



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SÜLFOKSİ RADİKALLERİN ve BU RADİKALLERİN SÜPÜRME ESASLI
ANTIÖKSİDAN AKTİVİTENİN KOLORİMETRİK TAYİNİ İÇİN YÖNTEM
GELİŞTİRİLMESİ**

ÇİĞDEM AŞILIOĞLU

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ**

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

Haziran, 2022

TEZ KABUL VE ONAYI

Çiğdem AŞILIOĞLU tarafından, **Prof. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ** danışmanlığında hazırlanan "**SÜLFOKSİ RADİKALLERİN ve BU RADİKALLERİN SÜPÜRME ESASLI ANTİOKSİDAN AKTİVİTENİN KOLORİMETRİK TAYİNİ İÇİN YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ**" başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından **06/06/2022** tarihinde yapılan sınav sonucunda **oy birliği** ile başarılı bulunarak **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

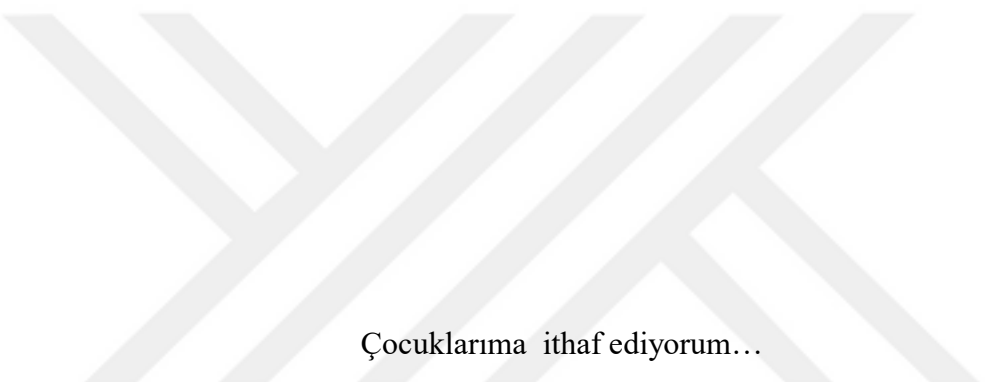
	İmza	Sonuç
DANIŞMAN	Prof. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ	☒
	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa	Kabul
	Kimya Anabilim Dalı	☐ Ret
ÜYE	Doç. Dr. Saliha Esin Çelik	☒
	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa	Kabul
	Kimya Anabilim Dalı	☐ Ret
ÜYE	Doç. Dr. Mustafa Bener	☒
	İstanbul Üniversitesi	Kabul
	Kimya Anabilim Dalı	☐ Ret

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve bilimsel etik kuralları içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve her türlü hukuki sorumluluğu aldığımı kabul ederim.

Çiğdem AŞILIOĞLU

(İmza)



Çocuklarıma ithaf ediyorum...

BÜTÇE DESTEKLERİ

SÜLFOKSİ RADİKALLERİN ve BU RADİKALLERİN SÜPÜRME ESASLI ANTIOKSİDAN AKTİVİTENİN KOLORİMETRİK TAYİNİ İÇİN YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

Bu tez çalışması için herhangi bir kurumdan bütçe desteği alınmamıştır.



TEŞEKKÜR

Bilimsel anlamda yapmış olduğu çalışmalardan örnek aldığım, saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. Reşat Apak’a,
Tezimde bana danışmanlık yapan, tüm bilgi ve birikimini paylaşan, gülyüzü ve samimiyetiyle desteğini hep hissettiğim Sayın Prof. Dr. Sema Demirci Çekiç’e,
Lisansüstü eğitim hayatım ve tez çalışmalarım boyunca her zaman desteklerini ve yol göstericiliğini hissettiğim, sevgili arkadaşlarım ve hocalarım Dr. Seda Uzunboy’a, Arş. Gör. Aslı Neslihan Avan’a, Arş. Gör. Dr. Asiye Aslıhan Avan’a, Özge Karakaş’a, Aysu Arman’a, Zainab Majid Salim Al-lamı’ye, Herbert Circus Kaboggoza’ya, Kerem Veral’a ve Analitik Kimya Anabilim Dalındaki tüm laboratuvar arkadaşlarıma,
Hiçbir zaman destek ve özverilerini esirgemeyen sevgili anneme, babama, ağabeyime ve tabi ki sevgili büyük aileme; sabrı ve hoşgörüsü ile yanımda olduğunu her zaman hissettiğim sevgili eşime ve canım oğlum ile canım kızıma teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2022

Çiğdem AŞILIOĞLU

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI	ii
BEYAN	iii
BÜTÇE DESTEKLERİ	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİL LİSTESİ	xi
TABLO LİSTESİ	xiv
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xv
ÖZET	xvii
ABSTRACT	xix
1. GİRİŞ	1
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE	4
2.1. OKSİDATİF STRES VE SERBEST RADİKAL TÜRLERİ	4
2.1.1. Oksidatif Stres	4
2.1.2. Serbest Radikal Türleri	4
2.1.3. Serbest Radikallerin Metabolizmaya Etkileri	6
2.2. SÜLFOKSİ RADİKALLERİ	7
2.2.1. Sülfat Radikalleri	7
2.2.2. Sülfat Radikallerinin Oluşumu	8
2.2.3. Katalizör Aktivasyon Sistemleri	10
2.2.4. Sülfat Radikalleri	12
2.3. ANTİOKSİDANLAR	14
2.4. ANTİOKSİDANLARIN SINIFLANDIRILMASI	14
2.4.1. Enzimatik Antioksidanlar	15
2.4.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	16
2.5. POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN SINIFLANDIRILMASI	18
2.5.1. Flavonoidler	18
2.5.2. Fenolik Asitler	21
2.6. TİYOL GRUBU İÇEREN ANTİOKSİDANLAR	23

2.6.1. Glutasyon	23
2.6.2. N-Asetil Sistein	23
2.6.3. Sistein	24
2.6.4. Homosistein	24
2.6.5. Sisteamin	24
2.7. 3,3',5,5'-TETRAMETİLBENZİDİN REAKTİFİNİN ÖZELLİKLERİ	25
2.8. RODAMİN B	26
3. YÖNTEM	27
3.1. CİHAZLAR VE KİMYASALLAR	27
3.1.1. Cihazlar	27
3.1.2. Kimyasallar	27
3.2. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI	28
3.2.1. Sülfoksi Radikallerin Süpürme Aktivite Tayininde Önerilen Yöntemde Kullanılan Çözeltiler	28
3.2.2. CUPRAC Yöntemi Çözeltileri	28
3.2.3. Sentetik Antioksidan Çözeltileri	29
3.2.4. Gerçek Örneklerin Hazırlanması	29
3.3. YÖNTEMLER	29
3.3.1. Sülfoksi Radikallerinin Üretim Yöntemi	29
3.3.2. Sülfoksi Radikallerinin Süpürme Yöntemi	29
3.3.3. Rodamin B Yöntemi	30
3.3.4. CUPRAC Yöntemi	30
3.4. GELİŞTİRİLEN YÖNTEM İÇİN EN UYGUN KOŞULLARIN BELİRLENMESİ ...	30
3.4.1. En uygun Sodyum Sülfidin Konsantrasyonunun Belirlenmesi	30
3.4.2. En uygun Kobalt (II) Heptahidrat Konsantrasyonunun Belirlenmesi	31
3.4.3. En uygun TMB Konsantrasyonunun Belirlenmesi	31
3.4.4. Tampon Çözelti Sisteminin Seçilmesi ve En uygun Tampon Çözelti Konsantrasyonunun Belirlenmesi	31
3.4.5. Ortam Sıcaklığının Belirlenmesi	32
3.4.6. Reaksiyon Süresinin Belirlenmesi	32
3.5. RODAMİN B KIYASLAMA METODUNUN EN UYGUN KOŞULLARININ BELİRLENMESİ	32
3.5.1. En uygun Sodyum Sülfidin Konsantrasyonunun Belirlenmesi	32
3.5.2. En uygun Kobalt (II) Heptahidrat Konsantrasyonunun Belirlenmesi	33
3.5.3. Tampon Çözelti Sisteminin Seçilmesi ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi	33
3.5.4. Ortam Sıcaklığının Belirlenmesi	33
3.5.5. Reaksiyon Süresinin Belirlenmesi	34

3.5.6. En uygun Rodamin B Konsantrasyonunun Optimizasyonu.....	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. GELİŞTİRİLEN YÖNTEMİN OPTİMİZASYONU	35
4.1.1. Sodyum Sülfid Konsantrasyonunun Optimizasyonu	35
4.1.2. Kobalt (II) Heptahidrat Konsantrasyonunun Optimizasyonu	35
4.1.3. TMB Konsantrasyonunun Optimizasyonu.....	36
4.1.4. pH Optimizasyonu.....	37
4.1.5. Ortam Sıcaklığının Optimizasyonu	37
4.1.6. Uygun Reaksiyon Süresinin Optimizasyonu.....	37
4.1.7. Çözücü Etkisi	38
4.2. SEÇİLEN SENTETİK ANTİOKSİDANLARA SÜLFOKSİ RADİKALİ SÜPÜRME YÖNTEMİNİN UYGULANMASI	39
4.2.1.2. Geliştirilen Sülfoksi Radikalleri Süpürme Yönteminin Antioksidanları Süpürme Aktivitesi Tayini.....	39
4.2.2. Tayin Edilen Antioksidan Maddelerin Önerilen Yöntem ile Sülfoksi Radikallerini Süpürme Etkinliğinin Sıralaması	46
4.3. SEÇİLEN SENTETİK ANTİOKSİDAN KARIŞIMLARA SÜLFOKSİ RADİKALİ SÜPÜRME YÖNTEMİNİN UYGULANMASI	47
4.3.1. İkili Karışımlar	47
4.3.2. Üçlü Karışımlar	48
4.4. SEÇİLEN SENTETİK ANTİOKSİDAN KARIŞIMLARA CUPRAC YÖNTEMİNİN UYGULANMASI.....	48
4.4.1. İkili Karışımlar	48
4.4.2. Üçlü Karışımlar	50
4.5. RODAMİN B YÖNTEMİNİN OPTİMİZASYONU	50
4.5.1. Sodyum Sülfid Konsantrasyonunun Belirlenmesi	50
4.5.2. Kobalt (II) Heptahidrat Konsantrasyonunun Belirlenmesi	51
4.5.3. pH Optimizasyonu.....	51
4.5.4. Ortam Sıcaklığının Optimizasyonu	52
4.5.5. Reaksiyon Süresinin Optimizasyonu	52
4.5.6. Rodamin B Konsantrasyonunun Optimizasyonu	53
4.6. RODAMİN B YÖNTEMİNİN SEÇİLEN SENTETİK ANTİOKSİDAN MADDELERE UYGULANMASI	54
4.6.1. Rodamin B Yönteminin Antioksidanları Süpürme Aktivitesi Tayini.....	54
4.6.2. Antioksidan Maddelerin Rodamin B Yöntemi ile Sülfoksi Radikallerini Süpürme Etkinliğinin Sıralaması.....	62
4.7. GERÇEK ÖRNEKLERE UYGULANAN YÖNTEMLERİN SONUÇLARI	63

4.7.1. Geliştirilen Sülfoksi Radikalleri Süpürme Yönteminin Bitki Çaylarına Uygulanmasıyla Elde Edilen Sonuçlar.....	63
5. TARTIŞMA.....	64
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	69
KAYNAKLAR.....	70
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	82
ETİK KURUL İZİN YAZISI	83
KURUM İZNİ YAZILARI	84
ÖZGEÇMİŞ	85



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Oksidatif stresin şekilsel gösterimi.	4
Şekil 2.2: Sülfat radikalının molekül yapısı.	8
Şekil 2.3: PMS'nin geçiş metalleriyle aktivasyonu.	9
Şekil 2.4: Sülfat radikali oluşum süreçleri	9
Şekil 2.5: Sülfat radikalleri oluşumunda kullanılan aktivasyon yöntemleri.	10
Şekil 2.6: Sülfat radikalının molekül yapısı.	13
Şekil 2.7: Antioksidanların sınıflandırılmasına ait şema.	15
Şekil 2.8: α - tokoferolün kimyasal yapısı.	16
Şekil 2.9: Askorbik asitin moleküler yapısı.	17
Şekil 2.10: β -Karotenin kimyasal yapısı.	17
Şekil 2.11: Polifenollerin sınıflandırılması.	18
Şekil 2.12: Flavonoidlerin genel yapısı.	19
Şekil 2.13: Flavonollerin genel yapısı.	19
Şekil 2.14: Flavanollerin genel yapısı.	19
Şekil 2.15: Flavanonların kimyasal yapısı.	20
Şekil 2.16: Flavonların genel kimyasal yapıları.	20
Şekil 2.17: Antosiyanidinlerin genel yapısı.	20
Şekil 2.18: İzoflavonların genel yapısı.	21
Şekil 2.19: <i>p</i> -kumarik asit ve kafeik asitin kimyasal yapıları.	21
Şekil 2.20: Gallik asit, protokateşuik asit ve vanilik asidin kimyasal yapıları.	22
Şekil 2.21: İndirgenmiş ve yükseltgenmiş glutatyonun kimyasal yapısı.	23
Şekil 2.22: N-asetil sisteinin kimyasal yapısı.	23

Şekil 2.23: Sistein ve sistinin kimyasal yapıları.....	24
Şekil 2.24: Homosistein ve homosistin bileşiklerinin kimyasal yapısı.....	24
Şekil 2.25: Sisteamin bileşiğinin kimyasal formülü.	24
Şekil 2.26: 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidinin kimyasal yapısı.	25
Şekil 2.27: TMB ile Ag(I) için önerilen reaksiyon.	25
Şekil 2.28: Rodamin B' nin molekül yapısı.	26
Şekil 4.1: Sodyum sülfid için en uygun konsantrasyonun belirlenmesi.	35
Şekil 4.2: Kobalt (II) heptahidrat için en uygun konsantrasyonun belirlenmesi.....	36
Şekil 4.3: TMB için en uygun konsantrasyonun belirlenmesi.	36
Şekil 4.4: En uygun ortam sıcaklığının belirlenmesi.	37
Şekil 4.5: En uygun reaksiyon süresinin belirlenmesi.	38
Şekil 4.6: Galik asit için sülfoksi radikalleri süpürme yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.	39
Şekil 4.7: Kateşin için sülfoksi radikalleri süpürme yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.....	40
Şekil 4.8: Askorbik asit için sülfoksi radikalleri süpürme yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.	40
Şekil 4.9: Epikateşin için sülfoksi radikalleri süpürme yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.	41
Şekil 4.10: Ferulik asit için sülfoksi radikalleri süpürme yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.	41
Şekil 4.11: L-sistein için sülfoksi radikalleri süpürme yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.	42
Şekil 4.12: Kafeik asit için sülfoksi radikalleri süpürme yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.	42
Şekil 4.13: L-glutasyon için sülfoksi radikalleri süpürme yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.	43
Şekil 4.14: N-asetil sistein için sülfoksi radikalleri süpürme yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.	43
Şekil 4.15: Kuersetin için sülfoksi radikalleri süpürme yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.	44

Şekil 4.16: <i>p</i> -kumarik asit için sülfoksi radikalleri süpürme yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.	44
Şekil 4.17: Naringenin için sülfoksi radikalleri süpürme yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.	45
Şekil 4.18: Rodamin B yöntemi için sodyum sülfıt konsantrasyonunun belirlenmesi.	51
Şekil 4.19: Rodamin B yöntemi için kobalt (II) heptahidrat konsantrasyonunun belirlenmesi.	51
Şekil 4.20: Gallik asidin artan konsantrasyonları ve buna karşılık gelen % bozunma farkları.	55
Şekil 4.21: Kateşinin artan konsantrasyonları ve buna karşılık gelen % bozunma farkları.....	55
Şekil 4.22: Askorbik asidin artan konsantrasyonları ve buna karşılık gelen % bozunma farkları.	56
Şekil 4.23: L-sisteinin artan konsantrasyonları ve buna karşılık gelen % bozunma farkları...	56
Şekil 4.24: L-glutasyonun artan konsantrasyonları ve buna karşılık gelen % bozunma farkları.	57
Şekil 4.25: Kuersetinin artan konsantrasyonları ve buna karşılık gelen % bozunma farkları.	58
Şekil 4.26: Naringenin artan konsantrasyonları ve buna karşılık gelen % bozunma farkları.	58
Şekil 4.27: Ferulik asitin artan konsantrasyonları ve buna karşılık gelen % bozunma farkları.	59
Şekil 4.28: Epikateşinin artan konsantrasyonları ve buna karşılık gelen % bozunma farkları.	59
Şekil 4.29: <i>N</i> -asetil sisteinin artan konsantrasyonları ve buna karşılık gelen % bozunma farkları.	60
Şekil 4.30: <i>p</i> -kumarik asitin artan konsantrasyonları ve buna karşılık gelen % bozunma farkları.	61
Şekil 4.31: Kafeik asitin artan konsantrasyonları ve buna karşılık gelen % bozunma farkları.	61
Şekil 5.1: TMB'nin yük transfer kompleksi oluşumu.....	66

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Reaktif oksijen ve azot türleri.	5
Tablo 2.2: Antioksidan maddelerin sınıflandırılması ve genel özellikleri.	22
Tablo 4.1: Sülfoksi radikali süpürme yöntemi için uygun çözücünün seçilmesi.	38
Tablo 4.2: Önerilen yöntemde uygulanan antioksidan bileşiklerinin doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları, lineer çalışma aralıkları, LOD ve LOQ değerleri.....	46
Tablo 4.3: ikili sentetik antioksidan karışımlarına ait yüzde (%) hata değerleri.....	47
Tablo 4.4: Üçlü sentetik antioksidan karışımlarına ait yüzde (%) hata değerleri.....	48
Tablo 4.5: CUPRAC yönteminin ikili sentetik antioksidan karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen yüzde (%) hata değerleri.	49
Tablo 4.6: CUPRAC yönteminin üçlü sentetik antioksidan karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen yüzde (%) hata değerleri.....	50
Tablo 4.7: Rodamin B yönteminde ortam sıcaklığının belirlenmesi.....	52
Tablo 4.8: Radikalin oluşması için reaksiyon süresinin belirlenmesi.	53
Tablo 4.9: Spektrofotometrik tayinin optimizasyonu için reaksiyon süresinin belirlenmesi. .	53
Tablo 4.10: Rodamin B konsantrasyonunun belirlenmesi.....	54
Tablo 4.11: Rodamin B yöntemine uygulanan antioksidan bileşiklerinin doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları, lineer çalışma aralıkları, LOD ve LOQ değerleri.....	62
Tablo 4.12: Gerçek Örneklerin mmol GA/g eşdeğeri toplam antioksidan kapasitesi (TAC) değerleri.	63

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
λ	: Dalga boyu
ΔA	: Absorbans farkı
r	: Lineer korelasyon katsayısı
ϵ	: Molar absorplama katsayısı
C	: Derişim
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
$KHSO_5$	: Oxone

Kısaltmalar	Açıklama
LOD	: Gözlenebilme sınırı (Limit of Detection)
LOQ	: Tayin sınırı (Limit of Quantitation)
Nc	: Neokuproin
CUPRAC	: Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RNS	: Reaktif Azot Türleri
CAT	: Katalaz
SOD	: Süperoksit Dismutaz
GR	: Glutasyon Redüktaz
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
R	: Yağ molekülü
$R^\bullet$	: Reaktif yağ molekülü
$L^\bullet$	: Lipid radikali
$LOO^\bullet$	: Lipid peroksit radikali
LOOH	: Lipid hidroperoksit
$O_2^{\bullet-}$	: Süperoksit anyon radikali
$^{\bullet}OH$	: Hidroksil radikali
$HOO^\bullet$	: Hidroperoksil radikali

ROO[•]	: Peroksil radikali
RO[•]	: Alkoksil radikali
SO₄^{•-}	: Sülfat radikali
SO₃^{•-}	: Sülfat radikali
NO[•]	: Azot Oksit
PMS	: Peroksimonosülfat
PS	: Persülfat
TMB	: 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin
[•]OH	: Hidroksil radikali
HOCl	: Hipoklorit
¹O₂	: Singlet Oksijen
O₃	: Ozon
QR	: Kuersetin
CT	: Kateşin
KAM	: Kamferol
GA	: Gallik Asit
AA	: Askorbik Asit
VA	: Vanilik Asit
CMA	: <i>p</i> -Kumarik Asit
CGA	: Klorojenik Asit
FS	: Fisetin
RT	: Rutin
CFA	: Kafeik Asit
EC	: Epikateşin
EtOH	: Etanol
NH₄Ac	: Amonyum asetat
TP	: α -Tokoferol

ÖZET

[YÜKSEK LİSANS TEZİ]

[SÜLFOKSİ RADİKALLERİN ve BU RADİKALLERİN SÜPÜRME ESASLI ANTIOKSİDAN AKTİVİTENİN KOLORİMETRİK TAYİNİ İÇİN YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

[Çiğdem AŞILIOĞLU]

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

[Danışman: Prof. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ]

Bir yandan yaşamımız için vazgeçilmez olan oksijen, bir yandan da solunum zincirinde çeşitli reaktif türlerinin (RS) (hidroksil radikali, süperoksit vb.) oluşumuna neden olabilmektedir. Bu türlerin vücudun savunma mekanizmasına katkıda bulunmak ve hücreler arası sinyal üretimi gibi aslında bir takım önemli işlevleri bulursa ROS konsantrasyonunun antioksidanlarca (endojen veya eksojen) dengelenmesi zorunludur. Bu dengenin RS lehine bozunması ‘oksidatif stres’ olarak adlandırılmakta olup bu koşullar altında biyolojik yapıların yıkımına neden olabilecek radikalik zincir reaksiyonları oluşabilmektedir. Antioksidanlar, reaktif türleri giderebilen ve çeşitli insan hastalıklarına yol açabilecek oksidatif stres koşullarını önleyebilen sağlık açısından faydalı bileşiklerdir. Oksidatif stres ile başa çıkmanın yollarından biri antioksidan mıtarı yüksek gıdaların tüketilmesidir. Örneğin meyve ve sebzelerin yapılarında antioksidan özelliklere sahip maddelerin (polifenoller ve vitaminler vb.) çok miktarda bulunduğu bilinmektedir. Dolayısıyla, farklı örneklerde antioksidan kapasitenin (veya aktivitenin) gerçekçi olarak belirlenebilmesi için duyarlı, basit ve ekonomik tayin yöntemlerinin geliştirilmesi önemlidir.

Bu tez çalışmasının amacı, sülfoksi radikallerin ve bu radikallerin süpürme esaslı antioksidan aktivitenin kolorimetrik tayini için, duyarlı, ekonomik ve kolay uygulanabilen bir yöntem geliştirilmesi ve bu yöntemin standart antioksidanların sülfoksi radikallerini süpürme etkinliğinin belirlenmesine uygulanabilmesidir. Geliştirilen yöntemin tayin prensibi, bir geçiş metali olan kobaltın sülfid ile reaksiyonu sonucu ortamda oluşturulan sülfoksi radikalleri ile 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) reaktifi arasındaki reaksiyon sonucu renkli bir katyonik türün oluşturulması ve oluşan rengin şiddetinin 653 nm'de ölçülmesidir. Antioksidanlar varlığında oluşan radikal türler süpürüleceğinden, TMB'den oluşan katyonik türde azalma olacak ve bu da absorbansta da bir azalma olarak kendini gösterecektir. Antioksidanların süpürme etkinliğinin belirlenebilmesi için denemeler seçilen standart antioksidanlar varlığında ve yokluğunda yapılmış, absorbans farkları (ΔA) hesaplanmıştır. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda denenen antioksidanların molar konsantrasyonları ile ΔA arasında doğrusal bir ilişki olduğu saptanmıştır. Ayrıca referans yöntem olarak daha önce literatürde var olan Rodamin B metodu amaca uygun olarak modifiye edilmiştir. Bu yöntemde oluşan radikallerin rodamin B'nin rengini gidermesinden yararlanılmaktadır. Sentetik antioksidanların tek başlarına ve ikili ve üçlü karışımlar halinde denenmesinin ardından geliştirilen yöntem gerçek örnek olarak yeşil çay, beyaz çay ve siyah çay örneklerinin sülfoksi radikallerini süpürme etkinliğinin belirlenmesine uygulanmıştır. Yapılan denemeler sonucunda, test edilen bir dizi antioksidan için sülfoksi radikalleri süpürme etkinliklerinin sıralaması geliştirilen metod ile Epikateşin > Kateşin > Kuersetin > Gallik asit > Ferulik asit > Askorbik asit > L-sistein > Kafeik asit > L-glutasyon > Naringenin > *p*-kumarik asit > N-asetil sistein şeklinde bulunurken bu sıralama Rodamin B yöntemi ile Epikateşin = Kateşin > Kafeik asit > Gallik asit = Ferulik asit = Askorbik asit = L-sistein > N-asetil sistein > Kuersetin > Naringenin > L-glutasyon > *p*-kumarik asit şeklinde belirlenmiştir. Her iki sıralama arasında birtakım farklar olamkla birlikte sonuçların birbiriyle uyumlu olduğu görülmektedir. Yine LOD değerleri karşılaştırıldığında önerilen yöntem için düşük LOD değeri epikateşin için elde edilmiş olup ($3,82 \times 10^{-8} M$), Rodamin B yöntemiyle hesaplanan LOD değeri yine epikateşin için belirlenmiş olup bu değer $3,48 \times 10^{-9} M$ şeklinde bulunmuştur. |

Haziran 2022 , [105] sayfa.

Anahtar kelimeler: [Sülfoksi radikalleri, kolorimetrik tayin, antioksidan maddeler, Co(II), SO_3^{2-} |

ABSTRACT

[M.Sc. THESIS]

**[METHOD DEVELOPMENT for COLORIMETRIC DETERMINATION of
SULFOXY RADICALS and ANTIOXIDANT ACTIVITY BASED ON SCAVENGING
of THESE RADICALS]**

[Çiğdem AŞILIOĞLU]

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Chemistry

Analytical Chemistry

[Supervisor: Prof. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ]

[On the one hand, oxygen, which is indispensable for our life, can also cause the formation of various reactive species (RS) (hydroxyl radical, superoxide, etc.) in the respiratory chain. Although these species actually have some important functions such as contributing to the body's defense mechanism and producing intercellular signals, it is imperative that the ROS concentration be balanced by antioxidants (endogenous or exogenous). The deterioration of this balance in favor of RS is called 'oxidative stress' and under these conditions, radical chain reactions causing destruction of biological structures can occur. Antioxidants have beneficial effects and can remove RS and prevent oxidative stress conditions that can cause various human diseases. One of the ways to cope with oxidative stress is to consume foods having high antioxidant content. As an example, substances having antioxidant properties (polyphenols and vitamins, etc.) are present largely in the structures of fruits and vegetables. Therefore, developing a sensitive, simple and economical determination methods for realistic measurement of antioxidant capacity (or activity) in different samples is important.

In this thesis development of a sensitive, economical and easy-to-apply colorimetric method for determination of sulfoxy radicals and sulfoxy radical scavenging-based antioxidant activity was aimed. The developed method was applied to the determination of the scavenging efficiency of standard antioxidants and real samples. The determination principle of the developed method

was the occurrence of colored cationic species as a result of the reaction between the sulfoxy radicals formed in the reaction medium (as a result of the reaction between cobalt, which is a transition metal, and sulfide) and the 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) reagent. Then the intensity of the color formed was measured at 653 nm. When antioxidants were present in the reaction medium, since the radical species was scavenged, decrease in the cationic species formed from TMB was realized, and it caused a decrease in absorbance. In order to determine the scavenging efficiency of antioxidants, the experiments were carried out with or without selected standard antioxidants, and absorbance differences (ΔA) were determined. In the experiments conducted, a linear relationship between antioxidant concentrations and ΔA was observed. In addition, the Rhodamine B method, which was previously available in the literature, was used as the reference method and it was modified in accordance with the purpose. The radicals formed in this method are used to decolorize Rhodamine B. After testing synthetic antioxidants individually and in combination, the methods were applied to the real samples (green tea, white tea and black tea). As a result of the experiments, the order of sulfoxy radical scavenging activities for tested antioxidants was determined by the developed method as Epicatechin > Catechin > Quercetin > Gallic acid > Ferulic acid > Ascorbic acid > L-cysteine > Caffeic acid > L-glutathione > Naringenin > p-coumaric acid > N-acetyl cysteine. On the other hand, the radical scavenging order determined by Rhodamine B method was Epicatechin = Catechin > Caffeic acid > Gallic acid = Ferulic acid = Ascorbic acid = L-cysteine > N-acetyl cysteine > Quercetin > Naringenin > L-glutathione > p-coumaric acid. Although the rankings obtained by two different methods were not completely the same, the results were highly similar. When the LOD values were compared, the lowest LOD value was obtained for epicatechin ($3,82 \times 10^{-8} \text{M}$) for the proposed method, and the LOD value calculated by the Rhodamine B method was again determined for epicatechin, and this value was found to be $3.48 \times 10^{-9} \text{M}$. |

June 2022, [105] pages.

Keywords: Sulfoxy radicals, colorimetric determination, antioxidant, Co(II), SO_3^{2-} |

1. GİRİŞ

Antioksidan kapasite/aktiviteyi ölçmek için düşük maliyetli ve pratik yöntemlerin geliştirilmesi, analitik kimya açısından önem taşıyan konulardan biridir. Antioksidanlar, reaktif oksijen ve azot türlerini giderebilen ve çeşitli hastalıklara yol açabilecek 'oksidatif stres' koşullarını önleyebilen sağlık açısından faydalı bileşiklerdir [1]. Antioksidanlar organizmaya zarar veren reaktif/radikalik türleri süpürerek onları göreceli olarak daha az zararlı veya zararsız türlere dönüştürebilirler. Bu zararlı türlerin insan sağlığına olan olumsuz etkilerinin engellenebilmesi için vücutta antioksidan maddelerin bulunması gerekmektedir. [2,3]. Günümüzde yaşam bilimleri ve tıpta değişen antioksidan paradigması ile dikkatler her türlü organik kimyasal maddenin (gıda, gıda ambalaj malzemeleri, biyopolimerler, vb.) oksidasyona karşı korunmasına yönelmektedir. Bu nedenle, geleneksel gıda ve biyolojik özlerde, buna ilaveten farklı ortamlarda ve karmaşık matrislerde antioksidan aktivitenin ölçülmesi giderek daha önemli hale gelmektedir [1].

Antioksidan maddelerin aktivitesi bazı esaslara dayanmaktadır. Bunlar radikal süpürme yeteneği, indirgenme potansiyeline bağlı olmak üzere hidrojen donör ve elektron aracı olarak gösterdiği reaktivite, diğer antioksidanlarla meydana gelen etkileşim ve metal kelatlayabilme potansiyelidir [4]. Etki etme mekanizmaları ise toplayıcı, bastırıcı, zincir kırıcı, enzimatik ve onarıcı etki olarak işlemektedir.

Diğer taraftan doğada bozunmaya karşı çok dirençli olan belirli kirleticinin toksisitesinin giderilmesi ve/veya kirleticilerin biyolojik olarak kolaylıkla parçalanabilen ara ürünlerine dönüştürülmesi kısmi oksidasyonla gerçekleşmektedir. Bazen de özel durumlarda tamamıyla oksidasyon son ürünleri olan karbondioksit ve su edilmesi amacıyla kuvvetli oksidanlar olan reaktif türlerden yararlanılabilmektedir. Bu yöntemler genel olarak “ileri oksidasyon prosesleri (İOP)” olarak anılır ve bu amaçla reaksiyon ortamında üretilen yüksek oksidasyon potansiyeline sahip radikaller sıklıkla kullanılır. Kullanılan reaktif türler arasında en çok bilinen $\cdot\text{OH}$ 'nin seçici olmaması hedef kirleticinin giderim veriminin azalmasına sebep olmaktadır. $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 'nin oksidasyon uygulamalarında, $\cdot\text{OH}$ 'ne göre bazı üstünlükleri olan kullanılabilirliğinin araştırılması son yıllarda giderek artmaktadır [5,6,7,8]. $\text{SO}_4^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$ ile hemen hemen birbirine yakın hız sabitleri ile organik bileşiklerle reaksiyona girebilmektedir. Bunun yanı sıra radikal

tüketimine sebep olan bazı inorganik bileşiklerle düşük hız sabitleri ile reaksiyona girebilmektedir. [9].

Sülfat radikallerinin süpürülmesi için kullanılan bir enzim bilinmemektedir. Ancak bu radikaller doğal veya sentetik antioksidanlar tarafından süpürülebilmektedir. Organik kirleticileri oksitlemek için genellikle sülfat radikalleri kullanılır; çünkü sülfat radikalleri, hidroksil radikalleri gibi radikalik türlere nazaran daha seçicidir [10]. Tüm bunlar göz önüne alındığında sülfoksi radikallerinin ileri oksidasyon proseslerinde kullanılması ve açığa çıkan ara ürünlerin analizi çevresel açıdan önemli bir ihtiyaçtır. Bu alanda yapılan çalışmalar genel olarak gelişmiş enstrümantal yöntemlere dayanmakta olup, oldukça pahalı ekipman ve deneyimli operatörlere ihtiyaç duyulur. Tez çalışması, insan sağlığı üzerine direkt etkide bulunabilecek sülfoksi radikallerini süpürme yeteneğine sahip antioksidanların aktivitelerinin mevcut olmayan kolorimetrik metod ile belirlenmesini amaçlamaktadır. Bu nedenle tez çalışması ile varolan bu eksikliği gidermek amacıyla sülfoksi radikalleri ve bu radikallerin süpürülmesi için kullanımı kolay ve uygulaması rahat, stabil ve ekonomik bir kolorimetrik yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu yöntem, bir geçiş metali olan kobaltın, sülfat ile reaksiyonu sonucu ortamda oluşan sülfoksi radikalleri ile, renkli bir reaktif olan TMB arasında meydana gelen reaksiyon sonucu oluşan renkli (mavi) TMB katyonunun renk şiddetinin UV-görünür bölge spektrofotometresi ile 653 nm dalgaboyunda ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Antioksidanlar varlığında oluşan katyonik türde azalma olacağından absorbansta da bir azalma meydana gelir. Bu şekilde denemeler seçilen standart antioksidanlar varlığında ve yokluğunda yapılmış, absorbans farkları (ΔA) hesaplanmıştır. Her bir antioksidan ile aynı işlem yapılmış olup antioksidan konsantrasyonu ile absorbans farkı arasında lineer kalibrasyon denklemleri elde edilmiştir. Geliştirilen yöntem kullanılarak bir dizi antioksidan için gözlenebilirlik sınırları (LOD), tayin sınırları (LOQ) belirlenmiştir. Denen her bir antioksidan için kalibrasyon doğruları çizilmiş ve gerçek örneklerin eşdeğeri antioksidan kapasiteleri gallik asit (GA) eşdeğeri cinsinden belirlenmiştir. Kullanılan antioksidan bileşiklerden ikili ve üçlü sentetik karışım çözeltileri hazırlanarak bu sentetik karışımların beklenen ve bulunan antioksidan kapasiteleri mM TR ekivalenti cinsinden hesaplanarak karşılaştırma yapılmıştır. Çalışmanın bir diğer aşamasında ise referans metod olarak belirlenen rodamin B metodu ile her bir standart antioksidan bileşiklerin kalibrasyon doğruları oluşturulup benzer denemeler gerçekleştirir. Her iki yöntem ayrıca gerçek örnek olarak seçilen yeşil çay,

beyaz çay ve siyah çay örneklerinde toplam antioksidan kapasite ölçümlerinde başarıyla uygulanmıştır.

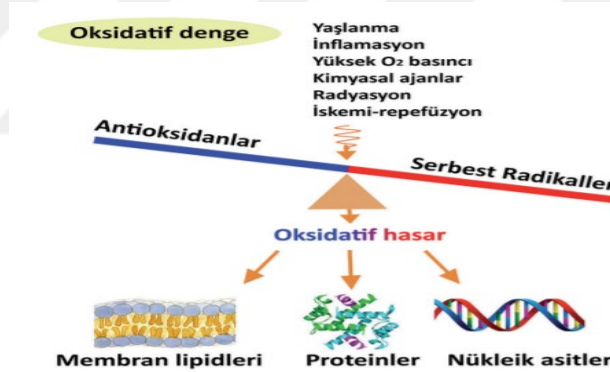


2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. OKSİDATİF STRES VE SERBEST RADİKAL TÜRLERİ

2.1.1. Oksidatif Stres

Serbest radikal, eşleşmemiş elektron içeren atom, atom grubu veya moleküllerdir. Buna göre; moleküler oksijen diradikal olarak kabul edilir [11]. Oksijenin bu özelliklere sahip olması, yüksek reaktivitesi olan kısmen oksitlenmiş ara maddelerin oluşumunu tetikler [12]. Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROS), hücreler arası savunma sistemlerinden organizmada daha çok olması sonucu oluşur (şekil 2.1) [13]. Oksidatif stres ortamında başta kanser, koroner kalp rahatsızlığı, hücresel yaşlanma/yıpranma mutajenizm, DNA hasarı ve hücre membranları hasarı oluşmaktadır [14].



Şekil 2.1: Oksidatif stresin şekilsel gösterimi.

2.1.2. Serbest Radikal Türleri

Serbest radikaller, biyolojik evrimde ve yaşamın kökeninde çok önemli rol oynamıştır. Bununla beraber organizmaya yararlı etkileri vardır. Yüksek aktiviteye sahip olan bu radikallerin yararlarının yanında zararları da çokça fazladır [15]. Serbest radikaller ortaklaşmamış elektronlarından dolayı bazı bileşiklerle rahatlıkla reaksiyona girebilirler. Bu özelliklerinden dolayı genellikle 'reaktif türler' olarak tanımlanmaktadır [16]. Serbest radikaller, insan vücudunda metabolik ve fizyolojik süreçler sırasında veya doğal olarak çevresel kirleticilere, endüstriyel kimyasallara, x-ışınlarına, ozon ve sigaraya maruz kalmanın bir sonucu olarak üretilmektedir [17].

Serbest radikaller, oksijenli solunum sırasında meydana gelen işlemler sonucu oluşur. Mitekontride gerçekleşen gerçekleşen ATP (adenozin trifosfat) üretimi sonucunda serbest radikaller ortaya çıkar. Oksijenin kullanılması serbest radikal miktarını artırır [18]. Başlıca oluşan serbest radikaller; oksijen içeren radikal türlerden süperoksit anyon ($O_2^{\cdot-}$), hidroksi radikal ($HO^{\cdot}$), hipoklorik asit ($HOCl^{\cdot}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksil radikal ($ROO^{\cdot}$), alkoksil radikal ($RO^{\cdot}$), ve azot içeren radikal türlerden ise peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$), nitrik oksit radikali ($^{\cdot}NO$), ve azot dioksit radikali ($^{\cdot}NO_2$)'dir (tablo 2.1) [19].

Reaktif oksijen ve azot türleri (ROS/RNS) gibi kuvvetli oksidan maddeler, hücre yapısını ve molekülleri zarara uğratabilir.[20]. ROS/RNS türleri tarafından meydana gelebilecek zararlara karşı hücrelerdeki antioksidan savunma sistemi karşı koyacaktır. Buna rağmen yaşam süresince ortaya çıkabilecek reaktif türlerin protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi dokularda hasara yol açabileceği düşünülmektedir [21]. Serbest radikallerin etkisiz duruma getirilmesi, dokuları bu hasarlardan koruyabilmek için oldukça önemlidir. Antioksidan bileşikler ROS türlerinin zararlı etkilerini en aza indirebilirler [22].

Tablo 2.1: Reaktif oksijen ve azot türleri.

Radikaller		Nonradikaller	
Süperoksit	$O_2^{\cdot-}$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Hidroksil	$OH^{\cdot}$	Hipokloröz asit	$HOCl$
Peroksil	$ROO^{\cdot}$	Hipobromöz asit	$HOBr$
Alkoksil	$RO^{\cdot}$	Singlet oksijen	$^1O_2$
Hidroperoksil	$HO_2^{\cdot}$	Ozon	O_3
Lipid peroksil	$LOO^{\cdot}$		

Radikaller		Nonradikaller	
Nitrik oksit	$NO^{\cdot}$	Nitrik asit	HNO_2
Nitrojen dioksit	$NO_2^{\cdot}$	Nitrosil katyonu	NO^+
		Nitroksil anyonu	$NO^{\cdot-}$
		Dinitrojen tetroksid	N_2O_4
		Dinitrojen trioksit	N_2O_3
		Peroksinitrit	$ONOO^{\cdot-}$
		Peroksinitrik asit	$ONOOH$
		Nitronyum katyonu	NO_2^+
		Nitril klorid	NO_2Cl
		Alkil peroksinitrit	$ROONO$

2.1.3. Serbest Radikallerin Metabolizmaya Etkileri

2.1.3.1. Serbest Radikallerin Nükleik asitlere ve DNA'ya Etkileri

Serbest radikaller özellikle hidroksil radikali (HO[•]) olmak üzere DNA zinciri kırılmalarına ve nükleik asit bazlarının modifikasyonuna neden olur. Serbest radikallerin, DNA ile reaksiyonu sonucu meydana gelen hücre mutasyonları ve ölüm iyonize radyasyondan kaynaklanır. Bu olaydan genellikle hidroksil radikali sorumlu tutulmaktadır. Aynı zamanda hidroksil radikali DNA polimeraz aktivitesini inhibe ederler [23,24,25]. Hidrojen Peroksit, hücre duvarından kolaylıkla geçerek çekirdeğe ulaşır. Bu durum DNA'yı hasara uğratabileceği gibi, hücre ölümüne varacak kadar tehlikeli durumlara da ulaşabilmektedir [26].

2.1.3.2. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri

Özellikle oksijen içeren ROS'ların en tehlikeli yanı hücre katmanları lipid peroksidasyonu ile yıkıma uğratmasıdır [27].

Lipid radikalleri (L[•]) dayanıksız radikallerdir ve devamlı surette değişirler (Eşitlik 2.1). Lipid radikallerinin moleküler oksijen ile (O₂) reaksiyonu sonucu lipid peroksit radikalleri (LOO[•]) meydana gelir (Eşitlik 2.2). Bir taraftan oluşan radikaller, membrandaki çoklu doymamış yağ asitleri ile etkileşime girerek yeni radikallerin meydana gelmesine sebep olurken, bu duruma eş zamanlı olarak hidrojen atomlarını alarak lipid peroksitlerine (LOOH) dönüşmektedirler (Eşitlik 2.3). Bu şekilde bu olaylar, kontrol altına alınamayan zincirleme radikalik reaksiyonların kendiliğinden gerçekleşmesinde katalizör olarak rol oynar. Bu reaksiyonlar doğrudan hücre duvarına zarar verir ve lipid peroksitlerinin metabolik olarak yıkılması sonucu oldukça aktif aldehitler oluşur. Böylece, bunlar hücre bölümlerine oksidatif hasarı yayarak dolaylı yoldan etki gösterir [26].



2.1.3.3. Serbest Radikallerinin Proteinlere etkileri

Proteinlerin serbest radikallerden etkilenebilirlik ölçüleri, proteinlerin yapı taşı olan amino asit türlerinin çeşidine bağlıdır. [28]. Özellikle kükürtlü (örn: metiyonin, sistein, histidin, gibi) ve doymamış amino aside sahip olanlar çok hızlı etkilenecek reaksiyon vermektedirler. Serbest radikallerden hem proteinleri de hemoglobinde önemli oranda zarar görür. Oksihemoglobinin hidrojen peroksit (H_2O_2) veya süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) ile reaksiyonu methemoglobin oluşumuna neden olur [26].

2.1.3.4. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri

Karbonhidratlar özellikle $HO^{\cdot}$ ile tepkime sonucu radikal üretimine sebep olur. Oluşan bu radikaller önemli moleküllerde (hyaluronik asit) zincir kırılmalarına neden olmaktadır [29].

2.2. SÜLFOKSİ RADİKALLERİ

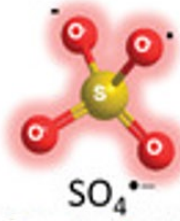
Kükürt dioksit önemli bir hava kirleticisidir. Sulu formu olan sülfid anyonunun; kükürtlü radikalleri $SO_3^{\cdot-}$, $SO_4^{\cdot-}$ ve $SO_5^{\cdot-}$ içeren zincirleme bir reaksiyon yoluyla hızla otookside olduğu bilinmektedir. Sülfidin, serbest radikal oluşumu koşulları altında, yani oksijen varlığında DNA'ya zarar verdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, bu tür zararlı reaksiyonların kinetiği ve mekanizmaları bugüne kadar araştırılmamıştır [30]. Sodyum sülfid ışığa çok duyarlıdır, kuantum verimi yaklaşık 10^5 'tir [31]. Ayrıca anilin, karbonhidratlar veya gliserol gibi bazı organik bileşiklerin varlığına da duyarlıdır; bunlardan herhangi biri, eğer küçük miktarlarda eklenirse, sülfid çözeltisini oksijene karşı stabil hale getirir [31].

2.2.1. Sülfat Radikalleri

Hidroksil ($^{\cdot}OH$) ve sülfat radikali ($SO_4^{\cdot-}$) gibi serbest radikaller, en çok kullanılan oksitleyici maddeler arasında önemli bir yere sahiptir. Yüksek oksitleyici yeteneklerine ek olarak, sülfat radikalleri genellikle peroksimonosülfat (PMS) ve persülfat (PS)'dan üretilir. İOP'lerde sülfat radikallerine dayalı çalışmalar genellikle $K_2S_2O_8$, $Na_2S_2O_8$ ve $KHSO_5$ (oxone) gibi sülfat tuzları ile yürütülmüştür [32,33,34]. $SO_4^{\cdot-}$ radikalleri H_2O_2 bazlı aktivasyon, termal aktivasyon, UV radyasyonu, alkali ortam aktivasyonu, metal aktivasyonu yöntemleri ile aktiveleştirilebilir [32,35].

2.2.1.1. Sülfat Radikallerinin Özellikleri

Organik kirleticileri oksitlemek için $\text{SO}_4^{\bullet-}$ radikalleri, hidroksil radikallerine nazaran daha seçicidir [32]. Sülfat radikali tek bir elektrona sahip olup çok güçlü bir oksidandır (şekil 2.2). Fosfat veya nitrat radikallerinden daha yüksek oksidasyon gücüne sahiptir [36,37]. $\text{SO}_4^{\bullet-}$, geniş bir pH aralığında (2-8) reaksiyona girebilmektedir. Nötral pH'larda $\text{OH}^{\bullet}$ radikali, $\text{SO}_4^{\bullet-}$ radikali ile karşılaştırıldığında, $\text{SO}_4^{\bullet-}$ radikalinin daha yüksek standart redüksiyon potansiyeline sahip olduğu görülmüştür (sırasıyla 1,8-2,7 V ve 2,5-3,1 V). Asidik pH'larda ise her ikisi de benzer bir redüksiyon potansiyeli göstermiştir [38,39].



Şekil 2.2: Sülfat radikalinin molekül yapısı.

Hidroksil ve sülfat radikalleri hücre yapıları ve fonksiyonları üzerinde ciddi hasarlar meydana getirerek zararlı mikroorganizmaların inaktivasyonunda kullanılmaktadır. Bu sebeple etkili bir oksidan olan $\text{SO}_4^{\bullet-}$, su arıtımı için son yıllarda giderek daha fazla uygulanmaktadır [40].

Sülfat radikallerinin yarılanma ömrünün yaklaşık 30-40 μs olması beklenir. Hidroksil radikallerinin ise yarılanma ömrü 20 ns'dir. Bu durum sülfat radikallerinin hidroksil radikallerine göre, hedef bileşiklerle daha iyi temas etmesine ve daha kararlı kütle transferine olanak sağlar [41,38].

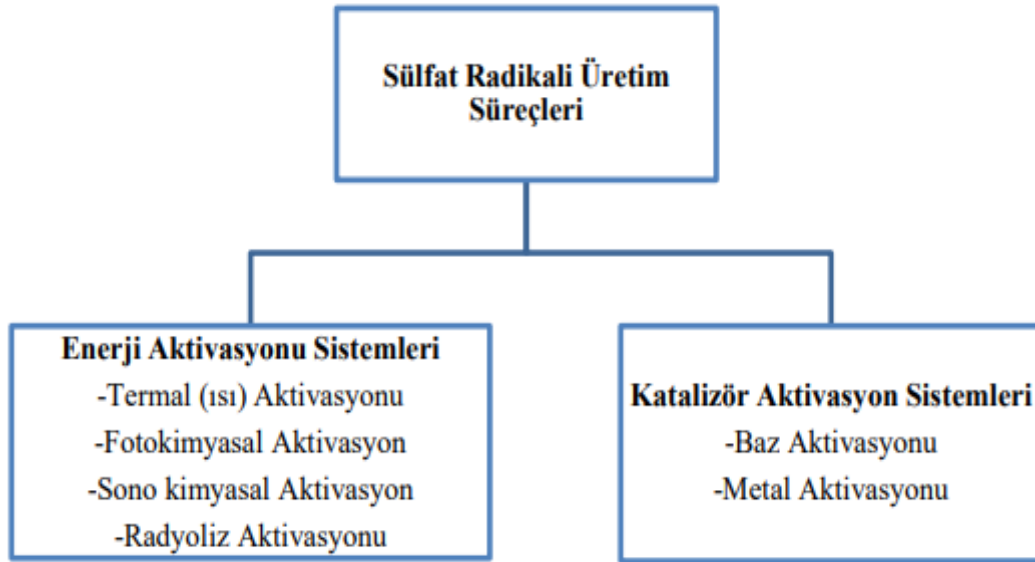
2.2.2. Sülfat Radikallerinin Oluşumu

$\text{SO}_4^{\bullet-}$ oluşumunu sağlamak için, Peroksimonosülfat veya Persülfat bileşikler aktivatör aracılığıyla ayrıştırma işlemine tabii tutulur. PS ve/veya PMS bileşikler, sülfat radikali oluşturulması için organik maddelerin (kirletici) etkili, hızlı olarak ayrışması için aktive edilebilir. $\text{SO}_4^{\bullet-}$ 'nin aktivasyonu, farklı yöntemler ile elde edilebilir [42]. Şekil 2.3'te sülfat radikallerinin PMS ile geçiş metalleri arasındaki aktivasyon sonucu oluşması şematize edilmiştir [41].



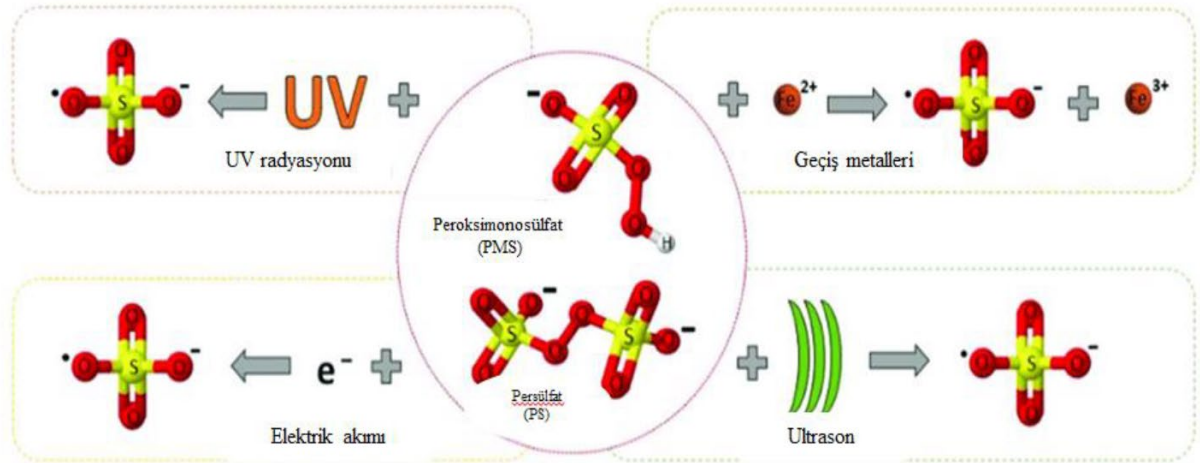
Şekil 2.3: PMS'nin geçiş metalleriyle aktivasyonu.

Persülfatın literatürde aktivasyonu sonucu $\text{SO}_4^{\bullet-}$ radikali oluşumuna dair fazlaca çalışma bulunmaktadır. [43,44]. Sülfat radikallerinin oluşum süreçleri iki farklı grup altında incelenebilir (Şekil 2.4)[45].



Şekil 2.4: Sülfat radikali oluşum süreçleri

Literatürde PS'den ve PMS'den sülfat radikali üretmek için geçiş metali aktivasyonu, UV radyasyonu, elektrik akımı ve ultrason gibi farklı stratejiler vardır (şekil 2.5). [46].



Şekil 2.5: Sülfat radikalleri oluşumunda kullanılan aktivasyon yöntemleri.

2.2.3. Katalizör Aktivasyon Sistemleri

2.2.3.1. Geçiş Metalleri Aktivasyonu

Maliyetinin ucuz ve toksisitesinin düşük olması sebebiyle Fe^{2+} iyonları aktivasyonda yaygın olarak kullanılmaktadır.



Fe^{2+} iyonları Fe^{3+} iyonlarına göre peroksidisülfat (PDS) ve PMS oksidantlarını aktive etmede daha etkindir (Eşitlik 2.4 ve 2.5). PDS ve PMS oksidantları geçiş metalleri ile etkin bir şekilde aktive edilebilmesine karşın bu aktivasyon yönteminde karşılaşılan sınırlamalar şöyle sıralanabilir:

- ❖ Reaksiyon ortamından çözülmüş metal iyonlarının uzaklaştırılmasının zorluğu,
- ❖ Organik kirletici miktarının fazla olması halinde fazla miktarda metal iyonlarının kullanılmasının gerekliliği,
- ❖ Bu aktivasyon yönteminin etkinliğinin pH'a bağlılığı ve metal iyonlarının asidik veya bazik koşullara göre farklı bileşikler oluşturabilmesi,
- ❖ Organik bileşiklerin metal iyonlarına bağlandığında radikal oluşumunun azaltılması [47,48,49].

Anipsitakis ve diğ. (2003), PMS'nin kobalt ile bozunmasıyla sülfat radikalleri üretmiştir (Eşitlik 2.6). Bu, fenton reaktifinin bir modifikasyonudur, çünkü bir oksitleyici, bir geçiş metali ile benzer şekilde birleştirilir. Co/PMS'nin geleneksel fenton reaktifine kıyasla avantajı, sülfat radikallerinin hidroksilden daha güçlü oksidanlar olması nedeniyle oluşan radikallerin oksitleme gücünün olmasıdır [10].

Yapılan çalışmalar sonucu Ag^+ iyonunun PDS aktivasyonunda (Eşitlik 2.7), Co^{2+} iyonunun ise PMS aktivasyonunda etkin olduğu belirlenmiştir [48];



Sülfat radikallerinin geçiş metali aktivasyonu ile üretiminde tercih edilen en yaygın metal demir olmasına rağmen; Ag, Cu, Zn, Co ve Mn, SO_4 üretiminde geçiş metali katalizörleri olarak da yaygın olarak kullanılmaktadır. M^{n+} 'nın metal iyonunu temsil ettiği ilgili reaksiyon eşitlik 2.8'deki gibi gösterilebilir:



Bazı durumlarda, sülfat radikalinin oluşumunu hidroksil radikalinin oluşumu takip edecektir. İlgili reaksiyon eşitlik 2.9'daki gösterilmiştir:



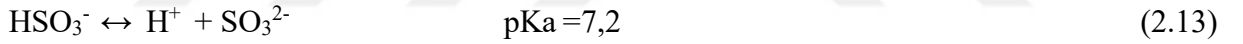
Reaksiyon ortamında uygun miktarda çözünen madde bulunmadığında, sülfat radikalleri kendiliğinden çözünme veya $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ ile reaksiyona girerek eşitlik 2.10 ve 2.11'deki gibi ayrışabilir [37]:



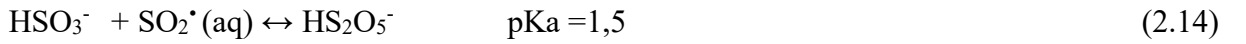
Bu reaksiyonlar, $\text{SO}_4^{\cdot-}$ üretim reaksiyonları sırasında fazla persülfattan kaçınılması gerektiğini göstermektedir. Literatürde kobalt (Co(II)) ve HSO_5^- çifti olarak), mikro veya nano ölçekte bakır, Ce(III), Ni(II), Ru(III), V(III), CuO ve MnO_2 gibi $\text{SO}_4^{\cdot-}$ üretimi için farklı metallerin kullanıldığı bazı çalışmalar bulunmaktadır [37]. Aslında literatürde sülfat radikallerinin spektrofotometrik tayini için çok az çalışma bulunmaktadır. Bu durumun muhtemel nedeni, kısa ömrü ve yüksek reaktivitesi nedeniyle sülfat radikallerinin doğrudan belirlenmesinin kısıtlanmasına bağlanabilir. Bu sınırlı sayıda çalışmadan birinde, Wang ve diğ. Ce(III)'ün $\text{SO}_4^{\cdot-}$ ile oksidasyonuna bağlı olarak bir yöntem önerilmiş ve üretilen Ce (IV) spektrofotometrik olarak 320 nm'de ölçülmüştür [50].

2.2.4. Sülfite Radikalleri

Kükürt dioksit, öncelikle fosil yakıtların yanması sırasında oluşan önemli bir hava kirleticidir. Diğer kaynaklar arasında doğal gaz temizleme, doğal olarak yayılan indirgenmiş kükürt bileşiklerinin oksidasyonu ve sülfür cevherlerinin eritilmesi yer alır. Kükürt dioksit suda çözünür, bisülfite ve sülfite oluşturur (eşitlik 2.12 ve 2.13).



Çok yüksek konsantrasyonlarda disülfite eşitlik 2.14'teki gibi oluşur.



Sülfite güçlü bir nükleofil olup elektrofilik pozisyonlarda substitüsyon reaksiyon yoluyla birçok biyomolekül ile reaksiyona girmektedir. Bisülfitin sistin (RSSR) ile reaksiyonu eşitlik 2.15'teki gibidir;



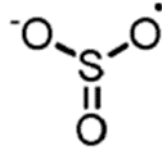
Bu reaksiyon, pH 7.75 ve 37°C'de 0.089'luk bir denge sabitine sahiptir. Büyük RSSR konsantrasyonu, kandaki sülfitin çoğunun S-sülfosistein, RSSO_3^- olarak bağlanmasına neden olmaktadır [51].

Lipid peroksidasyonu sülfid tarafından indüklenmiştir. Bu reaksiyon sadece bir antioksidan olan 2,6-di-tert-bütil-4-hidroksimetilfenol tarafından değil, aynı zamanda Mn^{2+} tarafından da sonlandırılabilir. Lipid peroksidasyonunun Mn^{2+} ile bu şekilde baskılanması sıçan karaciğer homojenatında da gözlenmiştir [52].

2.2.4.1. Sülfid Radikallerinin Özellikleri

Sülfid çözeltilerinin otoksidasyonunun eser miktarda geçiş metali iyonları tarafından kuvvetli bir şekilde katalize edildiği bulunmuş, daha yüksek oksidasyonlu durumlarda sülfidin metal iyonları ile reaksiyonu birçok çalışmaya konu olmuştur. Bu çalışmalar çoğunlukla sülfidin bu metal iyonlarını kompleks hale getirebilmesiyle iç içedir. Bu kompleksler genellikle oldukça karardır; sülfidi hava oksidasyonundan korumak için civa iyonu (klorür varlığında) kullanılmaktadır. Diğer metal iyon-sülfid kompleksleri daha kararsızdır, muhtemelen indirgenmiş metal iyonuna ve sülfid serbest radikaline ayrışır.

$Mn(III)$ gibi güçlü oksitleyiciler için reaksiyon hızlıdır ve görünürde reaksiyon geri döndürülemez yani irreversibl'dir. $Fe(III)$ gibi daha zayıf oksitleyiciler için reaksiyon çok daha yavaş ve tersinirdir [53].



Şekil 2.6: Sülfid radikalinin molekül yapısı.

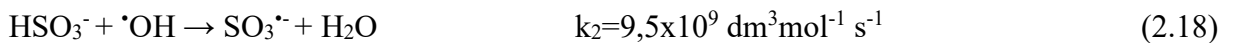
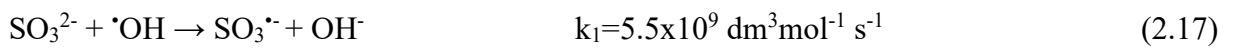
2.2.4.2. Sülfid Radikallerinin Oluşumu

Sülfid radikali en yaygın olarak hidroksil radikallerinin sülfid veya bisülfid ile reaksiyonu ile üretilir (eşitlik 2.16).



Bu radikalın, $S_2O_6^{2-}$ 'nin flash fotolizi ile üretildiği rapor edilmiştir. [36].

Sülfid radikali, N_2O 'nun doymuş sulu çözeltisinde sülfidin hidroksil radikalleri ile reaksiyonu ile eşitlik 2.17 ve 2.18'de verildiği gibi üretilmiştir [53].



Erben-Russ ve arkadaşları, birkaç nükleik asit bileşeninin sülfid ile krosin kullanarak reaktivitelerini incelediler. Dört DNA veya RNA bazının (adenin, sitozin, timin ve urasil) ve beş nükleozidin SO_3^- ile reaksiyonu araştırıldı. Bu sonuçlar DNA hasarının sülfidin otoksidasyonundan kaynaklandığını göstermiştir. Ancak bu hasar doğrudan SO_3^- radikallerine atfedilemedi. Bu nedenle, sülfid otoksidasyonunda yer alan diğer radikallerin, yani SO_4^- ve SO_5^- 'in DNA bileşenleriyle daha verimli reaksiyona girip girmediğini göstermek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.[54].

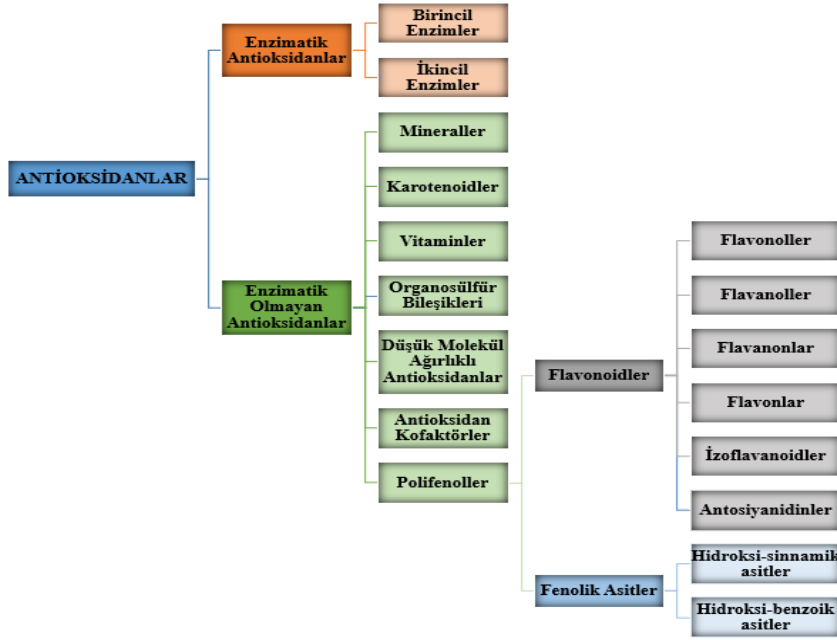
2.3. ANTİOKSİDANLAR

Antioksidan maddeler, yükseltgenebilen bileşiklere kıyasla daha düşük derişimlerde, substratın prooksidanlarla başlatılan oksidasyonunu büyük ölçüde önlenmesine neden olan veya geciktiren maddeler olarak tanımlanabilir. [2,3].

Antioksidan savunma mekanizmaları ikiye ayrılarak, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak adlandırılırlar [55]. Enzimatik antioksidan sistemler, özellikle katalazlar (CAT), tiyoredoksin sistemler, glutatyon peroksidaz (GP_x) ve süperoksit dismutazları (SOD) içermektedir. Enzimatik olmayan antioksidan sistemler ise, glutatyon, bilirubin, ürik asit, cinsiyet hormonları, koenzim Q, askorbik asit, melanin, melatonin, lipoik asit ve α -tokoferol'dür [56].

2.4. ANTİOKSİDANLARIN SINIFLANDIRILMASI

Antioksidan bileşikler iki farklı kategoride incelenebilir.



Şekil 2.7: Antioksidanların sınıflandırılmasına ait şema.

2.4.1. Enzimatik Antioksidanlar

Reaktif oksijen türlerinin nötralleşmesinde direk olarak görev alırlar. Bu antioksidan bileşikler sırasıyla; SOD, GPx, GRx ve CAT' dır [55].

2.4.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD; eşitlik 2.2'de görüldüğü gibi süperoksitin, H_2O_2 ve O_2 oluşumunu sağlamakta görevli enzimdir. Meydana gelen hidrojen peroksitin etksiz hale getirilmesinde, katalaz ve GPx enzimi görevlidir [57].



SOD, bir metalo-enzim olduğundan dolayı etkinlik gösterebilmesi için bir metale kofaktör olabilmesi için gereksinim duyar [58].

2.4.1.2. Katalaz (CAT)

CAT, moleküler oksijen ve su oluşumu için H_2O_2 'in Eşitlik 2.5'te gösterildiği gibi, ayrışmasında görevlidir.[59].



Katalaz, lipidlerin hidro-peroksitlerini etkilememektedir [60].

2.4.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx)

Peroksitlerin indirgenmesini katalizleyerek hücre içerisindeki indirgenmiş formdaki glutasyonu (GSH) yükseltgenmiş formdaki glutatona (GSSG) dönüştürmekte GPx enzimi görev alır. [61].



2.4.1.4. Glutasyon Redüktaz (GRx)

Okside haldeki GSSG'nun tekrar indirgenmiş glutatona GSH dönüşümünden sorumlu enzimdir.[62].

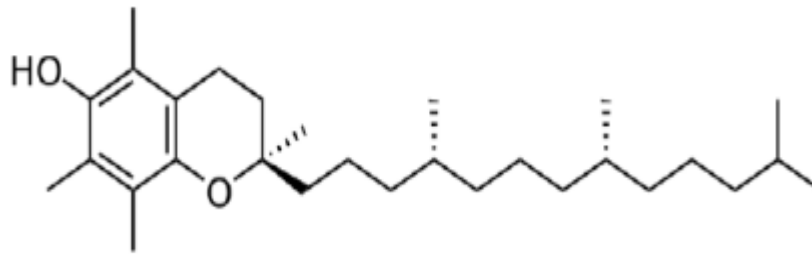


2.4.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Endojen veya eksojen bazlı olmak üzere ikiye ayrılırlar. E, C ve A vitaminleri eksojen bazlı iken, ferritin, hemoglobin, ürik asit, bilirubin, melatonin, laktoferin, albümin, askorbik asit, miyoglobin, ve glutasyon ise endojen kaynaklı antioksidanlardır [55,63,14].

2.4.2.1. E Vitamini

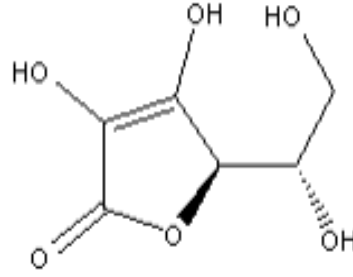
E vitamini, tokoferoller ve tokotrienoller olarak da isimlendirilebilir. Bunun yanı sıra, hem tokoferollerin hem de tokotrienollerin α -, β -, γ - ve δ - olmak üzere dörder izomeri vardır [64]. Tamamı antioksidan aktiviteye sahip olsa da, α -tokoferol hem kimyasal hem de biyolojik olarak en aktif olanıdır [65,66].



Şekil 2.8: α -tokoferolün kimyasal yapısı.

2.4.2.2. C Vitamini

C vitamini (askorbik asit), organizmanın en fazla gereksinim duyduğu vitamin olup, sebze ve meyvelerde çok miktarda bulunup, radikalleri direkt olarak süpürebilen suda çözünebilir antioksidan bileşiklerdir [67].

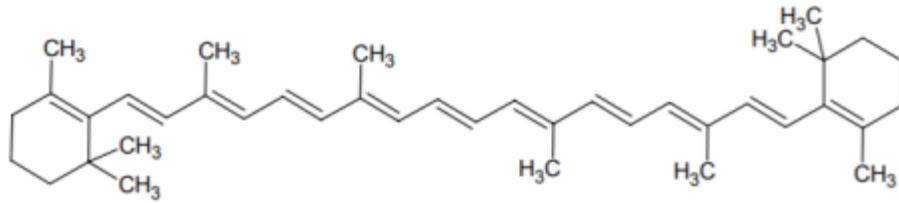


Şekil 2.9: Askorbik asitin moleküler yapısı.

Antioksidan aktivite özellik gösteren 2 ayrı bileşiği vardır. Her iki bileşik birbirlerine hücre içerisinde enzimler yardımıyla dönüşebilir [68].

2.4.2.3. Karotenoidler

Karotenoidlerin kendilerine has renkleri sarı, kırmızı ve turuncudur. Bu renklenmenin nedeni sahip oldukları konjuge çifte bağlardır [69]. Karotenoidlere mikroorganizmalarda, neredeyse tüm bitkilerde ve hayvanlarda rastlanmaktadır. Sayıca oldukça fazla karotenoid çeşidi bilinmektedir.[70]. α -/ β -karoten ve likopenler kimyasal özelliklerine göre karotenler ve ksantofiller olarak ayrılırlar [71]. Karotenoidler radikaller ile reaksiyona girerek, radikalik özellik taşımayan bileşikler meydana getirirler [72].

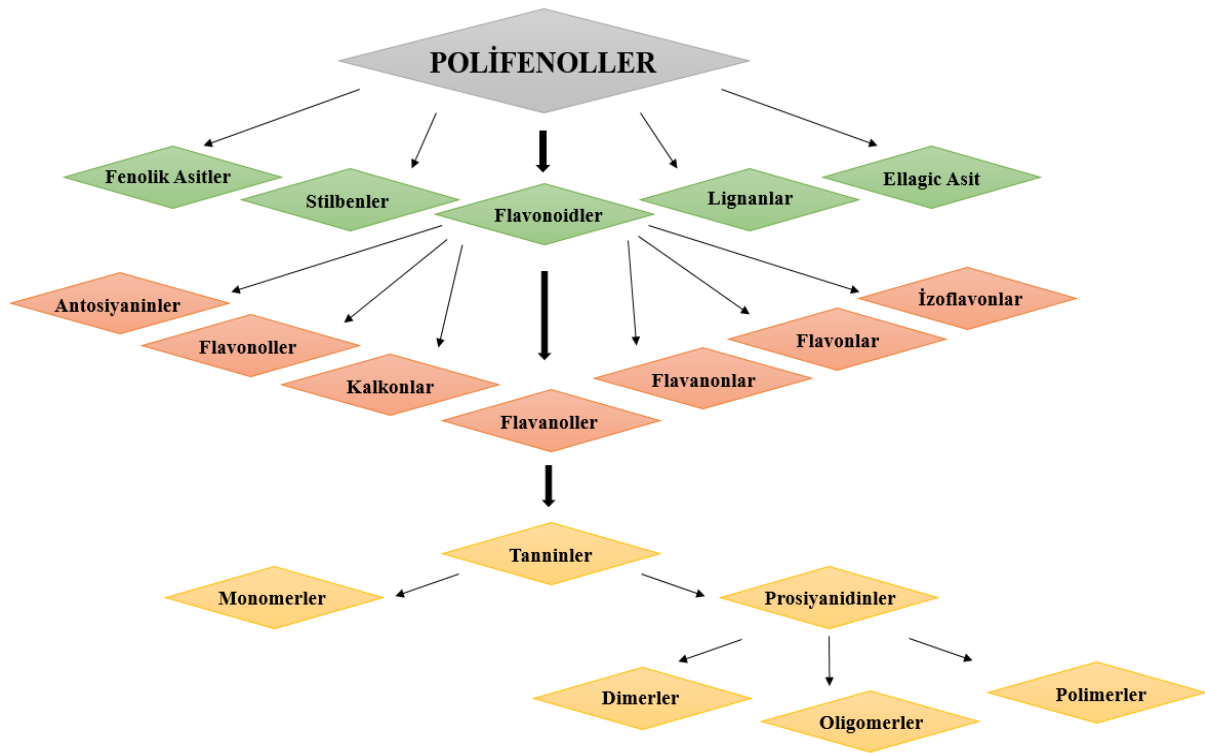


Şekil 2.10: β -Karotenin kimyasal yapısı.

2.4.2.4. Polifenolik Bileşikler

Bu bileşikler en çok meyve-sebzelerde, çayda, bitkilerde, yağda ve kırmızı şarapta bulunur [73]. Doğal polifenolik bileşiklerin sınıflandırılması, bitkilerdeki çeşitliliği ve geniş dağılımına göre yapılabilmektedir. Polifenollerin biyolojik fonksiyonları ve kökenleri ise, kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmıştır [74,75]. Bilim adamları sayıca oldukça fazla polifenol içerikli bileşikler bulmuştur. Kompleks yapıda olmayan polifenollerden kompleks yapıya kadar genellikle bitkilerde bol miktarda gözlemlenmektedir [76]. Polifenolik yapıdaki bileşikler zaman zaman

antioksidan özellikte bazen de prooksidan özellikte görev yapmaktadır [77]. Polifenollerin antioksidan bileşikler olarak tanımlanabilmesi için, çok az miktarlardaki konsantrasyonlarda bile oksidasyonu geciktirebilme, önleme ve hızını azaltma özelliğine sahip olması; bir diğer özelliği ise serbest radikaller ile reaksiyonunda kararlı bir şekilde kalabilmesi gerekmektedir [78].



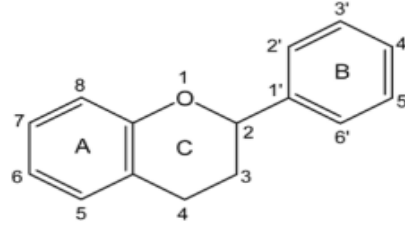
Şekil 2.11: Polifenollerin sınıflandırılması.

2.5. POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN SINIFLANDIRILMASI

2.5.1. Flavonoidler

Bitkiler, kırmızı şarap, sebze-meyve, kakao ve çaylarda yüksek miktarlarda bulunurlar. Gıdalarda genellikle 3-orto glikozitler ve polimerler şeklinde bulunurlar. Aromatik halkalara bağlı birçok fenolik hidroksil grubu içermeleri, yüksek antioksidan aktivite göstermelerinin nedeni olarak kabul edilir. Ayrıca metal kelatlama, lipid peroksidasyon inhibisyonu ve diğer reaktif oksijen türlerinin aktivitelerinin önlenmesi gibi özelliklere de sahiptir. Flavonoidlere bağlanan grupların, pozisyonu, çeşidi ve sayısı önemlidir çünkü bu duruma göre farklı radikal süpürme etkinliği göstereceklerdir [79]. Sınıflandırılmaları; A, B veya C halkasındaki hidroksil

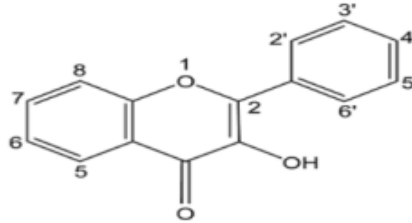
gruplarının sayısına, pozisyonuna, konjugasyonuna ve oksidasyon derecesine dayanır. Flavonoidlerin alt sınıfları flavonlar, izoflavonlar, flavonoller, flavanonlar ve antosiyaninlerdir[80].



Şekil 2.12: Flavonoidlerin genel yapısı.

2.5.1.1. Flavonoller

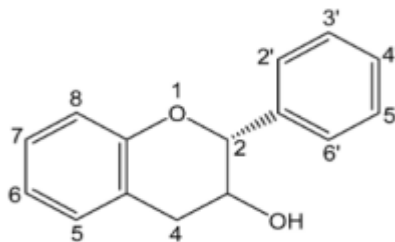
Keton grubuna sahiptirler. Çeşitli meyve ve sebzelerde bulunurlar. En bilinenleri mirisetin, kamferol (KAM), kuersetin ve fisetin'tir.[81].



Şekil 2.13: Flavonollerin genel yapısı.

2.5.1.2. Flavanoller

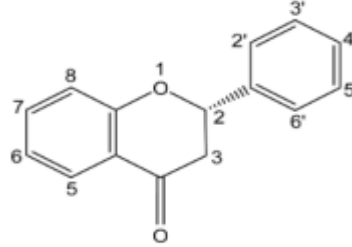
Flavanoller ısıya, yüksek pH koşullarına, çözünmüş oksijen veya diğer reaktif oksijen türlerinin varlığı ile çeşitli bozunma reaksiyonlarına karşı savunmasızdır [82]. Birçok meyvenin kendisinde ve kabuğunda bulunur. Örnek olarak yaban mersini, üzümde bulunur [83].



Şekil 2.14: Flavanollerin genel yapısı.

2.5.1.3. Flavanonlar

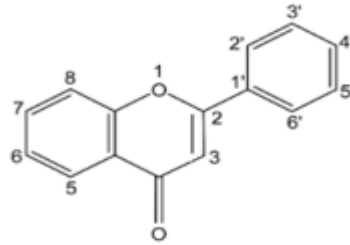
Flavonlar ve flavanonlar arasındaki tek fark, C halkasında çifte bağ bulunmamasıdır. Bu grup en çok hesperitin, naringenin, eriodiktiol ve homoeriodiktiol ile temsil edilir. Hesperitin çoğunlukla portakal ve limonda bulunur. Naringenin greyfurttaki ana flavanondur ve diğer meyve ve bitkilerde de bulunabilir [84].



Şekil 2.15: Flavanonların kimyasal yapısı.

2.5.1.4. Flavonlar

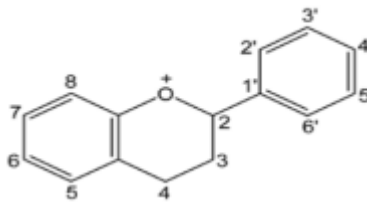
Genellikle domates ve kırmızı şarabın içeriğinde bulunur. [74].



Şekil 2.16: Flavonların genel kimyasal yapıları.

2.5.1.5. Antosiyanidinler

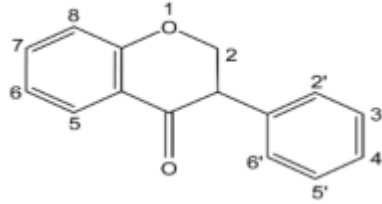
Çiçekteki yaprakların, meyve, sebzelerde bulunan genellikle kırmızı, mavi ve mor olan pigmentlerinin temelini oluşturan bileşiklerdir. Glikozidik formda bitki içeriklerinde bulunur [85].



Şekil 2.17: Antosiyanidinlerin genel yapısı.

2.5.1.6. İzoflavonlar

Aromatik B-halkasının C-halkasındaki 3. karbon atomu ile birleşmesinden oluşur. Bu grubun temsilcileri soya fasulyesinin içeriğinde mevcut olan daidzein, glisitin ve genisteindir [86].

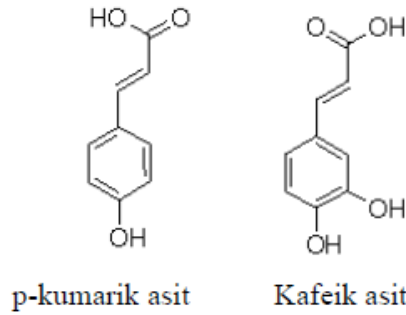


Şekil 2.18: İzoflavonların genel yapısı.

2.5.2. Fenolik Asitler

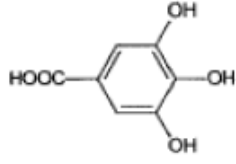
Bitki bazlı gıdalarda yoğun olarak bulunurlar. İki farklı gruptan meydana gelir.

Hidroksi-sinamik asitler, fenil-propanoid türevleridir. Bitkilerde özellikle biyosentetik türevi şeklinde bulunurlar. Ayrıca bunlara bitki içerisinde esteri formunda, organik asitler, şekerler veya lipidler ile birleşmiş şekilde rastlanılmaktadır. Genellikle meyve, sebze, şarap, çay, kahve ve zeytinyağında bulunurlar. Kafeik asit, *p*-kumarik asit ve klorojenik asit bu türe örnek olarak verilebilir [23,87-91].

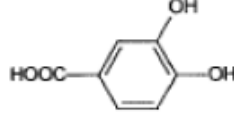


Şekil 2.19: *p*-kumarik asit ve kafeik asitin kimyasal yapıları.

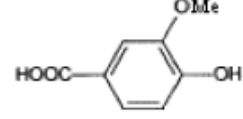
Hidroksi-benzoik asitler (benzoatlar), içeriklerindeki metoksi/hidroksi grup sayısı ve düzenine çeşitleri mevcuttur. Bu benzoatlardan bazıları; gallik asit, vanilik asit ve protokateşuik asittir. En etkili hidroksil radikal süpürücüleri mono hidroksibenzoatlardır [86].



Gallik Asit



Vanilik Asit



Protokateşuik Asit

Şekil 2.20: Gallik asit, protokateşuik asit ve vanilik asidin kimyasal yapıları.

Tablo 2.2: Antioksidan maddelerin sınıflandırılması ve genel özellikleri.

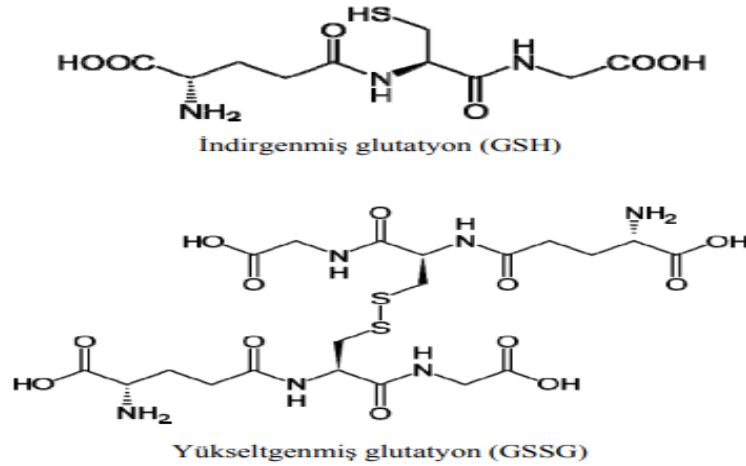
ANTIOKSİDAN SINIFI	ADI	SÜBSTİTÜSYON KONUMLARI	BULUNDUĞU BESİN KAYNAĞI
Flavon	Krisin	5,7-OH	Meyve kabuğu
	Apigenin	5,7,4'-OH	Maydanoz, kereviz
	Luteolin	5,7,3',4'-OH	Kırmızı biber
Flavanol	(+)-Kateşin	3,5,7,3',4'-OH	Çay
	(-)-Epikateşin	3,5,7,3',4'-OH	Çay
	Epigallokateşin gallat	3,5,7,3',4',5'-OH, 3-gallat	Çay
Flavanon	Naringin	5,4'-OH, 7-ramnoglukoz	Turunçgiller, greyfurt
	Naringenin	5,7,4'-OH	Turunçgiller
	Taksifolin	3,5,7,3',4'-OH	Turunçgiller
	Hesperidin	3,5,3'-OH, 4'-OMe, 7-rutinoz	Portakal
	Eriodiktol	5,7,3',4'-OH	Limon
Flavonol	Kamferol	3,5,7,4'-OH	Pırasa, brokoli, hindiba, greyfurt, çay
	Kuersetin	3,5,7,3',4'-OH	Soğan, marul, brokoli, çay, kırmızı şarap, mor meyveler, zeytinyağı, elma kabuğu
	Mirisetin	3,5,7,3',4',5'-OH	Yaban mersini, üzüm, kırmızı şarap
Antosiyanidin	Rutin	5,7,3',4'-OH, 3-rutinoz	Kırmızı şarap, kara buğday, domates kabuğu, turunçgiller
	Apigenidin	5,7,4'-OH	Renkli meyveler
	Siyanidin	3,5,7,4'-OH, 3,5-OMe	Kiraz, ahududu, çilek
İzoflavon	Genistin	5,4'-OH, 7-glukoz	Soya fasulyesi
	Genistein	5,7,4'-OH	Soya fasulyesi
	Daidzin	4'-OH, 7-glukoz	Soya fasulyesi
	Daidzein	7,4'-OH	Soya fasulyesi

2.6. TİYOL GRUBU İÇEREN ANTİOKSİDANLAR

İndirgenmiş glutatyon (GSH), dihidrolipoik asit (DHLA), sistein, homosistein ve bu antioksidan bileşiklerin disülfürleri olan yükseltgenmiş glutatyon (GSSG), lipoik asit (LA), sistin, homosistin önemli olan antioksidanlardır. Diğer antioksidan bileşikler ise, sisteamin metiyonin, 1,4-ditiyoeritritol (DTE), N-asetil sistein (NAC), ve glutatyon etil ester (GSHEE)'dir [91].

2.6.1. Glutatyon

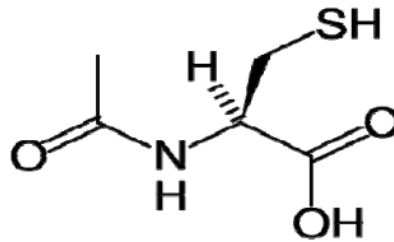
İndirgenmiş glutatyon, serbest sülfidril grubu içeren bir tripeptittir. Glutatyonun indirgenmiş formu, organik peroksitlerin ve hidrojen peroksitin (H_2O_2) neden olduğu detoksifikasyon reaksiyonları için önem teşkil eder [92].



Şekil 2.21: İndirgenmiş ve yükseltgenmiş glutatyonun kimyasal yapısı.

2.6.2. N-Asetil Sistein

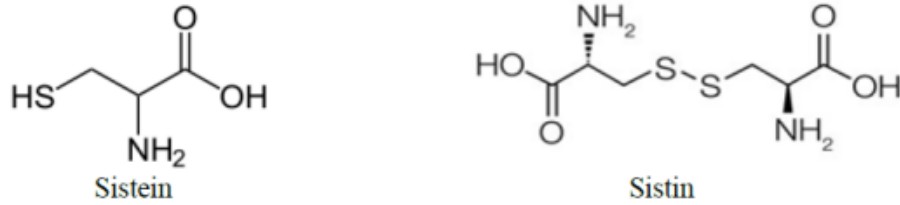
Dolaylı ve dolaysız şekilde olmak üzere antioksidan özellik göstermektedir. Serbest radikallerin elektrofilik yapıdaki bileşenleri ile etkileşebilir [93].



Şekil 2.22: N-asetil sisteinin kimyasal yapısı.

2.6.3. Sistein

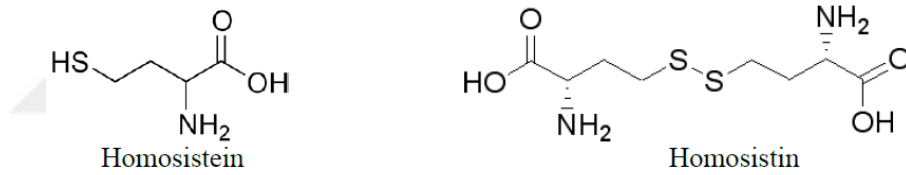
Patalojik kaynaklı ve fizyolojik nedenli olaylarda önemli rol alarak hücrelerin zararlı türlerden etkilenmemesinde önemli rolü olan indirgenmiş glutatyon için gereki olan sentetik maddedir. [94-95].



Şekil 2.23: Sistein ve sistinin kimyasal yapıları.

2.6.4. Homosistein

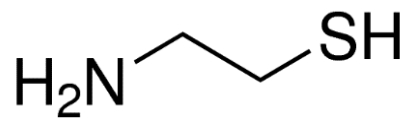
Yapısında tiyol grubu barındıran , düşük molekül ağırlıklı antioksidan bileşiklerdendir. Ara ürün olarak, metiyonin metabolizması sonucu oluşur. [91].



Şekil 2.24: Homosistein ve homosistin bileşiklerinin kimyasal yapısı.

2.6.5. Sisteamin

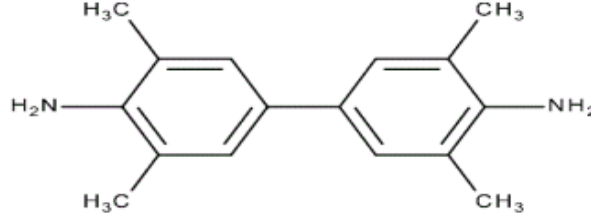
Koenzim A (CoA)'nın ayrışması ile oluşur [96]. Sisteamin somatostatin sentezini azalttığından büyümeyi teşvik etmektedir. Bunun yanı sıra glutatyon miktarını da artırır [97].



Şekil 2.25: Sisteamin bileşiğinin kimyasal formülü.

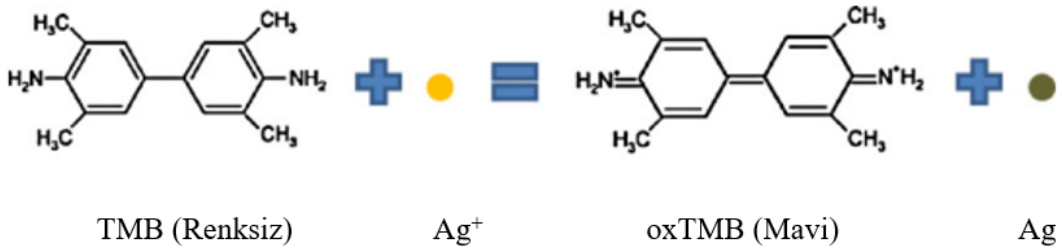
2.7. 3,3',5,5'-TETRAMETİLBENZİDİN REAKTİFİNİN ÖZELLİKLERİ

3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB) genel olarak, düşük kanserojen etkili reaksiyon ürünleri ve yüksek absorpsiyon katsayılı ürünleri vermektedir. 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB) kararsız bir yapıya sahiptir. Ayrıca bazı çözeltilerde ve sulu tamponlarda çok az çözünür. TMB, bir yıl süresince +4 °C sıcaklıkta kararlıdır. [98].



Şekil 2.26: 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin kimyasal yapısı.

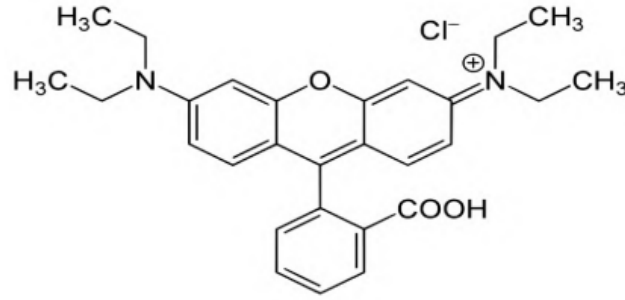
Literatürde gümüş iyonları ile 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin arasında gerçekleşen reaksiyondan yararlanılarak hassas ve kararlı bir tayin yapılmıştır. Burada zayıf asidik pH'da gümüş iyonlarının 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidini yükseltgemesi ile 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin katyonik formuna yükseltgenmiş olur. TMB'nin kendine özgü olan mavi renginin gümüş konsantrasyonu ile doğrusal olarak arttığı gözlemlenmiştir [99]. Tez çalışması kapsamında üretilen radikallerin TMB reaktifini yükseltgemesi sonucu mavi rengin oluşması, antioksidanlar varlığında da bu rengin azalması incelenmiş, bu şekilde sülfoksi radikallerinin süpürülmesi spektrofotometrik olarak izlenmiştir.



Şekil 2.27: TMB ile Ag(I) için önerilen reaksiyon.

2.8. RODAMİN B

Şekil 2.28’de kimyasal yapısı gösterilen rodamin B, üç aril halkasının iki tanesinde dimetilamino grubu, bir tanesinde ise karboksil grubu bulundurmaktadır. Bağlanma eğilimini sağlayan oksokromlar, dimetilamino grubu; rengini veren ise, kation grubunu oluşturan kromofor gruplarıdır [100]. Tez çalışması kapsamında üretilen sülfoksi radikallerinin Rodamin B’nin rengini gidermesi ile dolaylı yoldan radikal üretimi ve antioksidan varlığında ise radikallerin süpürülmesi izlenmiştir.



Şekil 2.28: Rodamin B’ nin molekül yapısı.

Rodamin B floresan özelliği nedeni ile akış yönü ve taşıma oranını belirlemek için su yollarının takibinde; floresans korelasyon spektroskopisi ve mikroskopisi, akış sitometrisi ile ELISA gibi biyoteknoloji uygulamalarında; ilaç, gıda, kozmetik ve tekstil gibi endüstriyel alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır [101,102].

3. YÖNTEM

3.1. CİHAZLAR VE KİMYASALLAR

3.1.1. Cihazlar

Kullanılan cihazlar; kimyasal maddelerin tartımı için RADWAG marka AS 220/C/2 model analitik terazi, hazırlanan çözeltilerin karıştırılmasında Wisemix VM-10 girdap karıştırıcı, kimyasal maddelerin çözünmesine yardımcı olmak için Elmasonic marka ultrasonik banyo, çözeltilerin pH'larının belirlenmesinde HANNA HI221 pH-metre, inkübasyon işlemi için Memmert WNB 22 (Schwalbach, Almanya) su banyosu, absorbans ölçümlerinde Varian Cary 100 Bio model UV-görünür alan spektrofotometresi (Mulgrave, Victoria, Avustralya), ölçüm yapmak için 10 mm ışık yollu bir çift kuartz küvet, çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan bidestile suyun üretimi için GFL 2008 su sistemi.

3.1.2. Kimyasallar

Deneylerde kullanılan tüm reaktifler ve kimyasallar analitik saflıktadır.

Kobalt (II) sülfat heptahidrat, sodyum sülfat, asetik asit, sodyum asetat, amonyum klorür, amonyak, etanol (EtOH), tetrametilbenzidin (TMB), gallik asit (GA), ferulik asit (FA), kateşin (CT), epikateşin (EC), askorbik asit (AA), L-sistein ($C_3H_7NO_2S$) (CYS), kafeik asit (CFA), glutatyon (GSH), N-asetil sistein (NAC), kuersetin (QR), p-kumarik asit (PCA), naringenin (NG), bakır (II) klorür dihidrat ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$), neokuproin (2,9-dimetil 1,10-fenantrolin) hidroklorür (Nc), amonyum asetat (CH_3COONH_4), disodyum hidrojen fosfat dihidrat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$), sodyum dihidrojen fosfat dihidrat ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$), Rodamin B Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya); yeşil, beyaz ve siyah çay (kullanıma hazır poşet çaylar, yerel marketten (İstanbul, Türkiye) alınmıştır).

3.2. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

3.2.1. Sülfoksi Radikallerin Süpürme Aktivite Tayininde Önerilen Yöntemde Kullanılan Çözeltiler

Kobalt (II) Sülfat Heptahidrat Çözeltisi: Kobalt (II) Sülfat Heptahidrat hammaddesinden 2,811 g tartılarak 50 mL lik balon joje içerisinde distile suyla çözülerek çalışma çözeltisi 200 mM olacak şekilde hazırlanmıştır.

1 M pH 8,0 $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ Tampon Çözeltisi: Katı amonyum klorürden 2,5274 g alınarak bir miktar distile su ile çözülerek, pH-metre yardımıyla yaklaşık 200 μL derişik NH_3 çözeltisi kontrollü olarak ilave edilmiş ve toplam hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanmıştır.

0.5 M pH 4.0 HAc/NaAc Tampon Çözeltisi: 0.5 M HAc ve 0.5 M NaAc çözeltilerinin karıştırılmasıyla hazırlandı. 100 mL pH 4,0 tampon çözeltisi, 2,432 mL HAc ile 1,0084 g NaAc'ın karıştırılmasıyla hazırlanmıştır.

Sodyum Sülfat Çözeltisi: 2 mM olacak şekilde, katı Na_2SO_3 'ten alınan 0,0126 g'lık tartım bir miktar distile su ile çözülerek hacim balon joje içerisinde 50 mL'ye seyreltilmiş ve böylece 2 mM'lık çalışma çözeltisi hazırlanmıştır.

TMB çözeltisi: Konsantrasyonu $1,0 \times 10^{-2}$ M olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu amaçla katı TMB'den alınan 0,0240 g'lık tartım ultrasonik banyo yardımıyla etil alkol ile çözülerek hacim 10 mL'ye tamamlanmıştır.

Rodamin B Çözeltisi: $1,0 \times 10^{-3}$ M konsantrasyonundaki stok çözelti uygun miktarda katı maddenin suda çözülmesiyle hazırlanmıştır. Ardından distile su ile gerekli seyreltme işlemi yapılarak $2,5 \times 10^{-5}$ M konsantrasyonundaki çalışma çözeltisi hazırlanmıştır.

3.2.2. CUPRAC Yöntemi Çözeltileri

Bakır (II) klorür çözeltisi: 0,1705 g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ distile su ile çözülüp son hacmi 100 mL'ye tamamlanarak $1,0 \times 10^{-2}$ M konsantrasyonunda çözelti hazırlanmıştır.

Neokuproin (Nc) çözeltisi: 0,0917 g Neokuproin (Nc) tartılıp, EtOH ile çözülerek hacim 100 mL'ye tamamlanmış ve $7,5 \times 10^{-3}$ M konsantrasyonunda çözeltisi hazırlanmıştır.

Amonyum Asetat Çözeltisi: 7,708 g katı madde tartılarak saf su ile çözülmüş olup, son hacim 250 mL olacak şekilde 1 M konsantrasyonunda çözeltisi hazırlanmıştır [103].

3.2.3. Sentetik Antioksidan Çözeltileri

Antioksidanların stok çözeltileri aşağıda belirtilen şekilde hazırlanmıştır; $1,0 \times 10^{-2}$ M GA, FA, QR, CFA, PCA, CAT ve EC, yeterli miktarda katı maddenin etanol içerisinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. $1,0 \times 10^{-2}$ M GSH, AA ve NAC yeterli miktardaki katılarının distile su içerisinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. $1,0 \times 10^{-2}$ M CYS hazırlamak için, yeterli miktarda katı, 0,5 mL $1,0$ M HCl içerisinde çözülmüş ve hacmi 25 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır. Stok çözeltiler -18°C 'de saklanmış olup, buradan alınan uygun hacimler, kullanılan çözücü (etanol veya su) ile seyreltilerek çalışma çözeltileri hazırlanmıştır.

3.2.4. Gerçek Örneklerin Hazırlanması

Gerçek örnek olarak yeşil çay, beyaz çay ve siyah çay kullanılmıştır. Bunun için bitkilerin iyi kurutulmuş ve tartılabilen kısımları hassas analitik terazi yardımıyla gerekli miktarlarda tartılmıştır. Daha sonra elektrikli ısıtıcı yardımıyla kaynatılmış distile sudan üzerlerine 100'er mL ilave edilmiş; her biri 100°C 'de 5'er dk boyunca ısıtıcı üzerinde demlendirilerek inkübasyon işlemi tamamlanmıştır. Bu işlemin ardından süzgeç kâğıdı yardımıyla süzülüp balonjojeye alınmıştır. Hazırlanan numune çözeltisi, önerilen sülfoksi radikali süpürme yönteminde, CUPRAC ve Rodamin B yöntemleri için gerekli seyreltmeler yapılarak kullanılmıştır. Her bir çay numunesinden 0,3 mL alınarak 5 tekrarlı denemeler yapılmıştır.

3.3. YÖNTEMLER

3.3.1. Sülfoksi Radikallerinin Üretim Yöntemi

0,5 mL kobalt (II) sülfat heptahidrat çözeltisi + 0,5 mL 1 M pH 8 $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ tampon çözeltisi + 2 mL distile su + (0,1-x) mL EtOH, (suda hazırlanan antioksidan çözeltileri için (2-x) mL su + 0,1 mL EtOH) + x mL AOx + 0,4 mL 2 mM sodyum sülfid çözeltisi 37°C 30 dakika su banyosunda inkübe edildikten sonra oluşan karışımın üzerine 0,3 mL EtOH ilave edilmiştir.

3.3.2. Sülfoksi Radikallerinin Süpürme Yöntemi

Bölüm 3.3.1.'de belirtilen yöntemle oluşturulan sülfoksi radikal çözeltisinden 1 mL alınarak sırasıyla üzerine 1 mL 0,5 M pH 4 HAc/NaAc tamponu ve 0,1 mL $3,33 \times 10^{-3}$ M TMB çözeltisi ilave edildikten sonra 50°C 'de 10 dakika su banyosunda inkübe edilmiş ve oda sıcaklığında 10 dakika daha bekletilmiştir. Elde edilen çözeltinin absorbansı 653 nm'de okunmuştur.

Geliştirilen yöntem, polifenoller, vitaminler ve enzimatik olmayan biyolojik antioksidanlar olmak üzere farklı antioksidan gruplarından seçilen antioksidan bileşiklerine uygulanmıştır.

Antioksidanlar için ayrı ayrı ΔA absorbans-konsantrasyon grafikleri oluşturulmuş, lineer konsantrasyon aralığında elde edilen doğru iyi bir korelasyon göstermiştir. AO_x varlığında elde edilen absorbans değeri A_i olarak ve herhangi bir AO_x yokluğunda elde edilen absorbans değeri ise A_0 olarak kaydedilmiş ve absorbans farkı A_0-A_i formülü kullanılarak hesaplanıp ve ΔA olarak adlandırılmıştır.

3.3.3. Rodamin B Yöntemi

Bu yöntem iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada 0,5 mL kobalt (II) sülfat heptahidrat çözeltisi + 0,5 mL 1 M pH 8 NH_3/NH_4Cl tampon çözeltisi + 2 mL distile su + (0,1-x) mL EtOH, (suda hazırlanan antioksidan çözeltileri için (2-x) mL su + 0,1 mL EtOH) + x mL AO_x + 0,4 mL 20 mM sodyum sülfid çözeltisi 37°C 15 dakika su banyosunda inkübe edildikten sonra oluşan karışımın üzerine 0,3 mL EtOH ilave edilmiştir. İkinci aşamada ise 1 mL $1,25 \times 10^{-5}$ M Rodamin B çözeltisi + 1 mL 0,5 M pH 4 HAc/NaAc tamponu + oluşturulan sülfoksi radikal çözeltisinden 1 mL alınarak 50°C'de 10 dakika su banyosunda inkübe edildikten sonra absorbansı 554 nm'de okunmuştur.

3.3.4. CUPRAC Yöntemi

1 mL $1,0 \times 10^{-2}$ M $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 1 mL $7,5 \times 10^{-3}$ M Nc, 1 mL pH 7 tamponu (1 M NH_4Ac) + (2- x mL) distile su / veya EtOH (kullanılan çözücüye uygun olarak) ve x mL örnek (AO_x bileşiklerinin tek başına, ikili veya üçlü karışımları ile gerçek örnek olarak yeşil, beyaz ve siyah çaylar) belirtilen sırada karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilip referans çözeltiye karşı 450 nm'de absorbansı okunmuştur [103].

3.4. GELİŞTİRİLEN YÖNTEM İÇİN EN UYGUN KOŞULLARIN BELİRLENMESİ

3.4.1. En uygun Sodyum Sülfidin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Sodyum sülfidin konsantrasyonunu optimize etmek amacıyla belirlenen konsantrasyonun (2 mM) farklı hacimlerinde (0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 mL) çalışma yapılmıştır. Belirlenen yöntemle göre bir tüpe sırasıyla 200 mM kobalt (II) sülfat heptahidrat çözeltisinden 0,5 mL, üzerine 1 M pH 8 NH_3/NH_4Cl tampon çözeltisinden 0,5 mL, üzerine 0,1 mL etanol ve 2 mM sodyum sülfitten sırasıyla 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 mL eklenerek son hacim 3,5 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanıp hazırlanan karışım 37°C'de 30 dakika su banyosunda bekletilmiştir. Su banyosundan çıkarılan örneklerin üzerlerine 0,3'er mL etanol eklenmiştir. Hazırlanan

karışımlardan 1'er mL alınıp, üzerlerine 0,5 M pH4 HAc/NaAc tamponundan 1'er mL ilave edilmiştir. Daha sonra 0,1'er mL $3,33 \times 10^{-3}$ M TMB reaktifi eklenerek son hacim 2,1 mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Tüm örnekler 50°C'de 10 dakika su banyosunda bekletildikten sonra, oda sıcaklığına gelene kadar 10 dakika daha bekletilmiştir. UV/görünür bölge spektrofotometresi ile referans çözeltiye (suya) karşı spektrumları 653 nm'de alınmıştır.

3.4.2. En uygun Kobalt (II) Sülfat Heptahidrat Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Farklı konsantrasyon aralıklarında kobalt (II) sülfat heptahidrat için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Belirlenen yöntemle göre bir tüpe sırasıyla 200 mM kobalt (II) heptahidrat çözeltisinden 0, 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 0,9 mL, üzerine 1 M pH 8 $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ tampon çözeltisinden 0,5 mL, üzerine 0,1 mL etanol ve 2 mM sodyum sülfitten sırasıyla 0,4 mL eklenerek son hacim 3,5 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanıp hazırlanan karışım 37°C'de 30 dakika su banyosunda bekletilmiştir. Su banyosundan çıkarılan örneklerin üzerlerine 0,3'er mL etanol eklenmiştir. Hazırlanan karışımlardan 1'er mL alınıp, üzerlerine 0,5 M pH4 HAc/NaAc tamponundan 1'er mL ilave edilmiştir. Daha sonra 0,1'er mL $3,33 \times 10^{-3}$ M TMB reaktifi eklenerek son hacim 2,1 mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Tüm örnekler 50°C'de 10 dakika su banyosunda bekletildikten sonra, oda sıcaklığına gelene kadar 10 dakika daha bekletilmiştir. UV/görünür bölge spektrofotometresi ile referans çözeltiye (suya) karşı spektrumları 653 nm'de alınmıştır.

3.4.3. En uygun TMB Konsantrasyonunun Belirlenmesi

TMB reaktifi konsantrasyonunu belirlemek için Bölüm 3.3.1.'de açıklanan yöntemle oluşturulan sülfoksi radikal çözeltisinden 1 mL alınarak üzerlerine 1'er mL 0,5 M pH 4 HAc/NaAc tamponu ve sırasıyla $3,33 \times 10^{-3}$, $1,66 \times 10^{-3}$, $1,11 \times 10^{-3}$, $6,66 \times 10^{-4}$, $3,33 \times 10^{-4}$, $1,66 \times 10^{-4}$ M'lık TMB çözeltisinden 0,1'er mL ilave edildikten sonra 50°C'de 10 dakika su banyosunda inkübe edilmiş ve oda sıcaklığında 10 dakika daha bekletilmiştir. Elde edilen çözeltinin absorbanı 653 nm'de okunmuştur.

3.4.4. Tampon Çözelti Sisteminin Seçilmesi ve En uygun Tampon Çözelti Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Farklı pH ve özellikteki tampon çözeltileri denenerek ayrı ayrı etkileri incelenmiştir. 1 M konsantrasyonunda asetik asit – sodyum asetat (pH 3,6-4-5-6), sitrik asit – sodyum sitrat (pH 3), amonyak-amonyum klorür (pH 8-9) ve farklı konsantrasyonlardaki fosfat tampon çözeltileri

(pH 7) hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler yöntemle uygulanarak absorbens değerleri 653 nm’de ölçülmüştür.

3.4.5. Ortam Sıcaklığının Belirlenmesi

Ortam sıcaklığının belirlenebilmesi için Bölüm 3.3.1.’de açıklanan yöntemle oluşturulan sülfoksi radikal çözeltisinden 1 mL alınarak üzerlerine 1’er mL 0,5 M pH 4 HAc/NaAc tamponu konulduktan ve en son olarak $3,33 \times 10^{-3}$ M TMB çözeltisinden 0,1 mL eklendikten sonra örnek çözeltiler farklı sıcaklıklarda 37, 50 ve 75°C’de su banyosunda bekletildikten sonra oda sıcaklığında 10 dakika daha bekletilerek denemesi yapılan tüm örneklerin absorbens 653 nm’de okunmuştur.

3.4.6. Reaksiyon Süresinin Belirlenmesi

Bu yöntem iki aşamalı olarak gerçekleştirilir. İlk aşamada bir tüpe sırasıyla 200 mM kobalt (II) heptahidrat çözeltisinden 0,5 mL üzerine 1 M pH 8 $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ tampon çözeltisinden 0,5 mL ilave edilmiştir. Üzerine 0,1 mL etanol ve 20 mM sodyum sülfitten sırasıyla 0,4 mL eklenerek son hacim 3,5 mL olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır. Hazırlanan karışım 37°C’de 5, 15, 30 ve 60 dakika su banyosunda bekletilmiştir. Su banyosundan çıkarılan örneklerin üzerlerine 0,3’er mL etanol eklenmiştir. İkinci aşamada ise ayrı bir tüpe birinci aşamadaki örneklerden 1’er mL örnek alınıp üzerine sırasıyla 0,5 M pH 4 HAc/NaAc tamponundan 1’er mL ilave edilip üzerine $3,33 \times 10^{-3}$ M TMB çözeltisinden 0,1 mL ilave edilmiştir. Son hacim 2,1 mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Tüm örnekler 50°C’de 5, 10, 30 ve 60 dakika su banyosunda bekletildikten sonra, oda sıcaklığında 10 dakika daha bekletilmiştir. Elde edilen çözeltinin absorbens 653 nm’de okunmuştur.

3.5. RODAMİN B KIYASLAMA METODUNUN EN UYGUN KOŞULLARININ BELİRLENMESİ

3.5.1. En uygun Sodyum Sülfitin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Bu yöntem iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. Sodyum sülfitin konsantrasyonunu optimize etmek amacıyla belirlenen konsantrasyonun (20 mM) farklı hacimlerinde (0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 mL) çalışma yapılmıştır. Belirlenen yöntemle göre birinci aşamada bir tüpe sırasıyla 200 mM kobalt (II) sülfat heptahidrat çözeltisinden 0,5 mL, üzerine 1 M pH 8 $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ tampon çözeltisinden 0,5 mL, üzerine 0,1 mL etanol ve 20 mM sodyum sülfitten sırasıyla 0, 0,1, 0,2,

0,4, 0,6, 0,8 mL eklenerek son hacim 3,5 mL olacak şekilde distile su ile tamamlanıp hazırlanan karışım 37°C'de 15 dakika su banyosunda bekletilmiştir. Su banyosundan çıkarılan örneklerin üzerlerine 0,3'er mL etanol eklenmiştir. İkinci aşamada ise 1 mL $1,25 \times 10^{-5}$ M Rodamin B çözeltisi + 1 mL 0,5 M pH 4 HAc/NaAc tamponu + oluşturulan sülfoksi radikal çözeltisinden 1 mL alınarak 50°C'de 10 dakika su banyosunda inkübe edildikten sonra oda sıcaklığına gelene kadar musluk altında soğutma yapıp absorbansları 554 nm'de okunmuştur.

3.5.2. En uygun Kobalt (II) Sülfat Heptahidrat Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Bu yöntem iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. Farklı konsantrasyon aralıklarında kobalt (II) heptahidrat için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Belirlenen yöntemle göre birinci aşamada bir tüpe sırasıyla 200 mM kobalt (II) sülfat heptahidrat çözeltisinden 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 1 mL, üzerine 1 M pH 8 $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ tampon çözeltisinden 0,5 mL, üzerine 0,1 mL etanol ve 20 mM sodyum sülfitten sırasıyla 0,4 mL eklenerek son hacim 3,5 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanıp hazırlanan karışım 37°C'de 15 dakika su banyosunda bekletilmiştir. Su banyosundan çıkarılan örneklerin üzerlerine 0,3'er mL etanol eklenmiştir. İkinci aşamada ise 1 mL $1,25 \times 10^{-5}$ M Rodamin B çözeltisi + 1 mL 0,5 M pH 4 HAc/NaAc tamponu + oluşturulan sülfoksi radikal çözeltisinden 1 mL alınarak 50°C'de 10 dakika su banyosunda inkübe edildikten sonra oda sıcaklığına gelene kadar musluk altında soğutma absorbansları 554 nm'de okunmuştur.

3.5.3. Tampon Çözelti Sisteminin Seçilmesi ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Farklı pH ve özellikteki tampon çözeltileri denenerek ayrı ayrı etkileri incelenmiştir. 1 M konsantrasyonunda HAc/NaAc (pH 4–5–6), $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ (pH 7–8–9) ve farklı konsantrasyonlardaki fosfat tampon çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler yöntemle uygulanarak absorbans değerleri 554 nm'de ölçülmüştür.

3.5.4. Ortam Sıcaklığının Belirlenmesi

Bu yöntem iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada sülfoksi radikallerinin oluşum sıcaklığının belirlenmesi için bir tüpe sırasıyla 200 mM kobalt (II) sülfat heptahidrat çözeltisinden 0,5 mL üzerine 1 M pH 8 $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ tampon çözeltisinden 0,5 mL ilave edilmiştir. Üzerine 0,1 mL etanol ve 20 mM sodyum sülfitten sırasıyla 0,4 mL eklenerek son hacim 3,5 mL olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır. Hazırlanan karışım 25°C, 37°C ve 50°C'de 15 dakika su banyosunda bekletilmiştir. Su banyosundan çıkarılan örneklerin üzerlerine 0,3'er mL etanol eklenmiştir. İkinci aşamada ise sülfoksi radikallerinin Rodamin B

maddesi tarafından süpürülebilmesi için gereken optimum sıcaklığın belirlenmesi sağlanmıştır. Bunun için ayrı bir tüpte 0,5 M pH 4 HAc/NaAc tamponundan 1'er mL ilave edilip üzerine $1,25 \times 10^{-5}$ M Rodamin B çözeltisinden ilave edilmiştir. Daha sonra ilk aşamada hazırlanan karışımlardan 1'er mL alınıp bu tüpe ilave edilmiştir. Son hacim 3 mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Tüm örnekler 25°C, 37°C, ve 50°C'de 10 dakika su banyosunda bekletildikten sonra, oda sıcaklığına gelene kadar musluk altında soğutma yapıp absorbands değerleri 554 nm'de okunmuştur.

3.5.5. Reaksiyon Süresinin Belirlenmesi

Bu yöntem iki aşamalı olarak gerçekleştirilir. İlk aşamada bir tüpe sırasıyla 200 mM kobalt (II) sülfat heptahidrat çözeltisinden 0,5 mL üzerine 1 M pH 8 $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ tampon çözeltisinden 0,5 mL ilave edilmiştir. Üzerine 0,1 mL etanol ve 20 mM sodyum sülfitten sırasıyla 0,4 mL eklenerek son hacim 3,5 mL olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır. Hazırlanan karışım 37°C'de 5, 15, 30 ve 60 dakika su banyosunda bekletilmiştir. Su banyosundan çıkarılan örneklerin üzerlerine 0,3'er mL etanol eklenmiştir. İkinci aşamada ise ayrı bir tüpte 0,5 M pH 4 HAc/NaAc tamponundan 1'er mL ilave edilip üzerine $1,25 \times 10^{-5}$ M Rodamin B çözeltisinden ilave edilmiştir. Daha sonra ilk aşamada hazırlanan karışımlardan 1'er mL alınıp bu tüpe ilave edilmiştir. Son hacim 3 mL olacak şekilde ayarlanmıştır.

Tüm örnekler 50°C'de 5, 10, 30 ve 60 dakika su banyosunda bekletildikten sonra, oda sıcaklığına gelene kadar musluk altında soğutma yapıp absorbandsları 554 nm'de okunmuştur.

3.5.6. En uygun Rodamin B Konsantrasyonun Optimizasyonu

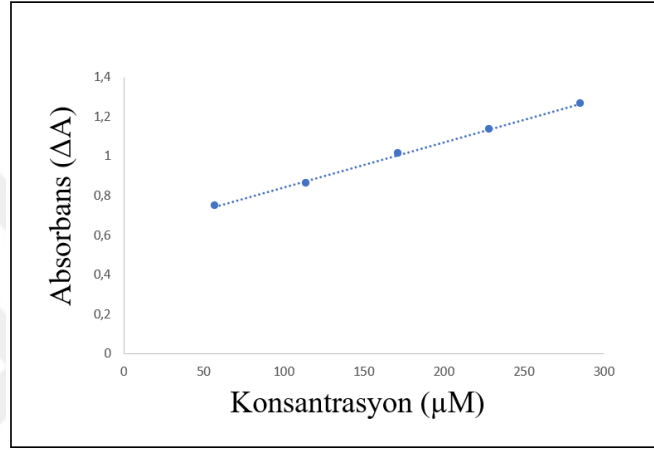
$2,5 \times 10^{-5}$ M Rodamin B çözeltisinden 0,3, 0,5, 1, 1,5 ve 2 mL alınarak üzerlerine 0,5 M 1'er mL pH 4 asetik asit/sodyum asetat tampon çözeltisinden ilave edilmiştir. Son hacim 3 mL olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır. 50°C su banyosunda 10 dakika bekletildikten sonra musluk altında soğutma yapıp 554 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. GELİŞTİRİLEN YÖNTEMİN OPTİMİZASYONU

4.1.1. Sodyum Sülfid Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Önerilen yöntem için optimum sodyum sülfid konsantrasyonunun belirlenmesi, Bölüm 3.4.1.'de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda sodyum sülfid denemeleri yapılmış olup elde edilen sonuçlar Şekil 4.1'de verildiği gibidir.

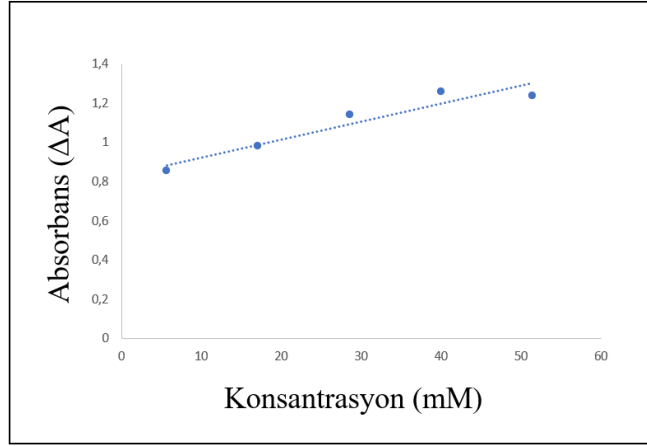


Şekil 4.1: Sodyum sülfid için en uygun konsantrasyonun belirlenmesi.

Şekil 4.1'de sodyum sülfidin konsantrasyonu ile elde edilen absorbanslar arasında doğrusal bir korelasyon olduğu görülmektedir ($r=0,9993$). Bununla birlikte, Lambert–Beer prensibine göre, 1,0'ın üzerindeki absorbans değerlerinin, çeşitli hata ve sapmalara eğilimli olduğu bilinmektedir. Bu nedenle sodyum sülfid için optimize edilmiş konsantrasyon değeri, 1,1373 absorbans veren $2,28 \times 10^{-4}$ M olarak seçilmiştir.

4.1.2. Kobalt (II) Sülfat Heptahidrat Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Önerilen yöntem için optimum kobalt (II) sülfat heptahidrat konsantrasyonunun belirlenmesi, Bölüm 3.4.2.'de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda kobalt (II) heptahidrat denemeleri yapılmış olup elde edilen sonuçlar Şekil 4.2'de verildiği gibidir.

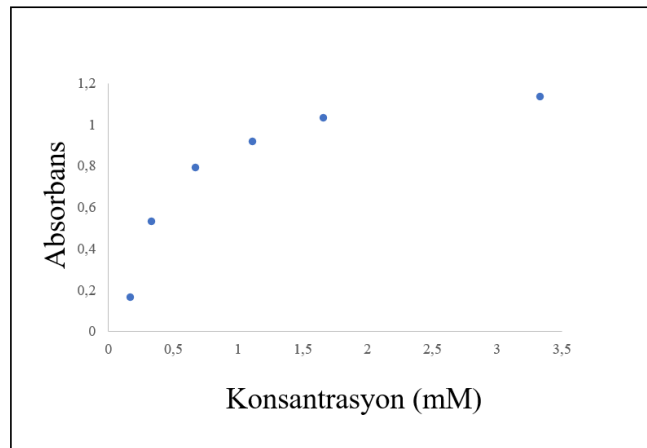


Şekil 4.2: Kobalt (II) sülfat heptahidrat için en uygun konsantrasyonun belirlenmesi.

Şekil 4.2’de kobalt (II) sülfat heptahidrat konsantrasyonu ile elde edilen absorbanslar arasında doğrusal bir korelasyon olduğu görülmektedir ($r=0,9534$). Lambert–Beer kanununa göre kobalt (II) sülfat heptahidrat için optimize edilmiş konsantrasyon değeri, 1,1328 absorbans veren $2,85 \times 10^{-4}$ M olarak seçilmiştir.

4.1.3. TMB Konsantrasyonun Optimizasyonu

Bölüm 3.4.3.’de ayrıntılarıyla belirtildiği gibi TMB reaktifinin uygun konsantrasyonunu tespit edebilmek için son konsantrasyon $3,33 \times 10^{-3}$, $1,66 \times 10^{-3}$, $1,11 \times 10^{-3}$, $6,66 \times 10^{-4}$, $3,33 \times 10^{-4}$, $1,66 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde değişen konsantrasyonlarda çalışılarak, geliştirilen yöntem her bir konsantrasyonda uygulanmış ve absorbans değerleri ölçülmüştür. Lambert–Beer kanunundan olası sapmalar dikkate alındığında, optimum konsantrasyon $3,33 \times 10^{-3}$ M olarak seçilmiştir. Elde edilen sonuçlar şekil 4.3’te verildiği gibidir.



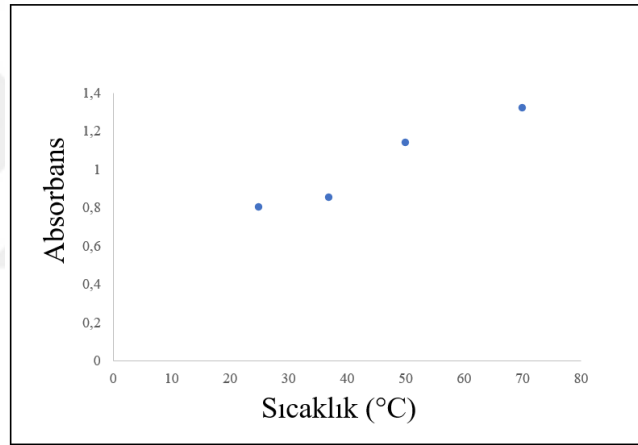
Şekil 4.3: TMB için en uygun konsantrasyonun belirlenmesi.

4.1.4. pH Optimizasyonu

Yöntem iki aşamalı olup, Bölüm 3.5.3'te anlatılan şekilde uygulanmıştır. İkinci aşamada asidik şartların daha iyi sonuç verdiği görülmüştür. Yüksek absorbans değerlerine bağlı hata ve sapmalardan kaçınmak için optimum pH değeri olarak 1,005 absorbans veren pH 4,0 seçilmiştir. Önerilen sülfoksi radikali süpürme yönteminde optimum pH 4 olarak belirlenmiş ve denemeler pH 4 Hac/NaAc tampon çözeltisi varlığında gerçekleştirilmiştir.

4.1.5. Ortam Sıcaklığının Optimizasyonu

TMB ilavesinden sonra sıcaklığın etkisini incelemek için örnek çözeltiler 37, 50 ve 70°C'de su banyosunda ve oda koşullarında (25°C) 10 dakika bekletilmiş ve bütün örneklerin absorbans değerleri ölçülmüştür. Farklı sıcaklıkların absorbanslar üzerinde etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.4'te verildiği gibidir.

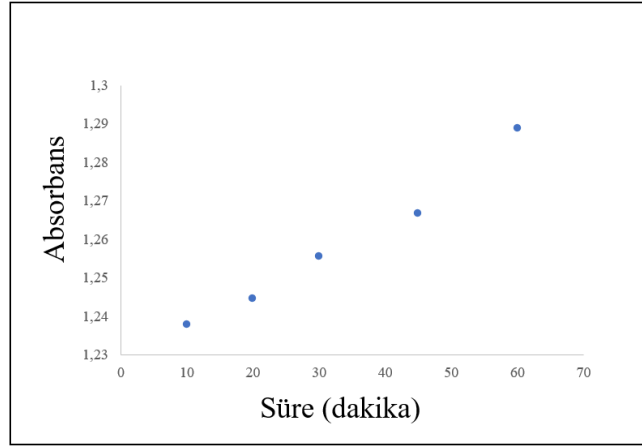


Şekil 4.4: En uygun ortam sıcaklığının belirlenmesi.

Reaksiyon ortamına TMB ilavesinden sonra, 50°C'de elde edildiğinden absorbans değeri yaklaşık 1,1210 verdiği için 50°C seçilmiştir.

4.1.6. Uygun Reaksiyon Süresinin Optimizasyonu

İki ayrı reaksiyon olduğundan iki ayrı reaksiyon süresi vardır. İlki sülfoksi radikallerinin üretimi için geçen süre, ikincisi ise oluşan sülfoksi radikalleri ile TMB arasında gerçekleşen redoks tepkimesidir. Her iki reaksiyonun gerçekleşmesi için gereken süreyi tespit etme aşamasında 10, 20, 30, 45 ve 60'ar dakikalık deneme süreleri tutulmuş, hazırlanan çözeltilerin absorbansları 653 nm'de okunmuştur. TMB ilave edildikten sonraki elde edilen sonuçlar Şekil 4.5'te verildiği gibidir.



Şekil 4.5: En uygun reaksiyon süresinin belirlenmesi.

Şekil 4.5'te görüldüğü üzere TMB eklendikten sonra, 10 dakika sonraki absorbans değerinden sonra hızlı bir absorbans artışı gözlemlenmiştir. Bu nedenle 10 dakikalık bekleme süresi uygun bulunmuştur.

4.1.7. Çözücü Etkisi

Önerilen sülfoksi radikali süpürme yönteminde çözücü etkisini gözlemlemek için, ortama etil alkol, metil alkol, aseton, asetonitril, tersiyer-bütanol gibi çeşitli çözücüler ilave edilerek ve ilave edilmeden absorbans değerleri ölçülmüştür. Antioksidanların hazırlanmasında çözücü olarak etil alkol kullanıldığından ve absorbans değerlerine bakılarak etil alkol seçilmesine öncelik verilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.1'de verildiği gibidir.

Tablo 4.1: Sülfoksi radikali süpürme yöntemi için uygun çözücünün seçilmesi.

Çözücü	Absorbans
Etil Alkol	0,934
Metil Alkol	0,958
Aseton	0,112
Asetonitril	1,056
Çözücü yok	0,986
t-Bütanol	1,037

4.2. SEÇİLEN SENTETİK ANTİOKSİDANLARA SÜLFOKSİ RADİKALİ SÜPÜRME YÖNTEMİNİN UYGULANMASI

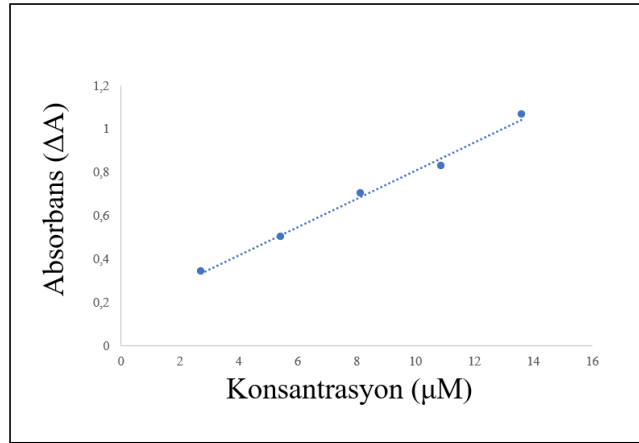
Geliştirilen yöntem çeşitli antioksidan maddelere uygulanarak her bir antioksidan için çalışma aralıkları belirlenmiş, kalibrasyon eğrileri oluşturulmuş ve molar absorplama katsayıları bulunmuştur.

4.2.1.2. Geliştirilen Sülfoksi Radikalleri Süpürme Yönteminin Antioksidanları Süpürme Aktivitesi Tayini

Önerilen sülfoksi radikali süpürme yöntemi, malzeme ve yöntem bölümünde belirtildiği şekilde değişik antioksidan kategorilerinden seçilen gallik asit (GA), *p*-kumarik asit (PCA), kafeik asit (CFA), ferulik asit (FA), askorbik asit (AA), L-glutatyon (GSH), kuersetin (QR), kateşin (CT), epikateşin (EC), L-sistein (L-CYS), N-asetil sistein (NAC), naringenin (NG) gibi antioksidanlara uygulanmıştır. Antioksidanların konsantrasyonlarına karşılık, antioksidan varlığında ve yokluğunda elde edilen absorbans farkları (ΔA) grafiğe geçirilerek her bir antioksidan için doğru denklemleri elde edilmiştir.

4.2.1.1. Gallik Asit

$2,72 \times 10^{-6} - 1,36 \times 10^{-5}$ M konsantrasyon aralığında hazırlanmış gallik asit çözeltileri için oluşturulan çalışma doğrusu Şekil 4.6'da verildiği gibidir.

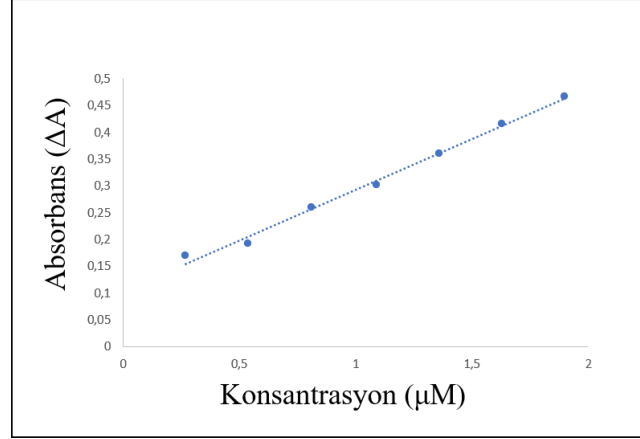


Şekil 4.6: Gallik asit için sülfoksi radikalleri süpürme yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.

Kalibrasyon grafiğinden elde edilen doğru denkleminde yararlanılarak Gallik asit için molar absorplama katsayısı $6,53 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

4.2.1.2. Kateşin

$5,44 \times 10^{-7} - 1,90 \times 10^{-6}$ M konsantrasyon aralığında hazırlanmış kateşin çözeltileri için oluşturulan çalışma doğrusu Şekil 4.7’de verildiği gibidir.

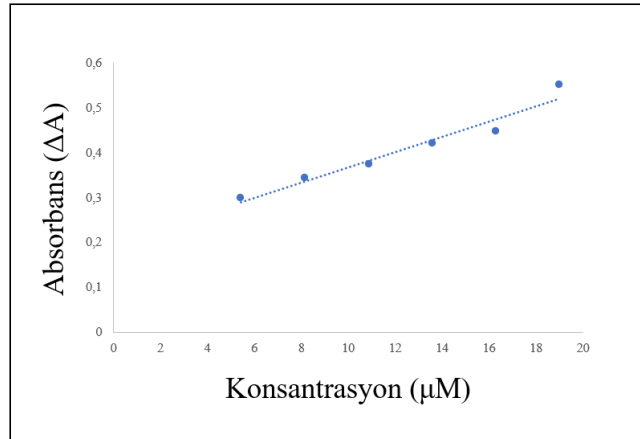


Şekil 4.7: Kateşin için sülfoksi radikalleri süpürme yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.

Kalibrasyon grafiğinden elde edilen doğru denkleminden yararlanılarak Kateşinin molar absorplama katsayısı $1,99 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

4.2.1.3. Askorbik Asit

$5,44 \times 10^{-6} - 1,90 \times 10^{-5}$ M konsantrasyon aralığında hazırlanmış askorbik asit çözeltileri için oluşturulan çalışma doğrusu Şekil 4.8’de verildiği gibidir.

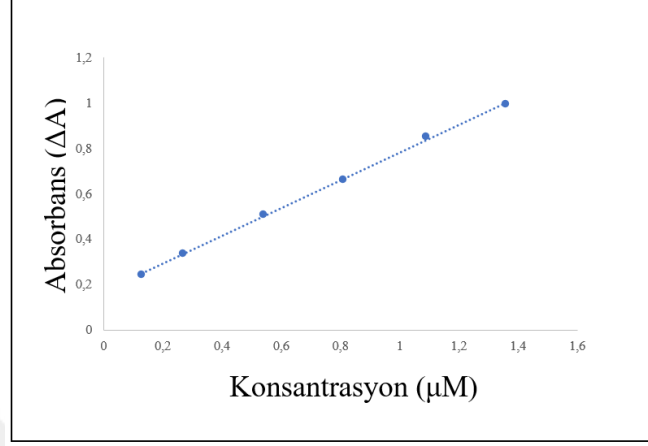


Şekil 4.8: Askorbik asit için sülfoksi radikalleri süpürme yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.

Askorbik asitin molar absorplama katsayısı $1,69 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak kalibrasyon grafiğinden elde edilen doğru denkleminden yararlanılarak bulunmuştur.

4.2.1.4. Epikateşin

$1,36 \times 10^{-7} - 1,36 \times 10^{-6}$ M konsantrasyon aralığında hazırlanmış epikateşin çözeltileri için oluşturulan çalışma doğrusu Şekil 4.9’da verildiği gibidir.

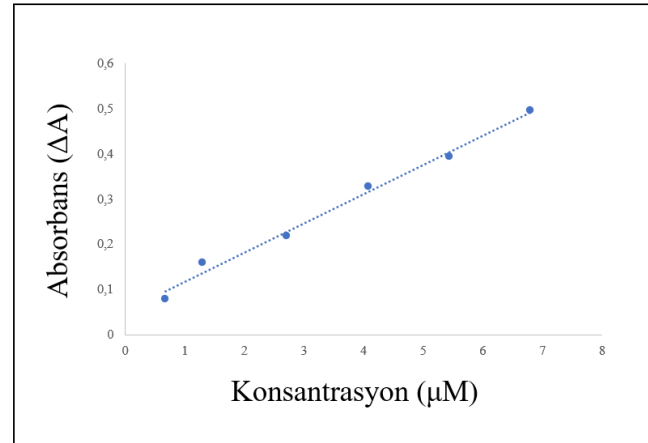


Şekil 4.9: Epikateşin için sülfoksi radikalleri süpürme yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.

Epikateşinin molar absorplama katsayısı $6,14 \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak kalibrasyon grafiğinden elde edilen doğru denkleminde yararlanılarak bulunmuştur.

4.2.1.5. Ferulik Asit

$1,36 \times 10^{-6} - 6,80 \times 10^{-6}$ M konsantrasyon aralığında hazırlanmış ferulik asit çözeltileri için oluşturulan çalışma doğrusu Şekil 4.10’da verildiği gibidir.

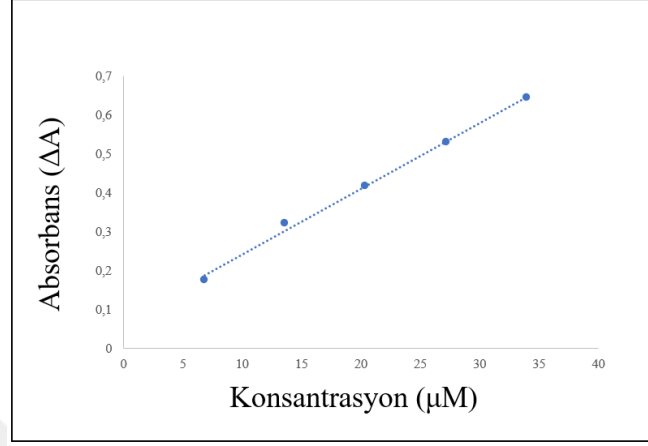


Şekil 4.10: Ferulik asit için sülfoksi radikalleri süpürme yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.

Ferulik asitin molar absorplama katsayısı $6,19 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak kalibrasyon grafiğinden elde edilen doğru denkleminde yararlanılarak bulunmuştur.

4.2.1.6. L-Sistein

$6,80 \times 10^{-6} - 3,40 \times 10^{-5}$ M konsantrasyon aralığında hazırlanmış L-sistein çözeltileri için oluşturulan çalışma doğrusu Şekil 4.11’de verildiği gibidir.

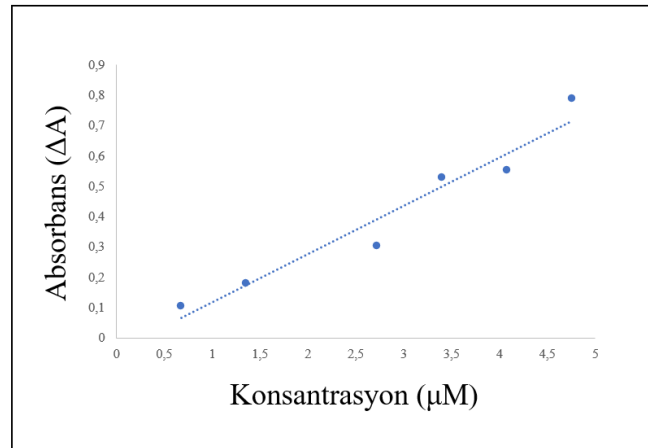


Şekil 4.11: L-sistein için sülfoksi radikalleri süpürme yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.

L-sisteinin molar absorplama katsayısı $1,69 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak kalibrasyon grafiğinden elde edilen doğru denkleminde yararlanılarak bulunmuştur.

4.2.1.7. Kafeik Asit

$6,80 \times 10^{-7} - 4,76 \times 10^{-6}$ M konsantrasyon aralığında hazırlanmış kafeik asit çözeltileri için oluşturulan çalışma doğrusu Şekil 4.12’de verildiği gibidir.

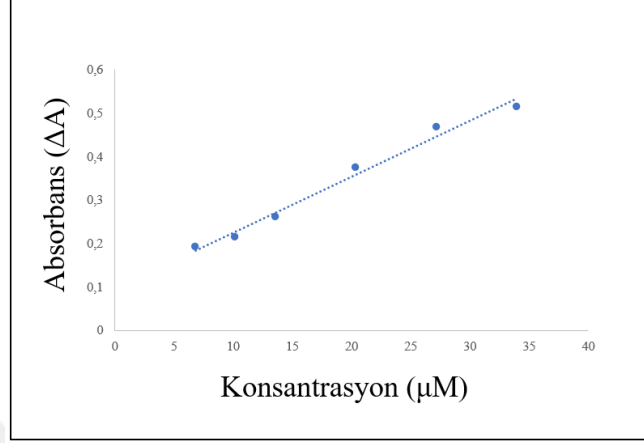


Şekil 4.12: Kafeik asit için sülfoksi radikalleri süpürme yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.

Kafeik asitin molar absorplama katsayısı $1,59 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak kalibrasyon grafiğinden elde edilen doğru denkleminde yararlanılarak bulunmuştur.

4.2.1.8. L-Glutatyon

$6,80 \times 10^{-6} - 3,40 \times 10^{-5}$ M konsantrasyon aralığında hazırlanmış L-glutatyon çözeltileri için oluşturulan çalışma doğrusu Şekil 4.13'te verildiği gibidir.

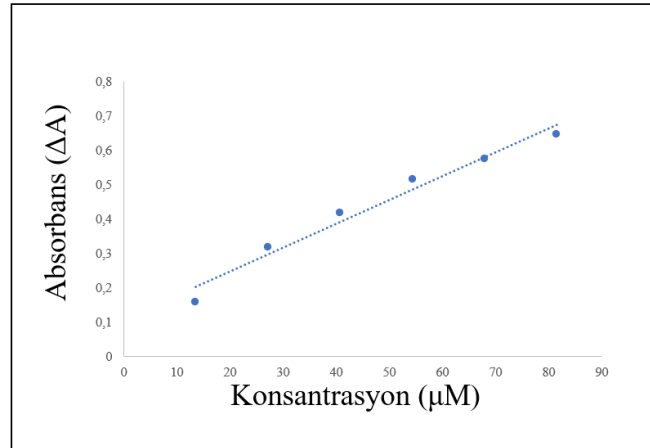


Şekil 4.13: L-glutatyon için sülfoksi radikalleri süpürme yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.

Kalibrasyon grafiğinde elde edilen doğru denkleminde yararlanılarak L-glutatyonun molar absorplama katsayısı $1,29 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

4.2.1.9. N-Asetil Sistein

$1,36 \times 10^{-5} - 1,09 \times 10^{-4}$ M konsantrasyon aralığında hazırlanmış N-asetil sistein çözeltileri için oluşturulan çalışma doğrusu Şekil 4.14'te verildiği gibidir.

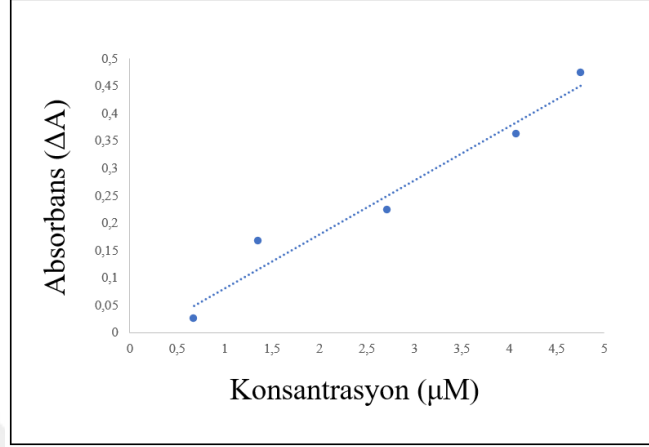


Şekil 4.14: N-asetil sistein için sülfoksi radikalleri süpürme yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.

N-asetil sisteinin molar absorplama katsayısı $6,94 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak kalibrasyon grafiğinden elde edilen doğru denkleminde yararlanılarak bulunmuştur.

4.2.1.10. Kuersetin

$1,36 \times 10^{-6} - 4,76 \times 10^{-6}$ M konsantrasyon aralığında hazırlanmış kuersetin çözeltileri için oluşturulan çalışma doğrusu Şekil 4.15'te verildiği gibidir.

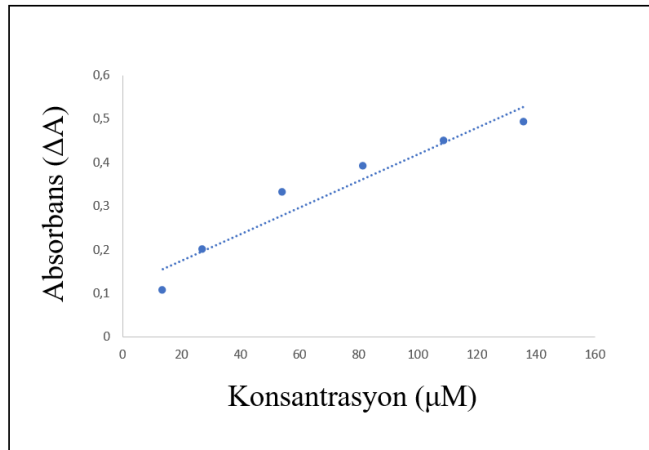


Şekil 4.15: Kuersetin için sülfoksi radikalleri süpürme yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.

Kuersetinin molar absorplama katsayısı $8,88 \times 10^4$ L.mol⁻¹.cm⁻¹ olarak kalibrasyon grafiğinden elde edilen doğru denkleminde yararlanılarak bulunmuştur.

4.2.1.11. *p*-Kumarik Asit

$1,36 \times 10^{-5} - 6,80 \times 10^{-5}$ M konsantrasyon aralığında hazırlanmış *p*-kumarik asit çözeltileri için oluşturulan çalışma doğrusu Şekil 4.16'da verildiği gibidir.

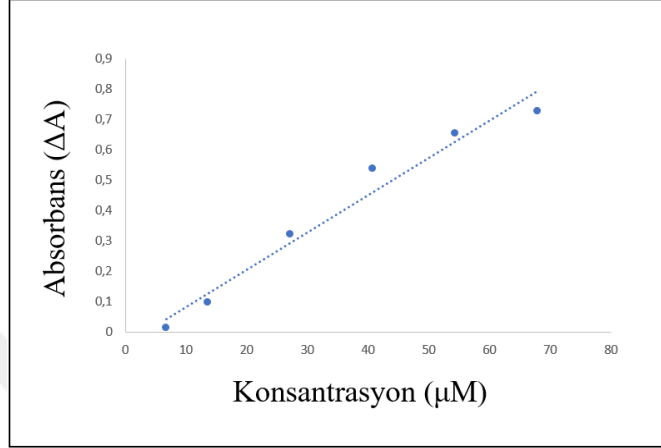


Şekil 4.16: *p*-kumarik asit için sülfoksi radikalleri süpürme yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.

p-kumarik asitin molar absorplama katsayısı $7,47 \times 10^3$ L.mol⁻¹.cm⁻¹ olarak kalibrasyon grafiğinde elde edilen doğru denkleminde yararlanılarak bulunmuştur.

4.2.1.12. Naringenin

$6,80 \times 10^{-6} - 6,80 \times 10^{-5}$ M konsantrasyon aralığında hazırlanmış naringenin çözeltileri için oluşturulan çalışma doğrusu Şekil 4.17’de verildiği gibidir.



Şekil 4.17: Naringenin için sülfoksi radikalleri süpürme yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.

Naringenin molar absorplama katsayısı $1,22 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak kalibrasyon grafiğinden elde edilen doğru denkleminde yararlanılarak bulunmuştur.

Yöntemin tekrarlanabilirliği için gün içi ve günler arası absorbans ölçümleri alınarak, bağlı standart sapma (%RSD) hesaplandı. Gün içi yapılan deneylerde %RSD 1,76, günler arası yapılan deneylerde %RSD 3,70 olarak hesaplanmıştır.

$$RSD = \frac{s}{x} \cdot 100$$

LOD ve LOQ değerleri için aşağıdaki denklem (4.1) ve (4.2)’de belirtilen formüller ile hesaplama yapılmıştır.

SD: referansın standart sapması (N=5), m: kalibrasyon doğrusunun eğim değeridir.

$$LOD = (SD/m) \times 3 \quad (4.1)$$

$$LOQ = (SD/m) \times 10 \quad (4.2)$$

Tablo 4.2: Önerilen yöntemle uygulanan antioksidan bileşiklerinin doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları, lineer çalışma aralıkları, LOD ve LOQ değerleri.

Antioksidan	Doğru Denklemleri	Lineer Aralıklar (M)	LOD (M)	LOQ (M)	Korelasyon Katsayıları
Gallik Asit	$\Delta A = 6,53 \times 10^4 C_{GA} + 0,154$	$2,72 \times 10^{-6} - 1,36 \times 10^{-5}$	$3,59 \times 10^{-7}$	$1,20 \times 10^{-6}$	$r = 0,9962$
Kateşin	$\Delta A = 1,99 \times 10^5 C_{CT} + 0,088$	$5,44 \times 10^{-7} - 1,90 \times 10^{-6}$	$1,17 \times 10^{-7}$	$3,91 \times 10^{-7}$	$r = 0,9965$
Askorbik Asit	$\Delta A = 1,70 \times 10^4 C_{AA} + 0,197$	$5,44 \times 10^{-6} - 1,90 \times 10^{-5}$	$1,38 \times 10^{-6}$	$4,60 \times 10^{-6}$	$r = 0,9758$
Epikateşin	$\Delta A = 6,14 \times 10^5 C_{EC} + 0,164$	$1,36 \times 10^{-7} - 1,36 \times 10^{-6}$	$3,82 \times 10^{-8}$	$1,27 \times 10^{-7}$	$r = 0,9996$
Ferulik Asit	$\Delta A = 6,19 \times 10^4 C_{FR} + 0,064$	$1,36 \times 10^{-6} - 6,80 \times 10^{-6}$	$3,78 \times 10^{-7}$	$1,26 \times 10^{-6}$	$r = 0,9922$
L-Sistein	$\Delta A = 1,69 \times 10^4 C_{L-CYS} + 0,073$	$6,80 \times 10^{-6} - 3,40 \times 10^{-5}$	$1,39 \times 10^{-6}$	$4,63 \times 10^{-6}$	$r = 0,9979$
Kafeik Asit	$\Delta A = 1,59 \times 10^4 C_{CFA} - 0,043$	$6,80 \times 10^{-7} - 4,76 \times 10^{-6}$	$1,47 \times 10^{-7}$	$4,91 \times 10^{-7}$	$r = 0,9718$
L-Glutatyon	$\Delta A = 1,29 \times 10^4 C_{GSH} + 0,096$	$6,80 \times 10^{-6} - 3,40 \times 10^{-5}$	$1,82 \times 10^{-6}$	$6,08 \times 10^{-6}$	$r = 0,9923$
N-Asetil Sistein	$\Delta A = 6,94 \times 10^3 C_{NAC} + 0,107$	$1,36 \times 10^{-5} - 1,09 \times 10^{-4}$	$3,37 \times 10^{-6}$	$1,13 \times 10^{-5}$	$r = 0,9851$
Kuersetin	$\Delta A = 8,88 \times 10^4 C_{QR} - 0,018$	$1,36 \times 10^{-6} - 4,76 \times 10^{-6}$	$2,64 \times 10^{-7}$	$8,80 \times 10^{-7}$	$r = 0,9689$
Naringenin	$\Delta A = 1,22 \times 10^4 C_{NG} - 0,039$	$6,80 \times 10^{-6} - 6,80 \times 10^{-5}$	$1,92 \times 10^{-6}$	$6,39 \times 10^{-6}$	$r = 0,9841$
<i>p</i> -Kumarik Asit	$\Delta A = 7,47 \times 10^3 C_{CMA} + 0,094$	$1,36 \times 10^{-5} - 6,80 \times 10^{-5}$	$3,14 \times 10^{-6}$	$1,05 \times 10^{-5}$	$r = 0,9602$

4.2.2. Tayin Edilen Antioksidan Maddelerin Önerilen Yöntem ile Sülfoksi Radikallerini Süpürme Etkinliğinin Sıralaması

Hesaplanan molar absorpsiyon katsayıları (ϵ) her bir antioksidan madde için karşılaştırıldığında yüksek ϵ değeri (m ; eğim) söz konusu antioksidan bileşiğin düşük konsantrasyonlarının sülfoksi radikallerinin süpürülmesinde etkili olacağının göstergesidir. Her bir bileşiğin antioksidan kapasitesi, azalan ϵ değerlerine göre düzenlendiğinde aşağıdaki antioksidan sırası elde edilmiştir.

Epikateşin > Kateşin > Kuersetin > Gallik asit > Ferulik asit > Askorbik asit > L-sistein > Kafeik asit > L-glutatyon > Naringenin > *p*-kumarik asit > N-asetil sistein

4.3. SEÇİLEN SENTETİK ANTİOKSİDAN KARIŞIMLARA SÜLFOKSİ RADİKALI SÜPÜRME YÖNTEMİNİN UYGULANMASI

4.3.1. İkili Karışımlar

Yöntem ilk olarak karışımı oluşturan antioksidanların her birine teker teker uygulanmış ve sonrasında karışıma uygulanarak her biri için ΔA değeri hesaplanmıştır. Deneysel ΔA 'yı belirlemek için antioksidan ilave edilmeksizin elde edilen absorbans değerinden ikili antioksidan karışımının absorbansı çıkarılarak hesaplama yapılmıştır. Teorik ΔA 'yı hesaplamak için antioksidan ilave edilmeksizin ilave edilen absorbans değerinden her bir antioksidanın tek başına vermiş olduğu absorbans değerlerinin toplamı çıkarılmıştır. % Hata belirlenmesinde ise aşağıdaki formül kullanılmıştır.

% Hata = $\{(\Delta A_{\text{Deneysel}} - \Delta A_{\text{Teorik}}) / \Delta A_{\text{Teorik}}\} \times 100$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.3: ikili sentetik antioksidan karışımlarına ait yüzde (%) hata değerleri.

Antioksidan	Absorbans (Antioksidanlı)	Absorbans (Antioksidansız)	ΔA	% Hata ($\pm$)
10^{-3} M Gallik Asit	0,5439		0,2752	
5×10^{-4} M Kafeik Asit	0,6382	0,8191	0,1809	+7,67
10^{-3} M Gallik Asit + 5×10^{-4} M Kafeik Asit	0,3280		0,4911	
10^{-3} M Gallik Asit	0,5439		0,2752	
5×10^{-3} M L-Sistein	0,6223	0,8191	0,1958	+2,56
10^{-3} M Gallik Asit+ 5×10^{-3} M L-Sistein	0,3350		0,4841	
5×10^{-4} M Kafeik Asit	0,6382		0,1809	
5×10^{-3} M L-Sistein	0,6223	0,8191	0,1968	-4,84
5×10^{-4} M Kafeik Asit+ 5×10^{-3} M L-Sistein	0,4597		0,3594	
10^{-4} M Kateşin	0,7890		0,0301	
2×10^{-4} M Askorbik Asit	0,7205	0,8191	0,0986	+0,16
10^{-4} Kateşin+ 2×10^{-4} M Askorbik Asit	0,6902		0,1289	
10^{-4} M Kateşin	0,7890		0,0301	
5×10^{-4} M Ferulik Asit	0,7556	0,8191	0,0635	-3,31
10^{-4} M Kateşin+ 5×10^{-4} M Ferulik Asit	0,7286		0,0905	
2×10^{-4} M Askorbik Asit	0,7205		0,0986	
5×10^{-4} M Ferulik Asit	0,7556	0,8191	0,0635	+5,18
2×10^{-4} M Askorbik Asit+ 5×10^{-4} M Ferulik Asit	0,6486		0,1705	

4.3.2. Üçlü Karışımlar

Yöntem ilk olarak karışımı oluşturan antioksidanların her birine teker teker uygulanmış ve sonrasında karışıma uygulanarak her biri için ΔA değeri hesaplanmıştır. Deneysel ΔA 'yı belirlemek için antioksidan ilave edilmeksizin elde edilen absorbans değerinden üçlü antioksidan karışımının absorbansı çıkarılarak hesaplama yapılmıştır. Teorik ΔA 'yı hesaplamak için antioksidan ilave edilmeksizin ilave edilen absorbans değerinden her bir antioksidanın tek başına vermiş olduğu absorbans değerlerinin toplamı çıkarılmıştır. % Hata belirlenmesinde ise aşağıdaki formül kullanılmıştır.

% Hata = $\{(\Delta A_{\text{Deneysel}} - \Delta A_{\text{Teorik}}) / \Delta A_{\text{Teorik}}\} \times 100$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.4: Üçlü sentetik antioksidan karışımlarına ait yüzde (%) hata değerleri.

Antioksidan	Absorbans (Antioksidanlı)	Absorbans (Antioksidansız)	ΔA	% Hata ($\pm$)
10^{-3} M Gallik Asit	0,5439		0,2752	
5×10^{-4} M Kafeik Asit	0,6382		0,1809	
5×10^{-3} M L-Sistein	0,6223	0,8191	0,1968	
10^{-3} M Gallik Asit+ 5×10^{-4} M Kafeik Asit+ 5×10^{-3} M L- Sistein	0,2165		0,6026	-7,70
10^{-4} M Kateşin	0,7890		0,0301	
2×10^{-4} M Askorbik Asit	0,7205		0,0986	
5×10^{-4} M Ferulik Asit	0,7556	0,8191	0,0635	
10^{-4} M Kateşin+ 5×10^{-4} M Ferulik Asit+ 2×10^{-4} M Askorbik Asit	0,6235		0,1956	+1,77

4.4. SEÇİLEN SENTETİK ANTİOKSİDAN KARIŞIMLARA CUPRAC YÖNTEMİNİN UYGULANMASI

4.4.1. İkili Karışımlar

Yöntem ilk olarak karışımı oluşturan antioksidanların her birine teker teker uygulanmış ve sonrasında karışıma uygulanarak her biri için absorbans değeri ölçülmüştür. Deneysel absorbans değeri karışıma uygulanan yöntem sonrası elde edilen absorbans değeridir. Teorik absorbans hesaplaması için her bir antioksidanın tek başına vermiş olduğu absorbans değerleri toplanmıştır. % Hata belirlenmesinde ise şu formül kullanılmıştır:

$$\% \text{ Hata} = \{(A_{\text{Deneysel}} - A_{\text{Teorik}}) / A_{\text{Teorik}}\} \times 100$$

$$A_{\text{teorik}} = A_{ix} + A_{iy}$$

(A_{ix} ve A_{iy} sırasıyla x ve y antioksidan maddeleri için elde edilen absorban değerleridir.)

$$A_{\text{deneyssel}} = A_{\text{karışım}}$$

CUPRAC yöntemi ile deneyssel ve teorik absorban doğrudan ölçüm ile elde edilebilir olduğundan ΔA 'yı (absorbanstaki değişimi) belirlemeye gerek yoktur.

Tablo 4.5: CUPRAC yönteminin ikili sentetik antioksidan karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen yüzde (%) hata değerleri.

Antioksidan	Absorbans (Antioksidanlı)	% Hata ($\pm$)
Gallik Asit	0,2237	
Kafeik Asit	0,2691	
Gallik Asit + Kafeik Asit	0,5082	-3,03
Gallik Asit	0,2237	
L-Sistein	0,1892	
Gallik Asit+ L-Sistein	0,4055	+1,82
Kafeik Asit	0,2691	
L-Sistein	0,1892	
Kafeik Asit+L-Sistein	0,4767	-3,86
Kateşin	0,3433	
Askorbik Asit	0,2760	
Kateşin+Askorbik Asit	0,6352	-2,50
Kateşin	0,3433	
Ferulik Asit	0,2841	
Kateşin+Ferulik Asit	0,6093	+2,97
Askorbik Asit	0,2760	
Ferulik Asit	0,2841	
Askorbik Asit+Ferulik Asit	0,5554	+0,84

4.4.2. Üçlü Karışımlar

Yöntem ilk olarak karışımı oluşturan antioksidanların her birine teker teker uygulanmış ve sonrasında karışıma uygulanarak her biri için absorbands değeri ölçülmüştür. Deneysel absorbands değeri karışıma uygulanan yöntem sonrası elde edilen absorbands değeridir. Teorik absorbands hesaplaması için her bir antioksidanın tek başına vermiş olduğu absorbands değerleri toplanmıştır. % Hata belirlenmesinde ise şu formül kullanılmıştır:

$$\% \text{ Hata} = \{(A_{\text{Deneyssel}} - A_{\text{Teorik}}) / A_{\text{Teorik}}\} \times 100$$

$$A_{\text{teorik}} = A_{ix} + A_{iy} + A_{iz}$$

(A_{ix} , A_{iy} ve A_{iz} sırasıyla x, y ve z antioksidan maddeleri için elde edilen absorbands değerleridir.)

$$A_{\text{deneyssel}} = A_{\text{karışım}}$$

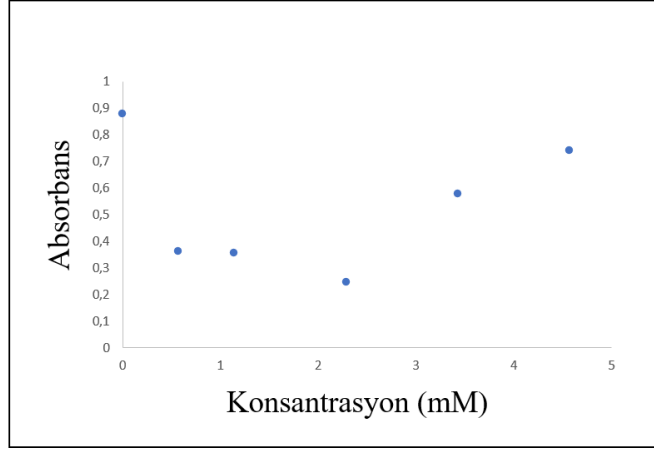
Tablo 4.6: CUPRAC yönteminin üçlü sentetik antioksidan karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen yüzde (%) hata değerleri.

Antioksidan	Absorbans (Antioksidanlı)	%Hata (±)
Gallik Asit	0,2237	
Kafeik Asit	0,2691	
L-sistein	0,1892	
Gallik Asit+Kafeik Asit+ L-Sistein	0,6789	+0,45
Kateşin	0,3433	
Askorbik Asit	0,2760	
Ferulik Asit	0,2841	
Kateşin+ Ferulik Asit+Askorbik Asit	0,9272	-2,57

4.5. RODAMİN B YÖNTEMİNİN OPTİMİZASYONU

4.5.1. Sodyum Sülfid Konsantrasyonunun Belirlenmesi

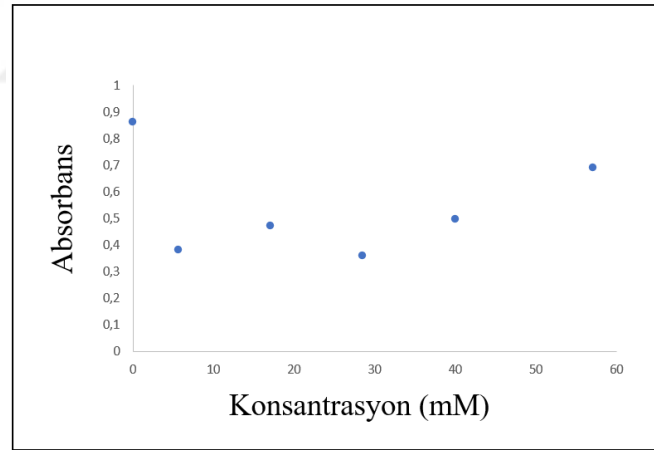
Rodamin B yöntemi için optimum sodyum sülfid konsantrasyonunun belirlenmesi, Bölüm 3.5.1.'de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda sodyum sülfid denemeleri yapılmış olup elde edilen sonuçlar Şekil 4.18'de verildiği gibidir.



Şekil 4.18: Rodamin B yöntemi için sodyum sülfat konsantrasyonunun belirlenmesi.

4.5.2. Kobalt (II) Sülfat Heptahidrat Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Rodamin B yöntemi için optimum kobalt (II) sülfat heptahidrat konsantrasyonunun belirlenmesi, Bölüm 3.5.2.'de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda kobalt (II) sülfat heptahidrat denemeleri yapılmış olup elde edilen sonuçlar Şekil 4.19'da verildiği gibidir.



Şekil 4.19: Rodamin B yöntemi için kobalt (II) sülfat heptahidrat konsantrasyonunun belirlenmesi.

4.5.3. pH Optimizasyonu

Farklı pH ve özellikteki tampon çözeltileri denenerek ayrı ayrı etkileri incelenmiştir. 1 M konsantrasyonunda Hac/NaAc (pH 3,6–4–5–6), sitrik asit – sodyum sitrat (pH 3), $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ (pH 8–9) ve farklı konsantrasyonlardaki fosfat tampon çözeltileri (pH 7) hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler yöntemle uygulanarak absorbans değerleri 554 nm'de ölçülmüştür.

Yöntem iki aşamalı olup birinci aşamada sülfoksi radikallerinin oluşması için en uygun pH 8 $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ olarak belirlenmiştir. İkinci aşamada ise asidik şartların daha iyi sonuç verdiği görülmüştür. Bu nedenle pH 4,0 Hac/NaAc seçilmiştir.

4.5.4. Ortam Sıcaklığının Optimizasyonu

Rodamin B yöntemi için optimum ortam sıcaklığının belirlenmesi Bölüm 3.5.4.'de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.6'da verildiği gibidir.

Tablo 4.7: Rodamin B yönteminde ortam sıcaklığının belirlenmesi.

Sıcaklık (İlk Aşama/İkinci Aşama) (°C)	37/25 °C	37/37 °C	37/50 °C
İkinci Aşama Sonrası Ölçülen Absorbans Değerleri			
Sodyum Sülfid Varlığında	0,353	0,360	0,342
Sodyum Sülfid Yokluğunda	0,772	0,785	0,741

İlk aşamada (radikalin oluşturulması) 25°C, 37°C ve 50°C sıcaklıklarında en düşük absorbans değeri sodyum sülfid varlığında 37 °C'de elde edilmiştir. İkinci aşamada (spektrofotometrik tayinin optimizasyonu) ise aynı sıcaklıklarda en düşük absorbans değeri 50°C'de elde edildiğinden; ilk aşama için 37 °C, ikinci aşama için 50°C seçilmiştir.

4.5.5. Reaksiyon Süresinin Optimizasyonu

Rodamin B yöntemi için optimum reaksiyon süresinin belirlenmesi Bölüm 3.5.5.'de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada (radikalin oluşturulması) elde edilen sonuçlar Tablo 4.7'de, ikinci aşamada (spektrofotometrik tayinin optimizasyonu) elde edilen sonuçlar ise Tablo 4.8'de verildiği gibidir.

Tablo 4.8: Radikalin oluşması için reaksiyon süresinin belirlenmesi.

Süre (Dakika)	5	15	30	60
Ölçülen Absorbans Değerleri				
Sodyum Sülfid Varlığında	0,478	0,474	0,608	0,802
Sodyum Sülfid Yokluğunda	0,810	0,801	0,820	0,821

İlk aşamada elde edilen sonuçlar incelendiğinde 30 dakikadan sonra sodyum sülfid varlığında absorbans değerlerinde artış gözlemlenmektedir. Bu nedenle radikalin oluşturulması için 15 dakika seçilmiştir.

Tablo 4.9: Spektrofotometrik tayinin optimizasyonu için reaksiyon süresinin belirlenmesi.

Süre (Dakika)	5	10	30	60
Ölçülen Absorbans Değerleri				
Sodyum Sülfid Varlığında	0,467	0,440	0,540	0,555
Sodyum Sülfid Yokluğunda	0,780	0,743	0,772	0,764

Tablo 4.8’de elde edilen sonuçlar incelendiğinde sodyum sülfid varlığında 10 dakika sonra en düşük absorbans değerlerine ulaşılmıştır. Bu nedenle ikinci aşama için 10 dakika seçilmiştir.

4.5.6. Rodamin B Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Kıyaslama yöntemi olarak seçilen Rodamin B metodunda, Rodamin B’nin konsantrasyonu bölüm 3.5.6’da belirtildiği gibi hazırlanmış olup, deneylerde kullanılmak üzere absorbans değeri 1’den az olan hacim seçilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.10’da verildiği gibidir.

Tablo 4.10: Rodamin B konsantrasyonunun belirlenmesi.

Hacim	Absorbans
0,3 mL	0,196
0,5 mL	0,336
1 mL	0,789
1,5 mL	1,268
2 mL	0,545

4.6. RODAMİN B YÖNTEMİNİN SEÇİLEN SENTETİK ANTİOKSİDAN MADDELERE UYGULANMASI

Kıyaslama yöntemi olarak seçilen Rodamin B metodu çeşitli antioksidan maddelere bölüm 3.3.3'te belirtildiği gibi uygulanarak her bir antioksidan için sülfoksi radikali süpürme aktivitesi kıyaslanmıştır.

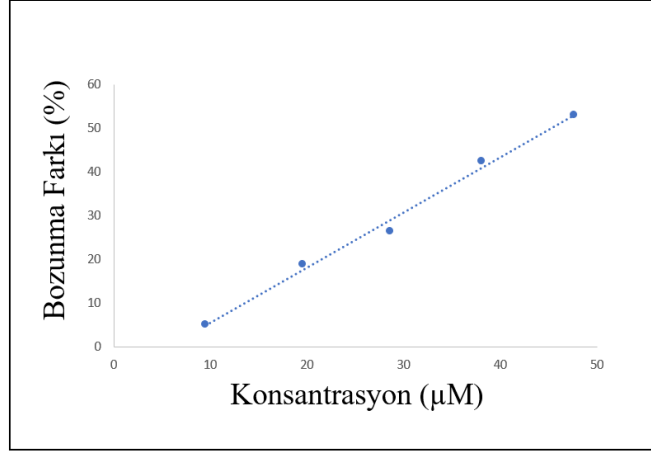
4.6.1. Rodamin B Yönteminin Antioksidanları Süpürme Aktivitesi Tayini

Rodamin B yöntemi, değişik antioksidan kategorilerinden seçilen gallik asit (GA), *p*-kumarik asit (PCA), kafeik asit (CFA), ferulik asit (FA), askorbik asit (AA), L-glutasyon (GSH), kuersetin (QR), kateşin (CT), epikateşin (EC), L-sistein (L-CYS), N-asetil sistein (NAC), naringenin (NG) gibi antioksidanlara uygulanmıştır. Antioksidanların konsantrasyonlarına karşılık, antioksidan varlığında ve yokluğunda elde edilen absorbans değerleri grafiğe geçirilerek her bir antioksidan için doğru denklemleri elde edilmiştir.

Bu yöntemle rodamin B'nin sülfoksi radikali ile renginin giderilmesi ve antioksidan varlığında radikallerin süpürülmesi ile bu rengin geri kazanılmasına bakılır.

4.6.1.1. Gallik Asit

$9,52 \times 10^{-6}$ – $4,76 \times 10^{-5}$ M konsantrasyon aralığında hazırlanmış gallik asit çözeltilerinin rodamin B yöntemine uygulandıktan sonra elde edilen çalışma doğrusu Şekil 4.20'de verilmiştir.

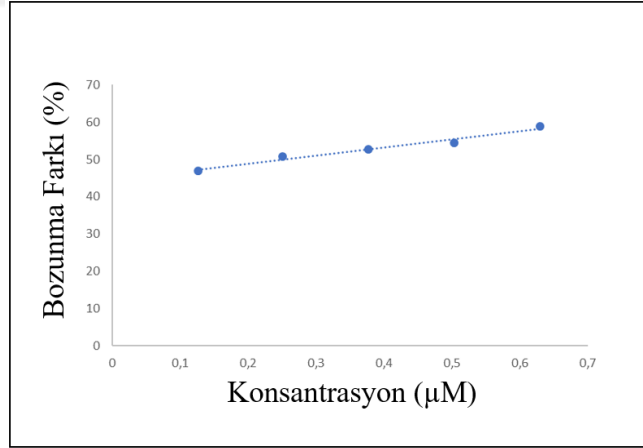


Şekil 4.20: Gallik asidin artan konsantrasyonları ve buna karşılık gelen % bozunma farkları.

Gallik asidin rodamin B metoduna göre, artan konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans azalması ile yüzde bozunma arasında çizilen grafiğinin doğru denkleminde yararlanılarak molar absorplama katsayısı $1,00 \times 10^6 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

4.6.1.2. Kateşin

$1,26 \times 10^{-5} - 6,29 \times 10^{-5} \text{ M}$ konsantrasyon aralığında hazırlanmış kateşin çözeltilerinin rodamin B yöntemine uygulandıktan sonra elde edilen çalışma doğrusu Şekil 4.21’de verilmiştir.

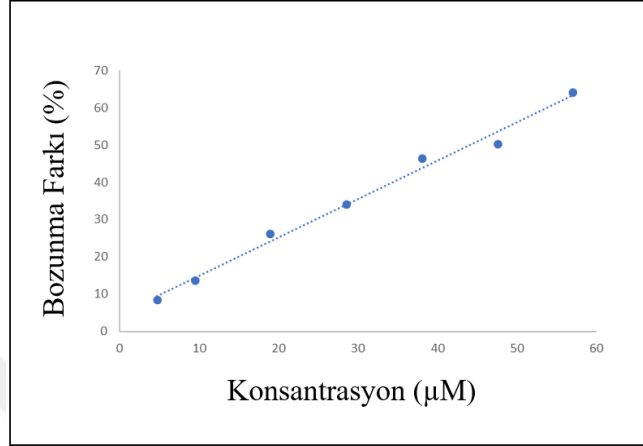


Şekil 4.21: Kateşinin artan konsantrasyonları ve buna karşılık gelen % bozunma farkları.

Kateşinin rodamin B metoduna göre, artan konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans azalması ile yüzde bozunma arasında çizilen grafiğinin doğru denkleminde yararlanılarak molar absorplama katsayısı $7,00 \times 10^6 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

4.6.1.3. Askorbik Asit

$4,76 \times 10^{-6} - 5,71 \times 10^{-5}$ M konsantrasyon aralığında hazırlanmış askorbik asidin çözeltilerinin rodamin B yöntemine uygulandıktan sonra elde edilen çalışma doğrusu Şekil 4.22’de verilmiştir.

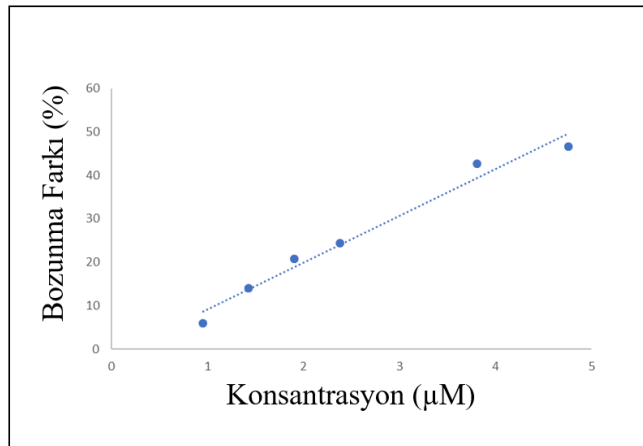


Şekil 4.22: Askorbik asidin artan konsantrasyonları ve buna karşılık gelen % bozunma farkları.

Askorbik asidin rodamin B metoduna göre, artan konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans azalması ile yüzde bozunma arasında çizilen grafiğinin doğru denkleminde yararlanılarak molar absorplama katsayısı $1,00 \times 10^6$ L.mol⁻¹.cm⁻¹ olarak bulunmuştur.

4.6.1.4. L-Sistein

$2,38 \times 10^{-5} - 4,76 \times 10^{-5}$ M konsantrasyon aralığında hazırlanmış L-sistein çözeltilerinin Rodamin B yöntemine uygulandıktan sonra elde edilen çalışma doğrusu Şekil 4.23’te verilmiştir.

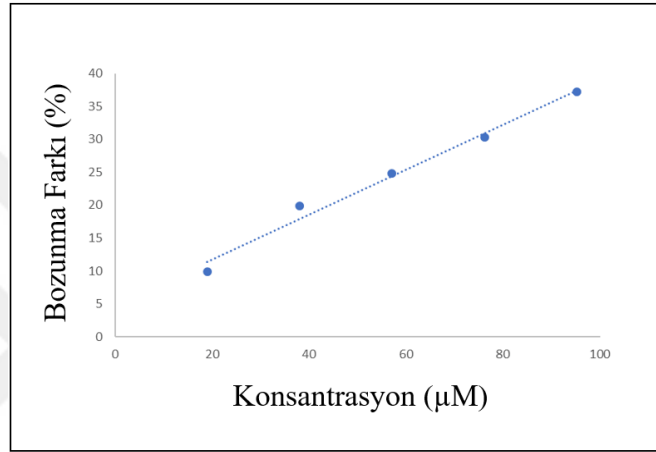


Şekil 4.23: L-sisteinin artan konsantrasyonları ve buna karşılık gelen % bozunma farkları.

L-sisteinin Rodamin B metoduna göre, artan konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans azalması ile yüzde bozunma arasında çizilen grafiğinin doğru denkleminde yararlanılarak molar absorplama katsayısı $1,00 \times 10^6 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

4.6.1.5. L-Glutatyon

$1,90 \times 10^{-5} - 9,52 \times 10^{-5} \text{ M}$ konsantrasyon aralığında hazırlanmış L-glutatyon çözeltilerinin rodamin B yöntemine uygulandıktan sonra elde edilen çalışma doğrusu Şekil 4.24'te verilmiştir.

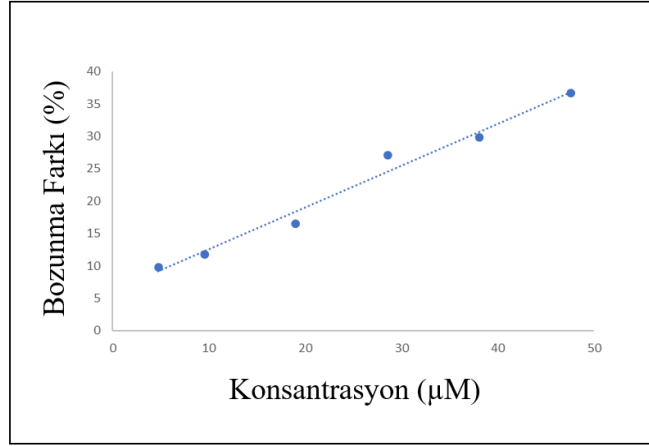


Şekil 4.24: L-glutatyonun artan konsantrasyonları ve buna karşılık gelen % bozunma farkları.

L-glutatyonun rodamin B metoduna göre, artan konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans azalması ile yüzde bozunma arasında çizilen grafiğinin doğru denkleminde yararlanılarak molar absorplama katsayısı $3,42 \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

4.6.1.6. Kuersetin

$4,76 \times 10^{-6} - 4,76 \times 10^{-5} \text{ M}$ konsantrasyon aralığında hazırlanmış kuersetin çözeltilerinin rodamin B yöntemine uygulandıktan sonra elde edilen çalışma doğrusu Şekil 4.25'te verilmiştir.

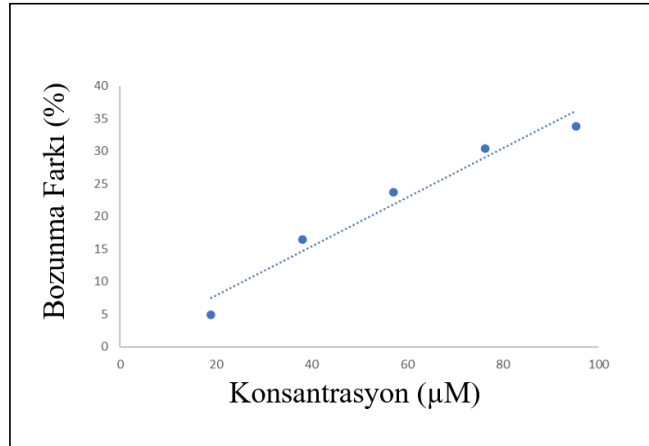


Şekil 4.25: Kuersetinin artan konsantrasyonları ve buna karşılık gelen % bozunma farkları.

Kuersetinin rodamin B metoduna göre, artan konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans azalması ile yüzde bozunma arasında çizilen grafiğinin doğru denkleminde yararlanılarak molar absorplama katsayısı $6,45 \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

4.6.1.7. Naringenin

$1,90 \times 10^{-5} - 9,52 \times 10^{-5} \text{ M}$ konsantrasyon aralığında hazırlanmış naringenin çözeltilerinin rodamin B yöntemine uygulandıktan sonra elde edilen çalışma doğrusu Şekil 4.26'da verilmiştir.

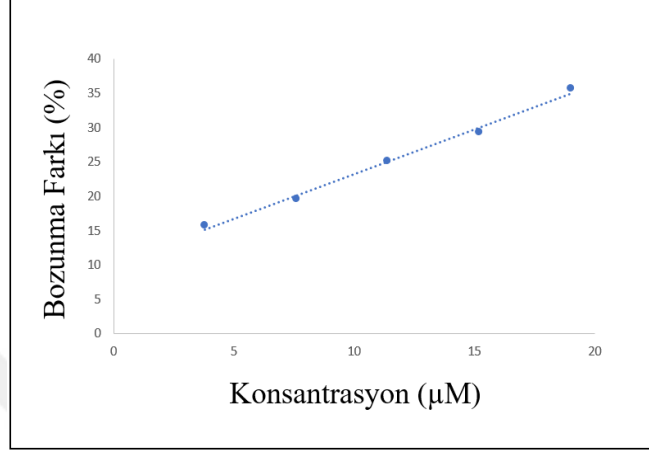


Şekil 4.26: Naringenin artan konsantrasyonları ve buna karşılık gelen % bozunma farkları.

Naringenin rodamin B metoduna göre, artan konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans azalması ile yüzde bozunma arasında çizilen grafiğinin doğru denkleminde yararlanılarak molar absorplama katsayısı $3,45 \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

4.6.1.8. Ferulik Asit

$3,81 \times 10^{-6} - 1,90 \times 10^{-5}$ M konsantrasyon aralığında hazırlanmış naringenin çözeltilerinin rodamin B yöntemine uygulandıktan sonra elde edilen çalışma doğrusu Şekil 4.27’de verilmiştir.

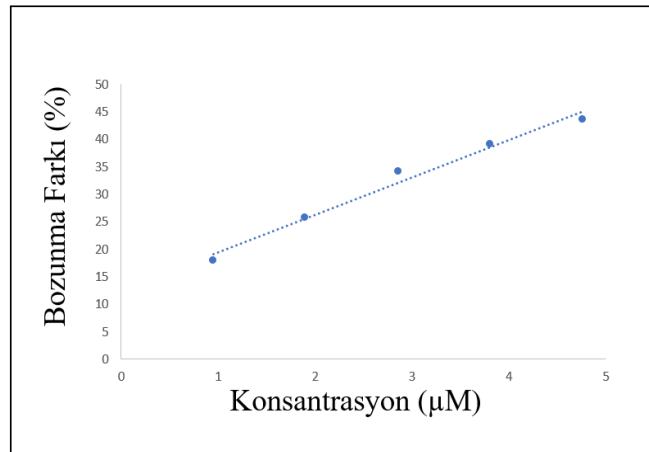


Şekil 4.27: Ferulik asitin artan konsantrasyonları ve buna karşılık gelen % bozunma farkları.

Ferulik asitin rodamin B metoduna göre, artan konsantrasyonlarına karşılık gelen absorptans azalması ile yüzde bozunma arasında çizilen grafiğinin doğru denkleminde yararlanılarak molar absorplama katsayısı $1,0 \times 10^6 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

4.6.1.9. Epikateşin

$9,5 \times 10^{-7} - 4,76 \times 10^{-6}$ M konsantrasyon aralığında hazırlanmış epikateşin çözeltilerinin rodamin B yöntemine uygulandıktan sonra elde edilen çalışma doğrusu Şekil 4.28’de verilmiştir.

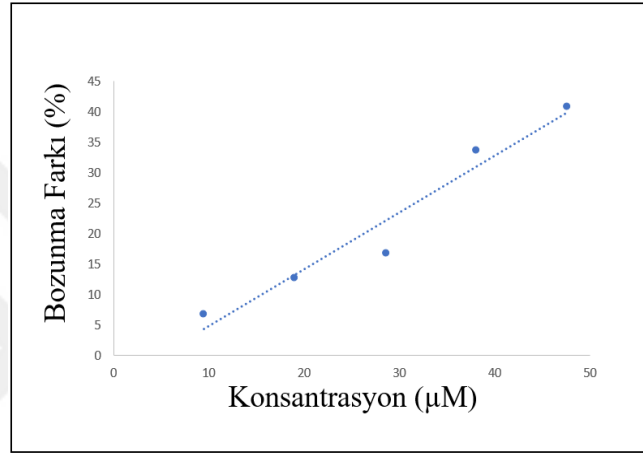


Şekil 4.28: Epikateşinin artan konsantrasyonları ve buna karşılık gelen % bozunma farkları.

Epikateşinin rodamin B metoduna göre, artan konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbands azalması ile yüzde bozunma arasında çizilen grafiğinin doğru denkleminde yararlanılarak molar absorplama katsayısı $7,0 \times 10^6 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

4.6.1.10. *N-asetil sistein*

$9,52 \times 10^{-6} - 47,6 \times 10^{-6} \text{ M}$ konsantrasyon aralığında hazırlanmış *N*-asetil sistein çözeltilerinin rodamin B yöntemine uygulandıktan sonra elde edilen çalışma doğrusu Şekil 4.29'da verilmiştir.

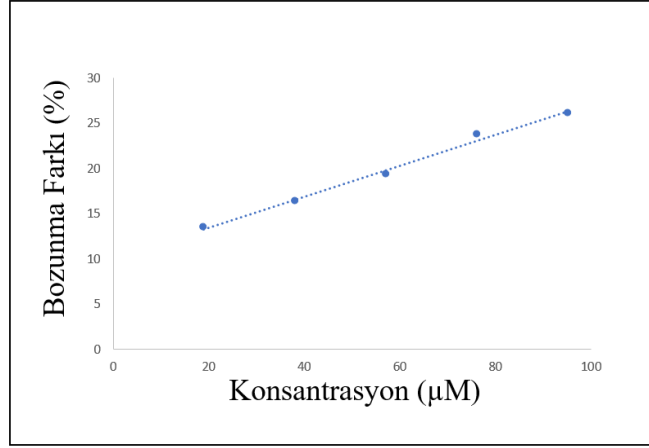


Şekil 4.29: *N*-asetil sisteinin artan konsantrasyonları ve buna karşılık gelen % bozunma farkları.

N-asetil sisteinin rodamin B metoduna göre, artan konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbands azalması ile yüzde bozunma arasında çizilen grafiğinin doğru denkleminde yararlanılarak molar absorplama katsayısı $9,32 \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

4.6.1.11. *p-kumarik asit*

$19,0 \times 10^{-6} - 95,2 \times 10^{-6} \text{ M}$ konsantrasyon aralığında hazırlanmış *p*-kumarik asit çözeltilerinin rodamin B yöntemine uygulandıktan sonra elde edilen çalışma doğrusu Şekil 4.30'da verilmiştir.

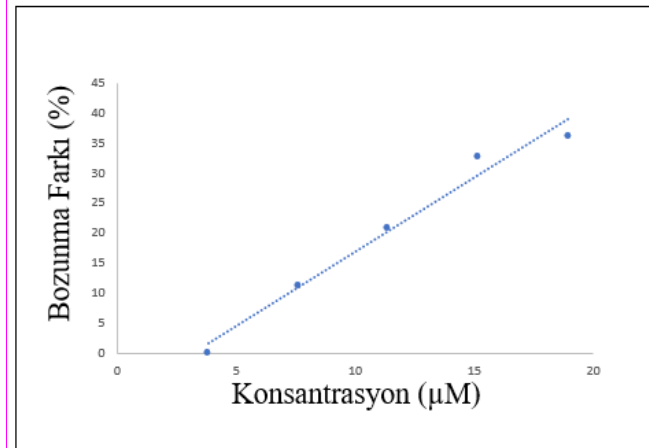


Şekil 4.30: *p*-kumarik asitin artan konsantrasyonları ve buna karşılık gelen % bozunma farkları.

p-kumarik asitin rodamin B metoduna göre, artan konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans azalması ile yüzde bozunma arasında çizilen grafiğinin doğru denkleminde yararlanılarak molar absorplama katsayısı $5,70 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

4.6.1.12. Kafeik asit

$3,81 \times 10^{-6} - 19 \times 10^{-6} \text{ M}$ konsantrasyon aralığında hazırlanmış kafeik asit çözeltilerinin rodamin B yöntemine uygulandıktan sonra elde edilen çalışma doğrusu Şekil 4.31’de verilmiştir.



Şekil 4.31: Kafeik asitin artan konsantrasyonları ve buna karşılık gelen % bozunma farkları.

Kafeik asitin rodamin B metoduna göre, artan konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans azalması ile yüzde bozunma arasında çizilen grafiğinin doğru denkleminde yararlanılarak molar absorplama katsayısı $2 \times 10^6 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Tablo 4.11: Rodamin B yöntemine uygulanan antioksidan bileşiklerinin doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları, lineer çalışma aralıkları, LOD ve LOQ değerleri.

Antioksidan	Doğru Denklemleri	Lineer Aralıklar (M)	LOD (M)	LOQ (M)	Korelasyon Katsayıları
Gallik Asit	$y=1 \times 10^6 C_{GA} - 6,7314$	$9,52 \times 10^{-6} - 4,76 \times 10^{-5}$	$2,43 \times 10^{-8}$	$8,11 \times 10^{-8}$	$r= 0,9958$
Kateşin	$y=7 \times 10^6 C_{CT} + 44,13$	$1,26 \times 10^{-5} - 6,29 \times 10^{-5}$	$3,48 \times 10^{-9}$	$1,16 \times 10^{-8}$	$r= 0,9813$
Askorbik Asit	$y= 1 \times 10^6 C_{AA} + 4,6044$	$4,76 \times 10^{-6} - 5,71 \times 10^{-5}$	$2,43 \times 10^{-8}$	$8,11 \times 10^{-8}$	$r= 0,9950$
Epikateşin	$y=7 \times 10^6 C_{EC} + 12,689$	$9,5 \times 10^{-7} - 4,76 \times 10^{-6}$	$3,48 \times 10^{-9}$	$1,16 \times 10^{-8}$	$r= 0,9904$
Ferulik Asit	$y= 1 \times 10^6 C_{FA} + 10,18$	$3,81 \times 10^{-6} - 1,90 \times 10^{-5}$	$2,43 \times 10^{-8}$	$8,11 \times 10^{-8}$	$r= 0,9967$
L-Sistein	$y= 1 \times 10^6 C_{CYS} - 1,6076$	$2,38 \times 10^{-5} - 4,76 \times 10^{-5}$	$2,43 \times 10^{-8}$	$8,11 \times 10^{-8}$	$r= 0,9882$
Kafeik Asit	$y= 2 \times 10^6 C_{CAF} - 1,6076$	$3,81 \times 10^{-6} - 19 \times 10^{-6}$	$1,22 \times 10^{-8}$	$4,06 \times 10^{-8}$	$r= 0,9718$
L-Glutatyon	$y=3,42 \times 10^5 C_{GSH} + 4,8579$	$1,90 \times 10^{-5} - 9,52 \times 10^{-5}$	$7,12 \times 10^{-8}$	$2,37 \times 10^{-7}$	$r= 0,9921$
N-Asetil Sistein	$y=9,32 \times 10^5 C_{NAC} - 4,5479$	$9,52 \times 10^{-6} - 47,6 \times 10^{-6}$	$2,56 \times 10^{-8}$	$8,52 \times 10^{-8}$	$r= 0,9742$
Kuersetin	$y=6,45 \times 10^5 C_{QR} + 6,0838$	$4,76 \times 10^{-6} - 4,76 \times 10^{-5}$	$3,77 \times 10^{-8}$	$1,26 \times 10^{-7}$	$r= 0,9902$
Naringenin	$y=3,45 \times 10^5 C_{NG} + 2,335$	$1,90 \times 10^{-5} - 9,52 \times 10^{-5}$	$7,05 \times 10^{-8}$	$2,35 \times 10^{-7}$	$r= 0,9301$
p-Kumarik Asit	$y=5,7 \times 10^4 C_{CMA} + 10,03$	$19,0 \times 10^{-6} - 95,2 \times 10^{-6}$	$4,27 \times 10^{-7}$	$1,42 \times 10^{-6}$	$r= 0,9962$

$y=\%$ Bozunma Farkı ($\%$ süpürmedeki azalma)

4.6.2. Antioksidan Maddelerin Rodamin B Yöntemi ile Sülfoksi Radikallerini Süpürme Etkinliğinin Sıralaması

Her bir antioksidan madde için antioksidan konsantrasyonuna karşılık gelen %bozunma farkları arasında kalibrasyon grafikleri çizilmiş ve bu doğruların eğimleri (m) yardımıyla antioksidanların süpürme etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Yüksek “m; eğim” söz konusu antioksidan bileşiğin düşük konsantrasyonlarının sülfoksi radikallerinin süpürülmesinde etkili olacağının göstergesidir. Her bir bileşiğin antioksidan kapasitesi, azalan m değerlerine göre düzenlendiğinde aşağıdaki antioksidan sırası elde edilmiştir.

Epikateşin = Kateşin > Kafeik asit > Gallik asit = Ferulik asit = Askorbik asit = L-sistein > N-asetil sistein > Kuersetin > Naringenin > L-glutatyon > p-kumarik asit

4.7. GERÇEK ÖRNEKLERE UYGULANAN YÖNTEMLERİN SONUÇLARI

4.7.1. Geliştirilen Sülfoksi Radikalleri Süpürme Yönteminin Bitki Çaylarına Uygulanmasıyla Elde Edilen Sonuçlar

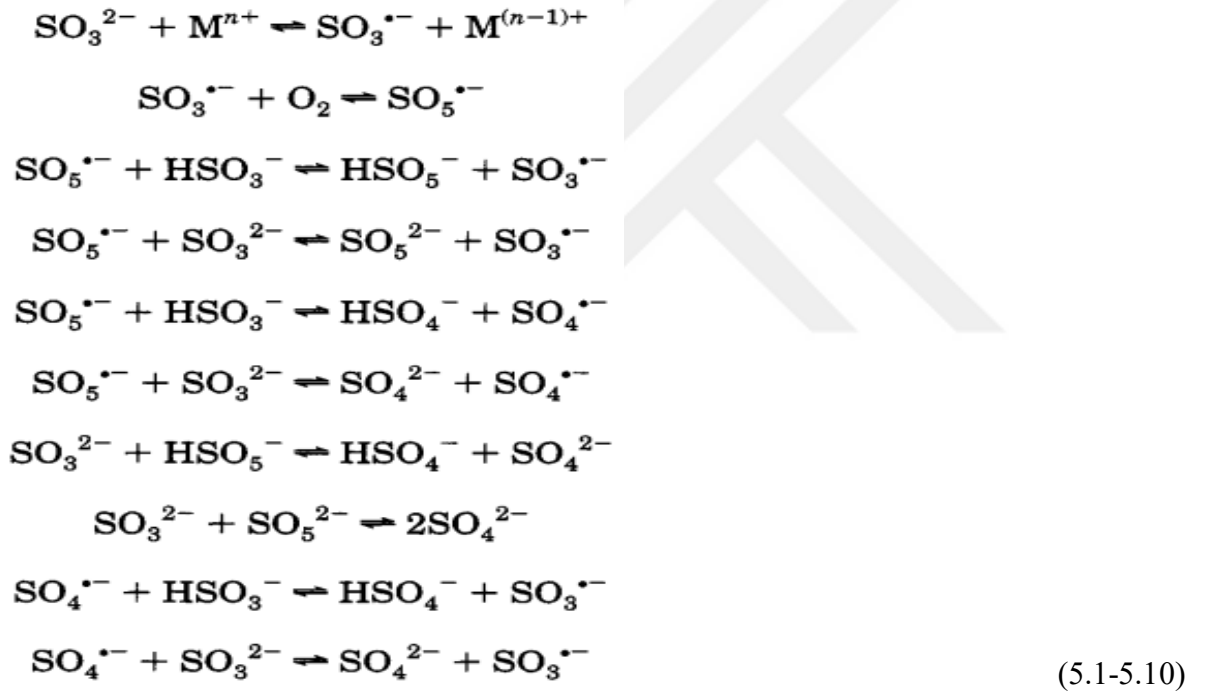
Gerçek örnek olarak kullanılan yeşil çay, beyaz çay ve siyah çay bölüm 3.2.4.'te bahsedildiği gibi hazırlanmıştır. Önerilen sülfoksi radikalleri süpürme yöntemi bitki çaylarına uygulanmıştır. Bu yöntemle elde edilen sonuçların karşılaştırılması amacıyla standart yöntem olarak CUPRAC, referans yöntemi olarak da Rodamin B yöntemi kullanılmıştır.

Tablo 4.12: Gerçek Örneklerin mmol GA/g eşdeğeri toplam antioksidan kapasitesi (TAC) değerleri.

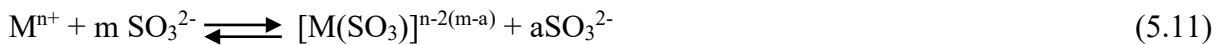
Gerçek Örnek	Sülfoksi Radikalleri Süpürme Yöntemi (mmol GA/g)	Rodamin B Metodu (mmol GA/g)	CUPRAC (mmol GA/g)
Yeşil Çay	0,349±0,011	0,590±0,032	0,423±0,006
Beyaz Çay	0,453±0,004	1,16±0,204	0,556±0,006
Siyah Çay	0,168±0,007	0,84±0,071	0,172±004

5. TARTIŞMA

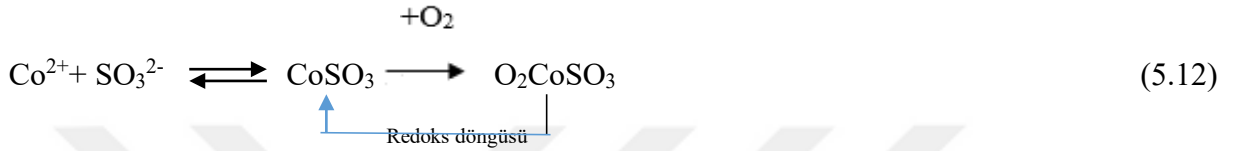
Sülfoksi radikalleri sülfat ve sülfite radikallerini (sırasıyla $\text{SO}_4^{\bullet-}$ ve $\text{SO}_3^{\bullet-}$) de içeren bir grubun ortak adıdır ve IV değerlikli kükürdün otoksidasyonu ile oluşurlar [104]. Geçiş metallerinin kükürt (IV) oksitlerin oksidasyonunu katalizlediği 100 yıldan uzun süredir bilinmektedir. Literatürde kükürt (IV) oksitlerin geçiş metali katalizli oksidasyonu için (i) radikal olmayan (ii) radikal ve (iii) karma olmak üzere üç farklı mekanizma önerilmiştir. Genel olarak, radikal olmayan mekanizmalar, metal iyonu ile sülfite arasında bir iç küre kompleksinin oluştuğunu ve ardından bir elektron transferinin gerçekleştiğini ifade eder [105]. Backström tarafından metal katalizli sülfite otoksidasyonunun basamakları aşağıda verilmiştir: [106]



Sülfür-(IV) oksitlerin geçiş metali katalizli oksidasyonunun aşağıdaki reaksiyon ile gösterilebilecek bir metal-sülfite kompleksinin oluşumunun ile başladığı düşünülmektedir [104].



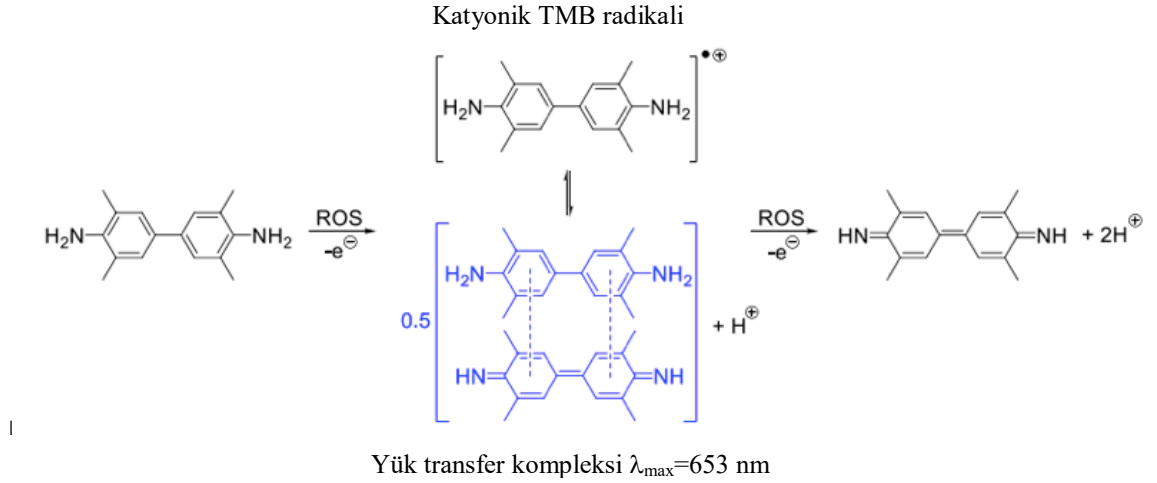
Bu kompleksleşme sırasında SO_3^{2-} 'nin kobalt iyonuna oksijenler veya S ve O donör atomları üzerinden bağlanabileceği ifade edilmiştir [107]. Kuvvetli elektron verme yeteneği ve yüksek polarizlenebilirliği nedeniyle kükürdün oksijenden daha güçlü bağ oluşturması daha olası görülmektedir [108]. Geçiş metali-sülfito kompleksleri daha sonra sülfid radikalleri vermek üzere bozunmaktadır. Sulu çözeltide stabil olan $2+$ değerlikli geçiş metallerinin katalitik aktivite gösterdiği bilinmektedir. Reaksiyon sonucunda bu metal iyonları muhtemelen $3+$ değerliğe yükseltgenmektedir [106]. Hobson vd. reaksiyon sırasında önce metal sülfito kompleksinin oluştuğunu ardından da metalin yükseltgendiğini ileri sürmüştür [109].



Yüksek sülfid konsantrasyonlarında, oluşan $3+$ değerlikli metal iyonları kısa süre içerisinde S(IV) tarafından tekrar $2+$ 'ya indirgenir.

Geçiş metali katalizli sülfid otoksidasyonu ortam pH'sından etkilenmektedir. Genel olarak $2+$ değerlikli metal iyonunun yükseltgenmesi asidik ortamda oldukça yavaştır. Farklı pH değerlerinde sülfid ve metal iyonlarının farklı tür dağılımları göstermektedir. Örneğin HSO_3^- , SO_3^{2-} 'ye göre 20-40 kat daha az reaktiftir [105]. Bu durum önerilen yöntemde sülfoks radikallerinin oluşturulması aşamasının optimizasyonu çalışmaları sonucu en uygun pH değerinin 8 olduğu saptanmasıyla tamamen uyumludur. Çünkü H_2SO_3 için ardışık pK_a değerleri yaklaşık 2 ve 7 olduğundan, 7'nin üzerindeki pH değerlerinde hakim türün SO_3^{2-} olması beklenmektedir.

Gerçekleştirilen tez çalışmasında radikallerin eldesinde Co(II) ve Na_2SO_3 kullanılmıştır. Oluşan reaktif türlerin belirlenmesi için TMB reaktifi kullanılmıştır. Bilindiği üzere TMB yükseltgenler varlığında önce bir TMB katyon radikali ($\text{TMB}^{\bullet+}$) oluşturmakta ardından ise ikinci bir TMB molekülü ile maksimum absorpsiyon dalga boyu 653 nm olan bir yük transfer kompleksi oluşturmaktadır.



Şekil 5.1: TMB'nin yük transfer kompleksi oluşumu

Çalışmada Co(II) ve SO_3^{2-} reaksiyonuyla sülfoksi radikallerinin oluşturulması ve TMB ile belirlenmesi amacıyla yöntemin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından yöntem farklı sınıflardan bir dizi sentetik antioksidanın sülfoksi radikallerini süpürme etkinliğinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Bu amaçla fenolik antioksidanlar: gallik asit (hidroksibenzoik asit), *p*-kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit (hidroksisinamik asit), kuersetin (flavonol), kateşin, epikateşin (flavan-3-ol), naringenin (flavanon); tiyol bileşikler: L-glutasyon, L-sistein, N-asetil sistein (NAC) ve son olarak askorbik asit ile denemeler yapılmıştır. Antioksidanların varlığında ve yokluğunda tekrarlanan denemeler sonucunda antioksidanların varlığında, reaksiyon ortamında oluşturulan sülfoksi radikallerinin antioksidanlarca süpürülmesi sonucu okunan TMB absorbansında azalma olduğu saptanmıştır. Yine yapılan denemeler sonucunda antioksidan konsantrasyonları ile antioksidan yokluğunda ve varlığında okunan absorbanslar arasındaki fark (ΔA) arasında lineer bir ilişki olduğu görülmüştür. Antioksidanlar tek tek denenerek herbiri için antioksidanın son konsantrasyonu ile ΔA arasında kalibrasyon grafikleri çizilmiş, bu grafiklerin doğru denklemleri ve belirleme katsayıları (R^2) hesaplanmıştır. Ayrıca yine herbir antioksidan için LOD ve LOQ değerleri belirlenmiştir. Böylece antioksidanların sülfoksi radikalleri süpürme kapasitelerinin dolaylı olarak belirlenmesi için yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Elde edilen kalibrasyon doğrularının eğimleri (ϵ) kıyaslandığında radikal süpürme etkinliklerinin sırasıyla Epikateşin > Kateşin > Kuersetin > Gallik asit > Ferulik asit > Askorbik asit > L-sistein > Kafeik asit > L-glutasyon > Naringenin > *p*-kumarik asit > N-asetil sistein şeklinde olduğu görülmüştür. Toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesinde gerçek bir örnekte bulunan antioksidanların kapasitesinin doğru belirlenebilmesi için denenen antioksidanların süpürme etkinliklerinin toplamsallığı önemlidir. Bu nedenle geliştirilen

yöntem ikili ve üçlü antioksidan karışımlarına uygulanarak relatif standart saplamalar hesaplanmıştır. Bu değerlerin -3,31 ile +7,67 arasında değişmesi yöntemin iyi bir yaklaşıklıkla toplam antioksidan kapasite belirlenmesinde kullanılabileceği görülmüştür. Aynı şekilde üçlü antioksidan karışımları için bu değerler +1,77 ile -7,70 olarak belirlenmiştir.

Geliştirilen yöntemin daha önce literatürde bulunan bir başka sülfat radikali süpürme etkinliği yöntemiyle kıyaslanması amacıyla Rodamin B testi seçilmiştir. Yapılan tez çalışmasında Rodamin B yöntemi amaca uygun olarak biraz modifiye edilmiştir. Daha önce Uzunboy vd tarafından da belirtildiği üzere Rodamin B ileri oksidasyon proseslerinde sıklıkla kullanılan bir reaktiftir. Bunun nedeni Rodamin B'nin son derece dirençli bir kimyasal olması ve ancak sülfat radikali veya hidroksil radikali gibi yalnızca son derece güçlü oksidanlar tarafından renksizleştirilebilmesidir. Uzunboy vd. son dönemde yapmış oldukları bir çalışmada Rodamin B'yi Cr(III) ile $K_2S_2O_8$ 'den ürettikleri sülfat radikallerinin tayininde karşılaştırma yöntemi olarak kullanmıştır [37]. Aynı antioksidanlar kullanılarak sülfoksi radikallerini süpürme etkinlikleri bir kez de Rodamin yöntemi ile test edilmiştir. Antioksidanlar varlığında ve yokluğunda denemeler tekrarlanarak, antioksidanların varlığında ve yokluğunda hesaplanan % bozunmalar arasındaki fark hesaplanmıştır. Buna göre belirlenen sıralama: Epikateşin = Kateşin > Kafeik asit > Gallik asit = Ferulik asit = Askorbik asit = L-sistein > N-asetil sistein > Kuersetin > Naringenin > L-glutasyon > p-kumarik asit şeklinde olup, önerilen yöntem ile oldukça benzer bir sonuç vermiştir. Son olarak hem geliştirilen yöntem ve hem de karşılaştırma yöntemi olarak kullanılan Rodamin B yöntemi gerçek örnek olarak yeşil, beyaz ve siyah çaya uygulanmıştır. Ayrıca yine her üç örneğin toplam antioksidan kapasitesi CUPRAC yöntemi yardımıyla hesaplanmıştır [103]. Buna göre geliştirilen yöntem ile belirlenen dolaylı toplam sülfoksi radikali süpürme antioksidan kapasite tayin yöntemi ile mmol GA/g cinsinden belirlenen toplam antioksidan kapasite sonuçları CUPRAC yöntemi ile belirlenen toplam antioksidan kapasite tayin yöntemleri ile benzer çıkmıştır. Ancak Rodamin B yönteminin sonuçları diğer iki yöntemle göre oldukça yüksek çıkmıştır. Bu durum oluşan radikalik türlere karşı TMB ile Rodamin B'nin farklı reaktiviteler göstermesiyle açıklanabilir. Ayrıca her iki yöntem için yapılan hesaplamalar arasında yaklaşım farkı bulunmaktadır. Önerilen yöntemde kalibrasyon doğruları antioksidan konsantrasyonu ile ΔA arasında çizilirken, Rodamin B yönteminde antioksidan konsantrasyonuna karşı %süpürmedeki azalma grafiğe alınmıştır. İki farklı yöntem için aynı bireysel antioksidanlara ait kalibrasyon grafiklerinin eğimleri karşılaştırıldığında Rodamin B yöntemindeki doğru denklemlerine ait eğimlerin çok daha

yüksek olduğu görülmektedir. Örneğin çayda en çok bulunan antioksidan olan kateşin için kalibrasyon doğrusunun eğimi geliştirilen yöntem ile $1,99 \times 10^5$ olarak hesaplanırken bu değer Rodamin B için $7,0 \times 10^6$ 'dır. Bu da Rodamin B yönteminin, önerilen yöntem ile kıyaslandığında daha düşük antioksidan konsantrasyonlarına daha yüksek süpürme etkinliği gösterebileceğini düşündürmektedir.

İstatistiksel yöntem olarak, Spearman korelasyon katsayısı kullanılmıştır.

$$r_s = 1 - \frac{6 \sum d_i^2}{n(n^2 - 1)}$$

r_s – Spearman sıralama analiz korelasyonu
 d_i – İki sıra arasındaki fark
 n – Örnek sayısı

- 00-019 “çok zayıf”
- 0.20-0.39 “zayıf”
- 0.40-0.59 “ılımlı”
- 0.60-0.79 “güçlü”
- 0.80-1.0 “çok güçlü”

[110]

Spearman sıra-korelasyon katsayısı istatistiklerine göre geliştirilen sülfoksi radikalleri yöntemine göre antioksidan bileşiklerin etkinlik sıralaması ile bu antioksidanların referans yöntem olarak kullandığımız Rodamin B yönteminde vermiş olduğu cevaba göre $r_s = 0,71329$ olduğundan dolayı geliştirilen yöntemde bulunan sıra arasında monotonik olarak “güçlü” bir ilişki olduğu doğrulanmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yukarıda ayrıntılı olarak açıklanmış olduğu üzere hem Co(II) ile Na₂SO₃ arasındaki reaksiyon sonucu üretilen sülfoksi radikallerinin, hem de antioksidanların bu radikalleri süpürme etkinliklerinin belirlenmesi için bir yöntem geliştirilmiştir. Önerilen yöntemin literatürde mevcut olan Rodamin B yöntemi ile karşılaştırılmış ve antioksidanlar için belirlenen radikal süpürme etkinlikleri kıyaslandığında etkinlik için yapılan sıralamanın uyumlu olduğu görülmüştür.



KAYNAKLAR

- [1]. Apak, R., Çekiç, SD., Üzer, A., Çapanoğlu, E., Çelik,, SE., Bener, M., 2020, Colorimetric sensors and nanoprobe for characterizing antioxidant and energetic substances, *Analytical Methods*, 12(44):5266–321.
- [2]. Prior, RL., Cao, G., 1999 Dec, In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods1, *Free Radical Biology and Medicine*, 27(11–12):1173–81.
- [3]. Halliwell, B., Gutteridge, JMC., 1995 Jan, The definition and measurement of antioxidants in biological systems, *Free Radical Biology and Medicine*, 18(1):125–6.
- [4]. Halliwell, B., 1990 Jan, How to Characterize a Biological Antioxidant., *Free Radical Research Communications*, 7;9(1):1–32.
- [5]. Madhavan, J., Maruthamuthu, P., Murugesan, S., Ashokkumar, M., 2009 Oct, Kinetics of degradation of acid red 88 in the presence of Co²⁺-ion/peroxomonosulphate reagent, *Applied Catalysis A: General*, 368(1–2):35–9.
- [6]. Criquet, J., Nebout, P., Karpel, Vel Leitner N., 2010 Mar, Enhancement of carboxylic acid degradation with sulfate radical generated by persulfate activation, *Water Science & Technology*, 1;61(5):1221–6.
- [7]. Méndez-Díaz J., Sánchez-Polo M., Rivera-Utrilla J., Canonica S., von Gunten U., 2010 Oct, Advanced oxidation of the surfactant SDBS by means of hydroxyl and sulphate radicals, *Chemical Engineering Journal*, 163(3):300–6.
- [8]. Lin, Y-T., Liang, C., Chen, J-H., 2011 Feb, Feasibility study of ultraviolet activated persulfate oxidation of phenol, *Chemosphere*, 82(8):1168–72.
- [9]. Liang, C., Su, H-W., 2009 Jun, Identification of Sulfate and Hydroxyl Radicals in Thermally Activated Persulfate, *Industrial Engineering Chemistry Research*, 48(11):5558–62.

- [10]. Anipsitakis, GP., Dionysiou, DD., 2003 Oct, Degradation of Organic Contaminants in Water with Sulfate Radicals Generated by the Conjunction of Peroxymonosulfate with Cobalt. *Environmental Science Technology*, 37(20):4790–7.
- [11]. Can, K., 2019, *Oksidaz Aktivitesi Arttırılmış Nano-Mangan Dioksit Kullanımıyla Dolaylı Antioksidan Aktivite Ölçümü*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü.
- [12]. Halliwell, B., 1989, Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis, *British journal of experimental pathology*, 70(6), 737–757.
- [13]. Yıldız, L., 2007, *Bazı bitki örneklerinde antioksidan kapasitesinin spektrofotometrik ve kromatografik tayini*, Yüksek Lisans tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [14]. Halliwell, B, Aruoma OL., 1991 Apr, DNA damage by oxygen-derived species Its mechanism and measurement in mammalian systems, *FEBS Letters*. 9;281(1–2):9–19.
- [15]. Baki, S., 2016, *Gıda maddelerinin toplam antioksidan kapasitelerinin tayini için yeni bir elektrokimyasal yöntem geliştirilmesi*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [16]. Genestra, M., 2007 Sep, Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants, *Cellular Signalling*, 9(9):1807–19.
- [17]. Odeyemi, O.I., 2020, *Hipokloröz Asit Süpürülmesine Dayalı Toplam Antioksidan Kapasite Tayini*, Yüksek Lisans tezi, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü.
- [18]. Kopáni, M., CelecP., Michalka P., 2006, Oxidative stress and electron spin resonance, *Clinica Chimica Acta*, 364(1-2), 61-66.
- [19]. Halliwell, B., Gutteridge JM., 1984 Apr , Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, *Biochemical Journal*, 1;219(1):1–14.
- [20]. Poli, G., Leonarduzzi, G., Biasi, F., Chiarpotto, E., 2004 May, Oxidative Stress and Cell Signalling, *Current Medicinal Chemistry*, 1;11(9):1163–82.

- [21]. Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J., 2004 Nov, Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 266(1/2):37–56.
- [22]. Halliwell, B., 1996 Jul, Antioxidants in Human Health and Disease, *Annual Review Nutrition*, 16(1):33–50.
- [23]. Fridovich, I., 1975 Jun, Superoxide Dismutases. *Annual Review Biochemistry*, 44(1):147–59.
- [24]. Kanofsky, J.R., 1989, Singlet oxygen production by biological systems, *Chemico Biological Interactions*, 70(1–2):1–28.
- [25]. Floyd, R.A., 1990 Jun, Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB Journal*, 4(9):2587–97.
- [26]. Özenç, B., 2011, *Fumaria officinalis*’un Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [27]. Cadenas, E., Packer, L., 2002., Second Edition, Handbook of Antioxidants, In:Cadenas, E., (ed), New York: *Marcel Dekker*, INC.
- [28]. Devasagayam, T.P.A., Boloor, K.K., Ramasarma, T., 2003 Oct ,Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits. *Indian Journal Biochemistry and Biophysics*, 40(5):300–8.
- [29]. Devasagayam, T.P.A., Tilak J.C., Boloor, K.K., Sane K.S., Ghaskadbi S.S., Lele, R.D., 2004 Oct, Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects, *Journal of The Association Physicians of India*, 52:794–804.
- [30]. Erben-Russ, M., Michel, C., Bors, W., Saran, M., 1987 Dec, Determination of sulfite radical ($\text{SO}_3^{\cdot-}$) reaction rate constants by means of competition kinetics. *Radiation and Environmental Biophysics*, 26(4):289–94.
- [31]. Semenov, N.N., 1959, 1st Edition, Some Problems of Chemical Kinetics and Reactivity, Volume 2, *Princeton Legacy Library*, ISBN: 9780691626277

- [32]. Yavaş, E., 2020, *Sülfat Radikalleri İle Bakterilerin İnaktivasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [33]. Wei G, Liang X, He Z, Liao Y, Xie Z, Liu P, 2015 Mar, Heterogeneous activation of Oxone by substituted magnetites $\text{Fe}_{3-x}\text{M}_x\text{O}_4$ (Cr, Mn, Co, Ni) for degradation of Acid Orange II at neutral pH, *Journal of Molecular Catalysis A Chemical*, 398:86–94.
- [34]. Rodríguez-Chueca, J., Moreira, SI., Lucas, MS., Fernandes, JR., Tavaresş PB., Sampaio, A., 2017 Apr, Disinfection of simulated and real winery wastewater using sulphate radicals: Peroxymonosulphate/transition metal/UV-A LED oxidation, *Journal of Cleaner Production*, 149:805–17.
- [35]. Devi, P., Das, U., Dalai, AK., 2016 Nov In-situ chemical oxidation: Principle and applications of peroxide and persulfate treatments in wastewater systems. *Science of The Total Environment*, 571:643–57.
- [36]. Neta, P., Huie, RE., Ross, AB., 1988 Jul, Rate Constants for Reactions of Inorganic Radicals in Aqueous Solution, *Journal Physical Chemical Reference Data*, 17(3):1027–284.
- [37]. Uzunboy, S., Karakaş, Ö., Demirci-Çekiç, S., Apak, R., 2021 Nov, Sulfate radical formation by Cr(III) activation of peroxydisulfate–Diphenylcarbazide spectrophotometric determination of sulfate radical and its scavenging activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 260:119941.
- [38]. Guerra-Rodríguez, S., Rodríguez, E., Singh, D., Rodríguez-Chueca, J., 2018 Dec, Assessment of Sulfate Radical-Based Advanced Oxidation Processes for Water and Wastewater Treatment: A Review. *Water*, 11;10(12):1828.
- [39]. Xu, XR., Li, S., Hao, Q., Liu, JL., Yu, YY., Li, 2012 Jan, Activation of persulfate and its environmental application. *International Journal Environment Bioenergy* 1;1:60–81
- [40]. Xiao, R., Liu, K., Baia, L., Minakatac, D., Seod, Y., Göktaş, R. K., Dionysiou, D. D., C.-J.Tang, Wei, Z., Spinneyh, R., 2019, Inactivation of pathogenic microorganisms by sulfate radical: Present and future, *ScienceDirect, Chemical Engineering Journal*, 222-232.

- [41]. Ghanbari, F., Moradi, M., 2017 Feb , Application of peroxymonosulfate and its activation methods for degradation of environmental organic pollutants: Review. *Chemical Engineering Journal*, 310:41–62.
- [42]. Braun, D., . 1996, Initiation of free radical polymerization by thermal cleavage of carbon-carbon bonds. *Macromolecular Symposia*, 111:63–71.
- [43]. Ike, IA., Linden, KG., Orbell, JD., Duke, M., 2018 Apr, Critical review of the science and sustainability of persulphate advanced oxidation processes, *Chemical Engineering Journal*, 338:651–69.
- [44]. Rodríguez-Chueca, J., Giannakis, S., Marjanovic, M., Kohantorabi, M., Gholami, MR., Grandjean, D., 2019 Jul, Solar-assisted bacterial disinfection and removal of contaminants of emerging concern by Fe²⁺-activated HSO₅⁻ vs. S₂O₈²⁻ in drinking water. *Applied Catalysis B Environmental*, 248:62–72.
- [45]. Wang, D., Cheng, L., Wang, M., Zhang, X., Xue, D., Zhuo, W., 2018, The performance of a sulfate-radical mediated advanced oxidation process in the degradation of organic matter from secondary effluents. *Environmental Science Water Research Technology*, 4(6):773–82.
- [46]. Arellano, M., Pazos, M., Sanromán, M.Á., 2019 Aug, Sulfate Radicals-Based Technology as a Promising Strategy for Wastewater. *Water*. 15;11(8):1695.
- [47]. Wang, J., Wang, S., 2018 Feb, Activation of persulfate (PS) and peroxymonosulfate (PMS) and application for the degradation of emerging contaminants. *Chemical Engineering Journal*, 334:1502–17.
- [48]. Kiejza, D., Kotowska, U., Polińska, W., Karpińska, J., 2021 Oct, New oxidants in advanced oxidation processes: The use of peracetic acid, peroxymonosulfate, and persulfate salts in the removal of organic micropollutants of emerging concern – A review. *Science of The Total Environment*, 790:148195.
- [49]. Duan, X., Yang, S., Waclawek, S., Fang, G., Xiao, R., Dionysiou, DD., 2020 Aug, Limitations and prospects of sulfate-radical based advanced oxidation processes, *Journal Environment Chemical Engineering*, 8(4):103849.

- [50]. Wang, C., Chen, R., Zhang, R., Zhang, N., 2018, Simple spectrophotometric determination of sulfate free radicals, *Analytical Methods*, 10(28):3470–4.
- [51]. Petering, D. H., 1977, Sulfur dioxide: a view of its reactions with biomolecules. In: Biochemical Effects of Environmental Pollutants In: S. D. Lee., (ed), *Ann Arbor Science*, Ann Arbor, MI, pp. 293- 306
- [52]. Inouye, B., Ikeda, M., Ishida, T., Ogata, M., Akiyama, J., Utsumi, K., 1978 Oct, Participation of superoxide free radical and Mn^{2+} in sulfite oxidation, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 46(1):29–38.
- [53]. Farhataziz, Ross AB (1977) Selected specific rates of reactions of transients from water in aqueous solution. III. Hydroxyl radical and perhydroxyl radical and their radical ions. NSRDS-NBS 59 (National Bureau of Standards, U.S. Dept. of Commerce)
- [54]. Erben-Russ, M., Michel, C., Bors, W., Saran, M., 1987 Jan 7, The Reaction of Sulfite Radical Anion with Nucleic Acid Components. *Free Radical Research Communication*, 2(4–6):285–8.
- [55]. Halliwell, B., 2007 Nov 1, Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35(5):1147–50.
- [56]. Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., Çapanoğlu, E., 2016 Feb 10, Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays, *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 64(5):997–1027.
- [57]. Fridovich, I., 1983 Apr, Superoxide Radical: An Endogenous Toxicant. *Annual Review Pharmacology and Toxicology*, 23(1):239–57.
- [58]. Fridovich, I., 1995 Jun, Superoxide Radical And Superoxide Dismutases. *Annual Review Biochemistry*, 64(1):97–112.
- [59]. Marklund, S.L., 1984 Sep 15, Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochemical Journal*, 222(3):649–55.

- [60]. Jenkins, RR., 1981, Catalase activity in skeletal muscle of varying fibre types. *Experientia, Springer Link* ,37(1):67–8.
- [61]. Sheng, L., Zheng, X., Tong, H., Liu, S., Du, J., Liu, Q., 2004 Dec, Purification and characterization of cytosolic isoenzyme III of Cu,Zn-superoxide dismutase from tobacco leaves, *Plant Science*, 167(6):1235–41.
- [62]. Altınışik, Mustafa., Serbest Oksijen Radikalleri Ve Antioksidanlar [*Internet*]. p. 1–30. Available from: <https://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01.pdf>
- [63]. Evans, MD., Cooke, MS., 2004 May, Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids, *BioEssays*, 26(5):533–42.
- [64]. Machlin, LJ., McCormick, BD., Suttie, WJ., Rucker, BR., 1991, *Handbook of Vitamins*. Third Edition, In: Machlin, LJ. (ed.), New York: Marcel Dekker, INC.;
- [65]. Yoshida, Y., Niki, E., Noguchi, N., 2003 Mar, Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects, *Chemistry Physics Lipids*, 123(1):63–75.
- [66]. Schneider, C., 2005 Jan, Chemistry and biology of vitamin E. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49(1):7–30.
- [67]. Holland, VR., Saunders, BC., Rose, FL., Walpole, AL., 1974 Jan, A safer substitute for benzidine in the detection of blood. *Tetrahedron*. 30(18):3299–302.
- [68]. Barros, A., Nunes, FM., Gonçalves, B., Bennett, RN., Silva, AP., 2011 Sep, Effect of cooking on total vitamin C contents and antioxidant activity of sweet chestnuts (*Castanea sativa* Mill.). *Food Chemistry*, 28(1):165–72.
- [69]. Carmen, S., 2007, *Major sources and stability during storage and processing food colorants, Chemical and functional properties of food components*,. In: Food Pigments. 4th ed. Romania: Taylor and Francis Group, LLC;. p. 245–74.
- [70]. Brand-Williams, W., Cuvelier, ME., Berset, C., 1995, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT-Food Science Technology*, 28(1):25–30.
- [71]. Ribeiro, D., Freitas, M., Silva, AMS., Carvalho, F., 2018 Oct, Fernandes, E., Antioxidant

- and pro-oxidant activities of carotenoids and their oxidation products. *Food Chemical Toxicology*, 120:681–99.
- [72]. Carocho, M., Ferreira, ICFR., 2013 Jan, A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives, *Food Chemical Toxicology*, 51:15–25.
- [73]. Choi, D.Y., Lee, Y.J., Hong, J.T., Lee, H.J., 2012 Feb, Antioxidant properties of natural polyphenols and their therapeutic potentials for Alzheimer's disease, *Brain Research Bulletin*, 87(2–3):144–53.
- [74]. Harborne, J.B., Williams, C.A., 2000 Nov, Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6):481–504.
- [75]. Cheynier, V., 2005 Jan 1, Polyphenols in foods are more complex than often thought, *American Journal Clinical Nutrition*, 81(1):223S–229S.
- [76]. Pazourek, J., Gajdošová, D., Spanilá, M., Farková, M., Novotná K., Havel, J., 2005 Jul, Analysis of polyphenols in wines: Correlation between total polyphenolic content and antioxidant potential from photometric measurements, *Journal of Chromatography A*, 1081(1):48–54.
- [77]. Sakihama, Y., 2002 Aug 1, Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants, *Toxicology*, 177(1):67–80.
- [78]. Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., 2005 Jun, Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4):287–306.
- [79]. Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., 2002 Oct, Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *Journal of Nutritional Biochemistry*;13(10):572–84.
- [80]. Kirschweng, B., Tátraaljai, D., Földes, E., Pukánszky, B., 2017 Nov, Natural antioxidants as stabilizers for polymers, *Polymer Degradation Stability*, 145:25–40.

- [81]. Rosa, L.A., Emilio, A.P., Gustavo, AG.A., 2010, *Chemistry, Nutritional Value and Stability*, Fruit and vegetable phytochemicals. In: Rosa, L.A.(ed.) J.Massachusetts: Wiley-Blackwell Publishing, USA; 131–153 p.
- [82]. Oroian, M., Escriche, I., 2015 Aug, Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis, *Food Research International*.;74:10–36.
- [83]. Tsao, R., Yang, R., Young, J.C., Zhu, H., 2003 Oct 1, Polyphenolic Profiles in Eight Apple Cultivars Using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), *Journal Agricultural Food Chemistry*, 51(21):6347–53.
- [84]. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1996 Jan, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology Medicine*, 20(7):933–56.
- [85]. Oyvind, M.A, Kenneth, R.M., 2005, *The anthocyanins In Flavonoids*. In: Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications. 1st ed. Florida: CRC Press/Taylor & Francis Group: Boca Raton; USA
- [86]. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, PG., Bramley PM, Pridham JB., 1995 Jan 7, The Relative Antioxidant Activities of Plant-Derived Polyphenolic Flavonoids, *Free Radical Research*, 22(4):375–83.
- [87]. Spanos, GA., Wrolstad, RE., 1992 Sep 1, Phenolics of apple, pear, and white grape juices and their changes with processing and storage. A review, *Journal Agricultural Food and Chemistry*, 40(9):1478–87.
- [88]. Heller, W., 1993, *Biosynthesis of flavonoids*, *The flavonoids*: Advances in Research since 1986. In: Forkmann, G., Chapman & Hall, London; p. 499–535.
- [89]. Wallace, G., Fry, S.C., 1994, Phenolic components of the plant cell wall, *International Review of Cytology*, 151:229–67.
- [90]. Herrmann, K., Nagel, C.W., 1989 Jan, Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28(4):315–47.

- [91]. Nilay, G., 2009, *Spektrofotometrik CUPRAC yönteminin tiyol grubu içeren antioksidan bileşiklere uygulanması*. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [92]. Ulakoğlu Zem., Gümüştas K.M., Belce A., Altuğ T. K., Kökoğlu, E., 1998, Strese bağlı mide mukozası hasarında endojen glutatyon tükenişinin enerji metabolizması ile ilişkisi, *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 3(29):127–31.
- [93]. Moldéus, P., Cotgreave, I.A., Berggren, M., 1986, Lung Protection by a Thiol-Containing Antioxidant: N-Acetylcysteine. *Respiration*, 50(1):31–42.
- [94]. Meister, A., Anderson, M.E., 1983 Jun, Glutathione. *Annual Review Biochemistry*, 52(1):711
- [95]. Nath, K.A., Salahudeen, A.K., 1993 Feb 1, Autoxidation of cysteine generates hydrogen peroxide: cytotoxicity and attenuation by pyruvate, *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 264(2):F306–14.
- [96]. Vécsei, L., Widerlöv, E., 1990 Jan, Preclinical and clinical studies with cysteamine and pantethine related to the central nervous system, *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 14(6):IN1-862.
- [97]. Miller, S., Schlesinger, G., 1993 Apr, Prebiotic syntheses of vitamin coenzymes: I. Cysteamine and 2-mercaptoethanesulfonic acid (coenzyme M) *Journal of Molecular Evolution*, 36(4).
- [98]. Frey, A., Meckelein, B., Externest, D., Schmidt, M.A., 2000 Jan, A stable and highly sensitive 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays, *Journal of Immunological Methods*, 233(1–2):47–56.
- [99]. Liu, S., Tia, J., Wang L., Sun, X., 2012 Apr , Highly sensitive and selective colorimetric detection of Ag(I) ion using 3,3',5,5',-tetramethylbenzidine (TMB) as an indicator. *Sensors Actuators B Chemical*, 165(1):44–7.
- [100]. Unsal, Y.E., Soylak, M., Tuzen, M., 2014 Sep 1, Spectrophotometric Detection of Rhodamine B after Separation-Enrichment by Using Multi-walled Carbon Nanotubes. *Journal of AOAC International*, 97(5):1459–62.

- [101]. Wu, J., Fu, H., Zhu, X., 2014, Separation/Analysis Rhodamine B by Anion Surfactant/Ionic Liquid Aqueous Two-Phase Systems Coupled with Ultraviolet Spectrometry, *Detection*, 02(03):17–25.
- [102]. Özkantar, N., Soylak, M., Tüzen, M., 2017, Spectrophotometric detection of rhodamine B in tap water, lipstick, rouge, and nail polish samples after supramolecular solvent microextraction, *Turkish Journal of Chemistry*, 41:987–94.
- [103]. Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., 2004, Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970–7981
- [104]. Wen, Liu., Guochun, L.V., Chenxi Z., Xiaomin, S., 2021, Mechanism of secondary organic aerosol formation from the reaction of isoprene with sulfoxy radicals, *Environmental Science and Pollution Research* (28): 42562–42569.
- [105]. Christian, B., Rudi V.E., 1995, Transition Metal-Catalyzed Oxidation of Sulfur(IV) Oxides Atmospheric-Relevant Processes and Mechanisms Chemical. Review, *American Chemical Society*, 95 (1):119-190.
- [106]. Hans L., Bäckström J., 1934, Der Kettenmechanismus bei der Autoxydation von Natriumsulfitlösungen” Zeitschrift für Physikalische Chemie, 25B, 122.
- [107]. Birgit, N., Ragnar L., 1973 Infrared Absorption Spectra of Solid Metal Sulfites, *Acta Chemical Scandinavica*, 27, 63-70.
- [108]. Martha H.C., Michael R.H., 1988, Metal Ion-Sulfur(IV) Chemistry. 3. Thermodynamics and Kinetics of Transient Iron(III)-Sulfur(IV) Complexes, *Environmental Science Technology*, 22, 899-907).

[109].Dennis B. H., Peter J. R., Peter J. R., E, A. H., Ian S., 1986 , Kinetics and mechanism of the cobalt-catalysed reaction of oxygen and sulphite at very low concentrations, *Journal of the Chemical. Society Faraday Transaction.*, 82, 869

[110].Spearman's correlation. accessed May 07, 2019.
<http://www.statstutor.ac.uk/resources/uploaded/spearmans.pdf>.



İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

UYARI: Bu bölümde intihal programında çıkan benzerlik yüzdesinin bulunduğu detaylı raporun ilk sayfasının yer alması tüm öğrenciler için zorunludur! Bu uyarıyı okuduktan sonra siliniz!



ETİK KURUL İZİN YAZISI

Uyarı: Canlı denekler üzerinde yapılan tüm araştırmalar için Etik Kurul Belgesi alınması zorunludur.

- ☐ Etik Kurul izni gerekmektedir.
- ☒ Etik Kurul izni gerekmemektedir.

Çiğdem AŞILIOĞLU
(İmza)



KURUM İZNİ YAZILARI

Uyarı: Canlı ve cansız deneklerle yapılan tüm çalışmalar için kurum izin belgelerinin eklenmesi zorunludur. Gizlilik ve mahremiyet içeren durumlarda kurum adı kapatılmalıdır.

- ☐ Kurum izni gerekmektedir.
- ☒ Kurum izni gerekmemektedir.

Çiğdem AŞILIOĞLU
(İmza)

