antioksidan yetenekleri bakımından sıralama yapıldığında kuersetin > kuersetin monoglikozid > kuersetin diglikozid > kuersetin triglikozid olarak sıralandıkları savunulmuştur.

Kim ve diğ. [57] spektrofotometrik metodlar kullanarak taze erikte bulunan polifenolleri ve antioksidan özelliklerini araştırmışlardır. Fenolik içeriği HPLC yöntemi ile tayin edilip gallik asid eşdeğeri cinsinden verilmiş, flavonoid içeriği de kateşin eşdeğeri cinsinden elde edilmiştir. Antioksidan kapasiteleri C vitamini eşdeğeri olarak hesaplanmıştır. Çıkan sonuçlara göre erikteki polifenolik maddelerin toplam antioksidan kapasitesine katkısının çok yüksek oranda olduğu görülmüştür. Erikte bulunan en önemli flavonollerin kuersetin ve türevleri olduğu, rutin yüksek oranda bulunduğu ve neoklorojenik asidin en baskın polifenol olduğu gözlenmiştir.

Firuzi ve diğ. [58] kendileri tarafından modifiye edilmiş FRAP yöntemi ve siklik voltametri yöntemleri ile yapıları birbirinden farklı 18 adet flavonoidin antioksidan kapasitelerini hesaplamışlardır. Her bir flavonoidin + 0.3 V (mirisetinin potansiyeli) ile + 1.2 V (5-hidroksi flavonun potansiyeli) arasında değişen oksidasyon potansiyellerini ölçmüşlerdir. Siklik voltametri ile FRAP sonuçlarının birbiriyle uyumlu olduğunu gözlemişlerdir. Kuersetin, fisetin ve mirisetinin oksidasyon potansiyellerinin çok düşük olduğunu ve FRAP yöntemine göre bu bileşiklerin sırasıyla 3.02, 2.52, 2.28 troloks eşdeğerinden antioksidan kapasitelerine sahip olduklarını bulmuşlardır. Buldukları sonuçları değerlendirerek B halkasındaki o-dihidroksi yapısının ve C halkasındaki 3-hidroksi grubu ve 2,3 çifte bağının antioksidan kapasitesi ile çok yüksek oranda ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır.

Yılmaz ve Toledo [59] üzümün çekirdeği ve kabuğunda bulunan temel flavonoidleri ve kateşin, epikateşin ve gallik asidin antioksidan kapasitelerini araştırmışlardır. Bu flavonoidlerin üzümün toplam antioksidan kapasitesine olan katkısını incelemişlerdir. Çekirdekte bulunan flavonoid miktarının kabukta bulunanlardan daha fazla olduğu sonucuna varmışlardır. ORAC yöntemini uygulayıp üzüm çekirdeği ve kabuğundaki flavonoidleri peroksil radikallerini süpürme yeteneklerine göre büyükten küçüğe şu şekilde sıralamışlardır: resveratrol > kateşin > epikateşin = gallokateşin > gallik asid = ellagik asid.

Lee ve diğ. [60] elmadaki başlıca flavonoidleri ve bunların toplam antioksidan kapasitesine olan etkilerini araştırmışlardır. 6 farklı elma çeşidinin antioksidan kapasitelerini ABTS yöntemi ile C vitamini eşdeğeri cinsinden hesaplamışlardır. En

önemli flavonoidler; kuersetin ve glikozidleri, prosiyanidin, klorojenik asid, epikateşin ve C-vitaminidir. Fenolik bileşiklerle C vitamini arasında toplam antioksidan kapasiteleri ve konsantrasyonları bakımından yüksek bir lineer ilişki saptamışlardır. C vitamini eşdeğeri cinsinden fenolik bileşiklerin antioksidan kapasiteleri; kuersetin için 3.06, epikateşin için 2.67, prosiyanidin için 2.36, C vitamini için 1.00 ve klorojenik asid için 0.97 olarak elde edilmiştir.

Miller ve diğ. [61] substrat olarak DPPH kullanarak kahvaltı tahılları (mısır gevreği), meyve ve sebzelerin içerdikleri toplam antioksidan kapasitelerini belirleyen bir çalışma yapmışlardır.

Wang ve diğ. [10] meyvelerin antioksidan kapasitelerini tayin etmek için ORAC yöntemini [4] kullanarak çeşitli meyvelerin toplam radikal süpürme yeteneklerini karşılaştırmışlardır.

Meyvelerle yapılan diğ. bir çalışmada Alonso ve diğ. [62] 28 farklı meyvenin antioksidan aktivitelerini iki farklı yöntemle uygulayıp yöntemler arası karşılaştırma yapmıştır.

Bir diğ. uygulamada Gao ve diğ. [63] tarafından FRAP metodu kullanılarak Çin'de bulunan 28 farklı meyvenin kabuk, et, kök ve toplam antioksidan kapasiteleri incelenmiştir. Bu çalışma, antioksidan içeriğinin meyvenin hangi kısmında daha fazla bulunduğunu belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Cai ve diğ. [64] Çin'in geleneksel 112 şifalı bitkisinin fenolik bileşiklerini ve antioksidan aktivitelerini incelemişlerdir. Şifalı bitki ekstraktlarının troloks eşdeğeri cinsinden toplam antioksidan kapasiteleri TEAC/ABTS yöntemi uygulanarak elde edilmiştir. Test edilen bitkilerin toplam fenolik içerikleri ile antioksidan kapasiteleri arasında önemli bir lineer ilişki olduğu gözlenmiştir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Kimyasal maddelerin tartılmasında AX200 SHIMATZU markalı hassas terazi, hazırlanan çözeltilerin karıştırılmasında girdap karıştırıcı, çözeltilerin pH'larının belirlenmesinde E512 Metrohm Herisau pH-metre, inkübasyon işlemi için IKA HB4 basic su banyosu, hidroliz işlemleri için yüksek sıcaklığa çıkabilen su banyosu ve geri soğutucu, antioksidan tayini için Varian Cary 1E model UV-görünür alan spektrofotometresi ve ölçüm yapmak için HELMA marka 10 mm ışık yollu bir çift quartz küvet kullanıldı.

3.2. KİMYASAL MADDELER

Kullanılan kimyasal maddeler; bakır(II) klorür dihidrat ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), neocuproin (2,9-dimetil 1,10-fenantrolin), amonyum asetat, etil alkol (%96), ABTS, potasyum persülfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), sodyum hidroksid, sodyum karbonat, bakır(II) sülfat, sodyum potasyum tartarat, Folin-Ciocalteu reaktifi, askorbik asid, gallik asid, kuersetin, rutin, kateşin, p-kumarik asid, kaffeik asid, ferulik asid, klorojenik asid, epikateşin, epigallokateşin, epikateşin gallat, epigallokateşin gallat, troloks, naringin, naringenin, morin, hesperidin, hesperetin, vanilik asid ve şiringik asiddir.

3.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması

Cu(II) klorür çözeltisi, 10^{-2} M olacak şekilde bakır(II)klorür dihidrat'tan ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,4262 g. tartım alınıp su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Amonyum asetat (NH_4Ac) tamponu, 1 M (pH=7) olacak şekilde NH_4Ac 'dan 19,27 g. tartım alınıp su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Neocuproine çözeltisi, $7,5 \times 10^{-3}$ M olacak şekilde (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin)'den 0,039 g. tartım alınıp %96'lık etil alkolle 25 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. ABTS'den 0.1920 g. tartım alınıp su ile 50 mL'ye tamamlanarak 7 mM ABTS çözeltisi hazırlandı. ABTS stok çözeltisi içine, son

konsantrasyonu 2.45 mM olacak şekilde 0,0331 g. $K_2S_2O_8$ ilave edildi. Elde edilen ABTS radikal çözeltisi, 12-16 h. boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletildikten sonra kullanıma hazır hale gelmektedir.

Lowry A: %2 Na_2CO_3 (0.1 M NaOH içerisinde)

Lowry B: 0.5 M $CuSO_4$ (%1'lik $NaKC_4H_4O_6$ içerisinde)

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

Folin-Ciocalteu reaktifi H_2O ile 1:3 oranında seyreltildi.

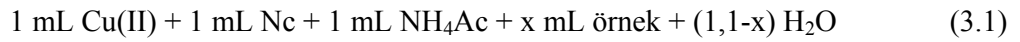
Tüm polifenolik bileşikler %96'lık etil alkol ile konsantrasyonları 1×10^{-3} M olacak şekilde hazırlandı.

3.3. UYGULANAN YÖNTEMLER

3.3.1. CUPRAC Yöntemi [29]

3.3.1.1. Normal Metod

Bir cam tüp içerisine bakır(II) çözeltisi, neokuproin çözeltisi ve amonyum asetat tamponundan sırasıyla 1'er mL eklendi. Üzerine (x) mL örnek çözeltisi ve (1-x) mL H_2O ilave edilip iyice çalkalandı. Toplam hacim 4.1 mL olacak şekilde çözeltiler hazırlandı. Tüpler oda koşullarında ağzı kapalı olarak 30 dakika boyunca bekletildi. Bu süre sonunda içinde örnek bulunmayan referans çözeltiliye karşı 450 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Bu yöntemle tüm polifenolik bileşiklerin çalışma eğrileri çizildi. Bu maddelerin lineer olduğu aralık tespit edildi ve her bir bileşiğin molar absorplama katsayısı bulundu.



Vtoplam: 4,1 mL

3.3.1.2. İnkübasyonlu Metod

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 absorbans değerleri ölçüldü.

3.3.1.3. Hidrolizli Metod

Polifenolik bileşiklerin herbirinden, konsantrasyonları 1×10^{-3} M olacak şekilde ayrı ayrı tartımlar alındı. Her bir bileşik bir miktar % 50'lik metanol çözeltisi içinde çözüldü ve 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 prosedür uygulanıp beklemeden 450 nm'de absorbans değerleri ölçüldü.

3.3.1.4. Hidrolizli ve İnkübasyonlu Metod

Elde edilen hidrolizat çözeltilerine inkübasyonlu metod 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.

3.3.1.5. İkili ve Üçlü Sentetik Karışımların Hazırlanması

İkili sentetik karışımların 1×10^{-3} M'lık çözeltileri etanol içerisinde hazırlanıp normal metod uygulanmıştır. 7 tüp içerisine sırasıyla 1'er mL Cu(II), Nc ve NH_4Ac çözeltilerinden ilave edilerek referans çözelti içeren tüp haricindeki 6 tüpe aynı hacim ve konsantrasyonda 1. antioksidan çözeltisi eklendi. 1. antioksidanın verilen konsantrasyonda yaklaşık 0.2 absorbans göstermesi gerekmektedir. Ardından 6 tüpün 5 tanesine artan konsantrasyonlarda 2. antioksidan çözeltisi ilave edilerek standart katkı yöntemi uygulandı.

Üçlü sentetik karışımlarda polifenolik bileşiklerin her birinin etanol içerisinde çözeltileri hazırlanıp üçlü karışımlar için tüm bileşikler kullanılarak farklı kombinasyonlarda karışımlar elde edilmiştir. Sentetik karışımın toplam absorbansı 0.80'i geçmeyecek şekilde her üç çözeltiden belirli hacimlerde alınıp bir tüp içerisinde karıştırıldı. Üzerine sırasıyla 1'er mL Cu(II), Nc ve NH_4Ac çözeltilerinden ilave edildi. Son olarak H_2O ile son hacme tamamlandı. Bunun yanı sıra sentetik karışımı oluşturan her üç bileşiğin karışıma eklenen hacimlerine karşılık gelen absorbans değerlerini ölçmek için normal ve inkübasyonlu metod uygulandı. 3 ayrı bileşiğin hem normal hem de inkübasyonlu absorbans değerleri toplanarak üçlü karışımın 450 nm'de vermiş

olduğu absorbanans değeri ile karşılaştırıldı. Beklenen ve deneysel olarak elde edilen absorbanans değeri arasında uyumluluk gözlemlendi. Ayrıca bu sentetik karışımların beklenen ve gözlenen antioksidan kapasiteleri mM TR ekivalenti cinsinden aşağıdaki denklemlere göre hesaplanıp birbirleriyle karşılaştırıldı:

$$\text{Beklenen Kapasite} = \text{TEAC}_1 \cdot C_1 + \text{TEAC}_2 \cdot C_2 + \text{TEAC}_3 \cdot C_3 \quad (3.2)$$

$$\text{Absorbans (toplam)} \pm \text{kayım}$$

$$\text{Gözlenen Kapasite} = \frac{\text{Absorbans (toplam)} \pm \text{kayım}}{\epsilon_{\text{trotoks}}} \times 10^3 \quad (3.3)$$

$\epsilon_{\text{trotoks}}$

3.3.2. ABTS-Persülfat Yöntemi [17]

Kullanıma hazır hale gelen mavi-yeşil renkli ABTS radikal çözeltisi etil alkolle 1:10 oranında seyreltildi. 1 mL ABTS⁺ çözeltisi üzerine 4 mL EtOH ilave edilip 734 nm'de 1. ve 6. dakika sonundaki absorbanans değeri kaydedildi. 1:10 seyreltilmiş ABTS⁺ radikal katyonunun 734 nm'deki absorbanansı 1.28 ± 0.04 'dür. Daha sonra x mL örnek üzerine 1 mL ABTS⁺ çözeltisi ve (4-x) mL EtOH ilave edilip aynı dalgaboyunda 1. ve 6. dakika sonundaki absorbanans değeri ölçüldü. Radikalin absorbanans değerinden örneğin bulunduğu çözeltinin absorbanansı çıkarılarak ΔA değerleri elde edildi.

3.3.3. Folin Ciocalteu Yöntemi [21, 22]

Her bir antioksidan çözeltisinden x mL alınıp üzerine (1-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 çözeltiliye karşı absorbanans değeri kaydedildi.

3.4. BITKİ EKSTRELERİNİN HAZIRLANMASI

Antioksidan kapasiteleri belirlenecek olan bitki ekstraları günlük hazırlandı. Herbir bitkiden yaklaşık 1,5 g. tartımlar alındı. Bu bitkiler küçük kesecikler içine konup, içerisinde taze kaynamış su bulunan 250 mL'lik erlenlerde 5 dakika boyunca demlenmeleri sağlandı. Soğumaya bırakılan ekstralar ardından 0.45- μm por selülozik membran filtreden süzüldü. Elde edilen süzüntülere belirli oranlarda seyreltmeler

yapıldı. Seyreltilmiş örneklere sırayla CUPRAC, Folin ve ABTS yöntemleri uygulandı. Hazırlanan bitki ekstraları 48 h. boyunca 4°C’de muhafaza edilebilmektedir.

4. BULGULAR

4.1. CUPRAC METODUNUN SAF POLİFENOLİK BİLEŞİKLERE UYGULANABİLİRLİĞİ

4.1.1. Optimum Deneş Koşullarının Belirlenmesi

CUPRAC metodunda; pH 7 ve üzerinde güvenilir sonuçlar veren Cu(II)-Nc reaktifi ile antioksidan kapasite tayininin optimum deneş koşulları belirlenmiştir. Nötral pH ortamının sağlanması için 1 M amonyum asetat tamponu varlığında reaksiyon gerçekleşmiştir. Cu(II)-Nc reaktifinin antioksidan bileşikle meydana getirdiğı redoks reaksiyonu 30 dakika ile 1 saat içinde tamamlanmaktadır. Bazı antioksidanlar (kuersetin, askorbik asid vb.) kolaylıkla okside olabilmektedirler bu nedenle reaksiyonun başlamasından 1-2 dakika içinde reaksiyon sonlanmış ve absorbans ölçümleri yapılmıştır.

4.1.2. Bazı Antioksidanların Kalibrasyon Grafikleri ve Görünür bölge Spektrumlarının Eldesi

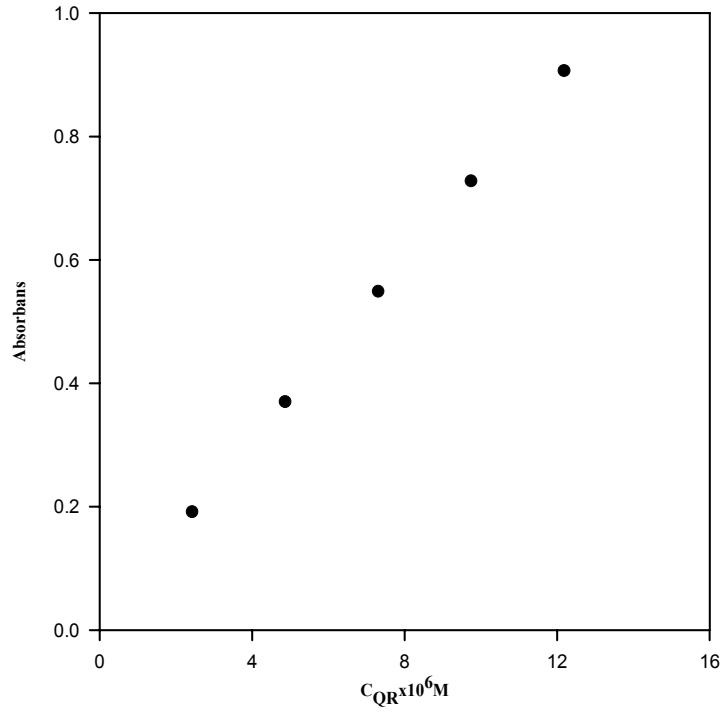
CUPRAC metodu uygulanan ve bazı alt sınıflara ayrılan antioksidan bileşiklerin arasından, flavonollerden kuersetin, flavonlardan rutin, flavanollerden kateşin, flavanonlardan hesperidin, fenolik asitlerden gallik asit ve vanilik asid, hidroksi sinnamik asitlerden ferulik asidin kalibrasyon grafikleri ve CUPRAC reaktifi ilavesinden sonra bu polifenoller varlığında elde edilen Cu(I)-Nc kelatinin görünür bölge spektrumları aşağıda verilmiştir. Diğer polifenoller varlığındaki Cu(I)-Nc kelatinin görünür bölge spektrumları EKLER kısmında verilmiştir. Lineer kalibrasyon doğrularındaki sembollerden x: molar konsantrasyon, y: absorbans ve r: korelasyon katsayısı karşılığıdır.

4.1.2.1. Kuersetin (QR)

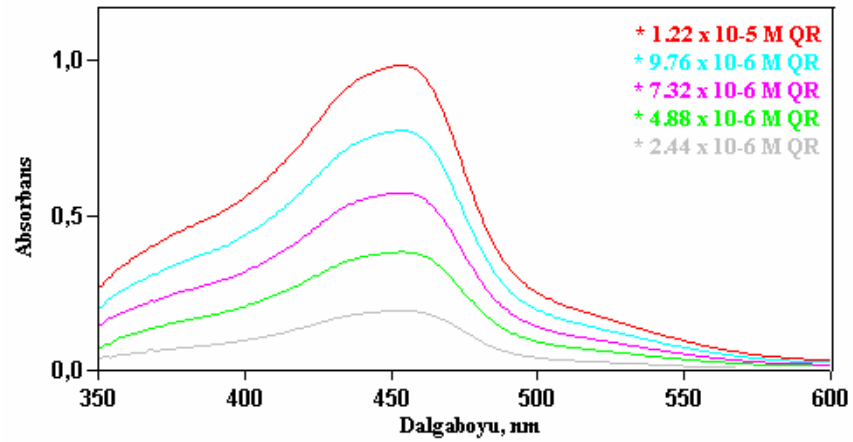
Tablo 4.1: Kuersetinin (QR) hacim-konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.

Hacim (μL)	Konsantrasyon (M)	Absorbans
10	2.44×10^{-6}	0.1908
20	4.88×10^{-6}	0.3695
30	7.32×10^{-6}	0.5483
40	9.76×10^{-6}	0.7271
50	1.22×10^{-5}	0.9059

Doğru Denklemi : $y = 73270 x + 0.012$ $r = 0.9999$



Şekil 4.1: Kuersetinin (QR) kalibrasyon eğrisi



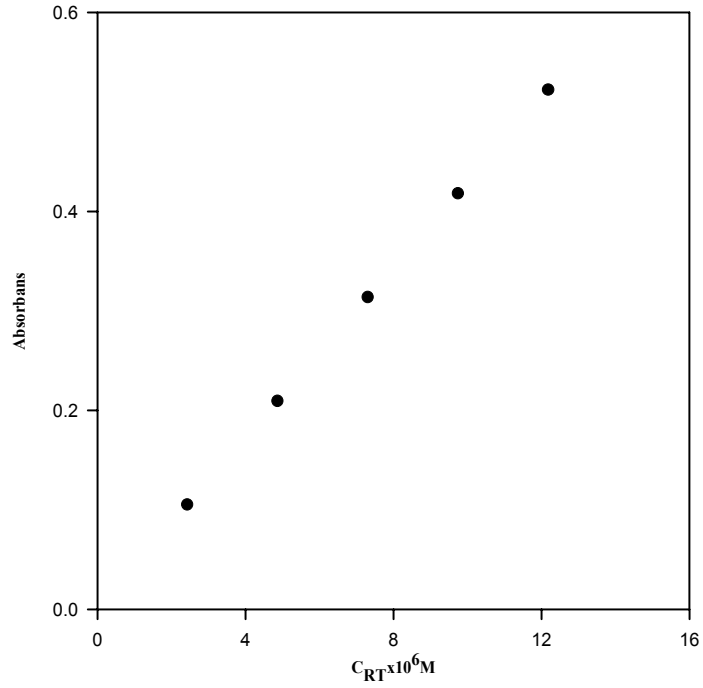
Şekil 4.2: Kuersetin (QR) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu

4.1.2.2. Rutin (RT)

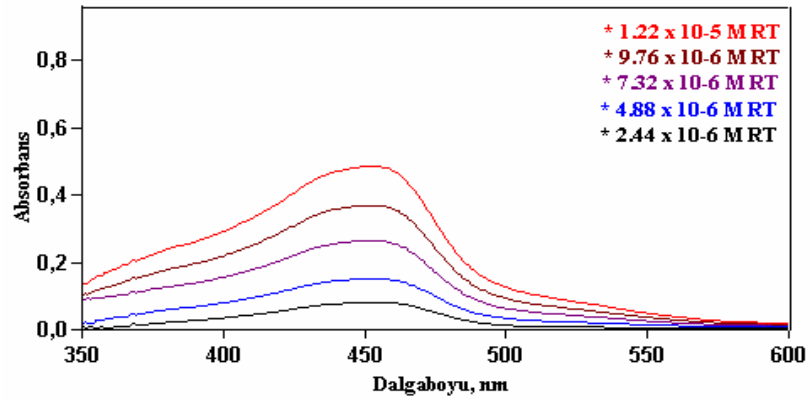
Tablo 4.2: Rutinin (RT) hacim-konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.

Hacim (μL)	Konsantrasyon (M)	Absorbans
10	2.44×10^{-6}	0.1046
20	4.88×10^{-6}	0.2089
30	7.32×10^{-6}	0.3132
40	9.76×10^{-6}	0.4175
50	1.22×10^{-5}	0.5218

Doğru Denklemi : $y = 42746 x + 0.0003$ $r=1$



Şekil 4.3: Rutinin (RT) kalibrasyon eğrisi



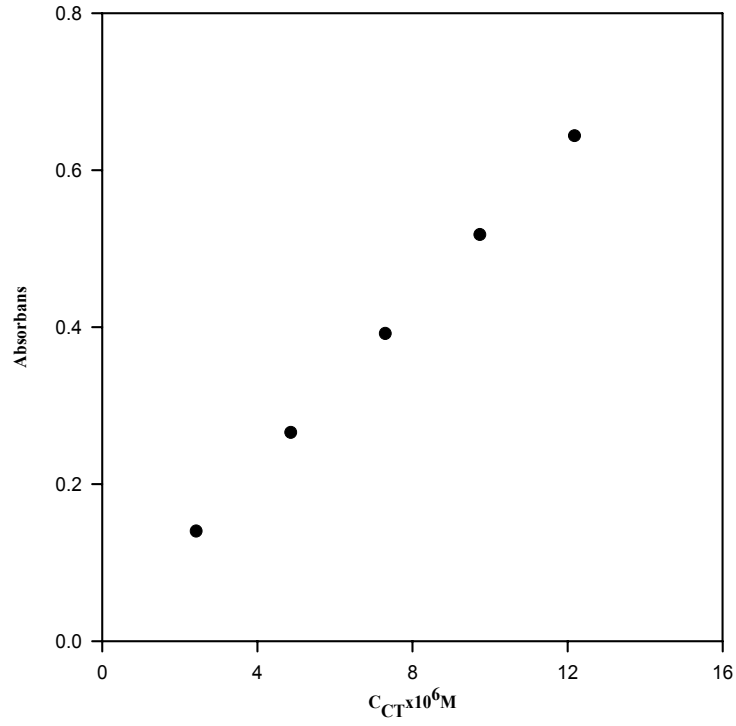
Şekil 4.4: Rutin (RT) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu

4.1.2.3. Kateşin (CT)

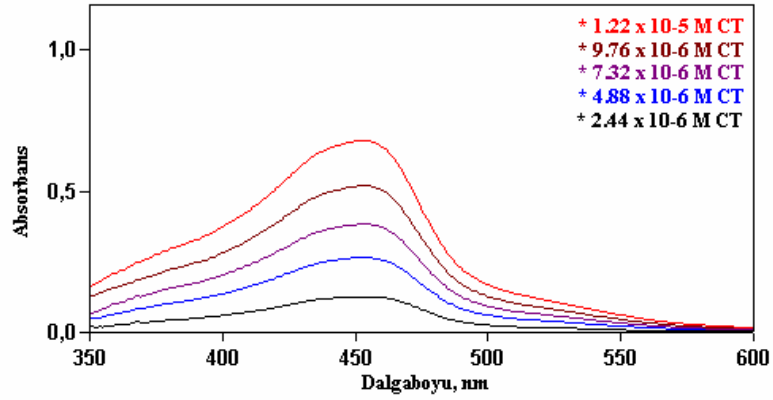
Tablo 4.3: Kateşinin (CT) hacim-konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.

Hacim (μL)	Konsantrasyon (M)	Absorbans
10	2.44×10^{-6}	0.1393
20	4.88×10^{-6}	0.2652
30	7.32×10^{-6}	0.3912
40	9.76×10^{-6}	0.5172
50	1.22×10^{-5}	0.6431

Doğru Denklemi : $y = 51623 x + 0.0133$ $r = 0.9999$



Şekil 4.5: Kateşinin (CT) kalibrasyon eğrisi



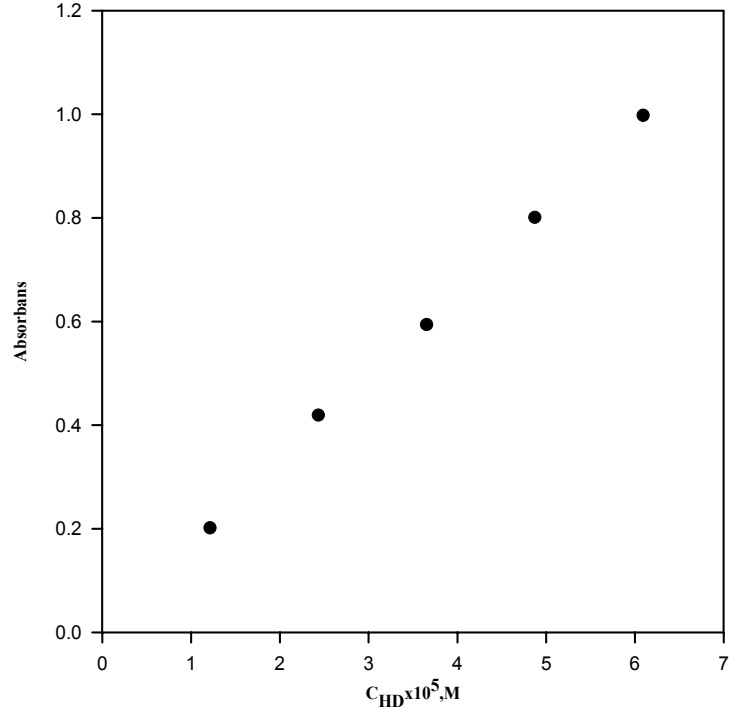
Şekil 4.6: Kateşin (CT) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu

4.1.2.4. Hesperidin (HD)

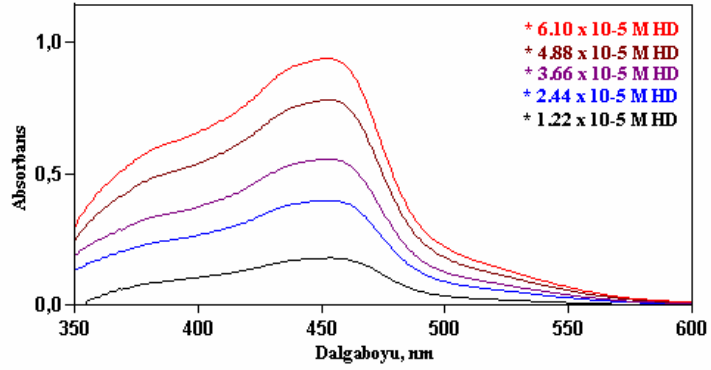
Tablo 4.4: Hesperidin (HD) hacim-konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi

Hacim (μL)	Konsantrasyon (M)	Absorbans
50	1.22×10^{-5}	0.2006
100	2.44×10^{-5}	0.4183
150	3.66×10^{-5}	0.5933
200	4.88×10^{-5}	0.8000
250	6.10×10^{-5}	0.9970

Doğru denklemi : $y = 16184 x + 0.009$ $r=0.9996$



Şekil. 4.7: Hesperidin (HD) kalibrasyon eğrisi



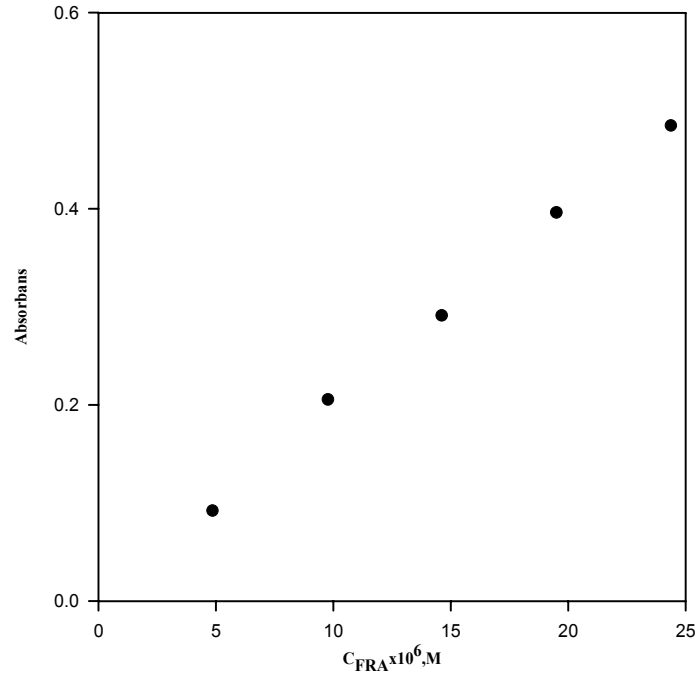
Şekil 4.8: Hesperidin (HD) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu

4.1.2.5. Ferulik Asid (FRA)

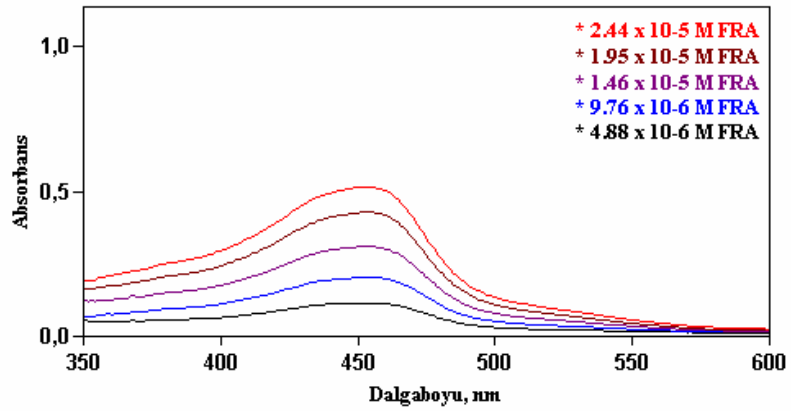
Tablo 4.5: Ferulik asidin (FRA) hacim-konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemleri.

Hacim (μL)	Konsantrasyon (M)	Absorbans
20	4.88×10^{-6}	0.0918
40	9.76×10^{-6}	0.2052
60	1.46×10^{-5}	0.2910
80	1.95×10^{-5}	0.3958
100	2.44×10^{-5}	0.4846

Doğru denklemi : $y = 20004 x + 0.0008$ $r = 0.9991$



Şekil 4.9: Ferulik asidin (FRA) kalibrasyon eğrisi



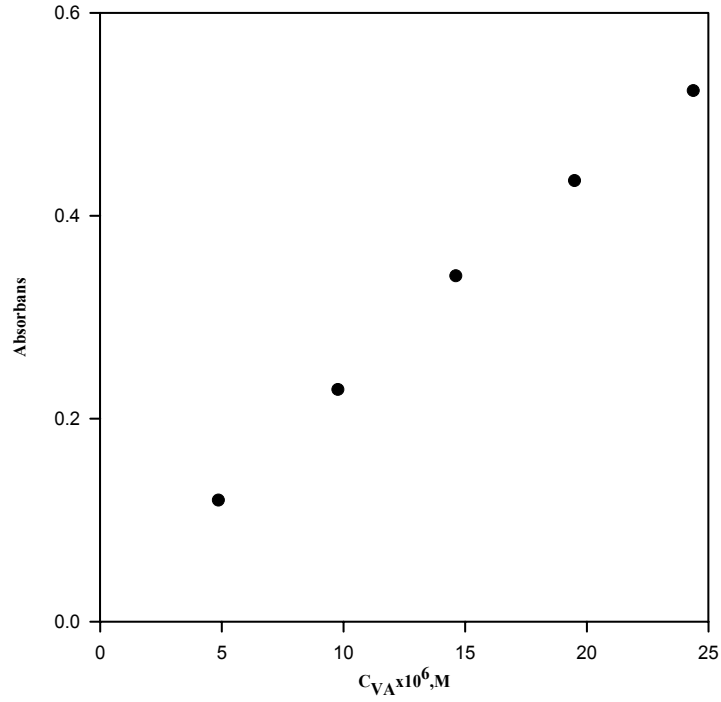
Şekil 4.10: Ferulik asid (FRA) varlığında Cu(I)-Nc kelatininin görünür bölge spektrumu

4.1.2.6. Vanilik Asid (VA)

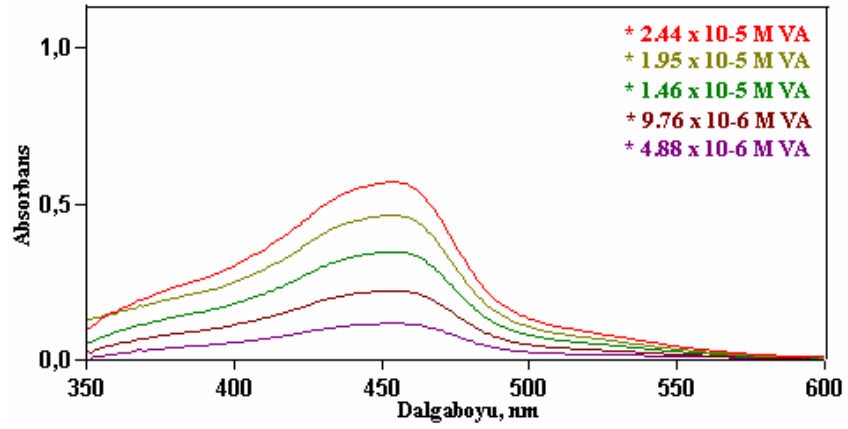
Tablo 4.6: Vanilik Asidin (VA) hacim-konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi

Hacim (μL)	Konsantrasyon (M)	Absorbans
20	4.88×10^{-6}	0.1192
40	9.76×10^{-6}	0.2282
60	1.46×10^{-5}	0.3403
80	1.95×10^{-5}	0.4342
100	2.44×10^{-5}	0.5229

Doğru denklemi : $y = 20766 x + 0.02$ $r = 0.9987$



Şekil 4.11: Vanilik asidin (VA) kalibrasyon eğrisi



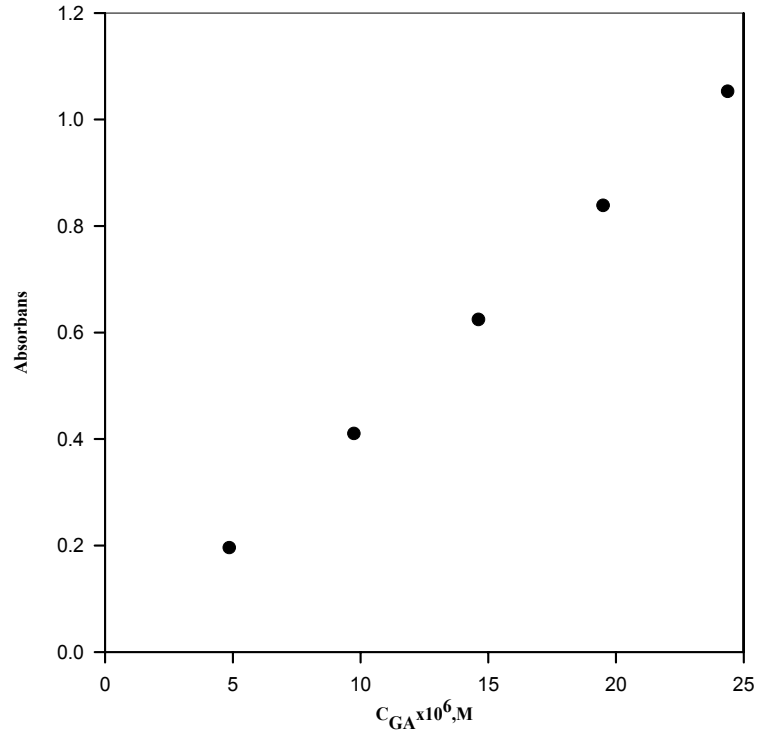
Şekil 4.12: Vanilik asid (VA) varlığında Cu(I)-Nc kelatının gorunr bölge spektrumu

4.1.2.7. Gallik Asid (GA)

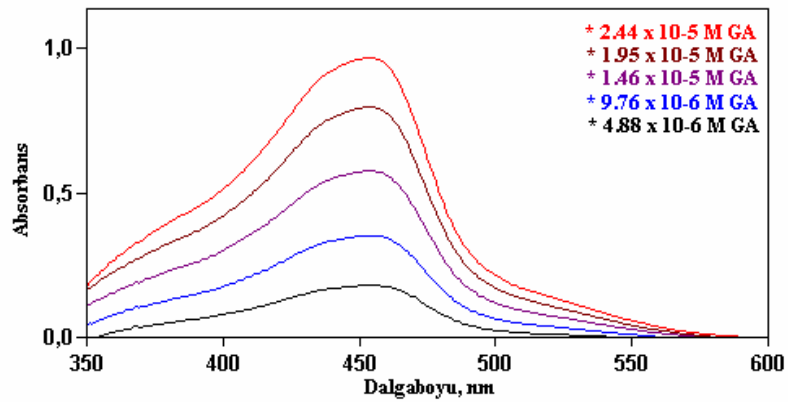
Tablo 4.7: Gallik Asidin (GA) hacim-konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi

Hacim (μL)	Konsantrasyon (M)	Absorbans
20	4.88×10^{-6}	0.1952
40	9.76×10^{-6}	0.4094
60	1.46×10^{-5}	0.6237
80	1.95×10^{-5}	0.8379
100	2.44×10^{-5}	1.0520

Doğru denklemi : $y = 43895 x - 0.019$ $r = 0.9999$



Şekil 4.13: Gallik asidin (GA) kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.14: Gallik asid (GA) varlığında Cu(I)-Nc kelatinin görünür bölge spektrumu

4.1.3. Antioksidanların Molar Absorblama Katsayıları Ve Lineer Aralıklarının Belirlenmesi

Antioksidan bileşiklerin molar absorplama katsayıları (ϵ) CUPRAC metoduna göre molar konsantrasyon-absorbans arasındaki kalibrasyon eğrilerinin eğimleri hesaplanarak elde edildi. Normal, inkübasyonlu, hidrolizli ve hidroliz & inkübasyonlu metodlar uygulanıp her biri için ϵ değerleri hesaplandı. Doğru denklemleri elde edilip lineer oldukları konsantrasyon aralıkları tespit edildi (Tablo 4.8).

Tablo 4.8: Çeşitli antioksidanların CUPRAC metoduyla elde edilen molar absorptivite ve lineer aralıkları.

Antioksidan İsmi	$\epsilon, L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$				Lineer Aralık, M
	ϵ_N	ϵ_I	ϵ_H	$\epsilon_{H\&I}$	
Troloks (TR)	1.67×10^4	1.86×10^4	1.64×10^4	1.71×10^4	$3.2 \times 10^{-6} - 8.4 \times 10^{-5}$ ($2.6 \times 10^{-6} - 7.5 \times 10^{-5}$)
Kuersetin (QR)	7.33×10^4				$5.19 \times 10^{-7} - 1.9 \times 10^{-5}$
Kateşin (CT)	5.16×10^4	6.60×10^4	5.14×10^4	6.49×10^4	$3.2 \times 10^{-7} - 2.5 \times 10^{-5}$ ($3.5 \times 10^{-8} - 1.9 \times 10^{-5}$)
Rutin (RT)	4.27×10^4	4.77×10^4	4.16×10^4	7.06×10^4	$1.16 \times 10^{-7} - 3.16 \times 10^{-5}$ ($7.78 \times 10^{-7} - 2.80 \times 10^{-5}$)
Gallik asid (GA)	4.39×10^4				$1.57 \times 10^{-6} - 3.23 \times 10^{-5}$
Fisetin (FS)	6.50×10^4	7.78×10^4			$7.02 \times 10^{-7} - 2.15 \times 10^{-5}$ ($4.50 \times 10^{-7} - 1.70 \times 10^{-5}$)
Naringin (N)	3.40×10^2	2.17×10^3	3.41×10^2	2.20×10^3	$1.47 \times 10^{-4} - 3.98 \times 10^{-3}$ ($4.60 \times 10^{-6} - 5.94 \times 10^{-4}$)
Naringenin (NG)		4.23×10^4		5.63×10^4	($8.29 \times 10^{-7} - 3.28 \times 10^{-5}$)
Askorbik asid (AA)	1.59×10^4				$5.6 \times 10^{-6} - 8.5 \times 10^{-5}$
Ferulik asid (FRA)	2.00×10^4	2.28×10^4	1.97×10^4	2.42×10^4	$2.46 \times 10^{-6} - 6.74 \times 10^{-5}$ ($2.29 \times 10^{-6} - 5.94 \times 10^{-5}$)
p-Kumarik asid (CMA)	9.20×10^3	1.85×10^4	8.88×10^3	2.14×10^4	$4.63 \times 10^{-6} - 1.51 \times 10^{-4}$ ($2.90 \times 10^{-6} - 7.60 \times 10^{-5}$)
Kaffeik asid (CFA)	4.83×10^4	5.51×10^4	4.80×10^4	5.98×10^4	$1.24 \times 10^{-6} - 2.81 \times 10^{-5}$ ($1.42 \times 10^{-6} - 2.50 \times 10^{-5}$)
Klorojenik asid (CGA)	4.13×10^4	5.05×10^4	2.01×10^4	2.64×10^4	$2.13 \times 10^{-6} - 3.48 \times 10^{-5}$ ($5.35 \times 10^{-7} - 2.73 \times 10^{-5}$)
α -tokoferol (TP)	1.83×10^4	1.91×10^4	1.65×10^4	1.61×10^4	$6.13 \times 10^{-6} - 7.73 \times 10^{-5}$ ($2.6 \times 10^{-6} - 7.00 \times 10^{-5}$)
Epikateşin (EC)	4.63×10^4	5.37×10^4			$1.51 \times 10^{-7} - 2.80 \times 10^{-5}$ ($1.86 \times 10^{-7} - 2.35 \times 10^{-5}$)
Epikateşin gallat (ECG)	8.88×10^4	1.05×10^5			$9.34 \times 10^{-7} - 1.50 \times 10^{-5}$ ($2.82 \times 10^{-7} - 1.21 \times 10^{-5}$)
Epigallokateşin (EGC)	5.59×10^4	6.68×10^4			$7.64 \times 10^{-7} - 2.40 \times 10^{-5}$ ($2.10 \times 10^{-7} - 1.97 \times 10^{-5}$)
Epigallokateşin gallat (EGCG)	8.17×10^4	1.02×10^5			$5.25 \times 10^{-7} - 1.58 \times 10^{-5}$ ($4.16 \times 10^{-7} - 1.27 \times 10^{-5}$)
Hesperidin (HD)	1.62×10^4	2.07×10^4	1.31×10^4	1.76×10^4	$2.53 \times 10^{-6} - 8.59 \times 10^{-5}$ ($2.01 \times 10^{-6} - 6.72 \times 10^{-5}$)

Antioksidan İsmi	$\epsilon, \text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$				Lineer Aralık, M
	ϵ_N	ϵ_I	ϵ_H	$\epsilon_{H\&I}$	
Hesperetin (HT)	1.65×10^4	1.96×10^4	1.42×10^4	1.82×10^4	$3.31 \times 10^{-6} - 8.52 \times 10^{-5}$ ($1.73 \times 10^{-6} - 7.06 \times 10^{-5}$)
Morin (MR)	3.15×10^4	6.17×10^4			$7.30 \times 10^{-7} - 4.36 \times 10^{-5}$ ($3.73 \times 10^{-7} - 2.23 \times 10^{-5}$)
Şiringik asid (SA)	1.88×10^4	3.04×10^4	1.89×10^4	3.10×10^4	$3.37 \times 10^{-5} - 9.47 \times 10^{-5}$ ($2.31 \times 10^{-5} - 6.43 \times 10^{-5}$)
Vanilik asid (VA)	2.08×10^4	2.83×10^4	2.20×10^4	2.91×10^4	$3.25 \times 10^{-6} - 7.17 \times 10^{-5}$ ($1.98 \times 10^{-5} - 5.69 \times 10^{-5}$)

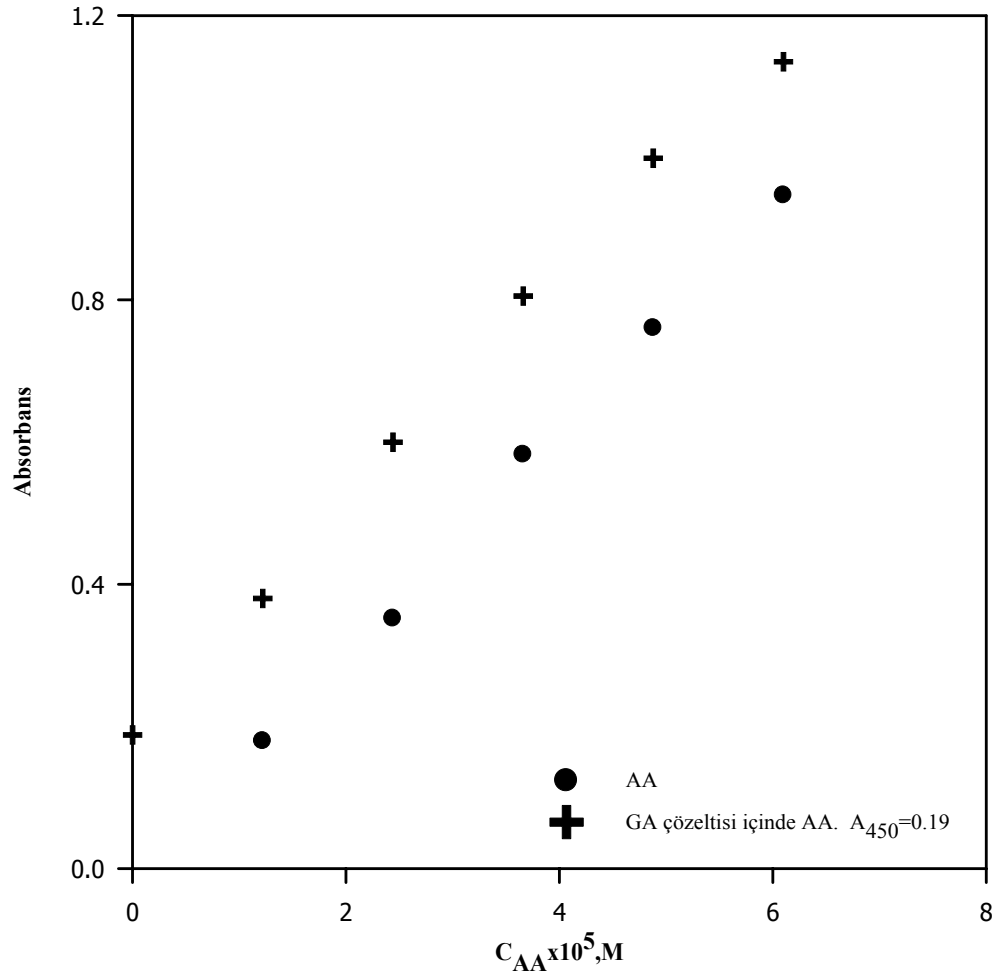
Tablo 4.9: Çeşitli antioksidanların CUPRAC, ABTS ve FOLIN metodlarına göre TEAC değerleri

Antioksidan ismi	TEAC _{CUPRAC}				TEAC _{ABTS}		TEAC _{FOLIN}
	TEAC _N	TEAC _I	TEAC _H	TEAC _{H&I}	TEAC _{1dak}	TEAC _{6dak}	
Kuersetin (QR)	4.38				2.75	2.77	5.17
Kateşin (CT)	3.09	3.56	3.08	3.49	3.05	3.14	4.09
Rutin (RT)	2.56			3.80	1.00	1.15	6.75
Gallik asit (GA)	2.62				3.65	3.48	1.23
Fisetin (FS)	3.90	4.18			2.59	2.62	3.90
Naringin (N)	0.02	0.13			0.50	0.62	1.12
Naringenin (NG)		2.28		3.03	0.56	0.64	5.52
Askorbik asid (AA)	0.96				1.02	1.03	
Ferulik asid (FRA)	1.20	1.23	1.18	1.34	2.01	2.16	3.49
p-Kumarik asid (CMA)	0.55	1.00	0.53	1.15	1.75	1.63	2.54
Kaffeik asid (CFA)	2.89	2.96	2.87	3.22	1.33	1.39	3.27
Klorojenik asid (CGA)	2.47	2.72	1.20	1.42	1.22	1.21	2.84
α -tokoferol (TP)	1.10	1.02	0.99	0.87	1.00	1.02	
Epikateşin (EC)	2.77	2.89			2.98	2.69	3.22
Epikateşin gallat (ECG)	5.32	5.65			2.95	3.51	4.35
Epigallokateşin (EGC)	3.35	3.60					
Epigallokateşin gallat (EGCG)	4.89	5.49			2.72	3.15	2.78
Hesperidin (HD)	0.97	1.11	0.79	0.95	1.05	1.40	3.29
Hesperetin (HT)	0.99	1.05	0.85	0.98	1.01	1.11	4.50
Morin (MR)	1.88	3.32			1.28	1.79	3.37
Şiringik asid (SA)	1.12	1.64	1.13	1.67	1.38	1.50	2.49
Vanilik asid (VA)	1.24	1.52	1.32	1.57	1.03	1.25	3.05

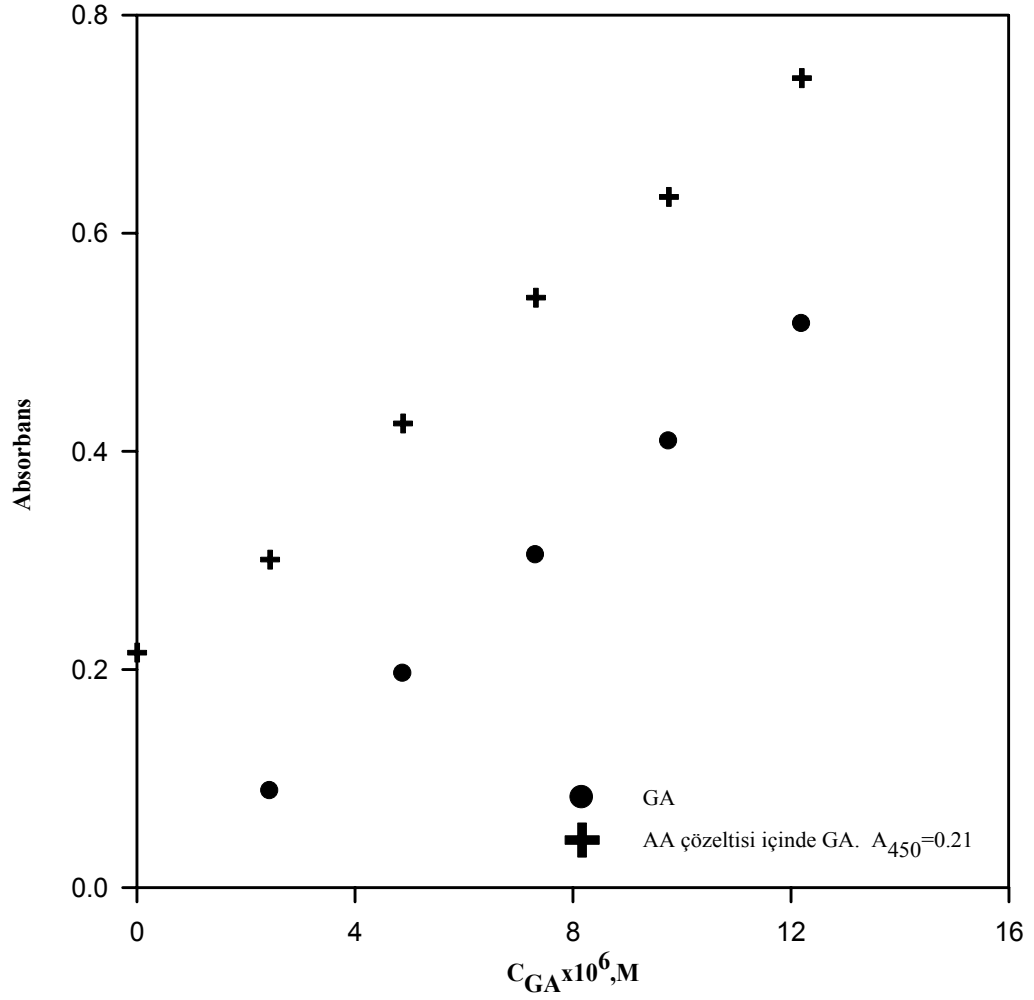
4.1.4. İkili Ve Üçlü Sentetik Karışımların Elde Edilmesi

4.1.4.1. Askorbik Asid (AA) – Gallik Asit (GA) İkili Sentetik Karışımının Kalibrasyon Eğrisi (Komponentlerden birinin sabit miktarları üzerine diğerinin değişen miktarlarının katılması)

İkili sentetik karışımlarda standart katkı yöntemi uygulanarak ilk olarak başlangıç absorbansı 0.19 olan gallik asid çözeltisi üzerine değişen konsantrasyonlarda askorbik asid çözeltisi ilave edildi, sonra başlangıç absorbansı 0.21 olan askorbik asid çözeltisi üzerine değişen konsantrasyonlarda gallik asid çözeltisi ilave edildi. Sonuç olarak, iki antioksidan bileşiğin elde edilen standart katkı grafiklerinden birbirleriyle Beer kanunundan kimyasal sapmaya yol açacak bir etkileşime girmedikleri görüldü.



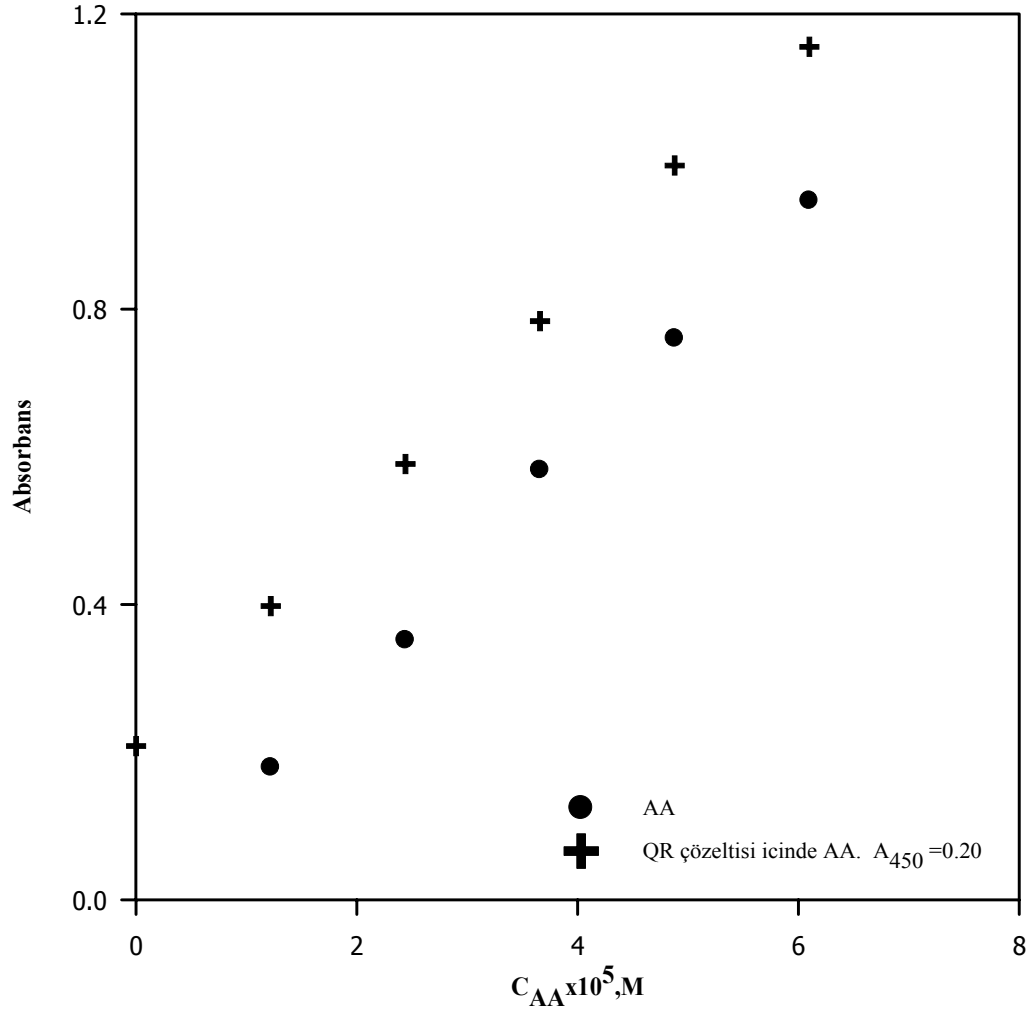
Şekil 4.15: Askorbik asidin (AA) gallik asid (GA) çözeltisi içindeki kalibrasyon eğrisi



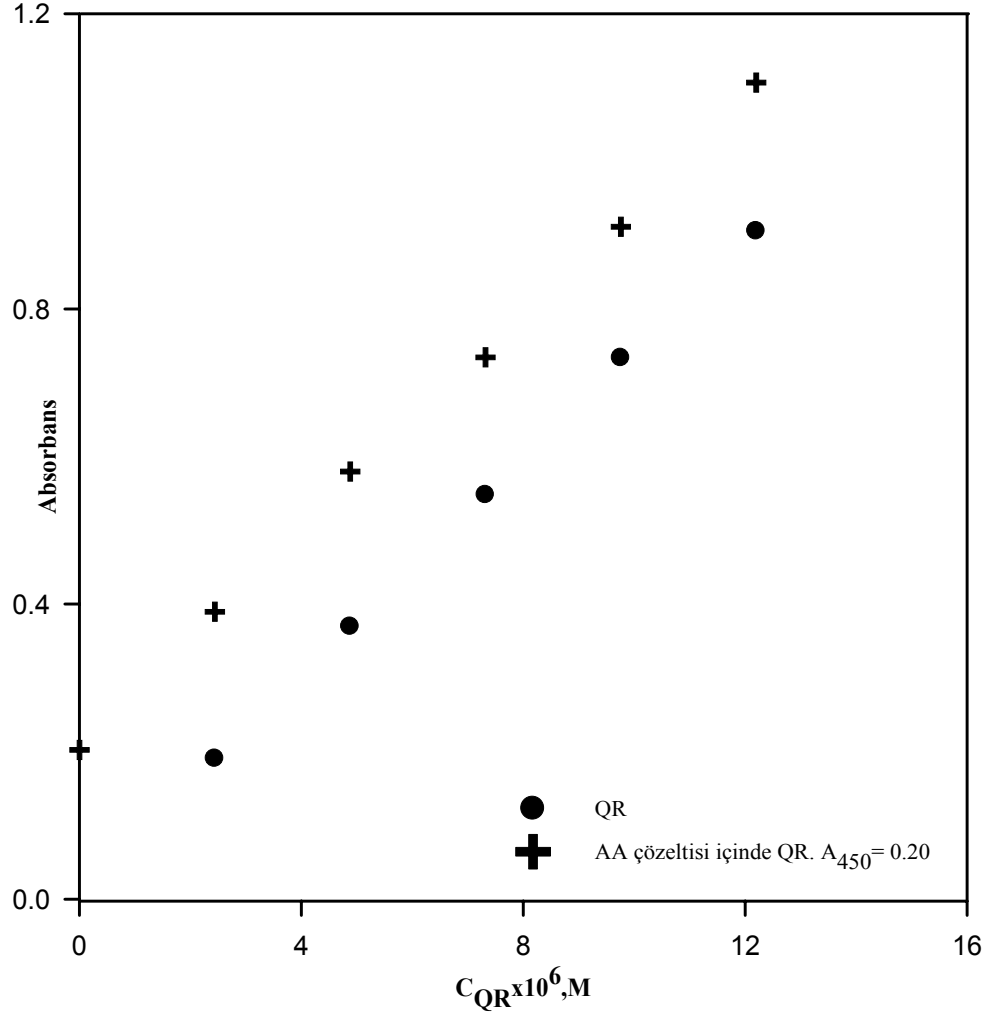
Şekil 4.16: Gallik asidin (GA) askorbik asit (AA) çözeltisi içinde kalibrasyon eğrisi

4.1.4.2. Askorbik Asit (AA) – Kuersetin (QR) İkili Sentetik Karışımının Kalibrasyon Eğrisi

Askorbik asidin kuersetin çözeltisi içine standart katkı yöntemi kullanılarak ilave edilmesi, başlangıç absorbansı 0.21 olan kuersetin çözeltisi içine askorbik asidin değişen konsantrasyonlarda ilave edilmesi ve başlangıç absorbansı olan askorbik asit çözeltisi içine kuersetinin değişen konsantrasyonlarda ilave edilmesi sonucu elde edilen kalibrasyon eğrilerinden iki antioksidan bileşik arasında Beer kanunundan sapmaya yol açan bir etkileşimin olmadığı sonucu çıkmaktadır (Şekil 4.17 – Şekil 4.18).



Şekil 4.17: Askorbik asidin (AA) kuersetin (QR) çözeltisi içindeki kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.18: Kuersetinin (QR) askorbik asid (AA) çözeltisi içindeki kalibrasyon eğrisi

4.1.4.3. Üçlü Sentetik Karışımların Beklenen ve Ölçülen TEAC Değerlerinin Eldesi

Konsantrasyonları 1 mM olan etenollü antioksidan bileşikler için farklı kombinasyonlarda üçlü karışımlar oluşturulup CUPRAC metoduna göre mM troloks (TR) cinsinden beklenen ve ölçülen antioksidan kapasiteleri 3.1 ve 3.2. denklemleri kullanılarak hesaplandı ve değerler birbiriyle karşılaştırıldı (Tablo 4.10).

Tablo 4.10: Sentetik karışım çözeltilerinin CUPRAC yöntemine göre mM troloks (TR) cinsinden beklenen ve ölçülen antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması

Metod	Karışımın İçeriği	Beklenen kapasite* (mM TR-eşdeğeri)	DeneySEL olarak bulunan kapasite (mM TR-eşdeğeri)
Normal metod	10 µL 1 mM QR 10 µL 1 mM CT 10 µL 1 mM RT	2,45x10 ⁻²	2,55x10 ⁻²
İnkübasyonlu metod	10 µL 1 mM QR 10 µL 1 mM CT 10 µL 1 mM RT	2,56x10 ⁻²	2,97x10 ⁻²
Normal metod	30 µL 1 mM GA 20 µL 1 mM CFA 50 µL 1 mM CMA	3,99x10 ⁻²	3,96x10 ⁻²
İnkübasyonlu metod	30 µL of 1 mM GA 20 µL of 1 mM CFA 50 µL of 1 mM CMA	4,58x10 ⁻²	4,25x10 ⁻²
Normal metod	20 µL of 1 mM GA 20 µL of 1 mM FRA 20 µL of 1 mM CFA	3,27x10 ⁻²	3,09x10 ⁻²
İnkübasyonlu metod	20 µL of 1 mM GA 20 µL of 1 mM FRA 20 µL of 1 mM CFA	3,32x10 ⁻²	3,11x10 ⁻²
Normal metod	20 µL of 1 mM FRA 50 µL of 1 mM CMA 20 µL of 1 mM CFA	2,66x10 ⁻²	2,62x10 ⁻²
İnkübasyonlu metod	20 µL of 1 mM FRA 50 µL of 1 mM CMA 20 µL of 1 mM CFA	3,26x10 ⁻²	3,10x10 ⁻²
Normal metod	20 µL of 1 mM FRA 50 µL of 1 mM CMA 20 µL of 1 mM GA	2,53x10 ⁻²	2,45x10 ⁻²
İnkübasyonlu metod	20 µL of 1 mM FRA 50 µL of 1 mM CMA 20 µL of 1 mM GA	3,09x10 ⁻²	3,21x10 ⁻²
Normal metod	10 µL of 1 mM QR 10 µL of 1 mM CT 50 µL of 1 mM TR	3,04x10 ⁻²	3,08x10 ⁻²
İnkübasyonlu metod	10 µL of 1 mM QR 10 µL of 1 mM CT 50 µL of 1 mM TR	3,15x10 ⁻²	3,09x10 ⁻²

Metod	Karışımın İçeriği	Beklenen kapasite* (mM TR-eşdeğeri)	Deneysel olarak bulunan kapasite (mM TR-eşdeğeri)
Normal metod	10 µL of 1 mM QR 10 µL of 1 mM RT 50 µL of 1 mM TR	2,91x10 ⁻²	3,02x10 ⁻²
İnkübasyonlu metod	10 µL of 1 mM QR 10 µL of 1 mM RT 50 µL of 1 mM TR	2,91x10 ⁻²	3,07x10 ⁻²
Normal metod	10 µL of 1 mM QR 10 µL of 1 mM RT 60 µL of 1 mM AA	3,1x10 ⁻²	3,25x10 ⁻²
Normal metod	10 µL of 1 mM RT 20 µL of 1 mM CT 50 µL of 1 mM TR	3,35x10 ⁻²	3,48x10 ⁻²
İnkübasyonlu metod	10 µL of 1 mM RT 20 µL of 1 mM CT 50 µL of 1 mM TR	3,58x10 ⁻²	3,38x10 ⁻²
Normal metod	10 µL of 1 mM RT 20 µL of 1 mM CT 60 µL of 1 mM AA	3,54x10 ⁻²	3,42x10 ⁻²
Normal metod	20 µL of 1 mM FRA 50 µL of 1 mM CMA 50 µL of 1 mM TR	2,46x10 ⁻²	2,43x10 ⁻²
İnkübasyonlu metod	20 µL of 1 mM FRA 50 µL of 1 mM CMA 50 µL of 1 mM TR	3,04x10 ⁻²	2,85x10 ⁻²
Normal metod	20 µL of 1 mM FRA 20 µL of 1 mM CFA 50 µL of 1 mM TR	3,21x10 ⁻²	3,21x10 ⁻²
İnkübasyonlu metod	20 µL of 1 mM FRA 20 µL of 1 mM CFA 50 µL of 1 mM TR	3,26x10 ⁻²	3,28x10 ⁻²
Normal metod	50 µL of 1 mM CMA 20 µL of 1 mM CFA 50 µL of 1 mM TR	3,3x10 ⁻²	3,43x10 ⁻²
İnkübasyonlu metod	50 µL of 1 mM CMA 20 µL of 1 mM CFA 50 µL of 1 mM TR	3,8x10 ⁻²	3,7x10 ⁻²
Normal metod	20 µL of 1 mM FRA 50 µL of 1 mM CMA 60 µL of 1 mM AA	2,64x10 ⁻²	2,46x10 ⁻²

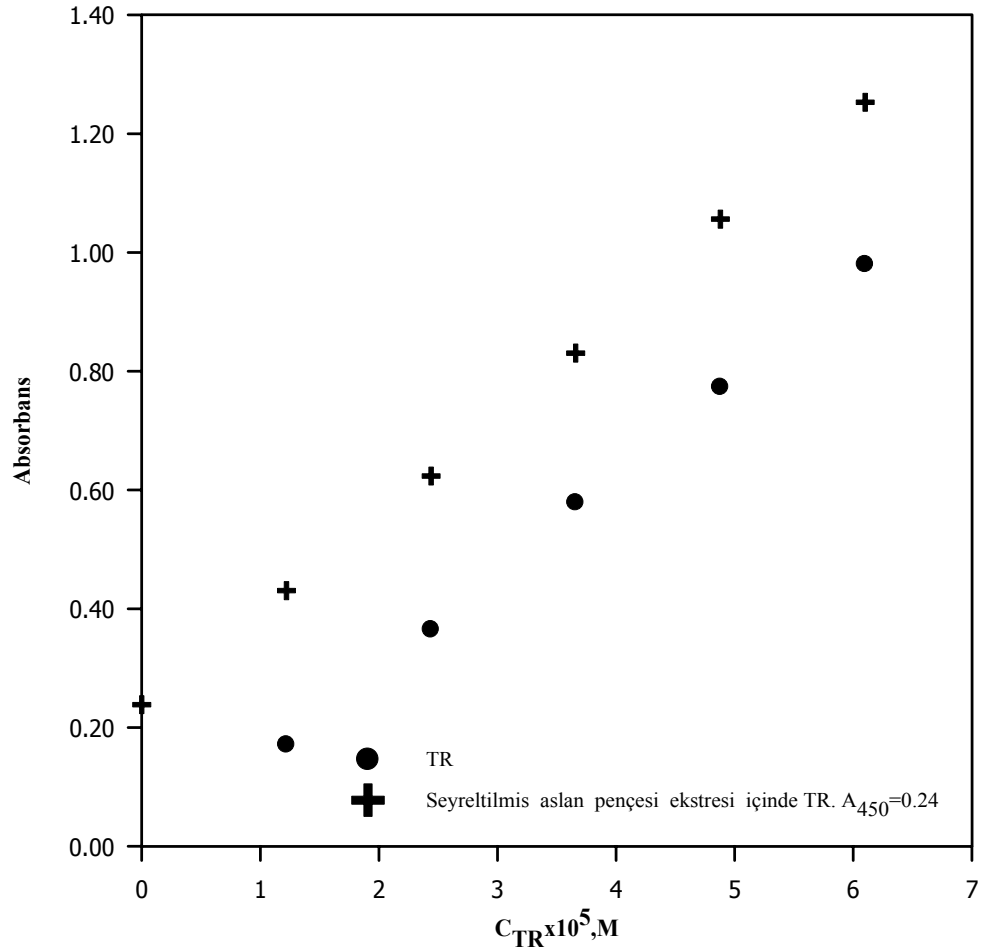
Metod	Karışımın İçeriği	Beklenen kapasite* (mM TR-eşdeğeri)	Deneyssel olarak bulunan kapasite (mM TR-eşdeğeri)
Normal metod	20 µL of 1 mM CFA 50 µL of 1 mM CMA 60 µL of 1 mM AA	3,46x10 ⁻²	3,22x10 ⁻²
İnkübasyonlu metod	50 µL of 1 mM TR 0.4 mL of 1 mM N 20 µL of 1 mM NG	3,5x10 ⁻²	3,77x10 ⁻²
İnkübasyonlu metod	10 µL of 1 mM QR 0.4 mL of 1 mM N 20 µL of 1 mM NG	3,35x10 ⁻²	3,5x10 ⁻²
İnkübasyonlu metod	0.4 mL of 1 mM N 20 µL of 1 mM NG 20 µL of 1 mM GA	3,56x10 ⁻²	3,72x10 ⁻²
Normal metod	50 µL of 1 mM TP 10 µL of 1 mM QR 50 µL of 1 mM TR	3,63x10 ⁻²	3,48x10 ⁻²
İnkübasyonlu metod	50 µL of 1 mM TP 10 µL of 1 mM QR 50 µL of 1 mM TR	3,52x10 ⁻²	3,47x10 ⁻²
Normal metod	50 µL of 1 mM TP 10 µL of 1 mM QR 60 µL of 1 mM AA	3,79x10 ⁻²	3,59x10 ⁻²
Normal metod	20 µL of 1 mM TP 20 µL of 1 mM GA 60 µL of 1 mM AA	4x10 ⁻²	3,71x10 ⁻²
Normal metod	50 µL of 1 mM TP 20 µL of 1 mM GA 10 µL of 1 mM QR	3,7x10 ⁻²	3,57x10 ⁻²
İnkübasyonlu metod	50 µL of 1 mM TP 20 µL of 1 mM GA 10 µL of 1 mM QR	3,59x10 ⁻²	3,43x10 ⁻²
Normal metod	20 µL of 1 mM FRA 50 µL of 1 mM TP 20 µL of 1 mM CFA	3,34x10 ⁻²	3,2x10 ⁻²
İnkübasyonlu metod	20 µL of 1 mM FRA 50 µL of 1 mM TP 20 µL of 1 mM CFA	3,29x10 ⁻²	3,13x10 ⁻²

*Kapasite_{karışım} = TEAC₁. C₁ + TEAC₂.C₂ + TEAC₃.C₃

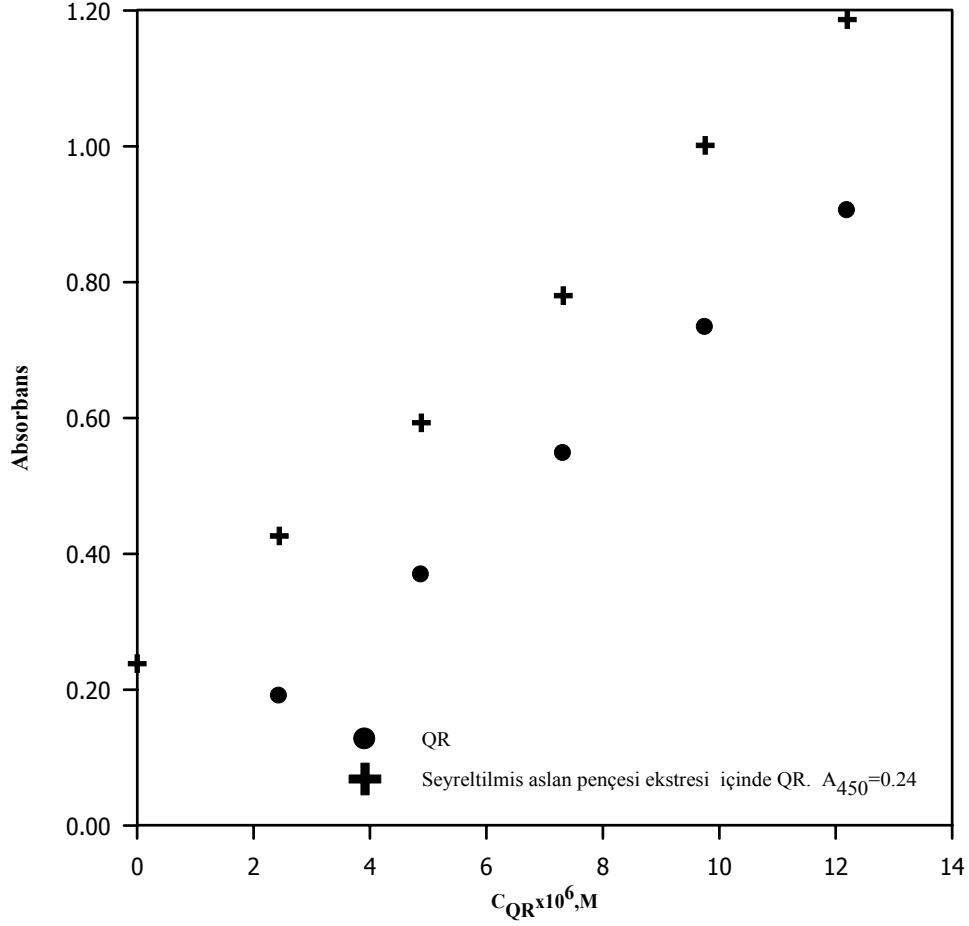
4.1.5. Şifalı Bitki Ekstrelerine Standart Katkı Yönteminin Uygulanması

4.1.5.1. Aslan Pençesi (*Anagallis Arvensis*) Ekstresine Troloks ve Kuersetin Standart Katkı Yönteminin Uygulanması

1:20 oranında su ile seyreltilen Aslan pençesi (*Anagallis Arvensis*) bitkisinin ekstresine troloks ve kuersetin standart katkı yöntemi uygulandı. Bunun için 0.1 mL seyreltik Aslan pençesi ekstresi üzerine (başlangıç absorbansı 0.24 olan) farklı hacimlerde 10^{-3} M troloks (TR) ve kuersetin (QR) ilave edilerek CUPRAC metodu uygulandı. Çalışma doğrularının paralellüğünden herhangi bir etkileşimin olmadığı gözlemlendi.



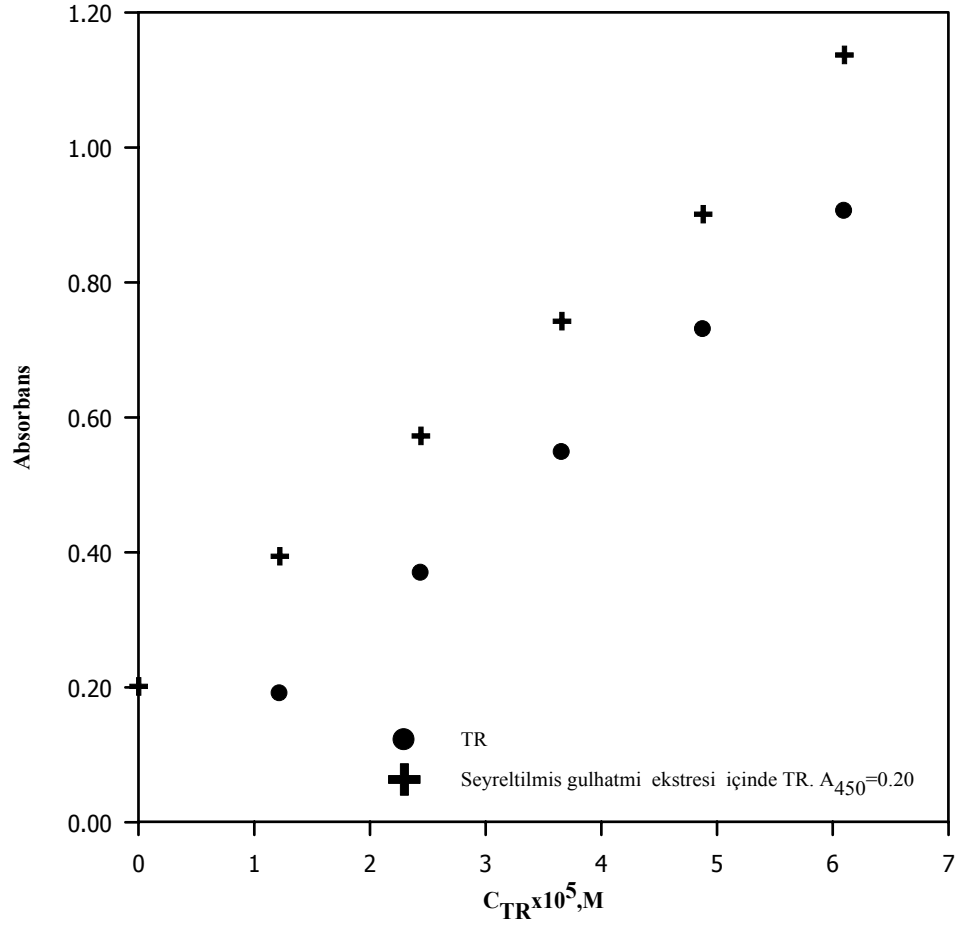
Şekil 4.19: Seyreltilmiş aslan pençesi ekstresi içinde troloksun (TR) kalibrasyon eğrisi



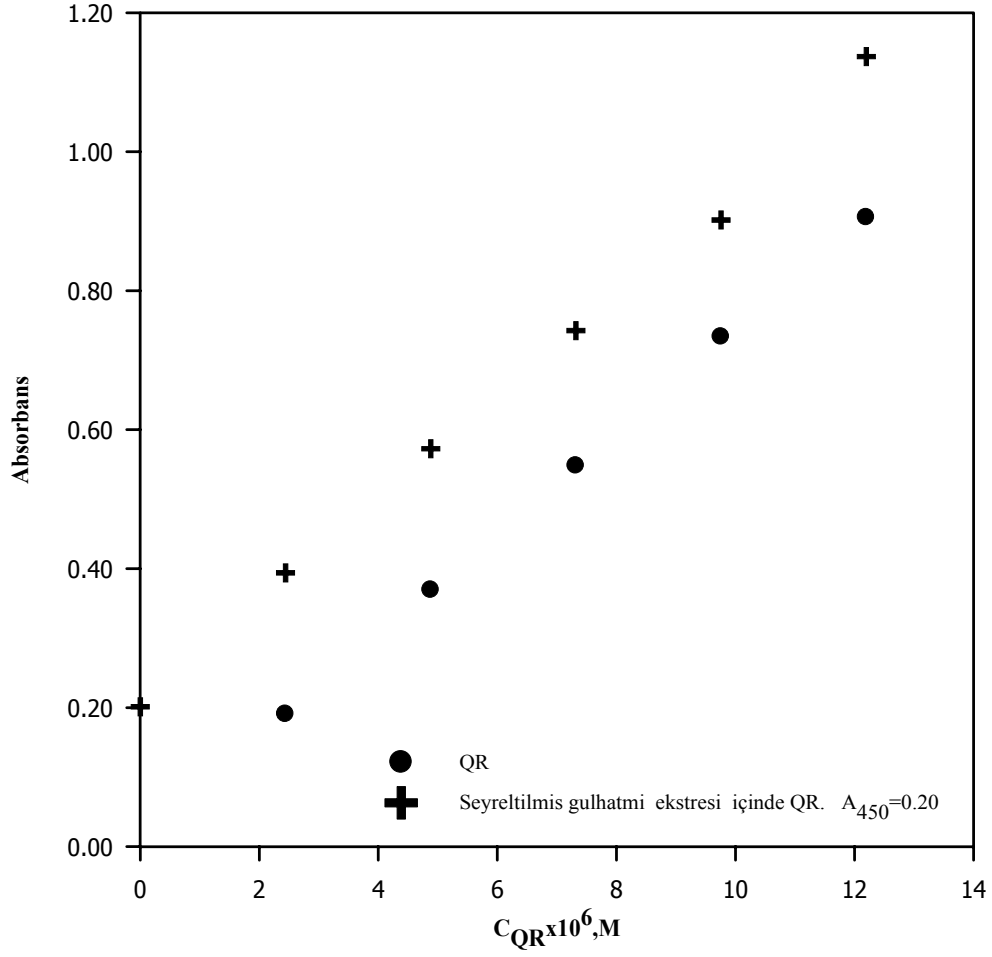
Şekil 4.20: Seyreltilmiş aslan pençesi ekstresi içinde kuersetinin (QR) kalibrasyon eğrisi

4.1.5.2. Gülhatmi (*Althaea Officinalis*) Ekstresine Troloks ve Kuersetin Standart Katkı Yönteminin Uygulanması

1:2 oranında su ile seyreltilen Gülhatmi (*Althaea Officinalis*) bitkisinin ekstresine troloks ve kuersetin standart katkı yöntemi uygulandı. Bunun için 0.2 mL seyreltik gülhatmi ekstresi üzerine (başlangıç absorbansı 0.20 olan) farklı hacimlerde 10^{-3} M troloks (TR) ve kuersetin (QR) ilave edilerek CUPRAC metodu uygulandı. Herhangi bir kimyasal etkileşimin olmadığı gözlemlendi.



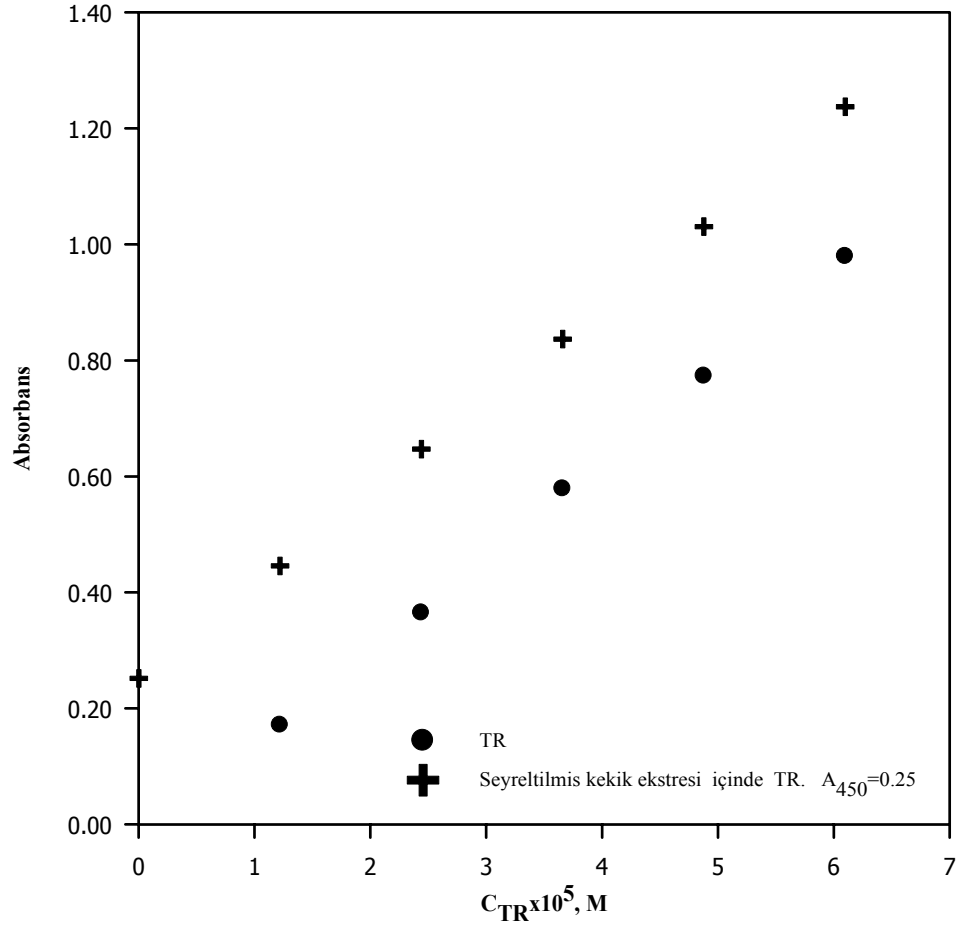
Şekil 4.21: Seyreltilmiş gülhatmi ekstresi içinde troloksun (TR) kalibrasyon eğrisi



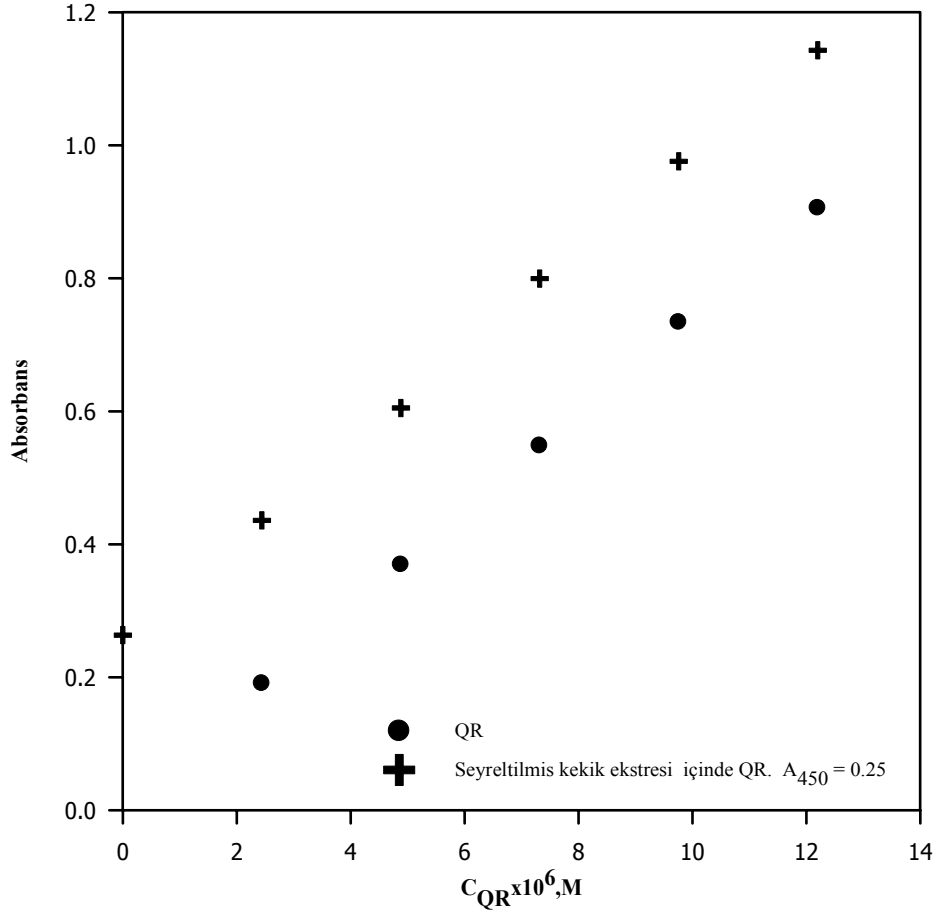
Şekil 4.22: Seyreltilmiş gülhatmi ekstresi içinde kuersetinin (QR) kalibrasyon eğrisi

4.1.5.3. Kekik (*Thymus Vulgaris*) Ekstresine Troloks ve Kuersetin Standart Katkı Yönteminin Uygulanması

1:10 oranında su ile seyreltilen Kekik (*Thymus Vulgaris*) bitkisinin ekstresine troloks ve kuersetin standart katkı yöntemi uygulandı. Bunun için 0.2 mL seyreltik kekik ekstresi üzerine (başlangıç absorbansı 0.25 olan) farklı hacimlerde 10^{-3} M troloks (TR) ve kuersetin (QR) ilave edilerek CUPRAC metodu uygulandı. Herhangi bir kimyasal etkileşimin olmadığı gözlemlendi.



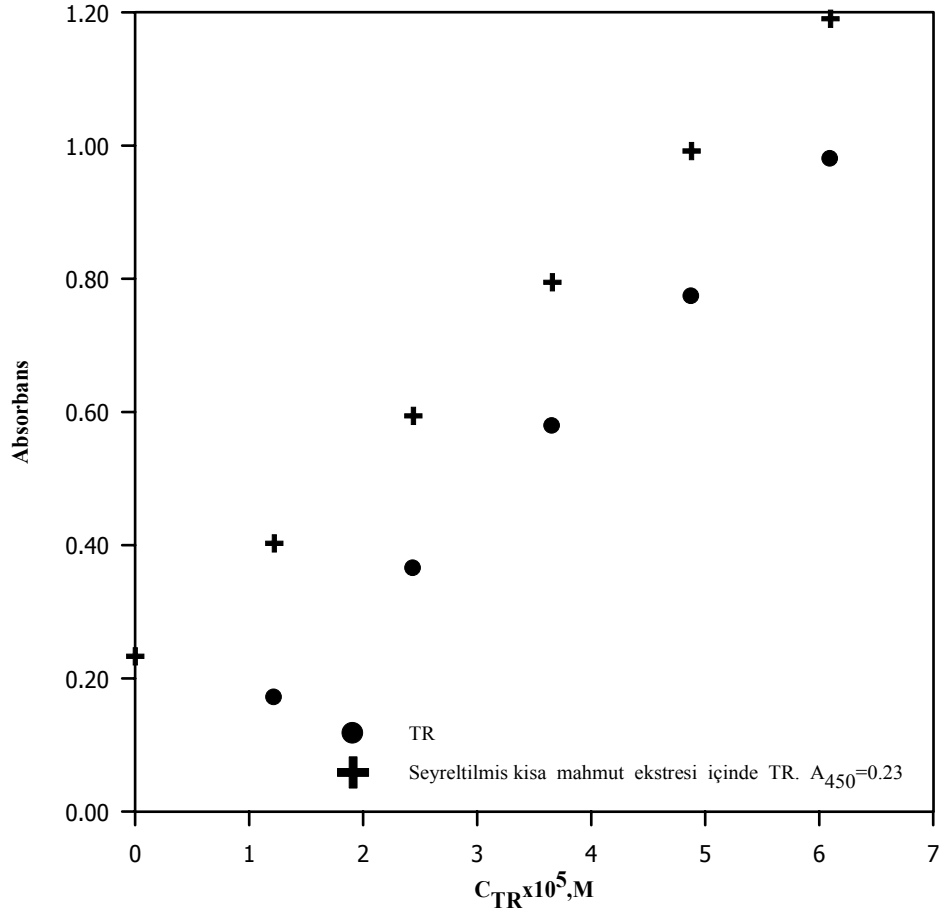
Şekil 4.23: Seyreltilmiş kekik ekstresi içinde troloksun (TR) kalibrasyon eğrisi



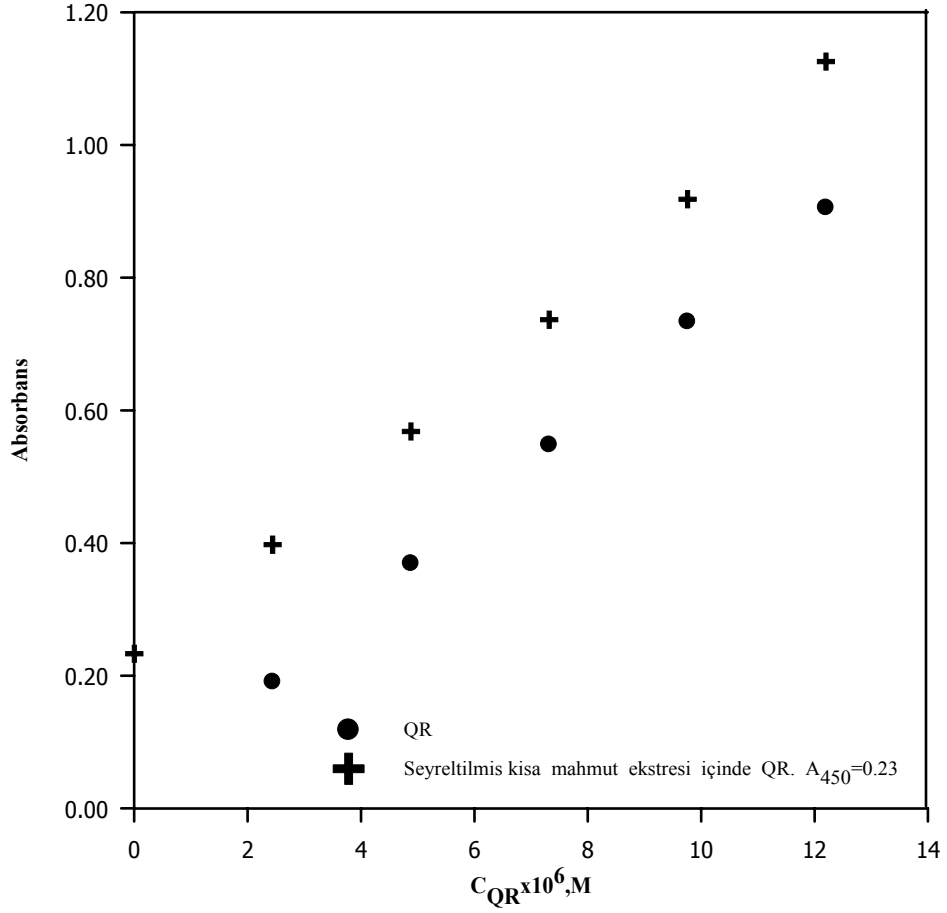
Şekil 4.24: Seyreltilmiş kekik ekstresi içinde kuersetinin (QR) kalibrasyon eğrisi

4.1.5.4. Kısa Mahmut (*Teucrium Chamaedrys*) Ekstresine Troloks ve Kuersetin Standart Katkı Yönteminin Uygulanması

1:8 oranında su ile seyreltilen Kısa Mahmut (*Teucrium Chamaedrys*) bitkisinin ekstresine troloks ve kuersetin standart katkı yöntemi uygulandı. Bunun için 0.2 mL seyreltik kısa mahmut ekstresi üzerine (başlangıç absorbansı 0.23 olan) farklı hacimlerde 10^{-3} M troloks (TR) ve kuersetin (QR) ilave edilerek CUPRAC metodu uygulandı. Herhangi bir kimyasal etkileşimin olmadığı gözlemlendi.



Şekil 4.25: Seyreltilmiş kısa mahmut ekstresi içinde trolüksun (TR) kalibrasyon eğrisi



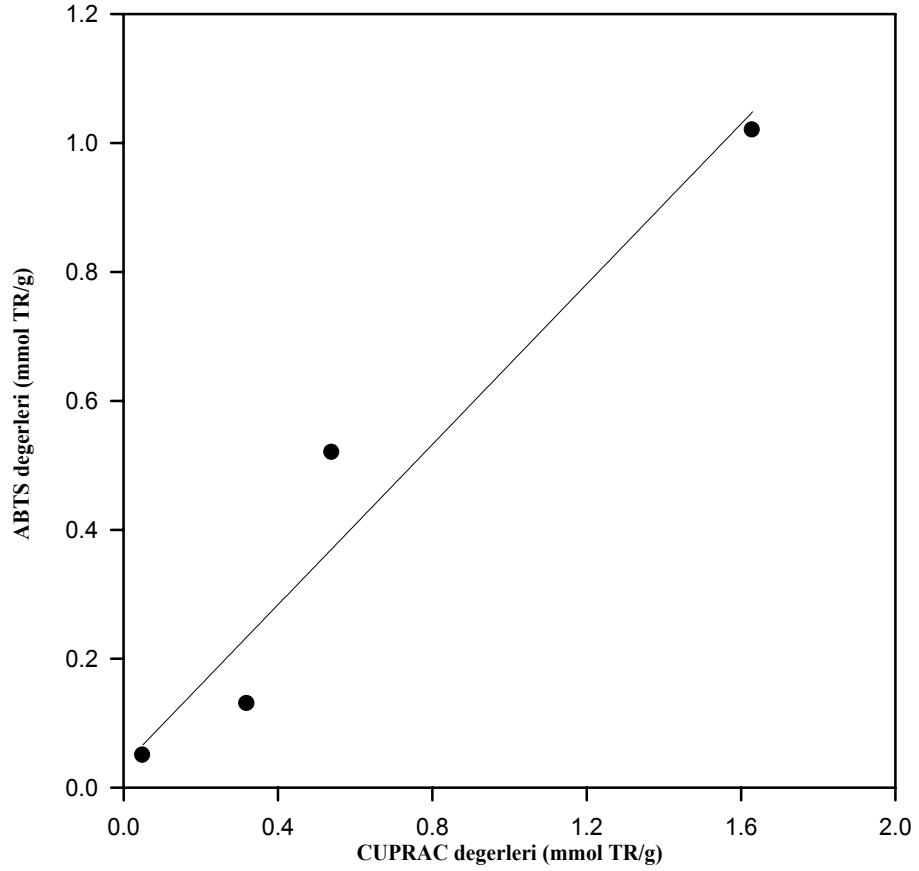
Şekil 4.26: Seyreltilmiş kısa mahmut ekstresi içinde kuersetinin (QR) kalibrasyon eğrisi

4.1.6. Şifalı Bitki Ekstrelerine CUPRAC, ABTS ve FOLİN Yöntemlerinin Uygulanması

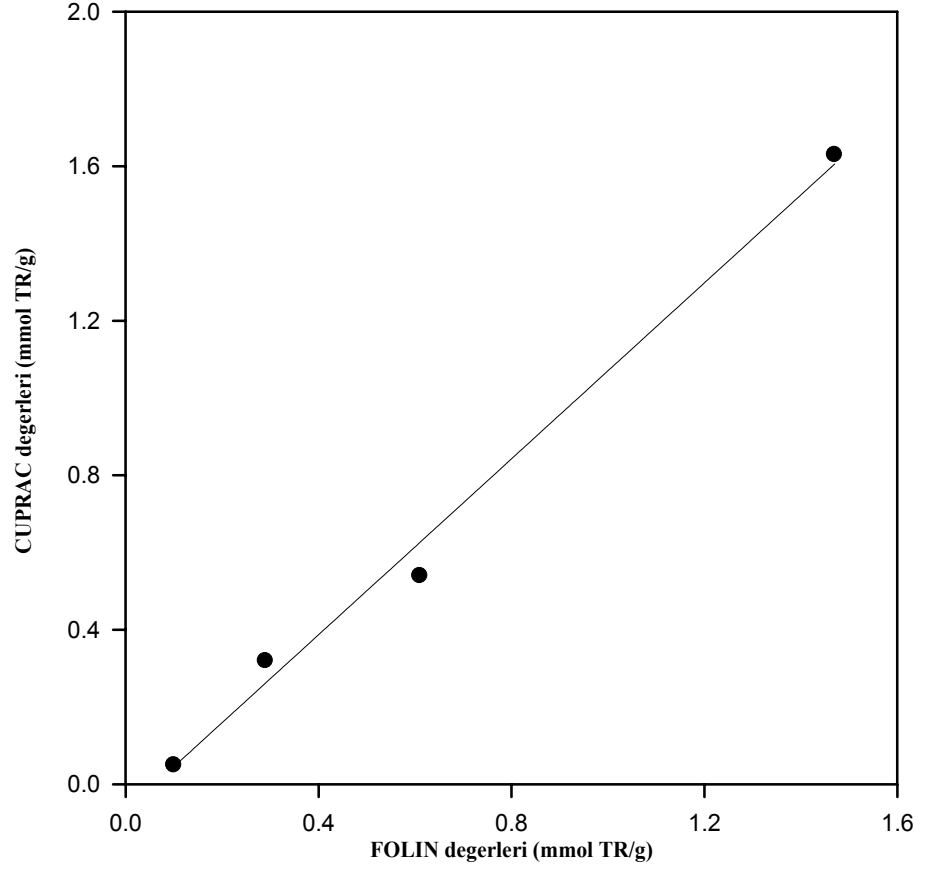
Şifalı bitki ekstrelerine CUPRAC, ABTS ve FOLİN yöntemleri uygulanıp toplam antioksidan kapasiteleri mmol TR/g eşdeğeri cinsinden elde edildi (Tablo 4.11). Bu sonuçlar çerçevesinde 3 yöntem birbirleriyle karşılaştırıldı. CUPRAC – ABTS, CUPRAC – FOLIN yöntemleri arasında sırasıyla $r=0.9706$ ve $r= 0.9960$ uyumluluk gözlemlendi (Şekil 4.27 ve 4.28).

Tablo 4.11: CUPRAC, ABTS ve FOLİN yöntemleriyle şifalı bitki ekstralarının mmol TR/g cinsinden antioksidan kapasitelerinin eldesi

Şifalı Bitkiler		CUPRAC	ABTS	FOLİN
Bitkinin Adı	Orijinal Adı			
Aslan Pençesi	Anagallis Arvensis	1.63	1.02	1.47
Gülhatmi	Althaea Officinalis	0.05	0.05	0.10
Kekik	Thymus Vulgaris	0.54	0.52	0.61
Kısa Mahmut	Teucrium Chamaedrys	0.32	0.13	0.29



Şekil 4.27: Şifalı bitkilerin CUPRAC ve ABTS yöntemlerine göre antioksidan kapasite değerlerinin karşılaştırılması



Şekil 4.28: Şifalı bitkilerin CUPRAC ve FOLİN yöntemlerine göre antioksidan kapasite değerlerinin karşılaştırılması

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda daha önce biyolojik bakımdan önemli indirgenler [24], sistein [25], vitamin E [26], vitamin C [27] ve proteinler [28] için geliştirilen spektrofotometrik bakır(II)-neokuproin (Cu(II)-Nc) reaktifi, bu tez çalışmasında antioksidan özelliği olan bazı polifenolik bileşiklerin spektrofotometrik yolla antioksidan kapasitelerinin tayin edilmesinde kullanılmıştır. Bu yeni metod 'bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi' olarak adlandırılmış ve kısaca CUPRAC metodu [29] olarak ifade edilmiştir. CUPRAC metodu, ABTS-Persülfat [17] ve FOLIN [22] yöntemleri olarak adlandırılan iki referans yöntemle karşılaştırılıp sonuçları değerlendirilmiştir.

Bu yeni metod; tek hidroksil grubuna sahip flavanonların (örneğin naringenin) kateşol grubu içeren kuersetin gibi fenolik bileşiklerden daha düşük antioksidan kapasitesine sahip olduğu teorisini [65] doğrulamaktadır. Aynı şekilde, geliştirilen metod naringenin (N) aglikonu olan naringeninden (NG) daha düşük aktiviteye sahip olduğunu da gösterebilmektedir. Gallik asid (GA) ve kuersetin (QR) için troloks eşdeğer antioksidan kapasite (TEAC) değerleri sırasıyla 2.62 ve 4.38 bulunmuştur. Bu değerler de ABTS metodunun öngördüğü ortalama 3 ve 4 TEAC değeri olarak ifade edilmektedir.

İndirgen gücü ölçülecek antioksidan bileşiğin 1 mM'lık çözeltisinin aktivitesine eşdeğer olan troloksun milimolar konsantrasyonu, TEAC kapasite katsayısını ifade eder. $TEAC_{CUPRAC}$ değerleri antioksidan bileşiklerin molar absorplama katsayılarının (ϵ) troloksun ilgili koşullar altındaki ϵ değerine (normal metod için $\epsilon_{TR} = 1.67 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, inkübasyonlu metod için $\epsilon_{TR} = 1.86 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) oranlanarak kolaylıkla hesaplanmıştır. Bu değerlere göre Tablo 4.9 daki veriler oluşturulmuştur. Örneğin, morin, kateşin ve fisetinin 1'er mM konsantrasyonundaki çözeltileri, Cu(II)-Nc redoks reaktifine karşı sırasıyla 2, 3 ve 4 mM troloks gibi davrandıklarından bu maddelerin

TEAC katsayıları yaklaşık 2, 3 ve 4'dür. Bu verilere göre; CUPRAC metoduna göre en yüksek antioksidan kapasitesi gösteren polifenolik bileşikler sırasıyla, epikateşin gallat, epigallo kateşin gallat, kuersetin, fisetin, epigallo kateşin, kateşin, kaffeik asid ve epikateşin' dir. Bu sonuçlar teorik olarak beklenen değerlerle uyum içindedir çünkü molekül içindeki hidroksil gruplarının sayısı ve yerleşimi kadar C halkasındaki doymamışlık, B halkasındaki kateşol yapısının varlığı da polifenollerin antioksidan kapasitelerini belirlemede önemlidir [9,11]. Örneğin epikateşin gallat (ECG) 7 tane OH fonksiyonel grubuna sahip olup $TEAC_{CUPRAC}$ değeri 5.30 bulunmuştur. Epigallo kateşin gallatın (EGCG) ise 8 OH grubu vardır ancak hidroksil grup sayısı yüksek olmasına rağmen $TEAC_{CUPRAC}$ değeri 4.88'dir. Bunun nedeni, ECG' ın B halkasında 3',4' kateşol grubunun bulunmasıdır.

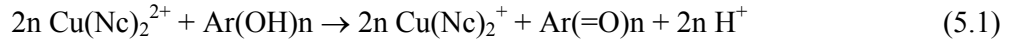
Antioksidan kapasiteleri bakımından kuersetin ve kateşini karşılaştırdığımızda, aynı sayıda hidroksil gruplarına sahip olmalarına rağmen kuersetin (QR) 4.38, kateşin (CT) 3.09 bulunmuştur. Kuersetinin kapasite bakımından yüksek olmasının nedeni C halkasında bulunan 4-okso fonksiyonunun varlığıdır.

Hidroksi sinnamik asitlerin aktiviteleri arasındaki farklılıklar aromatik halkanın hidroksillenme ve metillenme şekline göre çeşitlenmiştir [11]. Örneğin, kaffeik asid (CFA), ferulik asid (FRA) ve p-kumarik asidden (CMA) bir hidroksil grubu zengindir. Bu sebeple antioksidan kapasitesinin daha yüksek olması beklenmelidir. CFA için $TEAC_{CUPRAC}$ değerinin, FRA ve CMA'nın TEAC değerlerinden yüksek çıkmış olması da bu gerçeği desteklemektedir. CFA, FRA ve CMA için TEAC değerleri sırasıyla, 2.89, 1.20 ve 0.55 bulunmuştur. Ancak ABTS yönteminde bu sıralama farklı şeklindedir. Ferulik asidin TEAC değerinin, p-kumarik ve kaffeik asidden daha yüksek olduğu Tablo 4.9' da görülmektedir. Oysa o-pozisyonunda $-OCH_3$ ve p-pozisyonunda 1 OH grubuna sahip ferulik asidin, aynı pozisyonlarda 2 OH grubuna sahip kaffeik asidden kapasite bakımından daha düşük olması gerekmektedir. Bu sonuçlar ABTS metodu için büyük bir dezavantaj oluştururken, geliştirilen CUPRAC metodunun ne kadar başarılı olduğunun da bir göstergesidir.

Kuersetinin glikozidi olan rutin CUPRAC metoduna göre 2.56 troloks eşdeğeridir. İçerdiği glikozid bağının koparılması için yapılmış olan hidroliz işlemi sonrasında elde

edilen TEAC değeri 3.80 olarak bulunmuştur. Bu durum, hidroliz işleminin başarıyla gerçekleşip, rutin şeker yapısının parçalanıp büyük olasılıkla aglikonu olan kuersetine dönüştüğü varsayımını göstermektedir. Bu tip hidroliz reaksiyonları enzimatik olarak insan vücudunda meydana gelmektedir ve şeker bağlarının koparılmasıyla ilgili flavonoid aglikonuna dönüşerek yüksek antioksidan potansiyeli göstermektedir. Bu çalışma için seçilen metanollü çözeltide asidik hidroliz koşulları Hertog ve diğ. [66] tarafından ifade edilmiştir. Farklı bir çalışmada da HPLC yöntemi için örnek hazırlama prosedürü olarak kullanılmıştır [67]. Sonuç olarak kullanılan asid hidrolizi HPLC analizi için örnek hazırlamada ve CUPRAC yöntemi tarafından antioksidan kapasite tayininde kullanılmıştır. Naringenin normal metodla reaksiyon vermediği halde, hidroliz edilip inkübasyon sonrası çok yüksek kapasite gösterdiği gözlenmiştir.

Geliştirilen CUPRAC yönteminin kromojenik oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc reaktifi, polifenollerle (Ar(OH)_n) aşağıdaki reaksiyonu vermektedir:



Bu reaksiyonda, polifenollerin reaktif Ar-OH grupları ilgili kinon bileşiklerine dönüşürken, Cu(II)-Nc ise 450 nm'de maksimum absorpsiyon gösteren kuvvetli renk veren Cu(I)-Nc kelatına dönüşmektedir. n adet fenolik -OH grubu içeren her flavonoid 2n-e donör olarak davranır. Troloks, E ve C- vitaminleri Cu(II)-Nc kelatına karşı 2n-e donördür. Bazı polifenollerin troloks eşdeğeri antioksidan kapasiteleri (TEAC) teorik olarak n olursa, polifenollerin ilgili molar absorptivite (7.5-8.5 x 10³).2n L mol⁻¹cm⁻¹ olacaktır. Örneğin, CUPPAC metodu uygulanıp 30 dakika oda sıcaklığında bekletilip ölçülen polifenolik bileşikler ve ε_N değerleri şunlardır: kuersetin (7.33 x 10⁴), kateşin (5.16 x 10⁴), rutin (2.56 x 10⁴), gallik asid (4.39 x 10⁴), fisetin (6.50 x 10⁴), naringin (3.40 x 10²), askorbik asid (1.59 x 10⁴), ferulik asid (2.00 x 10⁴), p-kumarik asid (9.20 x 10³), kaffeik asid (4.83 x 10⁴), klorojenik asid (4.13 x 10⁴), α-tokoferol (1.83 x 10⁴), epikateşin (4.63 x 10⁴), epikateşin gallat (8.88 x 10⁴), epigallokateşin (5.59 x 10⁴), epigallokateşin gallat (8.17 x 10⁴), hesperidin (1.62 x 10⁴), hesperetin (1.65 x 10⁴), morin (3.15 x 10⁴), şiringik asid (1.88 x 10⁴), vanilik asid (2.08 x 10⁴) ve troloks (1.67 x 10⁴) (Tablo 4.8). Kolay yükseltgenen flavonoidlerin tümünün standart indirgeme potansiyelleri 0.2 V'dan düşükken, naringenin standart indirgeme potansiyeli

$\text{Cu}(\text{Nc})^{2+}$ - $\text{Cu}(\text{Nc})_2^+$ çiftininkine yakın olduğundan reaktif ile yavaş reaksiyon vermektedir. Reaksiyonun hızlanması ve tamamlanması ancak 50°C 'de 20 dakika inkübasyon işlemi yapılarak sağlanmıştır. İnkübasyon sonrasında naringenin ϵ değeri 4.23×10^4 , hidroliz ardından inkübasyon işlemi uygulandığında ise 5.63×10^4 bulunmuştur.

Çalışılan polifenollerden bazıları ikili ve üçlü sentetik karışımlar elde etmek için kullanılmıştır. Bu polifenollerin etanollü sentetik çözeltileri hazırlanıp farklı kombinasyonlarda çeşitli karışımlar oluşturulmuştur. Karışımlara CUPRAC metodu uygulanıp, ölçülen kapasitelerle beklenen kapasiteler arasında teorik olarak maksimum $\pm 5\%$ fark olması beklenmektedir. Bu kapasite değerlerinin hesaplanması için (3.1,3.2) denklemleri kullanılmıştır. Üçlü sentetik karışımların mM troloks eşdeğeri olarak elde edilen sonuçları Tablo 4.10'da verilmiştir. Beklenen ve deneysel olarak ölçülen CUPRAC kapasitelerinin genellikle birbiriyle uyumlu olduğu gözlenmiştir. İkili sentetik karışımlarda, bir antioksidanın diğer bir antioksidan içindeki kalibrasyon eğrileri elde edilip birbirleriyle Beer kanunundan kimyasal sapmaya yol açacak bir etkileşime girip girmedikleri gözlenmiştir (Şekil 4.15-4.18). Kalibrasyon grafikleri arasındaki paralellik bu sentetik antioksidanların enterfere edici hiçbir kimyasal etkileşim göstermedikleri anlamına gelmektedir. Standart katkı metodu yoluyla birkaç şifalı bitki ekstresinin troloks ve kuersetin antioksidan bileşikleriyle olan etkileşimleri incelenmiştir (4.19-4.26). Saf antioksidan bileşiklerle gerçek kompleks karışımlar arasında elde edilen kalibrasyon eğrileri lineerdir. Yani bir gerçek matriks çözeltisi bileşenleri, seçilen saf antioksidanlarla kimyasal olarak bir etkileşime girmemiştir. Bu sebeple CUPRAC metodu hem sentetik karışımların hem de gerçek karışımların antioksidan kapasitelerini tayin etmede etkili bir yöntemdir çünkü absorbansların aditivitesi (toplamsallığı) ilkesi geçerlidir.

CUPRAC metodunun avantajlarını özetlemek gerekirse;

- CUPRAC metodu tiyol grubu içeren antioksidanları yükseltgemedeki yeteri kadar hızlı iken, FRAP metodu [14] glutasyon gibi tiyol grubu taşıyan ve canlı bitki ve hayvan hücresinde bulunan önemli bir antioksidanı ölçmemektedir. Bunun nedeni yüksek spin gösteren $\text{Fe}(\text{III})$ 'ün kimyasal bir inertlik sağlayan yarı dolu d-orbitallerine sahip olmasından kaynaklanabilir. $\text{Cu}(\text{II})$ 'nin elektronik yapısı demir(III)'den daha hızlı kinetik göstermesine neden olmaktadır. Yapılan bir

çalışmada 1,10-fenantrolin varlığında sisteinin demir(III) ile vermiş olduğu redoks reaksiyonunun çok yavaş gerçekleşmekte olduğu gözlenmiş ve bu nedenle reaksiyonun hızlanması için katalizör olarak bakır(II) ilave edilmiştir [68]. Diğer yandan, glutatyon ve sistein 1-e redükthanları olup Tütem ve diğ. [24-25] tarafından molar absorptiviteyi sırasıyla 8.5×10^4 ve 7.5×10^4 L mol⁻¹ cm⁻¹ olarak bulunmuştur.

- Reaktif seçicidir çünkü fenantrolin veya tripiridiltriazin ligandları varlığında Fe(II)-Fe(III) çiftinin redoks potansiyelinden daha düşük potansiyele sahiptir. Bu nedenle CUPRAC reaktifiyle, indirgen şekerler ve sitrik asid yükseltgenemez.
- Reaktif diğer kromojenik reaktiflere (ABTS, DPPH vb.) oranla daha kararlı ve kolay ulaşılabilir.
- Bu metodun standart kolorimetreler kullanan ticari laboratuvarlarda uygulanması son derece kolaydır. Karmaşık ve yüksek maliyetli cihazlara gerek kalmadan kısa sürede doğru sonuç alınmaktadır.
- Renkli Cu(I)-Nc kelatı hava, güneş ışığı, pH ve nem gibi çeşitli parametrelere göreceli olarak duyarsızdır (örneğin, radikal reaktif olan DPPH bu parametrelere fazlaca duyarlıdır).
- CUPRAC metodu hidrofilik antioksidanlar kadar lipofilik antioksidanların da (α -tokoferol gibi) kapasitelerini ölçebilmektedir.
- Absorbans-konsantrasyon arasında çizilen kalibrasyon eğrileri CUPRAC metodunda yüksek lineerlik verirken diğer metodlarda polinomial eğriler oluşmaktadır.
- CUPRAC metodu fizyolojik pH'a yakın ortamlarda çalışabilirken, FRAP metodu asidik (pH 3.6), Folin metodu ise bazik (pH 10) ortamlarda işlemektedir. Sonuçta antioksidanların protonlanmış veya protonlarını vermiş olmasına bağlı olarak oksidasyon gerçekte olduğundan daha güç veya daha kolay olmakta ve bunun uzantısı olarak toplam antioksidan kapasite olduğundan daha eksik ya da fazla bulunabilmektedir.

Genel olarak bu yöntem kolay, hızlı, etkili ve maliyeti düşük bir yöntemdir. Bu yöntem sayesinde hem lipofilik hem hidrofilik saf antioksidan bileşikler (vitaminler, polifenoller, karotenoidler, flavonoidler vb.) için yeni bir antioksidan kapasite indeksi geliştirilmiş olmaktadır. Yapılan çalışmadan elde edilen bulgular doğrultusunda toplumun gıda tüketimi ve beslenme konusunda bilgilendirilmesine olanak sağlanacaktır. Böylelikle antioksidan ve vitaminlerce zengin beslenme alışkanlıkları elde edilecek ve bu tür beslenme sayesinde hücre yıpranması ve yaşlanmayı azaltıcı etkilerin gözlenmesi, toplumun ortalama ömrünün arttırılabilmesi söz konusu olabilecektir. Ortalama ömrün arttırılması ise, insana yapılan bir yatırım olarak ulusal ekonomiye doğrudan bir katkı sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

1. HALLIWELL, B., ARUOMA, O. I., 1991, DNA damage by oxygen-derived species: its mechanisms and measurement in mammalian systems, *FEBS Lett*, 281, 9-19.
2. MILLER, N. J., RICE EVANS, C. A., 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, *Clinical Science*, 84, 407-412.
3. WHITEHEAD, T. P., THORPE, G. H. G., MAXWELL, S. R. J., 1992, Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids, *Analytica Chimica Acta*, 266, 265-277.
4. CAO, G., ALESSIO, H. M., CUTLER, R. G., 1993, Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants, *Free Radical Biology & Medicine*, 14, 303-311.
5. GHISELLI, A., SERAFINI, M., MAIANI, G., AZZINI, E., FERRO-LUZZI, A., 1995, A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability, *Free Radical Biology & Medicine*, 18, 29-36.
6. WAYNER D.D.M., BURTON G. W., INGOLD K. LOCKE U. S., 1985, Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation, *FEBS Lett.*, 187, 33-37.
7. SALAH, N., MILLER, N. J., PAGANGA, G., TIJBURG, L., RICE-EVANS, C. A., 1995, Polyphenolic flavonols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants, *Arch. Biochem. Biophys.*, 322, 339-346.
8. GLAZER, A. N., 1990, Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species, *Meth. Enzymology*, 186, 161-168.
9. RICE-EVANS, C. A., MILLER, N. J., 1996, Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food, *Biochem. Soc. Trans*, 24, 790-795.
10. WANG, H., CAO, G., PRIOR, R.L., 1996, Total antioxidant capacity of fruits, *J. Agricultural and Food Chemistry*, 44, 701-705.
11. RICE-EVANS, C. A., MILLER, N. J., PAGANGA, G., 1996, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 933-956.

12. MILLER, N. J., RICE-EVANS, C. A., 1994, Total antioxidant status in plasma and body fluids, *Methods of Enzymology*, 234, 279-293.
13. CAO, G., VERDON, C. P., WU, A. H. B., WANG, H., PRIOR, R. L., 1995, Automated oxygen radical absorbance capacity assay using the COBAS FARA II, *Clinical Chemistry*, 41, 1738-1744.
14. BENZIE, I. F. F., STRAIN, J. J., 1996, Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power'; the FRAP assay, *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
15. VALKONEN, M., KUUSI, T., 1997, Spectrophotometric assay for total radical-trapping antioxidant potential in human serum, *Journal of Lipid Research*, 38, 823-833.
16. WINSTON, G. W., REGOLI, F., DUGAS, A. J. Jr., FONG, J. H., BLANCHARD, K. A., 1998, A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids, *Free Radical Biology & Medicine*, 24, 480-493.
17. PELLEGRINI, RE, R., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., RICE-EVANS C. A., 1999, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorisation assay, *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231-1237.
18. SANCHEZ, M. C., LARRAURI, J.A., SAURA, C. F., 1998, A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 270-276.
19. ALHO, H., LEINONEN, J., 1999, Total antioxidant activity measured by chemiluminescence methods, *Methods of Enzymology*, 299, 3-14.
20. TUBARO, F., GHISELLI, A., PAPUZZI, P., MAIORINO, M., URSINI, F., 1998, Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics, *Free Radical Biology & Medicine*, 24, 1228-1234.
21. SINGLETON, V. L., ROSSI, J. A., 1965, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
22. SINGLETON, V. L., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTOS, R. M., 1999, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, *In Methods in Enzymology*, Packer, L., Ed., Academic Press, Orlando, 299, 152-178.
23. LUSSIGNOLI, S., FRACCAROLI, M., ANDRIOLI, G., BROCCO, G., BELLAVITE, P., 1999, A microplate-based colorimetric assay of the total

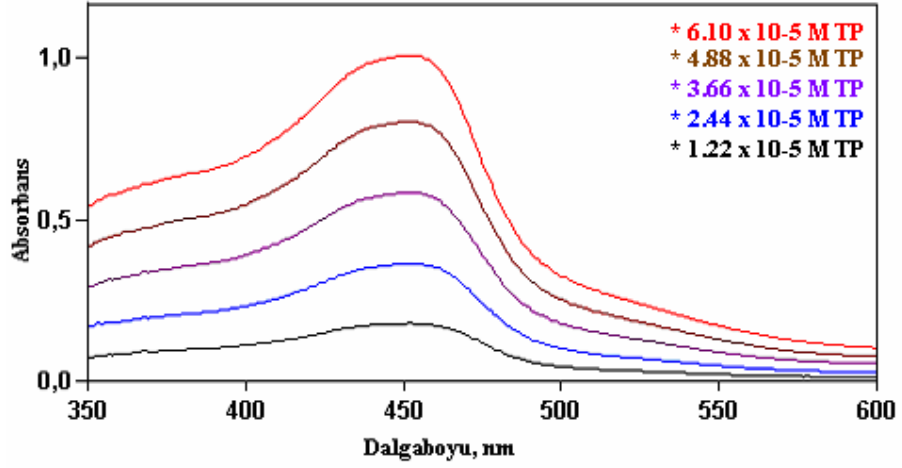
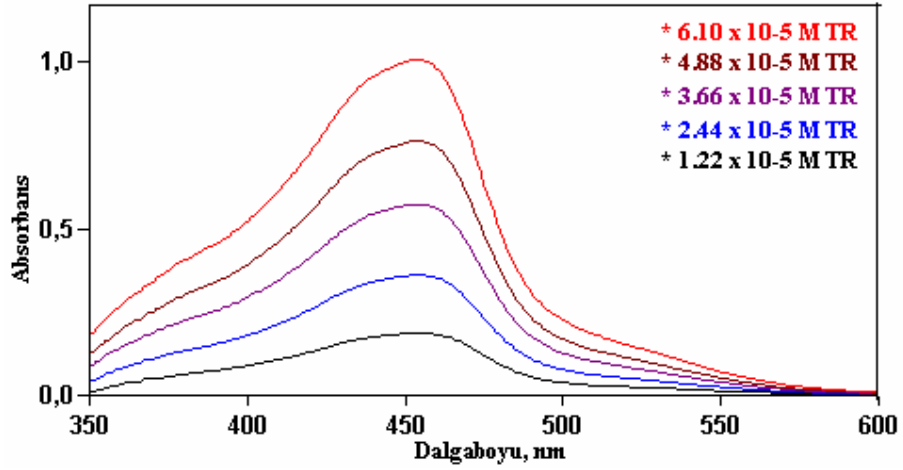
- peroxyl radical trapping capability of human plasma, *Analytical Biochemistry*, 269, 38-44.
24. TÜTEM, E., APAK, R., BAYKUT, F., 1991, Spectrophotometric determination of trace amounts of copper(I) and reducing agents with neocuproine in the presence of copper(II), *Analyst*, 116, 89-94.
 25. TÜTEM, E., APAK, R., 1991, Simultaneous spectrophotometric determination of cystine and cysteine in amino acid mixtures using copper(II)-neocuproine reagent", *Analytica Chimica Acta*, 255, 121-125.
 26. 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.
 27. GÜÇLÜ, K., SÖZGEN, K., TÜTEM, E., ÖZYÜREK, M., APAK, R., 2005, Spectrophotometric determination of ascorbic acid using copper(II)-neocuproine reagent in beverages and pharmaceutical, *Talanta*, 65, 1226-1232.
 28. APAK, R., TÜTEM, E., SÖZGEN, K., DEMİRCİ-ÇEKİÇ, S., 2005, A novel spectrophotometric method for protein assay using the copper(II)-neocuproine reagent, *Talanta*, basım aşamasında.
 29. APAK, R., GÜÇLÜ, K., ÖZYÜREK, M., KARADEMİR, S. E., 2004, Novel Total Antioxidant Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981.
 30. CAO, G., PRIOR, R.L., 1999, In vivo antioxidant capacity: comperison of different analytical methods, *Free Radical Biology & Medicine*, 27, 1173-1181.
 31. RICE-EVANS, C.,A., MILLER, N. J., PAGANGA, G., 1997, Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends in Plant Science*, 2, 152-159.
 32. KESKİN, H., ERKMEN G., 1987, *Besin Kimyası*, Güray Matbaacılık, Beşinci basım, İstanbul.
 33. SHAHIDI, F., 1996, Natural Antioxidants, Chemistry, Health Effects and Applications, *AOCS Press*, Champaign, Illinois, 0-935315-77-2.
 34. HUDSON, B., J., 1990, Food Antioxidants, *Elsevier Science*, USA.
 35. HALLIWELL, B., 1990, How to characterise a biological antioxidant, *Free Radical Research Comminucation*, 9, 1-32.
 36. SHAHIDI, F., WANASUNDARA, P., K., J., 1992, Phenolic antioxidants, *Critical Review of Food Science and Nutritional*, 32, 67-103.

37. HEIM, K.E., TAGLIAFERRO, R., BOBILYA, D. J., 2002, Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.
38. RICE-EVANS, C. A., MILLER, N. J., BOLWELL, P., G., BRAMLEY, P., M., PRIDHAM, J., B., 1995, The relative activities of plant-derived polyphenolic flavonoids, *Free Radical Research*, 22, 375-383.
39. CADENAS, E., PACKER, L., 2002, Handbook of Antioxidants, *Marcel Dekker*, Second Edition, New York, 0-8247-0547-5.
40. CAO, G., SOFIC, E., PRIOR, R. L., 1997, Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure-activity relationships, *Free Radical Biology & Medicine*, 22, 749-760.
41. SEKHER PANNALA, A., CHAN, T. S., O'BRIEN, P. J., RICE-EVANS, C. A., 2001, Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics, Biochemistry, *Biophysics Research Communication*, 282, 1161-1168.
42. BURDA, S., OLESZEK, W., 2001, Antioxidant and antiradical activities of flavonoids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2774-2779.
43. MORA, A., PAYA, M., RIOS, J. L., ALCARAZ, M. J., 1990, Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation, *Biochemistry and Pharmacology*, 40, 793-797.
44. WILLIAMS, R. J., SPENCER, J. P. E., RICE-EVANS, C., 2004, Flavonoids: Antioxidants or Signalling Molecules?, *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 838-849.
45. LLESUY, S., EVELSON, P., CAMPOS, A. M., LISSI, E., 2001, Methodologies for evaluation of total antioxidant activities in complex mixtures: A critical review, *Biol. Res. (Santiago)*, 34, 51-73.
46. VAN DEN BERG, R., HAENEN, R. M. M., VAN DEN BERG, H., BAST, A., 1999, Applicability of an improved trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures, *Food Chemistry*, 66, 511-517.
47. ARNAO, M.B., CANO, A., & ACOSTA, M., 1998, Total antioxidant activity in plant material and its interest in food technology, *Recent Res. Devel. in Agricultural and Food Chem.* 2, 893-905.
48. WAYNER, D. D. M., BURTON, G. W., INGOLD, K. U., LOCKE, S., 1986, The antioxidant efficiency of vitamin C is concentration-dependent, *Biochem. Biophys. Acta*, 884, 119-123.

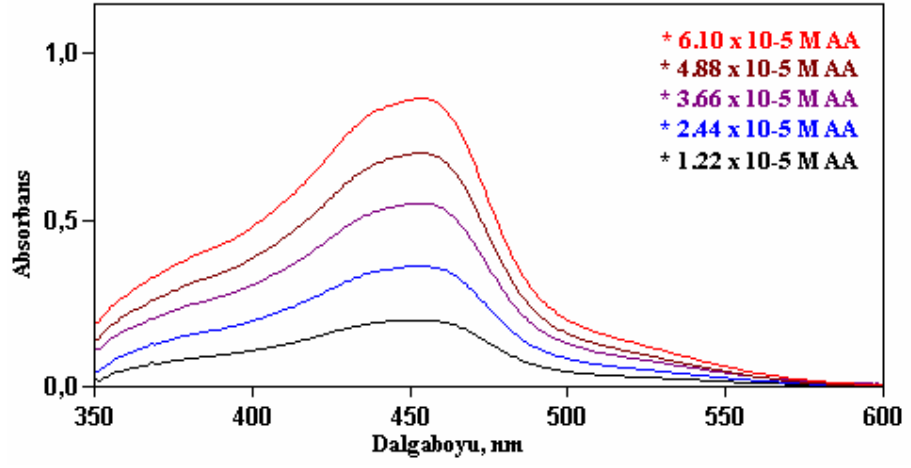
49. CAO, G., PRIOR, R. L., 1998, Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum, *Clinical Chemistry*, 44, 1309-1315.
50. CAO, G., SOFIC, E., PRIOR, R. L., 1996, Antioxidant capacity of tea and common vegetables, *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3426-3431.
51. HIRANO, R., SASAMOTO, W., MATSUMOTO, A., ITAKURA, H., IGARASHI, O., KONDO, K., 2001, Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation, *J Nutr Sci Vitaminol*, 47, 357-62.
52. HOU, L., , ZHOU, B. , YANG, L., LIU, Z., 2004, Inhibition of human low density lipoprotein oxidation by flavonols and their glycosides, *Chemistry and Physics of Lipids*, 129, 209-219.
53. LÓPEZ, M., MARTÍNEZ, F., DEL VALLE, C., FERRIT, M., LUQUE, R., Study of phenolic compounds as natural antioxidants by a fluorescence method, 2003, *Talanta*, 60, 609-616.
54. ARTS, M. J. T. J., DALLINGA J. S., VOSS, H. P., HAENEN, G. R. M. M., BAST A., 2003, A critical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures, *Food Chemistry*, 80, 409-414.
55. PLUMB, G. W., PRICE, K. R., WILLIAMSON, G., 1999, Antioxidant properties of flavonol glycosides from green beans, *Redox Rep.*, 4, 123-127.
56. PLUMB, G. W., PRICE, K. R., WILLIAMSON, G., 2003, Antioxidant properties of flavonol glycosides from tea, *Redox Rep.*, 4, 6-13.
57. KIM, D., CHUN, O., KIM, Y. J., MOON, H.,Y., LEE, C. Y., 2003, Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums, *J Agric Food Chem.*, 51, 15-6509.
58. FIRUZI, O., LACANNA, A., PETRUCCI, R., MARROSU, G., SASO, L., 2005, Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry, *Biochimica & Biophysica Acta*, 1721, 174-184.
59. YILMAZ, Y., TOLEDO, R.T., 2004, Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid, *J Agric Food Chem.*, 50, 255-260.
60. LEE, K.W., KIM ,Y. J., KIM, D., LEE, H. J., LEE C. Y., 2003, Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity, *J Agric Food Chem.*, 51, 20-6516.

61. MILLER, H. E., RIGELHOF, F., MARQUART, L., PRAKASH, A., KANTER, M., 2000, Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables, *Journal of American College of Nutrition*, 19, 312-319.
62. ALONSO, M. G., PASCUAL-TERESA, S., SANTOS-BUELGA, C., RIVAS-GONZALO, J. C., 2004, Evaluation of the antioxidant properties of fruits, *Food Chemistry*, 84, 13-18.
63. GUO, C., YANG, J., WEI, J., LI, Y., XU, J., JIANG, Y., 2003, Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay, *Nutrition Research*, 23, 1719-1726.
64. CAI, Y., LUO, Q., SUN, M., CORKE, H., 2004, Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer, *Life Sciences*, 74, 2157-2184.
65. ROBARDS, K., PRENZLER, P. D., TUCKER, G., SWATSITANG, P., GLOVER, W., 1999, Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66, 401-436.
66. HERTOOG, M. G. L., HOLLMAN, P. C. H., VENEMA, D. P., 1992, Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1591-1598.
67. MERKEN, H. M., BEECHER, G. M., 2000, Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 577-599.
68. TESHIMA, N., KATSUMATA, H., KURIHARA, M., SAKAI, T., KAWASHIMA, T., 1999, Flow-injection determination of copper(II) based on its catalysis on the redox reaction of cysteine with iron(III) in the presence of 1,10-phenanthroline, *Talanta*, 50, 41-47.

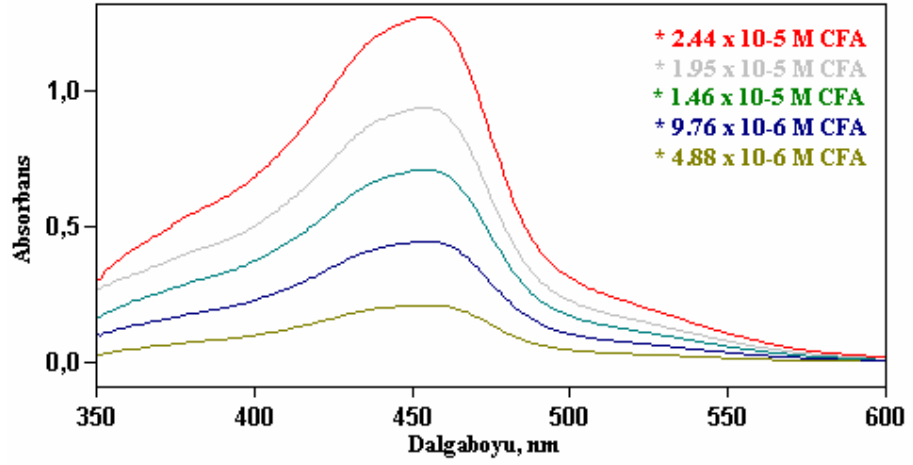
EKLER

Şekil E.1: α -tokoferol varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu

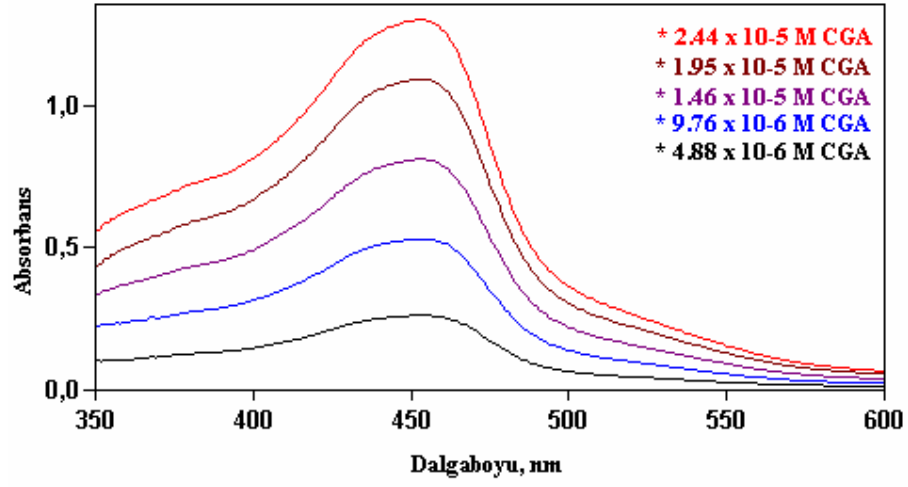
Şekil E.2: Troloks varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu



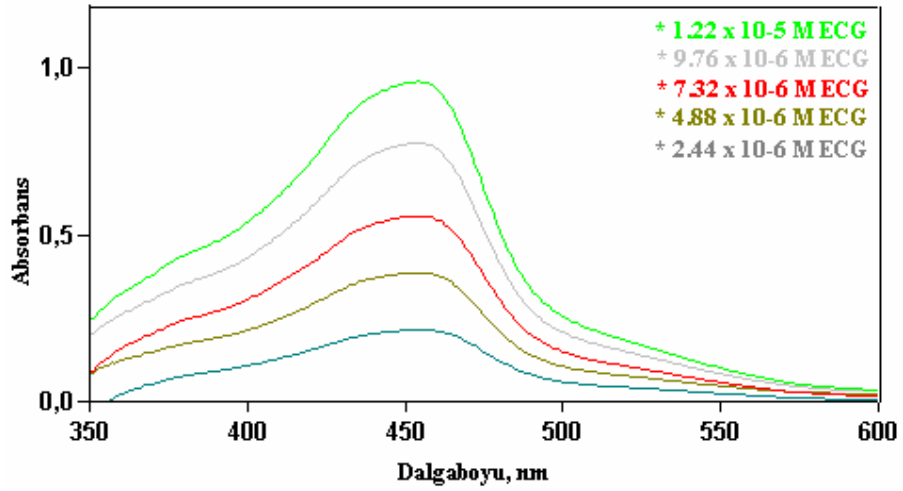
Şekil E.3: Askorbik asid varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu



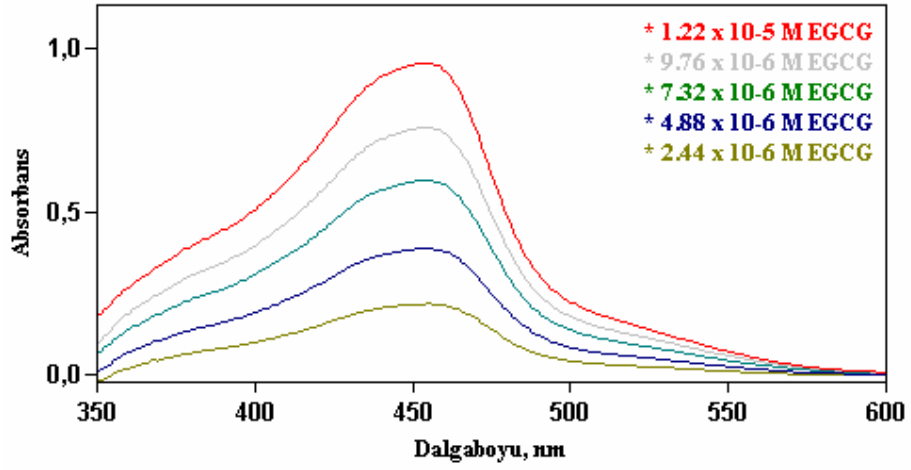
Şekil E.4: Kaffeik asid (CFA) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu



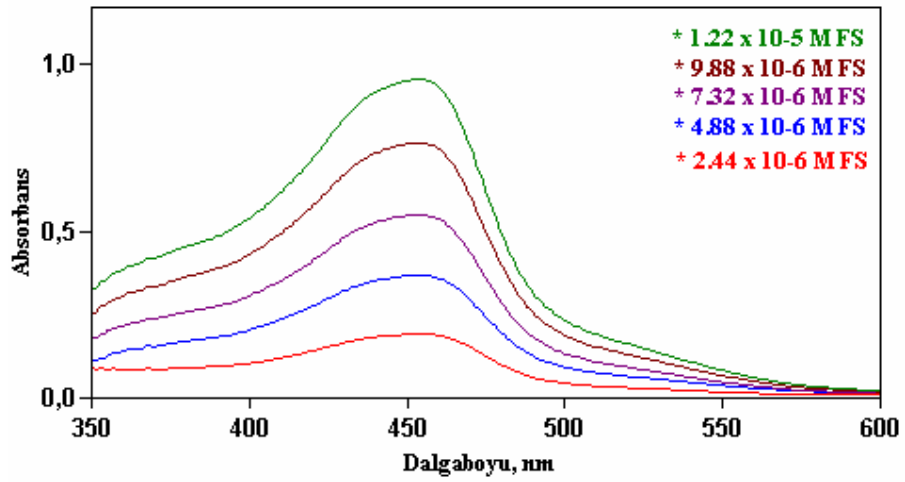
Şekil E.5: Klorojenik asid (CGA) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu



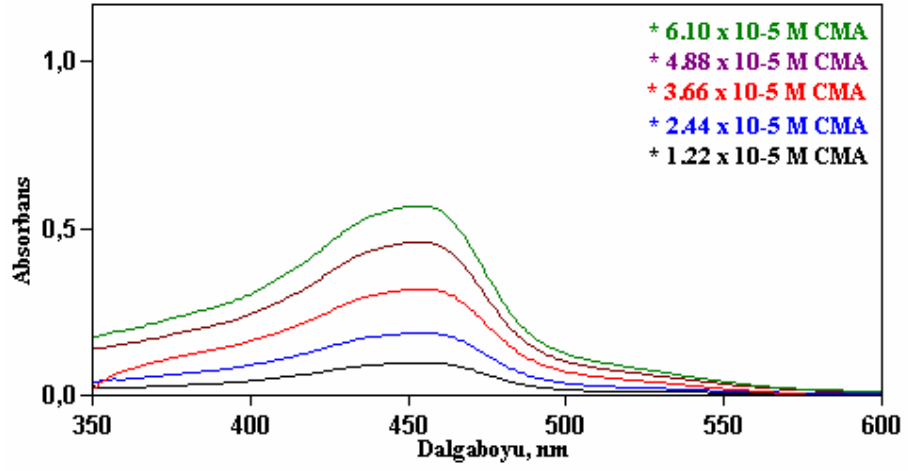
Şekil E.6: Epikateşin gallat (ECG) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu



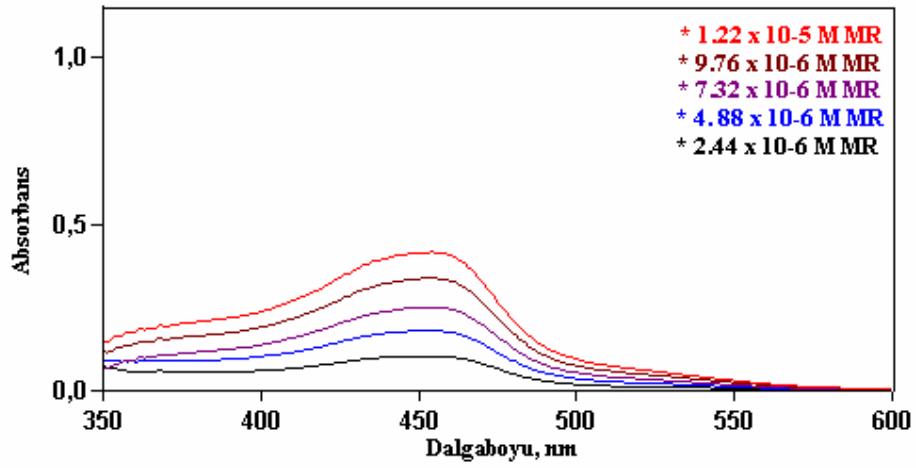
Şekil E.7: Epigallokateşin gallat (EGCG) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu



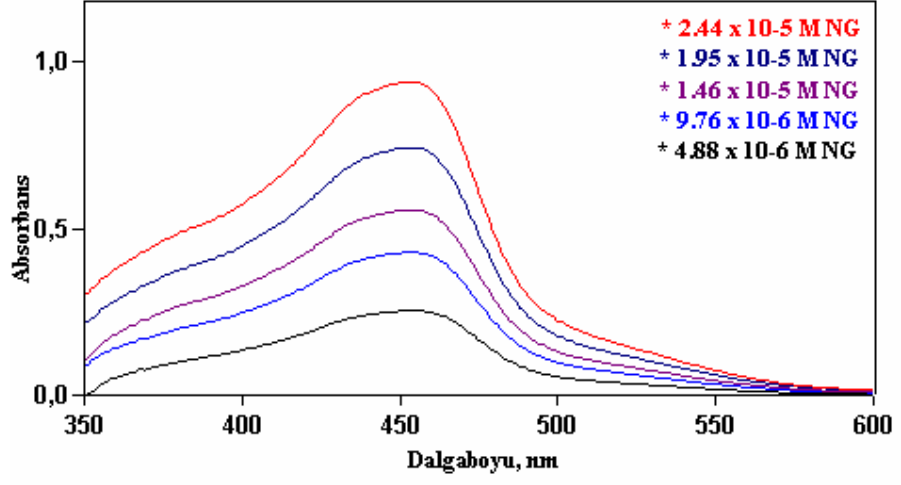
Şekil E.8: Fisetin (FS) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu



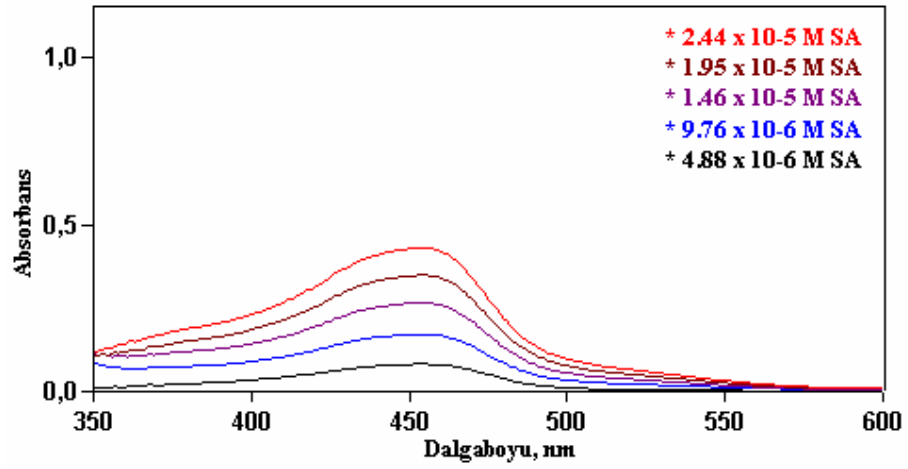
Şekil E.9: Kumarik asid (CMA) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu



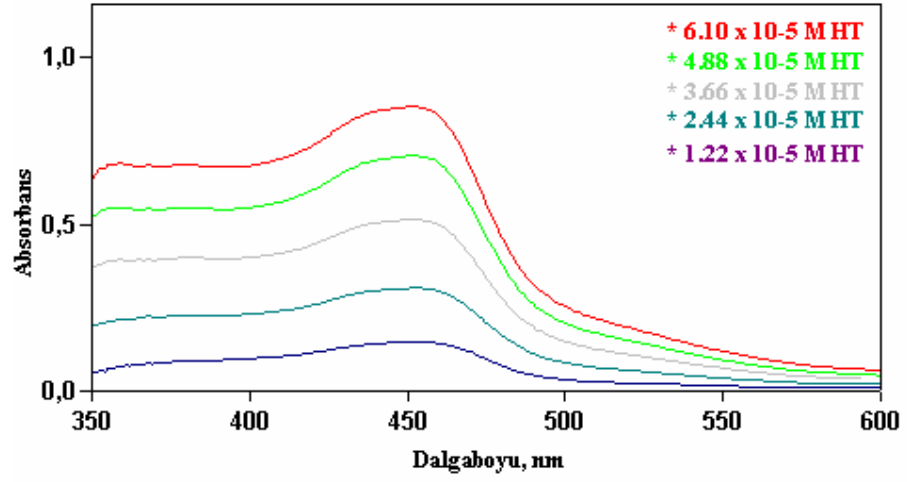
Şekil E.10: Morin (MR) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu



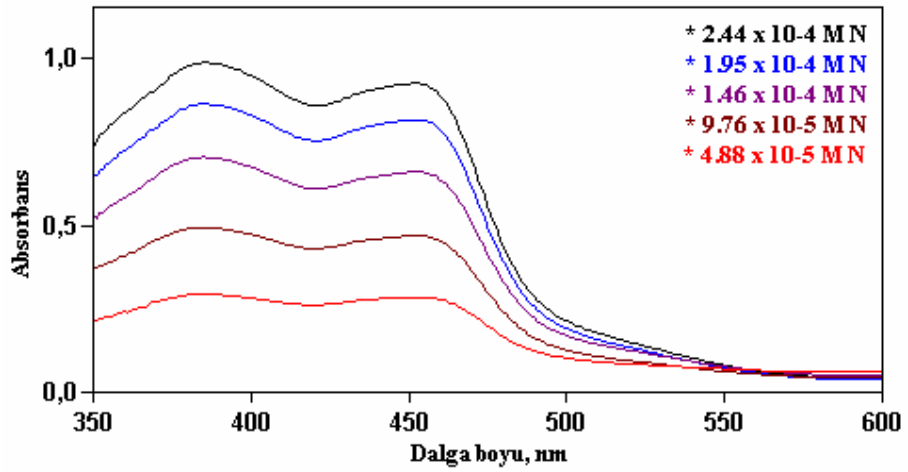
Şekil E.11: Naringenin (NG) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu



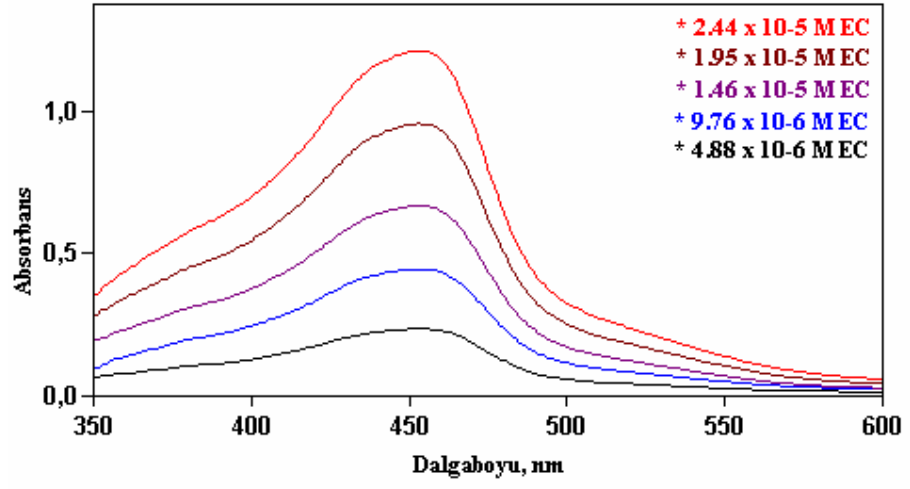
Şekil E.12: Şiringik asid (SA) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu



Şekil E.13: Hesperetin (HT) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu



Şekil E.14: Naringin (N) varlığında Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu



Şekil E.15: Epikateşin (EC) varlığında Cu(I)-Nc kelatinin görünür bölge spektrumu

ÖZGEÇMİŞ

01.11.1979 İstanbul doğumluyum. İlk öğrenimimi Mecidiye İlkokulu'nda, orta ve lise öğrenimimi Adile Mermerci Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 1998 yılında Öğrenci Seçme ve Yerleştirme Merkezi tarafından düzenlenen üniversite giriş sınavı sonucunda İ.Ü. Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümü'ne girmeye hak kazandım. 4 senelik üniversite öğrenimimi tamamlayıp 2002 yılında mezun oldum. 2001 yılı yaz döneminde BAYER İlaç Fabrikaları A.Ş.'de zorunlu stajımı yapıp 2003 yılı yaz döneminde geçici süreyle çalıştım. 2002 yılında İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Programı'nda yüksek lisans öğrenimime başladım.