



**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK ANABİLİM DALI
KİM-YL-2008-0009**

**ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİN YÖNTEMLERİNİN
ANALİTİK AÇIDAN KARŞILAŞTIRILMASI**

Asiye ARDAĞ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. A. Ersin KARAGÖZLER**

AYDIN-2008

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK ANABİLİM DALI
KİM-YL-2008-0009**

**ANTIOKSİDAN KAPASİTE TAYİN YÖNTEMLERİNİN
ANALİTİK AÇIDAN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Asiye ARDAĞ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. A. Ersin KARAGÖZLER**

AYDIN-2008

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Kimya Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Asiye ARDAĞ tarafından hazırlanan Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemlerinin Analitik Açıdan Karşılaştırılması başlıklı tez, 10.09.2008 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Unvanı	Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan :	Prof. Dr. A. Ersin Karagözler	ADÜ Fen-Edebiyat Fakültesi
Üye :	Prof. Dr. Mustafa Demir	ADÜ Fen-Edebiyat Fakültesi
Üye :	Prof. Dr. Mustafa Birincioğlu	ADÜ Tıp Fakültesi

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ
Enstitü Müdürü

İNTİHAL BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Adı Soyadı : Asiye ARDAĞ

İmza :

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ANTIOKSİDAN KAPASİTE TAYİN YÖNTEMLERİNİN ANALİTİK AÇIDAN KARŞILAŞTIRILMASI

Asiye ARDAĞ

Adnan Menderes Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. A. Ersin KARAGÖZLER

Antioksidanlar koruyucu etkilerini oksidasyon sürecinin farklı aşamalarında ve farklı mekanizmalarla gösterirler. Farklı test metotları antioksidan aktivite hakkında özel fakat sınırlı bilgi verdiklerinden, tek bir antioksidan üzerinde farklı antioksidan testlerinin sonuçlarının karşılaştırılması metotların gücü hakkında bilgi vereceği gibi antioksidanın farklı koruyucu etkilerini de ortaya çıkarabilir.

Bu çalışmada antioksidan aktivitenin ölçülmesinde sıklıkla kullanılan 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radikal süpürücü aktivite yöntemi, total fenolik bileşik miktarı tayin yöntemi, ABTS radikal katyonu kullanılarak troloks eşdeğeri antioksidan kapasite tayin yöntemi (TEAC), kuprik iyon indirgeme kapasitesi (CUPRAC) yöntemi ve oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC) yöntemi kapari (*Capari spinosa* L.) bitkisinin etanol ve su ekstralarının antioksidan aktivitelerini tayin etmek üzere kullanılmış ve karşılaştırma yapılmıştır.

Çalışmada kapari sulu ekstresinin DPPH radikal süpürme aktivitesi etanol ekstresinden biraz daha yüksek bulunmuştur. Öte yandan su ekstresinin fenolik bileşik içeriği alkol ekstresinin fenolik bileşik içeriğinden daha düşüktür. İncelenen yöntemlerden TEAC_{ABTS} ile fenolik bileşik miktarı arasında pozitif ilişki tespit edilirken TEAC_{CUPRAC} ve TEAC_{ORAC} yöntemleri negatif ilişki göstermişlerdir.

Sonuç olarak *in vitro* antioksidan aktivite tayininde tek bir tayin metodunun antioksidanın gücü hakkında sınırlı bilgi vereceği, bu nedenle birkaç tanesinin birlikte kullanılmasının gerektiği vurgulanmıştır.

Anahtar kelimeler: Kapari (*Capari spinosa* L.), DPPH, Total Fenolik Bileşik Tayini, TEAC, CUPRAC, ORAC

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

**ANALYTICAL COMPARISON OF
ANTIOXIDANT CAPACITY DETERMINATION METHODS**

Asiye ARDAĞ

Adnan Menderes University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Analytical Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. A. Ersin KARAGÖZLER

Antioxidants can exercise their protective properties at different stages of the oxidation process and by different mechanisms. As different testing methods provide particular, but limited information about antioxidant activity, a comparison of the methods using a single antioxidant should give information about the strength of the methods as well as about the different protective effects of the antioxidant.

In this work, five methods widely employed in the evaluation of antioxidant activity, namely 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging method, total phenolics analysis, trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay with ABTS radical cation, cupric ion reducing capacity (CUPRAC) method and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) method have been compared with regard to their application in the determination of antioxidant activity of ethanol and water extracts of capers (*Capari spinosa* L.).

According to the results DPPH radical scavenging activity of water extracts of capers was found to be slightly higher than that of ethanolic extract. On the other hand total phenolic content of water extract was found to be lower than that of ethanolic extract. According to the results of the tested methods there was a positive correlation between TEAC_{ABTS} and total phenolic content whereas the correlation was negative

for TEAC_{CUPRAC} and TEAC_{ORAC}. In conclusion it was stated that a single antioxidant activity test would present limited information about the power of the antioxidant in question and it was emphasized that use of a combination of various methods should be used in assessing the antioxidant activities *in vitro*.

Key words: Capers (*Capari spinosa* L.), DPPH, Total Phenolics, TEAC, CUPRAC, ORAC

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tezimin her aşamasında gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı çok değerli danışman hocam Prof. Dr. A. Ersin KARAGÖZLER'e,

Tez çalışmalarım boyunca birikimlerini benimle paylaşan, emek veren ve desteğini esirgemeyen sevgili hocam Doç. Dr. A.Alev KARAGÖZLER'e,

Laboratuar çalışmalarım ve tezimin yazımındaki yardımlarından dolayı Arş. Gör. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN'a ve Arş. Gör. Murat UYGUN'a,

Bu çalışmaya FEF-07002 No'lu araştırma projesi olarak maddi destek veren, Adnan Menderes Üniversitesi Rektörlüğü'ne ve olanaklarından yararlandığım Kimya Bölümü'ne,

Ve her türlü maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen ve bana hep destek olan ablam ve canım aileme teşekkürlerimi sunuyorum.

Asiye ARDAĞ

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
İNTİHAL BEYAN SAYFASI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	vii
SİMGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Serbest Radikaller	2
i) Kovalent Bağların Homolitik Kırılması	2
ii) Normal Bir Molekülün Elektron Kaybetmesi	2
iii) Normal Bir Moleküle Elektron Transferi	3
1.2 Antioksidanlar.....	4
1.3 Antioksidan Savunma Sistemleri ve Antioksidanların Sınıflandırılması.....	5
1.3.1 Enzimatik Antioksidanlar	6
1.3.1.1 Süperoksit dismutaz (SOD)	6
1.3.1.2 Katalaz	6
1.3.1.3 Glutasyon peroksidaz (GPx)	6
1.3.1.4 Glutasyon redüktaz (GR)	7
1.3.1.5 Glutasyon-S-transferaz (GST)	7
1.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	7
1.3.2.1 Sentetik Antioksidanlar	7
a) Bütillenmiş hidroksianisol (BHA) ve Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT)	7
b) Tersiyer bütihidrokinon (TBHQ).....	8
c) Galatlar	9
d) Nordihidroguareyetik asit (NDGA)	10
1.3.2.2 Doğal Antioksidanlar	10
a) C-Vitamini (L-askorbik asit)	10

b) E -Vitamini (α -tokoferol)	11
c) Polifenolik Bileşikler	12
d) Karetlenoidler	14
1.4 Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri	15
1.4.1 DPPH Süpürücü Antioksidan Aktivite Yöntemi	17
1.4.2 Folin-Ciocalteu Yöntemi İle Total Fenolik Bileşik Tayini	18
1.4.3 TEAC (Trolox Eşdeğer Antioksidan Kapasite) Yöntemi	19
1.4.4. (CUPRAC) Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite Yöntemi	21
1.4.5. ORAC (Oksijen Radikal Absorbsiyon Kapasitesi) Yöntemi	21
1.5 Kapari (Gebere Otu) Bitkisi	22
2. KAYNAK ÖZETLERİ	24
3. MATERYAL VE YÖNTEM	27
3.1 Materyal	27
3.2 Yöntem	27
3.2.1 Kapari Spinoza Özütlerinin (Ekstrelerinin) Hazırlanması	27
3.2.2. DPPH (1,1-Difenil 2-Pikril Hidrazil) Serbest Radikal Süpürücü Aktivite Tayini	28
3.2.3. Toplam Fenolik Bileşik Miktarı Tayini	28
3.2.4. TEAC (Trolox Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi) / ABTS-Persülfat Yöntemi	29
3.2.5 (CUPRAC) Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite Yöntemi	30
3.2.6 ORAC (Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi) Yöntemi	30
4. BULGULAR	32
4.1 DPPH (Serbest Radikal Giderme Aktivitesi) Sonuçları	32
4.2. Toplam Fenolik Bileşik Miktarı Tayini Sonuçları	33
4.3. TEAC (ABTS ⁺ Radikal Giderme Aktivitesi) Sonuçları	35
4.4. CUPRAC (Bakır (II) İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi) Sonuçları	37
4.5. ORAC (Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi) Yöntemi Sonuçları	39
5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	42
KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ.....	54

SİMGELER DİZİNİ

AA	Askorbik asit
ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzothiazolin-6-sulfonik asit) diamonyum tuzu
ABAP	2,2'-azobis-(2-amidinopropan)HCl
BHA	Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş hidroksitoluen
CUPRAC	Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
ET	Tek Elektron Transferi
FCR	Folin & Ciocalteu's Fenol Reaktifi
FRAP	Ferrik İyonu İndirgeme Antioksidan Gücü
GAE	Gallik Asit Eşdeğeri
PG	Propil gallat
GPx	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GST	Glutasyon-s-transferaz
HAT	Hidrojen Atomu Transferi
LDL	Low Density Lipoprotein
NDGA	Nordihidroguaryetik asit
ORAC	Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi
PG	Propil gallat
RNS	Reaktif Azot Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
TAC	Toplam Antioksidan Kapasitesi
TBHQ	Tersiyer bütihidrokinon
TEAC	Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite
TOC	α -Tokoferol
TR	Troloks
TRAP	Total Radikal Yakalama Antioksidan Kapasitesi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 BHA ve BHT'nin kimyasal yapıları.....	8
Şekil 1.2 TBHQ'nun kimyasal yapısı.....	9
Şekil 1.3 PG'nin kimyasal yapısı.....	10
Şekil 1.4 NDGA'nın kimyasal yapısı.....	10
Şekil 1.5 L-Askorbik asitin kimyasal yapısı.....	11
Şekil 1.6 α - tokoferol'ün kimyasal yapısı.....	12
Şekil 1.7 Flavonoidlerin temel kimyasal yapıları.....	13
Şekil 1.8: β -karotenin kimyasal yapısı.....	15
Şekil 1.9 DPPH reaktifinin kimyasal yapısı.....	18
Şekil 1.10 Trolox molekülünün kimyasal yapısı.....	19
Şekil 1.11 ABTS molekülünün kimyasal yapısı.....	19
Şekil 1.12 ABTS radikal katyon oluşumunun reaksiyon denklemi.....	20
Şekil 1.13 Pirogallol Red molekülünün kimyasal yapısı.....	22
Şekil 1.14 Kapari (Gebere otu) bitkisinin tomurcukları, yaprakları ve yerdeki Görünümü.....	23
Şekil 3.1 Gallik asit standart grafiği.....	29
Şekil 4.1 Kapari ekstraktları ve standartların DPPH radikali süpürücü aktiviteleri....	32
Şekil 4.2 Gallik asit standart grafiği.....	34
Şekil 4.3 TEAC tayininde kullanılan Trolox standardı grafiği.....	35
Şekil 4.4 Kapari su ekstraktının TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS ⁺ radikalini süpürme etkisi.....	36
Şekil 4.5 Kapari alkol ekstraktının TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS ⁺ radikalini süpürme etkisi.....	36
Şekil 4.6 CUPRAC yöntemi ile antioksidan aktivite tayini için farklı Trolox derişimlerine karşı elde edilen absorbans grafiği.....	37
Şekil 4.7 Örnek ve standartların CUPRAC tayininde verdikleri antioksidan miktarı absorbans grafiği.....	38
Şekil 4.8 ORAC yöntemi ile antioksidan aktivite tayininde farklı Troloks derişimlerinde pirogallol red tüketiminin kinetikleri.....	40
Şekil 4.9: Troloks için elde edilen derişime karşı R ⁰ /R grafiği.....	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1: Rektif Oksijen ve Azot Türleri.....	3
Çizelge 1.2: Enzimatik ve Enzimatik Olmayan Antioksidanlar.....	5
Çizelge 1.3 Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması.....	13
Çizelge 4.1 Kapari ekstrelerinin ve standart antioksidanların IC ₅₀ değerleri.....	33
Çizelge 4.2 Kapari ekstraktlarının toplam fenolik bileşik miktarları.....	34
Çizelge 4.3 Kapari ekstreleri ve standartların TEAC değerleri.....	37
Çizelge 4.4 Örnek ve standartların TEAC _{CUPRAC} değerleri.....	38
Çizelge 4.5: Örnek ve standartların TEAC _{ORAC} değerleri.....	41
Çizelge 5.1: Örnek ve standartların IC ₅₀ , µg GAE/mL, TEAC _{ABTS} , TEAC _{CUPRAC} , TEAC _{ORAC} değerleri.....	42

1. GİRİŞ

Yüksek aktiviteye sahip bileşikler olan serbest radikaller, yaşamsal faaliyetler sırasında veya solunum, enzim reaksiyonları, otooksidasyon reaksiyonları gibi endojen kaynaklar ile sigara dumanı, hava kirliliği, UV ışınları, iyonize radyasyon ve ksenobiyotikler gibi çeşitli çevresel kaynakların etkisiyle meydana gelebilmektedirler (Young ve Woodside, 2001). Serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türleri insan vücudunda sürekli meydana gelmektedir. Serbest radikaller nötralize edilmediklerinde vücutta hücre membranı proteinlerini yıkarak hücreleri öldürmek, membran lipid ve proteinlerini yok ederek hücre membranını sertleştirip hücre fonksiyonunu engellemek, çekirdek membranını yararak nükleustaki genetik materyale etki edip DNA'yı kırılma ve mutasyonlara açık hale getirmek, bağışıklık sistemindeki hücreleri yok ederek bağışıklık sisteminin etkisini azaltmak yoluyla ciddi hasarlara neden olabilirler (Serteser ve Gök, 2003). Bu dengelenmemiş serbest radikal saldırısı ve hücre zarının tahribatı "oksidatif stres" olarak adlandırılır. Oksidatif stres, oksidatif lezyonlara, doku hasarına, mutasyonlara ve hücre ölümlerine yol açabilen reaktif oksijen ve reaktif azot türlerinin (çoğunlukla serbest radikallerin) aşırı üretimiyle tetiklenir.

Oksidatif stres tüm canlılarda gözlenebilir. İnsanlarda çeşitli kalp damar patolojileri (arterioskleroz ve hipertansiyon), diyabet, nörodejeneratif süreçler (özellikle Alzheimer ve Parkinson hastalıkları), hücre yıpranması ve yaşlanma, kıkırdak iltihabından gelen patoloji, solunum yolu hastalıkları (sistik fibroz ve astım), Down sendromu ve kanser gibi hastalıkların oluşumunda oksidatif stresin katkı yaptığı bilinmektedir (Gardes-Albert *et al.*, 2002).

Oksidatif strese karşı güncel tıp biliminde büyük ölçüde sınama-yanılma yöntemiyle bazı tedaviler önerilmekte ise de aslında tedavi yaklaşımlarının moleküler mekanizmalara (yani moleküler tıbbı ve biyokimyaya) dayandırılması gittikçe önem kazanmaktadır. Bu da gerek hastaların ve gerekse sağlıklı insanların diyetlerinin koruyucu ve tedavi edici hekimlik bağlamında doğal ve yapay antioksidanlarla takviye edilmesini gerekli kılmaktadır. Doğal antioksidanların en önemli kaynağı

bitkiler olup özellikle insan beslenmesinde bitkisel kaynaklı besinlerin kullanılması özendirilmekte ve giderek artmaktadır. Moleküler düzeyde çok büyük çeşitlilik gösteren antioksidan maddelerin bitkilerdeki miktarları ve dağılımları araştırma konusudur. Bu araştırmalar yüksek antioksidan aktivite gösteren molekülleri içeren bitkisel kaynaklı besinlerin önerilmesi açısından önemlidir. Bu nedenle de antioksidan aktiviteyi ölçmek üzere kullanılan çeşitli tayin yöntemlerinin geliştirilmesi ve karşılaştırılması son zamanlarda en önemli araştırma konularından biridir.

1.1. SERBEST RADİKALLER

Radikaller, dış orbitallerinde bir veya daha fazla paylaşılmamış elektron içeren kimyasal yapılardır. Böyle bir kimyasal tür basit bir atom ya da kompleks yapılu bir organik molekül olabilir. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması, söz konusu kimyasal türün reaktivitesini olağanüstü arttırdığı için, radikaller reaktivitesi çok yüksek olan kimyasal türlerdir (Kılınç, 2002).

İçinde bulunduğumuz çevrede çeşitli fiziksel etkenler ve kimyasal olaylar nedeniyle devamlı bir radikal yapımı vardır. Nerede ve nasıl üretildiklerine bakılmaksızın, radikaller başlıca 3 temel mekanizma ile oluşurlar (Kılınç, 2002):

i) Kovalent Bağların Homolitik Kırılması: Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık (500 - 600 °C) kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa, bu tür kırılmaya homolitik kırılma denir ve her iki atom üzerinde de paylaşılmamış elektron kalır. Paylaşılmamış elektron taşıyan türler radikalik özellik gösterirler.

ii) Normal Bir Molekülün Elektron Kaybetmesi: Radikal özellik göstermeyen bir molekülden elektron kaybı sonucu dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa, radikal formu oluşur.

iii) *Normal Bir Moleküle Elektron Transferi*: Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşturuluyorsa, bu tür indirgenme radikal oluşumuna neden olabilir.

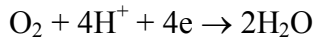
Hüresel koşullarda önemli miktar ve çeşitlilikte serbest radikal üretilir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijen ve azottan oluşan radikallerdir. Bu radikallerin bir listesi Çizelge 1.1’de gösterilmiştir (Halliwell ve Auroma, 1998).

Çizelge 1.1 Reaktif Oksijen ve Azot Türleri

Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	
Radikaller	Nonradikaller
Süperoksit, $O_2^{\cdot-}$	Hidrojen peroksit, H_2O_2
Hidroksil, OH^{\cdot}	Hipokloröz Asit, $HOCl$
	Hipobromöz Asit, $HOBr$
Peroksil, RO_2^{\cdot}	Ozon, O_3
Alkoksil, RO^{\cdot}	Singlet Oksijen, $\Delta g O_2$
Hidroperoksil, HO_2^{\cdot}	
Reaktif Azot Türleri (RNS)	
Radikaller	Nonradikaller
Nitrik oksit, NO^{\cdot}	Nitröz asit, HNO_2
Azot dioksit, NO_2^{\cdot}	Nitrozil katyonu, NO^+
	Nitroksil anyonu, NO^-
	Diazot tetroksit, N_2O_4
	Diazot trioksit, N_2O_3
	Peroksi nitrit, $ONOO^-$
	Peroksi nitröz asit, $ONOOH$
	Nitronyum katyonu, NO_2^+
	Alkil peroksinitritler, $ROONO$

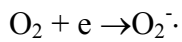
Serbest radikaller bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron bulundurlar. Bir veya daha fazla ortaklanmamış elektronun varlığı serbest radikali manyetik alanda kısmen paramanyetik kılarken bazen bu türlerin kimyasal reaktivitesi çok yüksek olur. Kimya ve biyolojide yukarıdaki tanımlamaya uygun pek çok serbest radikalın var olabileceği tartışılmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1989).

İnsan vücudunda da radikalik veya radikalik olmayan reaktif türler vardır. Bunların en önemlileri reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türleri (RNS) olarak adlandırılır ve bir listesi Çizelge 1.1’de verilmiştir (Halliwell ve Auroma, 1998). Bu reaktif türlerin bir kısmı normal biyokimyasal reaksiyonlar sırasında kaza ile meydana gelir. Örneğin aerobik canlıların mutlaka kullanılması gereken O₂ tam indirgenme sonucu,

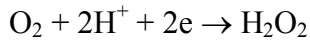


reaksiyonu gereğince suya dönüşürken;

tek elektronlu indirgenme ile:



süperoksit radikaline veya iki elektronlu indirgenme ile:



hidrojen peroksit dönüşür. Tam indirgenme ürünü olan su hücre için toksik etki göstermez ancak süperoksit radikali, hidroksil radikali ve H₂O₂ hücre için toksik etki gösterirler. Bunlar arasında en toksik özelliğe sahip olan hidroksil radikalidir.

Bir örneği yukarıda verilen ROS ve RNS’lerin önlemeyen oluşumları yanında canlı sistemlerde istemli üretimleri de gerçekleşir. Örneğin savunma hücreleri (fagositler) yabancı organizmalara karşı O₂⁻ ve H₂O₂ üretirler. Ancak, bu üretimin fazlası canlının kendisine de zarar verebilir.

1.2. ANTIOKSİDANLAR

Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek veya mevcut radikalleri süpürerek hücrenin zarar görmesini engelleyen ve yapısında genellikle fenolik fonksiyon taşıyan moleküllerdir (Kahkönen *et al.*, 1999; Nagai *et al.*, 2005).

Vücutta kalkan görevi yapan bu kimyasal bileşiklerin özelliği, kendi elektronlarını vererek serbest radikalleri nötralize etmeleri ve bu sırada serbest radikal haline gelmemeleridir (Prior ve Cao, 1999). Antioksidanların insan sağlığındaki yerini belirleyen en önemli faktörler, onların kimyasal yapıları, çözünürlükleri, yapı/aktivite ilişkileri ve doğal kaynaklardan elde edilebilmeleridir (Kaur ve Kapoor, 2001).

Canlı sistemlerde gerçekleşen bütün fizyolojik süreçler; enzim, hormon ve iz elementler gibi farklı ajanlar tarafından yönetilen oksidasyon ve indirgenme reaksiyonlarının kompleks kombinasyonlarını içerir. Canlılarda redoks dengesinde meydana gelebilecek herhangi bir değişiklik, hücrelerin ve doku fonksiyonlarının bozulmasına sebep olabilir. Antioksidan maddeler dokularda doğal olarak bulunur ve farklı oksidasyon reaksiyonlarını düzenler. Ayrıca, antioksidan maddeler veya antioksidan savunma sistemlerinde bulunan bazı bileşenlerin endojen sentezinde meydana gelebilecek bir yetersizlik, farklı hastalık türlerini meydana getirebilir (Cuttler ve Pryor, 1984).

1.3. ANTIOKSIDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ VE ANTIOKSIDANLARIN SINIFLANDIRILMASI

Normal fizyolojik koşullarda hücreler, serbest radikal ürünleri ve peroksitler gibi moleküllerin neden olabileceği oksidatif hasara karşı, antioksidan savunma sistemleri tarafından korunur. Antioksidan savunma sistemleri enzimatik ve enzimatik olmayan iki kategoride incelenebilir (Çizelge 1.2) (Rice-Evans *et al.*, 1997).

Çizelge 1.2 Enzimatik ve Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Enzimatik Antioksidanlar	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	
	Doğal	Sentetik
Süperoksit dismutaz (SOD)	Vitamin C	Bütillenmiş hidroksianisol (BHA)
Selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz (GPx)	α -tokoferol	Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT)
Glutatyon-S-transferaz (GST)	Polifenolik bileşikler	Gallik asit türevleri
Katalaz	Karotenoidler	Tersiyer bütillhidrokinon (TBHQ)
Glutatyon redüktaz (GR)		Nordihidroguareyetik asit (NDGA)

1.3.1. Enzimatik Antioksidanlar

1.3.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD)

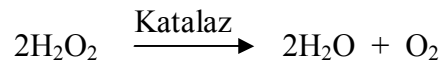
Süperoksiti hidrojen peroksit ve moleküler oksijene çeviren reaksiyonu katalizleyen bir metalloenzimdir.



Bu reaksiyon “oksidatif strese karşı ilk savunma” olarak da isimlendirilir. Çünkü, süperoksit zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısıdır. Bu sistem sayesinde hücrel kompartmanlardaki $\text{O}_2^{\cdot-}$ düzeyleri kontrol altında tutulur.

1.3.1.2. Katalaz

Katalaz, peroksizomlarda lokalize ve yapısında 4 “hem” grubu bulunan bir hemoproteindir. Karaciğer ve eritrositlerde en yüksek aktiviteye sahiptir. SOD aracılığı ile oluşan hidrojen peroksit bir radikal olmamasına karşın en reaktif tür olan $\text{HO}\cdot$ radikalinin öncüsü olması nedeniyle en fazla oksidatif hasara sebep olur. Katalaz hidrojen peroksiti su ve oksijene parçalar:



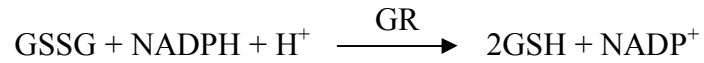
1.3.1.3. Glutasyon peroksidaz (GPx)

Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksit ve büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerinin indirgenmesinden sorumludur. GPx, aşırı hidrojen peroksit varlığında glutasyonun (GSH) okside glutatyon (GSSG, glutasyon disülfür) oksidasyonunu katalize ederken, hidrojen peroksiti de suya dönüştürür (Demirsoy *et al.*, 2003):



1.3.1.4. Glutasyon redüktaz (GR)

GPx tarafından H_2O_2 ve diğer lipid peroksitlerin indirgenmesi esnasında glutasyon okside glutasyona dönüşmektedir. Bu okside halin tekrar redükte GSH'a dönüştürülmesi gereklidir. Çünkü organizmanın glutasyon deposu sınırlıdır. GR, NADPH varlığında glutasyon disülfiti (GSSG) tekrar redükte glutasyona (GSH) çevirir:



1.3.1.5. Glutasyon-S-transferaz (GST)

Lipid hidroperoksitlere (ROOH) karşı GST'lar Se-bağımsız glutasyon peroksidaz aktivitesi gösterirler:



1.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

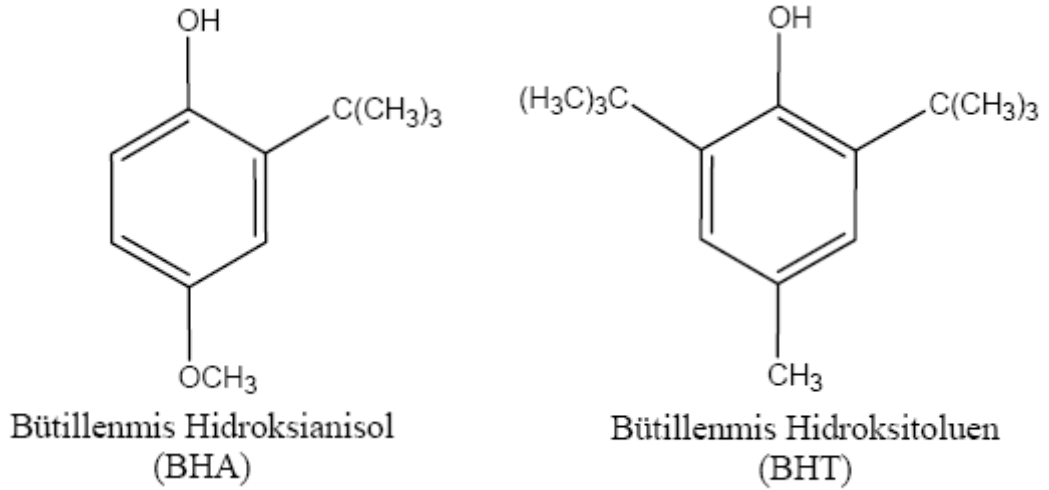
1.3.2.1. Sentetik Antioksidanlar

Besinlerdeki sıvı ve katı yağların oksitlenerek bozunması istenmeyen koku ve tatların oluşmasını takiben sekonder olarak besin kalitesinde ve güvenliğinde azalmaya neden olan toksik potansiyel taşıyan bileşiklerin oluşmasına neden olur. Besinlerin tat, renk ve vitamin değerlerinin korunması için antioksidan ilavesi gerekir. Besinlere doğal antioksidanlar (baharat veya diğer katkı maddeleri) da edilebilirse de endüstride daha çok aşağıda açıklanan sentetik antioksidanlar kullanılır.

a) Bütillenmiş hidroksianisol (BHA) ve Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT)

BHA, kimyasal olarak iki izomerin karışımıdır (3-terciyer butil-4-hidroksianisol ve 2-terciyer butil-4-hidroksianisol) ve beyaz mumsu parçacıklar halindedir. BHT ise, beyaz kristal görünümündedir. İki bileşik de, yağda çözünür fakat suda çözünmezler. BHA'nın gıda içinde taşınması BHT'den daha iyidir. Genellikle gıdanın yağ

içeriğinin ağırlığı üzerinden, tek başına veya antioksidan karışımı olarak % 0,02 (200 ppm) oranında kullanılırlar. BHA özellikle uçucu yağların renk, tat ve kokularının korunmasında, bilhassa kısa zincirli yağ asitlerinin oksidasyonunu kontrol etmede etkilidir. Genellikle tahıl ve şekerli ürünlerde kullanılır. BHA ve BHT birlikte kullanıldığında sinerjik etkiden bahsedilmektedir. Bu antioksidanların fazla tüketimi, vücutta aşırı hassasiyete ve alerjiye yol açabilmektedir. Günümüzde kanserojenik etkileri üzerinde de araştırma yapılmaktadır. İkisinin de, *National Research Council, Food Additive Committee*'nin verilerine göre gıdalarda kullanımında 1970'den beri azalma olmasına rağmen, halen 23 büyük gıda kategorisinde en fazla kullanılan antioksidanlar olduğu bilinmektedir (Çakmakçı ve Çelik, 2000).

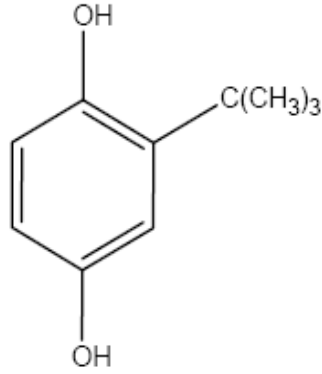


Şekil 1.1 BHA ve BHT'nin kimyasal yapıları

b) Tersiyer bütildidrokinon (TBHQ)

Kızartma yağlarını oksidasyona karşı korumak için en iyi antioksidan olarak bilinmektedir. Kızartma işlemi bitmiş ürünleri de korumaktadır. Bej renkli bir toz olan TBHQ, katı ve sıvı yağlarda çözünür. Diğer sentetik antioksidanların aksine bitkisel yağlar için en etkili sentetik antioksidandır. Yüksek sıcaklıklara dayanıklıdır (Keskin ve Erkmn, 1987).

Tek başına veya BHA ve/veya BHT ile birlikte kullanımı vardır. Sitrik asit ile karıştırıldığında, stabilize edici özellik kazanmaktadır. Avrupa Birliği ülkelerinde kullanımı yasaklanmıştır (Çakmakçı ve Çelik, 2000).



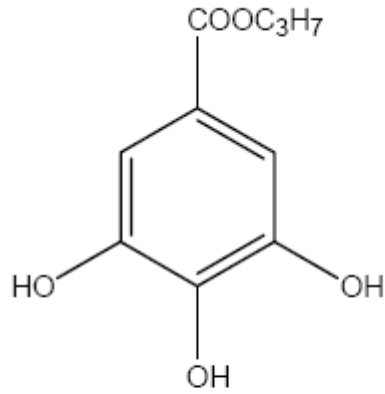
Tersiyer Bütül Hidrokinon
(TBHQ)

Şekil 1.2 TBHQ'nun kimyasal yapısı

c) Gallatlar

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

Gallatların kullanılmasında toplum sağlığı ve gıda hijyeni açısından olumsuz hiçbir bilgi ileri sürülmemektedir (Çakmakçı ve Çelik, 2000).



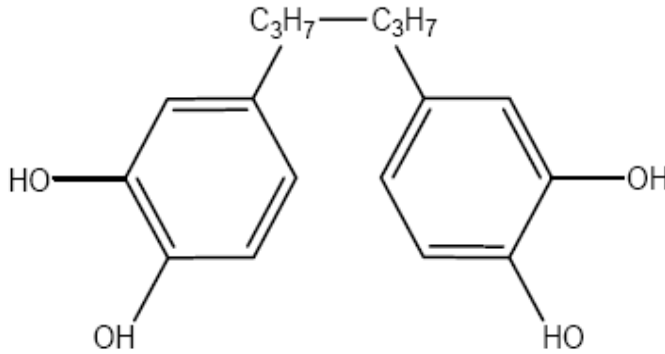
Propil gallat

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

Şekil 1.3 PG'nin kimyasal yapısı

d) Nordihidroguareyetik asit (NDGA)

NDGA, toksik etkisi yüksek, yağdaki çözünürlüğü az olan bir antioksidandır. Gıdalara % 0,01 oranında katılır, pişirilmiş besinlerde bile etkisini korur (Keskin ve Erkmen, 1987).



Şekil 1.4 NDGA'nın kimyasal yapısı

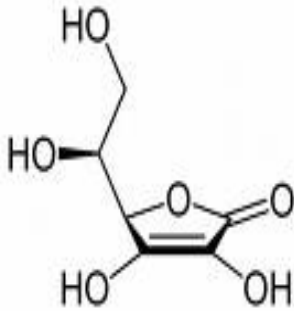
1.3.2.2. Doğal Antioksidanlar

a) C-Vitamini (L-askorbik asit)

C vitamini bir ketolaktondur (Şekil 1.5). Suda çözünen vitaminlerden olan askorbik asit özellikle taze yeşil sebze, meyve ve turuncgillerde bol miktarda bulunur. Çok

güçlü bir indirgeyici ajan olan C vitamini, süperoksit ve hidroksil radikalleri ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler (Gardner *et al.*, 2000). Ayrıca antiproteazların oksidan maddeler ile inaktive olmasını engeller. Yine vitamin C, tokoferoksil radikalinin tokoferole indirgenmesini de sağlar.

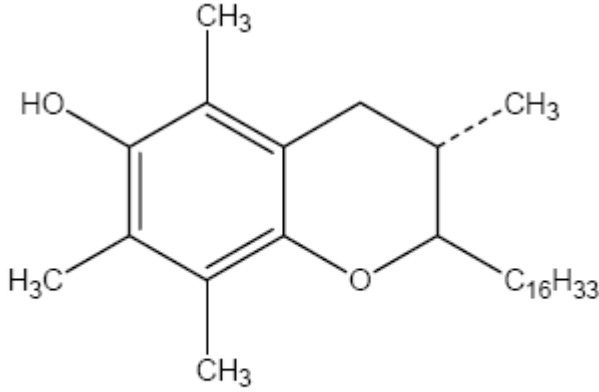
Çeşitli besin maddelerinde acılaşma, ekşime ve renk değişimini önler. C vitamininin koroner kalp hastalıklarına karşı koruyucu olduğu düşünülür. Çünkü LDL oksidasyonunu önler. Ayrıca doku yapımında ve onarımında rol alır, bağışıklık sistemini güçlendirir, kanserin önlenmesinde etkilidir, demirin vücutta kullanılmasına yardımcı olur ve sigaranın olumsuz etkilerini azaltır (Tütem ve Apak, 1991).



Şekil 1.5 L-Askorbik asitin kimyasal yapısı

b) E -Vitamini (α -tokoferol)

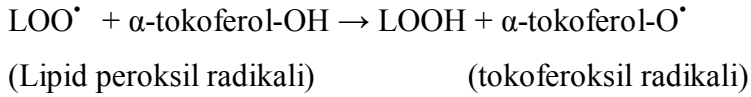
E vitamini doğada α -, β -, δ -, γ -tokoferoller ve tokotrienollerin oluşturduğu 8 farklı izomerik yapıda bulunmaktadır. Özellikle α -tokoferol, yüksek biyolojik aktivite göstermektedir. α -tokoferol vitaminlerin en güçlüsü ve yiyeceklerde en geniş şekilde yayılmış olanıdır (Landvik *et al.*,1998).Yapısında bulunan fenolik hidroksil gruplu aromatik halka, vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır (Şekil 1.6).



α -tokoferol

Şekil 1.6 α - tokoferol'ün kimyasal yapısı

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



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

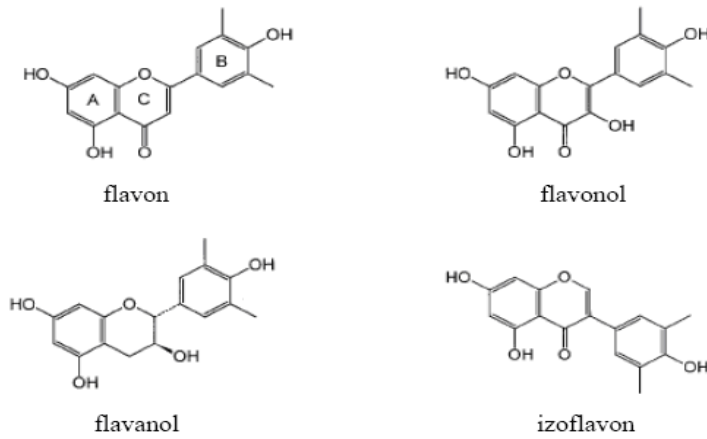
c) Polifenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler bir veya daha fazla hidroksil grubu içeren aromatik yapılardır. Pek çok polifenol bazıları metillenmiş veya glikozillenmiş birden fazla hidroksil grubu içerir. Bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerin yaklaşık 8000 çeşit olduğu tahmin edilmektedir. Fenolik bileşikler Çizelge 1.3'de gösterildiği üzere molekül yapılarına bağlı olarak alt sınıflarda incelenebilirler:

Çizelge 1.3 Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması

Altsınıflar	Açıklama
Antisiyaninler	Kırmızı ve mavi renkli çiçek pigmentleri
Antoklorlar	Sarıçiçek pigmentleri
Benzofuranlar	Bitki ve likenlerde bulunur
Kromonlar	Tedavi edici önemi olan küçük bir grup bileşik
Kumarinler	Bitkilerde yaygın olarak görülen 700'den fazla kimyasal yapı
Minor Flavonoidler	Flavanonlar ve dihidroflavonoller
Flavonlar ve flavonoller	Genellikle glikozidik formda pek çok kimyasal yapı
İzoflavonoidler	Baklagillerin karakteristik kimyasalları
Lignanlar	Genellikle odun ve ağaç kabuğunda bulunurlar
Fenoller ve fenolik asitler	Hemen hemen tüm bitkilerde bulunurlar
Fenolik ketonlar	Eğrelti ve şerbetçi otunda belirgin bir şekilde bulunurlar
Fenilpropanoidler	Yaygın Pekçok Yapı
Kinonoidler	Benzokinonlar, naptokinonlar ve antrakinonlar
Stilbenoidler	Dihidrofenantrenleri de içerir
Tanninler	Kondanse ve hidrolizlenebilir formda bulunurlar
Ksantonlar	Başlıca <i>Gentianaceae</i> ve <i>Guttiferae</i> ailesinde bulunurlar

Bu alt sınıflardan flavanoidler üye sayısı itibari ile en büyük grubu oluşturup yaklaşık 5000 üyesinin bulunduğu tahmin edilmektedir. Flavonoidler de flavonoller, flavonlar, flavanoller ve izoflavonlar gibi, temel kimyasal yapıları Şekil 1.7'de gösterilen, alt gruplara ayrılırlar.



Şekil 1.7 Flavonoidlerin temel kimyasal yapıları

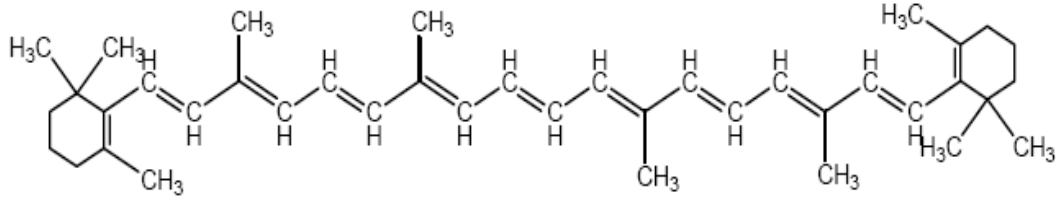
Hidrojen veya elektron verici ajanlar olarak indirgen özellik gösteren polifenollerin kimyasal aktiviteleri, serbest radikal süpürücü (antioksidan) potansiyellerinin bir ölçüsüdür. Bir antioksidanın aktivitesi aşağıdaki özellikleri ile tayin edilir:

- Hidrojen veya elektron verici ajan olarak reaktivitesi
- Ortaklanmamış elektronu stabilize ve delokalize etme kabiliyetine bağlı olarak oluşan antioksidandan türemiş radikalin etkinliği
- Diğer antioksidanlarla birlikte reaktivitesi
- Geçiş metal şelatlama potansiyeli

Polifenollerin serbest radikal süpürücü aktivite için ideal kimyasal yapıya sahip oldukları ve derişim düzeyinde *in vitro* olarak α - tokoferol ve vitamin C'den daha etkin antioksidan özellik gösterdikleri ispatlanmıştır (Rice-Evans *et al.*, 1997). Polifenollerin hidroksil (OH•), azid (N₃•), süperoksit (O₂•), lipid peroksil (LOO•) ve model t-bütül alkoksil (tBuO•) radikalleri ile ilişkileri, reaksiyonların hız sabitleri ve antioksidan radikalin kararlılığı konusunda pek çok çalışma yapılmıştır (Rice-Evans *et al.*, 1997). İlaveten, başta demir ve bakır olmak üzere metal bağlama eğilimleri polifenollerin geçiş metal katalizli serbest radikal oluşumunu engelleyerek koruyucu antioksidan özelliklerini doğrulamaktadır.

d) Karotenoidler

Birçok bitki, alg ve küçük organizmalarda bulunan karotenoidler yağda çözünebilen doğal antioksidanlardır. 600'den fazla karotenoid çeşidinin var olduğu bilinmektedir. Karotenoidlerin çoğunun temel yapısı poliizoprenoidden oluşmaktadır (Deming *et al.*, 2002). Yapıda bulunan çifte bağlardan dolayı sarı, portakal veya kırmızı renktedirler. Absorpsiyon maksimumu, konjuge çifte bağ sayısına bağlıdır ve 400-500 nm arasında değişmektedir. Karotenoidler, oldukça etkili ROS (reaktif oksijen türleri) süpürücüleridir. Karotenoidlerin antioksidan aktivitesi, yapısındaki konjuge çifte bağlardan ileri gelmektedir. Şekil 1.8'de β -karotenin kimyasal yapısı görülmektedir.



Şekil 1.8 β -karotenin kimyasal yapısı

1.4. ANTIOKSİDAN AKTİVİTE TAYİN YÖNTEMLERİ

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

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

- i) Hidrojen atomu transferi reaksiyonuna dayananlar (HAT)
- ii) Tek elektron transferi reaksiyonlarına dayananlar (ET)

HAT-esaslı analiz yöntemlerinin çoğunda yarışmalı reaksiyon kinetiği izlenir ve kantitasyon kinetik eğrilerden türetilir. HAT- esaslı yöntemler genellikle bir sentetik serbest radikal oluşturucu, bir oksitlenebilen prob ve bir antioksidandan oluşur. ET-esaslı yöntemler reaksiyon sonunun indikatörü olarak bir oksidan (aynı zamanda reaksiyonu takip etmek için prob olarak kullanılır) ile redoks reaksiyonunu içerir.

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

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

- a) İndüklenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein otooksidasyonu,
- b) Oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC)
- c) Total radikal yakalama antioksidan kapasitesi (TRAP)
- d) Crocin bleaching deneyleri olarak sıralanabilir.

ET esaslı analiz yöntemleri, antioksidan maddenin indirgenğinde renk değiştiren bir oksidan maddeyi indirgeme kapasitesinin ölçümüne dayanır. Renk değişiminin derecesi örnekteki antioksidan derişimi ile bağlantılandırılır. ET esaslı analiz yöntemleri:

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

Bu yöntemlerden FCR’in antioksidanın indirgeme kapasitesinin belirlenmesinde ve ORAC’in ise antioksidan radikal süpürücü kapasitesinin belirlenmesinde kullanılması önerilmektedir (Lopez-Alarcon ve Lissi, 2005).

Yukarıda bahsedilen tüm yöntemlerin bir bitkinin antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde kullanılması mümkün olmakla birlikte, örnekteki antioksidan maddelerin moleküler çeşitliliği bu yöntemler arasında her zaman doğrusal ilişki oluşmasını engelleyebilir. Bu nedenle tek bir yöntem kullanarak bitkinin antioksidan kapasitesi hakkında karar vermek uygun olmayabilir.

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

Bu çalışmada kullanılan antioksidan aktivite tayin yöntemlerinin prensipleri aşağıda açıklanmıştır.

1.4.1. DPPH Süpürücü Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemi

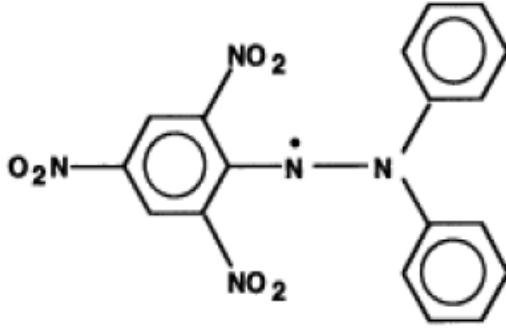
Bu yöntem ilk kez Blois (1958) tarafından 1,1-difenil-2-pikril hidrazil (DPPH) radikallerinin (Şekil 1.9) antioksidan moleküllerin tayininde kullanılabileceğinin önerilmesi ile ortaya çıkmıştır. Antioksidan aktivite ölçümlerinin yoğunlaştığı yıllarda Brand-Williams ve arkadaşları (Brand-Williams *et al.*, 1995) yöntemi geliştirmiş ve bu yöntem pek çok araştırmacı tarafından referans olarak kullanılmıştır.

Yöntemin esası DPPH içeren çözelti ile hidrojen atomu verme eğilimi olan bir molekülün (antioksidan) çözeltisinin karıştırılması sonucu DPPH radikalinin indirgenmesine ve çözeltinin başlangıçta mor olan renginin kaybolmasına dayanır. Mor renkli çözeltinin 520 nm civarındaki absorbansının azalması ölçülerek reaksiyon takip edilir.

Antioksidan aktivite başlangıçtaki DPPH derişiminin % 50'sinin azalması için harcanan antioksidan miktarını ifade eden IC₅₀ (etkin konsantrasyon) değeri ile verilir (Brand-Williams *et al.*, 1995).

DPPH yöntemi teknik olarak basit olmasına karşın bazı dezavantajları bulunmaktadır. Birçok antioksidan bileşik lipid peroksidasyonunda rol oynayan peroksil radikalleri ile çok hızlı tepkime vermektedir, ancak DPPH ile yavaş tepkime vermektedir. Örneğin askorbik asit ile 1,15 dakika ve rutin ile 103 dakikada tepkime vermektedir. Sonuç olarak antioksidan kapasitenin doğru bir şekilde ifade

edilemediği düşünülebilir. Ayrıca, DPPH ile antioksidan bileşik arasındaki reaksiyon kinetiğinin DPPH derişimi ile her zaman doğrusallık göstermediği de bilinmektedir (Huang ve Prior, 2005; Molyneux, 2004).



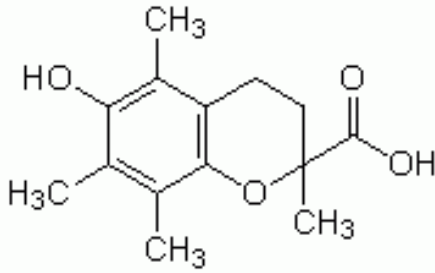
Şekil 1.9 DPPH reaktifinin kimyasal yapısı

1.4.2. Folin-Ciocalteu Yöntemi İle Total Fenolik Bileşik Tayini

Bu yöntem 1965’de Singleton ve Rossi tarafından önerilmiş ve daha sonra farklı uygulayıcılar tarafından geliştirilmiştir. Folin-Ciocalteu reaktifi (Folin Fenol Reaktifi veya Folin-Denis reaktifi) fosfomolibdat ve fosfotungstat karışımı bir reaktif olup fenolik ve polifenolik antioksidanların kolorimetrik tayininde kullanılır (Singleton *et al.*, 1965). Yöntem test edilen materyalin reaktifin oksidasyonunu inhibe etmesi için gerekli miktarını ölçer (Vinson *et al.*, 2005). Ancak bu reaktifin sadece total fenolik bileşik miktarını ölçmediği ve örnek içinde mevcut tüm indirgen maddelerle de reaksiyon vereceği bilinmektedir. Bu nedenle reaktifin sadece örnekteki fenolik bileşik düzeyini değil örneğin total indirgeme kapasitesini de ölçtüğü konusunda tartışma vardır (Ikawa *et al.*, 2003). Buna rağmen Folin-Ciocalteu reaktifi ile total fenolik bileşik miktarı tayini hemen hemen tüm antioksidan çalışmalarında örnekteki fenolik içeriğinin tayininde kullanılan standart bir yöntemdir. Ayrıca bu reaktifin ilaç analizinde (Rao *et al.*, 1978), idrar gibi biyolojik örneklerde (Raura *et al.*, 2006), gıda ürünlerinde (Mogalhaes *et al.*, 2006) fenolik bileşik düzeyi veya indirgeme kapasitesi ölçümleri için genişletilmiş veya modifiye edilmiş uygulamaları vardır.

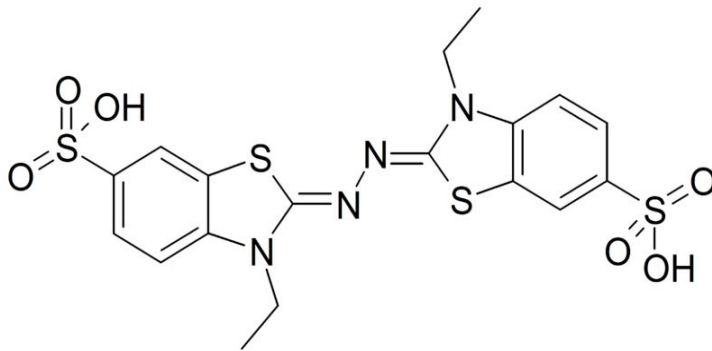
1.4.3. TEAC (Troloks Eşdeğer Antioksidan Kapasite) Yöntemi

Troloks [(±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit] (Şekil 1.10), E vitamininin suda çözünür eşdeğeridir (Ree *et al.*, 1999). Troloks canlı sistemlerde doğal olarak bulunan bir bileşik olmamakla birlikte pek çok antioksidan aktivite tayin yönteminde standart olarak kullanılır. Genellikle belli bir derişim aralığında Troloks antioksidan olarak kullanılarak bir çalışma grafiği hazırlanır ve bilinmeyen antioksidanın aktivitesi bu grafikten Troloks eşdeğeri olarak okunur.



Şekil 1.10 Troloks molekülünün kimyasal yapısı

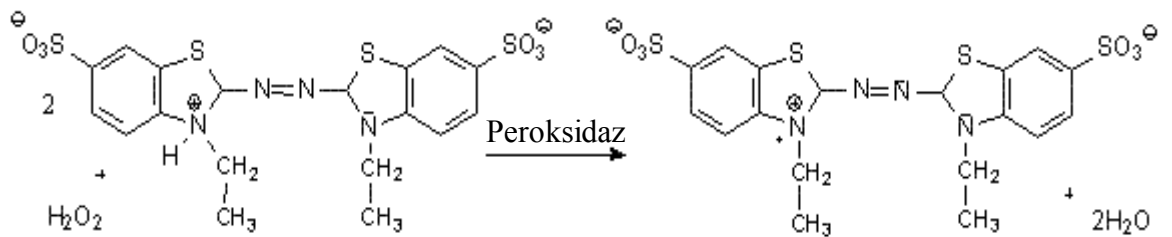
TEAC yöntemi ilk olarak Miller ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (Miller *et al.*, 1993). Kromojenik bir redoks radikali olan ABTS [2,2'-azinobis(3-etilbenzotiyazolin 6-sülfonat)] (Şekil 1.11) aynı zamanda kararlı bir radikaldir. Hem suda hem organik çözücülerde çözüldüğünden hem hidrofilik hem de hidrofobik antioksidan aktivite tayininde kullanılabilir. TEAC yöntemi, antioksidan varlığında çözeltideki ABTS' radikalinin absorbansındaki azalmanın ölçülmesine dayanmaktadır (Rice-Evans ve Miller, 1984; Pellegrini *et al.*, 1999).



Şekil 1.11 ABTS molekülünün kimyasal yapısı

Orijinal yöntemde ABTS radikal kasyonu, H_2O_2 ile metilmiyoglobinin reaksiyona girmesiyle oluşan ferrilmiyoglobin ile ABTS arasındaki etkileşimden oluşmaktadır. $ABTS^{*+}$ radikal kationunun karakteristik absorpsiyon spektrumu 660, 734, 820 nm'de maksimum vermektedir (Rice-Evans ve Miller, 1984; Pellegrini *et al.*, 1999). Orijinal TEAC yönteminde analiz edilen maddenin (antioksidanın) ABTS radikalini indirgeme yeteneği ölçülmektedir. Ancak bu madde ferrilmiyoglobini de indirgeyebilir. Re ve arkadaşları (1999) tarafından modifiye edilen TEAC yönteminde, ABTS'nin potasyum persülfat ile oksidasyonu sonucu $ABTS^+$ radikal kasyonu oluşmaktadır (Şekil 1.12). Yani sisteme antioksidan ilave edilmeden önce radikal kasyonu oluşturulmaktadır. Orijinal metotta ise antioksidan varlığında radikal meydana gelmektedir (van den Berg *et al.*, 1999). Oluşan radikal kasyonu oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 2 gün dayanıklıdır. Geliştirilen metodun orijinal metottan farkı hem lipofilik hem hidrofilik antioksidanlara uygulanabilmesi ve bir dekolorizasyon (renk giderimi) yöntemi olmasıdır.

TEAC metodunun diğer bir modifikasyonu van den Berg *et al.* (1999) tarafından geliştirilmiştir. Bu çalışmada bir azo bileşiği olan 2,2'-azobis-(2-amidinopropan)HCl (ABAP) kullanılarak $ABTS^*$ radikal anyonu oluşturulmuştur. Yöntemde antioksidanlar radikalın oluşmasından önce eklenmektedir. Böylece radikal oluşumuna etki edecek bileşiklerin girişimini önlemektedir. Bu yöntemde de hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidan kapasitesi ölçülebilmektedir. Diğer bir yenilik Arnao *et al.* (1998) tarafından ortaya konulmuştur. Burada ABTS radikalinin oluşumunda horse radish peroxidase (HRP) enzimi kullanılmıştır. ABTS/ H_2O_2 / HRP enzimatik sistemi kullanılarak hidrofilik ve lipofilik antioksidan aktivitesi ölçülebilmektedir (Arnao *et al.*, 1998; Rice-Evans *et al.*, 1996).



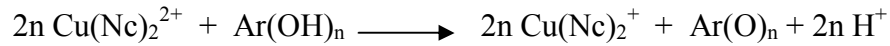
Şekil 1.12 ABTS radikal kation oluşumunun reaksiyon denklemi

1.4.4. (CUPRAC) Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite

Yöntemi

Tütem *et al.* (1991) tarafından ılımlı bir oksidan olarak çeşitli indirgen ajanların tayini için kullanılabileceği önerilen bis(neokuprein)bakır (II) klorür reaktifi sistein (Tütem ve Apak, 1991), E vitamini (Tütem *et al.*, 1997) ve askorbik asit (Güçlü *et al.*, 2005)'in tayininde başarı ile kullanılmıştır. Bu yöntem daha sonra kuprik iyonu indirgeme potansiyeli ölçülmek suretiyle bitki ekstralarında ve insan serumunda (Apak *et al.*, 2004; 2005) total antioksidan kapasite tayini için geliştirilmiş ve bakır iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity: CUPRAC) olarak isimlendirilmiştir. Bu yöntemle hem hidrofilik hem lipofilik toplam antioksidan kapasitesi kolaylıkla tayin edilebilmektedir.

Yeni geliştirilen CUPRAC yönteminde kullanılan kromojenik oksidasyon reaktifi olan bis(neokuproin)-Cu(II) klorür ile antioksidan polifenol arasındaki reaksiyon aşağıdaki gibi gerçekleşmektedir:

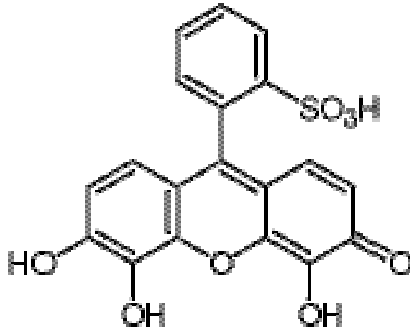


Bu reaksiyonda, Ar(O)_n hidroksi grubu içeren antioksidan polifenolden oluşan kinonu ifade etmektedir. Tepkime sonunda iki proton açığa çıkmakta ve Ar(OH)_n yapısında bulunan hidroksil grubu kinon formuna dönüşmektedir. Cu(II)-Nc ise 450 nm'de maksimum absorbans veren şiddetli renk oluşumuyla birlikte Cu(I)-Nc kelatına dönüşmektedir. Bu reaksiyonda, n-OH grubu içeren antioksidan karakterli bileşikler, 2n-e donörü olarak hareket etmektedir (Apak *et al.*, 2004).

1.4.5. ORAC (Oksijen Radikal Absorbsiyon Kapasitesi) Yöntemi

ORAC yöntemi ilk kez Cao, Alessio ve Cutler tarafından önerilmiştir (Cao *et al.*, 1993). Bu yöntemde peroksil radikalleri ile oksitlenen bir hedef molekülün bir antioksidan tarafından ne kadar korunduğu, hedef molekülün bozunması floresans veya absorbans takibi ile izlenerek, bozunma kinetiği eğrisinin altında kalan alanın değişimi ile ölçülür. Orijinal yöntemde hedef molekül olarak fikoeritrin kullanılmış

iken daha sonra bu molekülün yerini fluoresssein almıştır (Ou *et al.*, 2002; Alarcon *et al.*, 2008). Hem fikoeritrin hem de fluoresssein ile yapılan ORAC ölçümleri floresans spektrofotometre gerektirmektedir. Ayrıca test edilen bileşiğin antioksidan aktivitesinin yüksek olması durumunda kesin kinetik veri elde etmek zorlaşmaktadır. Bu nedenle bu reaktiflerin yerine renkli bir reaktif olan pirogallol red (PGR)'in (Şekil 1.12) kullanılması önerilmiştir (Lopez-Alarcon ve Lissi, 2006). Pirogallol red kullanılarak elde edilen ORAC değerlerinin antioksidanların peroksil radikallerine karşı reaktivitesini daha doğru gösterdiği de rapor edilmiştir (Lopez-Alarcon ve Lissi, 2005). Pirogallol red kullanılarak ORAC yöntemi ile antioksidan tayini saf antioksidan maddeler ve kompleks antioksidan karışımları için denenmiş ve sonuçların test edilen bileşiklerin reaktivitesi ile daha iyi korelasyon gösterdiği ve görünür spektroskopi uygulanmasının daha kolay olduğu sonucuna varılmıştır (Lopez-Alarcon ve Lissi, 2006).

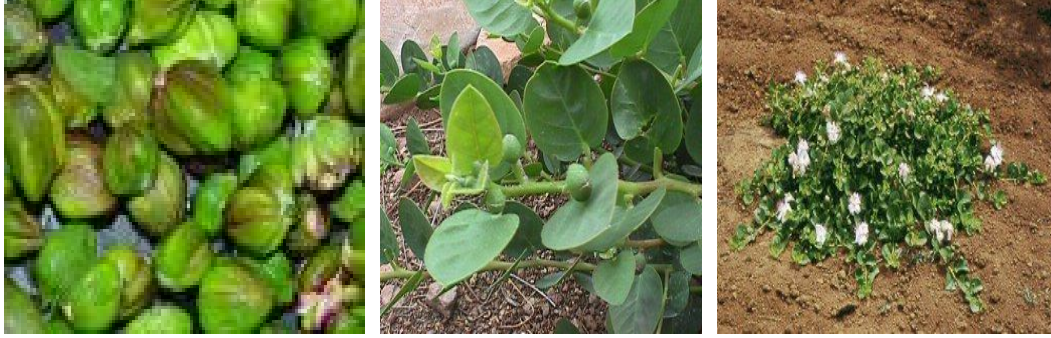


Şekil 1.13 Pirogallol Red molekülünün kimyasal yapısı

1.5. KAPARI (Gebere Otu) BİTKİSİ

Yurdumuzda Akdeniz ikliminin hakim olduğu Batı Anadolu illeri başta olmak üzere, Orta Anadolu'da Tokat ve civarında, Doğu Karadeniz ve Güneydoğu illerinde doğal olarak yetişen Gebere otu (*Capparis*); çalimsı yapıda yatık olarak büyüyen dikenli bir bitkidir. Fosfor, potasyum ve kalsiyumca zengin kalkerli ve killi toprakları seven ve güneşten hoşlanan bir bitki olması nedeniyle, güneşe bakan yamaçlarda

kendiliğinden yetişir ve iyi gelişir. Kaparinin çiçek tomurcukları mineral madde bakımından oldukça zengindir. 100 g yenilebilen kuru maddede: 67 mg kalsiyum, 65 mg fosfor, 9 mg demir, 24,01 g protein bulunmaktadır. *Capparaceae* familyasından olan gebere otunun *Capparis spinosa*, *Capparis ovata*, *Capparis scula* ve *Capparis orientalis* gibi çeşitleri vardır.



Şekil 1.14 Kapari (Gebere otu) bitkisinin tomurcukları, yaprakları ve yerdeki görünümü

Capparidaceae ailesine ait bitkilerin tomurcukları, meyveleri ve kısmen de filizleri Akdeniz bölgesi ülkelerinde ilk çağlardan beri yemeklerde tat verici olarak kullanılmaktadır. Ayrıca alternatif tıpta antiromatik, ekspektoran ve antihepatotoksik kullanımları da rapor edilmiştir (Inocencio *et al.*, 2000; El Tanbouly *et al.*, 1989). Kapari tomurcukları işlenip konservesi yapılarak Yunanistan, İtalya, Türkiye, Fas ve İspanya gibi Akdeniz ülkeleri tarafından diğer ülkelere ihracatı da yapılmaktadır.

Akdeniz ülkelerinde ticari olarak üretilen kapari tomurcuklarında yapılan bir çalışmada temel bileşenlerinin kuersetin 3-rutinozit, kamferol 3-rutinozit ve kamferol 3-ramnozil-rutinozit olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca 10 gram kapari tomurcuğu 65 mg flavonoid glikozit içerdiği bu antioksidan içeriğinin insan beslenmesine önemli katkı yapabileceği belirtilmiştir (Inocencio *et al.*, 2000).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Spektroskopik antioksidan kapasite tayininde kullanılan yöntemlerin içecek, şifalı bitkiler, besin ekstraları ve serum gibi farklı ortamlara uygulandığı birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalardan bir kaçını örneklendirmek yöntemlerin en çok uygulandığı alanları belirlemek açısından önemlidir.

Park ve arkadaşları tarafından, etilenle ve açık havayla muamele edilmiş kivi meyvesi örneklerine ABTS/TEAC, DPPH, CUPRAC yöntemleri uygulanmıştır. Etilenle muamele edilmiş kivilerde total polifenolik bileşik miktarı ile ABTS/TEAC, DPPH, CUPRAC yöntemleri ile ölçülen antioksidan kapasitelerinin korelasyon katsayıları sırasıyla, 0,74; 0,93; 0,98 olarak bulunmuş olup hava ile muamele edilmiş kivi örnekleri için ise bu değerlerin 0,72; 0,88; 0,97 olduğu gözlenmiştir (Park *et al.*, 2008).

Cai ve arkadaşları Çin'in geleneksel 112 şifalı bitkisinin fenolik bileşik içeriklerini ve antioksidan aktivitelerini incelemişlerdir. Şifalı bitki ekstralarının Trolox eşdeğeri cinsinden toplam antioksidan kapasiteleri TEAC/ABTS yöntemi uygulanarak elde edilmiştir. Test edilen bitkilerin toplam fenolik içerikleri ile antioksidan kapasiteleri arasında önemli bir lineer ilişki (hepsinde $R^2 \geq 0,95$) olduğu gözlenmiştir (Cai *et al.*, 2004).

Karakaya ve arkadaşları, Türkiye'de tüketilen katı ve sıvı gıdaların toplam fenolik içeriklerini Folin yöntemi ile, toplam antioksidan kapasitelerini ise ABTS radikalini süpürme yeteneklerini ölçerek belirlemişlerdir. Buna göre sıvı gıdalar için toplam fenolik içeriği 68-4162 mg/L arasında, katı gıdalar için ise 735-3994 mg/kg arasında değişmektedir. Katı ve sıvı gıdaların toplam antioksidan kapasitesi (TAC) ise sırasıyla 0,61-6,78 mM ve 0,63-8,62 mM arasında bulunmuştur. TAC ile toplam fenolik içerik arasında iyi bir korelasyon gözlenmiştir ($R^2=0,95$). Toplam fenolik içeriklerine göre sıvı gıdalar, siyah çay >çözünür kahve >kola >kırmızı şarap > mor havuç suyu >kayısı nektarı >türk kahvesi >üzüm pekmezi >ada çayı >beyaz şarap >ıhlamur şeklinde sıralanmıştır (Karakaya *et al.*, 2001).

Bir başka çalışma ise, Malatya bölgesindeki kayısılar üzerinde yapılmıştır. Bu çalışmada antioksidan aktivitesi CUPRAC, ABTS/ TEAC ve folin yöntemleri kullanılarak karşılaştırılmıştır. ABTS/ TEAC ve folin metotlarının CUPRAC metoduyla uyumlu olduğu görülmüştür ve saf flavonoidlerin kalibrasyon eğrileriyle, kayısı ekstrelerine iç standart ilavesiyle elde edilen kalibrasyon eğrileri paralellik göstermiştir (Güçlü *et al.*, 2006).

Öztürk ve arkadaşları tarafından, rubarb'ın kök ve baş kısımlarının metanol ve kloroform ekstrelerinin antioksidan aktivitelerini ölçülmüştür. Antioksidan aktiviteleri belirlemede 5 farklı yöntem (DPPH, süperoksit anyonunu süpürücü etki, ferrik indirgeme gücü, CUPRAC, metal şelatlama aktivitesi) kullanılmıştır. Özellikle köklerinin metanol ve kloroform ekstrelerinde yüksek aktivite gözlenmiştir. Bitkinin çalışılan kısımlarının ekstrelerinin 5 farklı yöntemle ölçülen antioksidan özellikleri arasında negatif ve pozitif korelasyonlar tespit edilmiştir (Öztürk ve ark., 2007).

Gil ve arkadaşları, nar sularını antioksidan aktivitesini dört farklı yöntemle (ABTS, DPPH, DMPD ve FRAP) ile tayin edip kırmızı şarap ve yeşil çay ile karşılaştırmışlardır. Ticari nar suları kırmızı şarap ve yeşil çaya nazaran 3 kat daha fazla antioksidan aktivite gösterdiği görülmüştür (Gil *et al.*, 2000).

Yapılan bir başka çalışmada ise, çayın fenolik madde içeriği, antioksidan özelliği ve çaydaki fenolik maddelerin sağlık üzerine etkisi tartışılmışlardır. Çay, içerdiği flavanoller nedeniyle güçlü antioksidan aktiviteye sahip olup birçok hastalığın oluşum ve gelişimini önlemektedir. Yapılan çalışma, çay tipine bağlı olarak fenolik madde miktar ve kompozisyonunun dolayısıyla antioksidan aktivitesinin değiştiğini, yeşil çay içerdiği yüksek flavanoller nedeniyle, siyah çay ise flavanol içeriği yanında enzimatik oksidasyon aşamasında oluşan sekonder fenolik maddeler nedeniyle yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Tosun ve Karadeniz, 2005).

Gülçin ve arkadaşları, kızılıçığın sudaki ekstratının antioksidan kapasitesini belirlemişlerdir. Örneklerin antioksidan özelliğini belirlemede farklı yöntemler (serbest radikal toplama, indirgeme gücü, süperoksit radikalini toplama, hidrojen

peroksit toplama ve metal şelatlama kapasitesi) kullanmışlardır. Örneklerin antioksidan özelliklerinin lipit peroksidasyonunu inhibe etmede önemli derecede etkili olabileceğini bildirmişlerdir. Kızılığın antioksidan özelliğini standart antioksidanlarla (BHA, BHT ve α -tokoferol) karşılaştırmışlardır (Gülçin ve ark., 2005).

Arts ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada, bir antioksidan bileşiğin antioksidan etkinliğini tahmin edebilmek için TEAC yönteminin uygulanabilirliğini değerlendirmişlerdir. Bu sebeple diğer yöntemlerle bir karşılaştırma yapılmış ve birbirleriyle yapısal benzerlikler taşıyan kateşol, resorsinol ve hidrokinon bileşiklerinin en etkili olanının resorsinol olduğu tespit edilmiştir. Tersine diğer yöntemlerde resorsinol diğer bileşiklerden daha düşük antioksidan kapasite göstermiştir. Benzer çalışma flavonoidlerden galangin ve krisine uygulanmış ve birbirine yakın sonuçlar vermiştir. Ancak diğer yöntemlerde galanginin daha kuvvetli bir antioksidan olduğu görülmüştür. Krisin ve resorsinolün TEAC yönteminde yüksek kapasite göstermesi, bu bileşiklerin ABTS[•] Radikali ile etkileştikten sonra bazı reaksiyon ürünleri vermesi ve bu reaksiyon ürünlerinin ilgili bileşiklerden daha fazla antioksidan etki gösterip radikal ile daha hızlı reaksiyon vermesinden kaynaklanır. Bu nedenden dolayı, kateşol, hidrokinon ve galangin ile oluşan reaksiyon ürünlerinin ABTS[•] radikali ile etkileşmeyip TEAC değerine bir etkisi olmadığı savunulmuştur (Arts *et al.*, 2003).

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

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

Etil alkol, gallik asit Riedel-de Haën'den (Seelze/Germany); PBS, NH₄SCN, FCR (Folin & Ciocalteau's Fenol Reaktif), BHT, α-tokoferol, Troloks [(±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit], ABTS [2,2'-azinobis(3-etilbenzotiyazin-6-sülfonik asit) diamonyum tuzu], potasyum persülfat (K₂S₂O₈), amonyum asetat, bakır(II) klorür dihidrat (CuCl₂.2H₂O), neokuprein (2,9-dimetil 1,10-fenantrolin), Merck'ten (Darmstadt/Germany); Na₂CO₃, NaH₂PO₄.2H₂O, DPPH (1,1-difenil-2-pikril hidrazil) Fluka'dan (Buchs/Switzerland); H₃PO₄, KCl Carlo Erba'dan (Rodano/Italy) temin edildi.

Deneylerde Soxhlet (Isolab) cihazı, Privileg (50502) öğütücü, Labconco (Freezone 6) Liyofilizatör, İka (RV 05 Basic 1B) Rotari Evaporatör, Heraeus (Fuktion Line) etüv, Shimadzu (AX 200) 0,0001 duyarlılıkta terazi, Hana (pH 211) pH metre, Shimadzu (UV-1601) Spektrofotometre, Heidolph (Reax Top) vorteks, Bandelin Sonorex (RK255H) ultrasonik banyo, Brand (transferpette) otomatik pipetler, Teknik (B8) distile su üretme cihazı kullanıldı.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Kapari Spinoza Ekstrelerinin Hazırlanması

Kapari (*Capparis spinosa*) tomurcuk örnekleri Mayıs ayında ADÜ kampüs alanından toplandı. Tomurcuklar etüvde 40 °C'de kurutulduktan sonra Privileg (50502) öğütücü de öğütülüp toz haline getirildi ve 300 mm çapında 50 meş'lik elek kullanılarak elendi. Elde edilen kapari toz örneği farklı polariteye (sırasıyla 24,3; 78,5 dielektrik sabitine) sahip iki farklı çözügen (etanol, su) ile ekstraksiyona tabi tutuldu. Bunun için 10 g toz örnek 50 mL etil alkol ile iki saat ultrasonik banyoda karıştırıldıktan sonra süzüldü. Kalıntıya 50 mL etil alkol ilave edilerek işlem tekrarlandı ve süzüntüler birleştirildi. Örnekteki etanol 40 °C'de döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı ve kalıntı alkol ekstresi olarak etiketlendi. Toz

halindeki bitki örneğinin 10 g'ı bu kez distile su (200 mL) içerisinde, iki saat karıştırıldıktan sonra süzüldü. Süzme işleminden sonra süzüntü donduruldu. Dondurulan örnek liyofilizatörde 96 saat 0,04 mbar; -50 °C'de tutularak suyu uzaklaştırıldı (su ekstresi). Elde edilen her iki ekstre +4 °C'de koyu renkli cam kaplarda saklandı. Örnekler uzun süre kullanılmadığı durumlarda -18 °C'de korundu. Ekstrelerin stok çözeltileri kendi çözenleri kullanılarak (etanol ve su) hazırlandı.

3.2.2. DPPH (1,1-Difenil 2-Pikril Hidrazil) Serbest Radikal

Süpürücü Aktivite Tayini

DPPH Radikal Süpürücü Aktivite Tayini Brand–Williams *et al.* (1995)'a göre yapıldı. 10^{-3} M DPPH'nin etanoldeki çözeltisinden 1 mL alındı 3 mL ekstre çözeltisi ilave edilip vorteks ile şiddetle çalkalandı. 30 dakika karanlıkta bekletilip 517 nm'de absorbans okundu. Standart olarak α -tokoferol, BHT ve Troloks kullanıldı. Absorbanstaki düşüş ne kadar büyükse antioksidan aktivite o kadar yüksek demektir. DPPH radikalini süpürme aktivitesi reaksiyonu inhibe etme yüzdesi şeklinde ifade edilmek üzere aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

$$\% \text{ İnhibisyon} = [A_K - A_Ö / A_K] \times 100$$

A_K : Kontrol (antioksidan içermeyen) örneğin absorbansı

$A_Ö$: Örneğin (antioksidan içeren) absorbansı

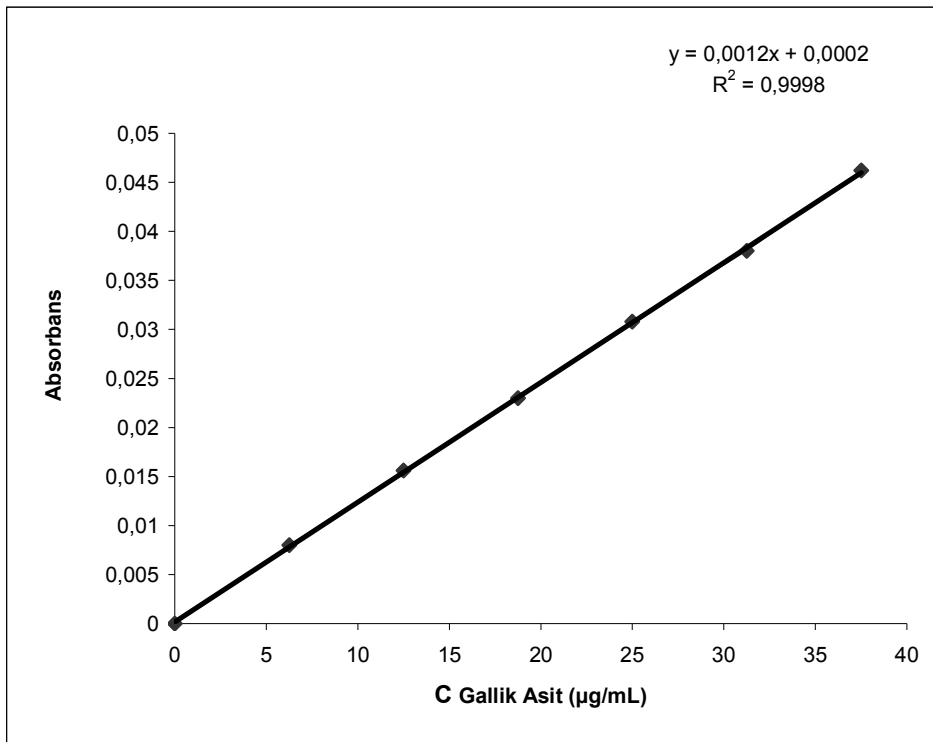
Antioksidan derişimlerine karşı hesaplanan % İnhibisyon değerleri ile çizilen grafikten % 50 inhibisyona neden olan antioksidan derişimleri (IC_{50}) okundu.

3.2.3. Toplam Fenolik Bileşik Miktarı Tayini

Toplam fenolik madde miktarı tayini, Singleton *et al.* (1999)'a göre yapıldı. 10 mg etanol ekstresi 10 mL etanolde; 10 mg su ekstresi ise 10 mL distile suda çözülerek ekstrelerin stok çözeltileri hazırlanmış oldu. 45,9 mL distile su içine hazırlanan stok çözeltilerden 100'er μ L ilave edildi. 45,7 mL distile su içine ise hazırlanan stok çözeltilerden 300'er μ L ilave edildi. İki farklı derişimdeki stok çözeltilerine (100 μ L

ve 300 µL), 1'er mL Folin-Ciocalteu Reaktifi (FCR) satın alındığı şekilde ilave edildi ve 3 dakika oda sıcaklığında bekledikten sonra 3 mL sodyum karbonat (% 2'lik) ilavesinden sonra karışımın 2 saat karıştırılması sonucu oluşan rengin 760 nm'de absorbansı okundu. Bu tayin için iyi bilinen bir fenolik bileşik olan gallik asit standart olarak kullanıldı.

Gallik asit standardı ile çizilen standart grafik (Şekil 3.1) yardımı ile örneklerdeki toplam fenolik bileşik miktarı gallik aside eşdeğer (GAE) olarak hesaplandı.



Şekil 3.1 Gallik asit standart grafiği

3.2.4. TEAC (Troluks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi) / ABTS-Persülfat Yöntemi

Troluks eşdeğeri antioksidan kapasite tayini, Re *et al.*, (1999)'a göre yapıldı. 7 mM ABTS'nin distile sudaki çözeltisinden 50 mL ve 2,45 mM potasyum persülfat çözeltisinden 25 mL alınarak karıştırıldı ve karanlıkta 12-16 saat bekletildi. Kullanıma hazır hale gelen mavi yeşil renkli ABTS radikal çözeltisi, 734 nm'de absorpsiyon 0,7 olacak şekilde etil alkolle 1:80 oranında seyreltilti.

Numaralandırılan ependorflara 1' er mL bu ABTS radikal çözeltisinden ilave edilip üzerlerine 10 µL örnek (5 mg/50 mL ekstre) çözeltilerinden eklendi. 1. ve 6. dakika sonunda 734 nm'de absorbans değerleri okundu. 1. dakikadaki absorbans değerinden (A_1) 6. dakikadaki absorbans değeri (A_6) çıkarılarak ΔA değerleri elde edildi. ΔA değerleri kullanılarak aşağıdaki formüle göre % inhibisyon değerleri hesaplandı ve örnek konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirildi.

$$\% \text{İnhibisyon} = \frac{A_6 - A_1}{A_1} \times 100 = \frac{\Delta A}{A_1} \times 100$$

3.2.5. (CUPRAC) Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite Yöntemi

Bakır(II) indirgeyici antioksidan kapasite tayini Güçlü *et al.*, (2006)'a göre yapıldı. 10^{-2} M CuCl_2 , $7,5 \times 10^{-3}$ M neokuproin çözeltileri ve amonyum asetat tamponundan (pH: 7) 1'er mL alındı. Üzerine son hacim 4.1 mL olacak şekilde, x mL ekstre çözeltisi ve (1-x) mL ekstre çözgeninden ilave edilip iyice çalkalandı. Tüpler oda sıcaklığında ağzı kapalı olarak 30 dakika bekletilip 450 nm'de absorbans okundu. Standart olarak BHT, Troloks ve α -tokoferol kullanıldı. Troloks için elde edilen grafiğin eğimi ile örnekler için elde edilen doğruların eğimleri oranlanarak CUPRAC aktivitesi $\text{TEAC}_{\text{CUPRAC}}$ olarak ifade edildi.

3.2.6. ORAC (Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi) Yöntemi

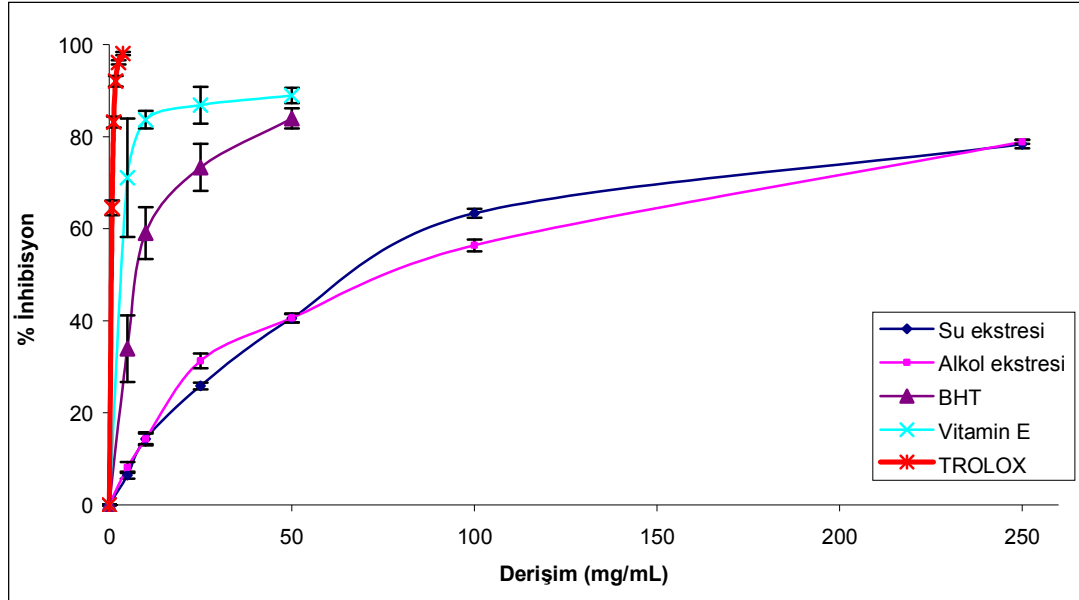
Oksijen radikal absorbans kapasite tayini Lopez-Alarcon ve Lissi (2005)'e göre yapıldı. 10mM AAPH [2,2'-Azo-bis(2-amidinopropan)dihidroklorid]' ın 75mM (pH: 7,4) fosfat tamponundaki çözeltisinden 1500 µL; x µL ekstrakt çözeltisi; 75mM (pH 7.4) fosfat tamponundan (1350-x) µL ve PGR'ın fosfat tamponundaki 5 µM çözeltisinden 15 µL ilave edilip çalkalandı ve 540nm'de 0., 5., 10., 15., 20., 25., 30. dakikalardaki absorbans azalması okundu. Standart olarak BHT, α -tokoferol ve Troloks kullanıldı. Okunan absorbans değerleri, A/A_0 / Zaman'a karşı grafiğe

geçirilerek bozunma kinetiği eğrisi elde edildi ve eğrinin altında kalan alanın değişimi ile oksijen radikal absorbens kapasitesi hesaplandı.

4. BULGULAR

4.1 DPPH (SERBEST RADİKAL GİDERME AKTİVİTESİ) SONUÇLARI

DPPH[•] kararlı bir serbest radikaldir. Kararlı bir diamanyetik molekül oluşturmak için bir elektron veya hidrojen radikalini bünyesine kabul eder. Bölüm 3.2.2’de belirtildiği gibi, antioksidan ile DPPH[•]’in oluşturduğu reaksiyon karışımının gösterdiği absorbans ne kadar düşük ise antioksidanın serbest radikal giderme aktivitesi o kadar yüksek demektir. DPPH[•] radikalinin ortamdaki miktarının azalması ile absorbansın azalması belli bir antioksidan derişimine kadar doğru orantılıdır. Absorbansın düşmesinin sebebi radikal ile antioksidan moleküllerin reaksiyonu sonucu hidrojen bağlanması ile radikalın giderilmesidir. Farklı derişimlerdeki kapari ekstreleri ve standartlar için elde edilen DPPH radikali süpürme aktivitelerinin % inhibisyon cinsinden hesaplanan antioksidan aktiviteleri Şekil 4.1’de görülmektedir.



Şekil 4.1 Kapari örnekleri ve standartların DPPH radikali süpürücü aktiviteleri

Şekil 4.1'den görüldüğü üzere, standart antioksidanlar olan Troloks, BHT ve α -tokoferol'ün DPPH* radikali süpürücü aktiviteleri çok yüksektir. Kaparinin su ve alkol ekstralarının antioksidan aktiviteleri ise düşüktür. Şekil 4.1'deki grafiklerden lineer regresyon analizi ile hesaplanan IC₅₀ değerleri Çizelge 4.1'de görülmektedir.

Çizelge 4.1 Kapari ekstralarının ve standart antioksidanların IC₅₀ değerleri

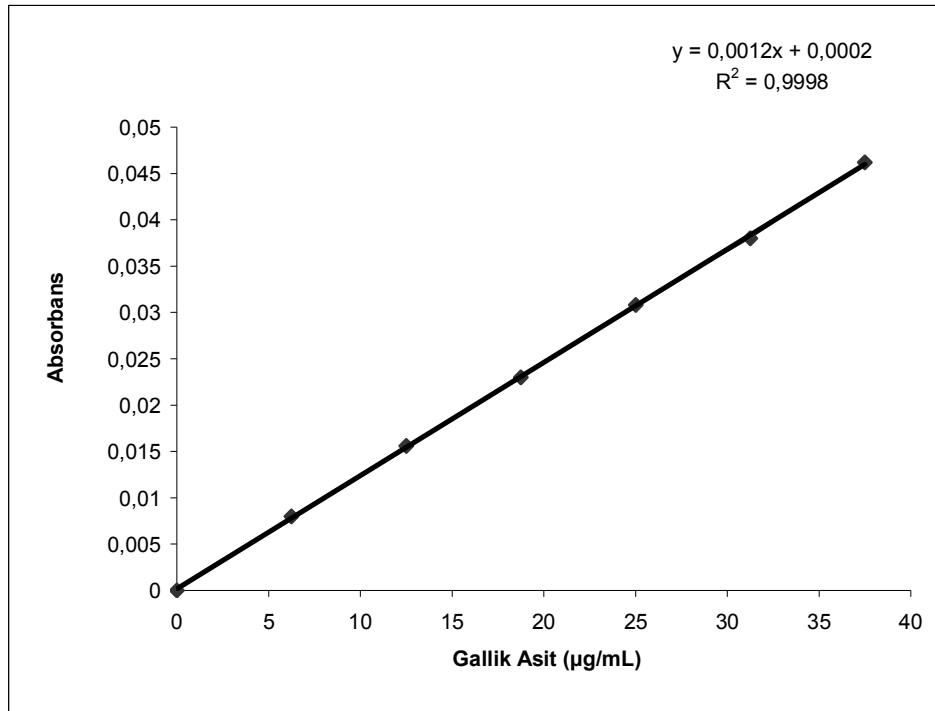
Antioksidan	Troloks	Alkol Ekstresi	Su Ekstresi	BHT	α -tokoferol
IC ₅₀ (μ g/mL)	0,58	52,81	54,36	2,32	3,52

Bu yöntemde Bir antioksidan için ölçülen IC₅₀ değeri ne kadar küçük ise antioksidan aktivitesi o kadar yüksek demektir. Çizelgedeki değerlerden de görüleceği üzere DPPH radikalini süpürme kapasitesi Troloks > BHT > α -tokoferol > Alkol Ekstresi > Su Ekstresi sırasını izlemektedir.

4.2. TOPLAM FENOLİK BİLEŞİK MİKTARI TAYİNİ

SONUÇLARI

Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak yapılan toplam fenolik bileşik tayininde en sık kullanılan standart bileşik gallik asittir. Gallik asit kullanılarak elde edilen standart çalışma grafiği Şekil 4.2'de görülmektedir.



Şekil 4.2 Gallik asit standart çalışma grafiği

Gallik asit standart grafiğinden elde edilen doğru denklemi:

$$\text{Absorbans} = 0,0012 \times \text{Toplam fenolik bileşik (GAE)} - 0,0002$$

kullanılarak kapari su ve alkol ekstralarının 100 µL ve 300 µL'lik örneklerindeki GAE değerleri hesaplandı. Stok örnek çözeltilerin derişimi 10 mg/10 mL olduğu için 100 µL ve 300 µL'lik örnek çözeltilerinde 100 µg ve 300 µg örnek bulunmaktadır. Çizelge 4.2'de yukarıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanan toplam fenolik bileşik miktarı değerleri görülmektedir.

Çizelge 4.2 Kapari ekstralarının farklı derişimdeki toplam fenolik bileşik miktarları

Örnek	Fenolik Bileşik ^a (µg GAE/mL)	Fenolik Bileşik ^b (µg GAE/mL)
Su Ekstresi	3,33 ± 0,70	6,83 ± 0,95
Etanol Ekstresi	1,83 ± 0,46	4,67 ± 0,70

^a: Örnek derişimi 100 µg/mL

^b: Örnek derişimi 300 µg/mL

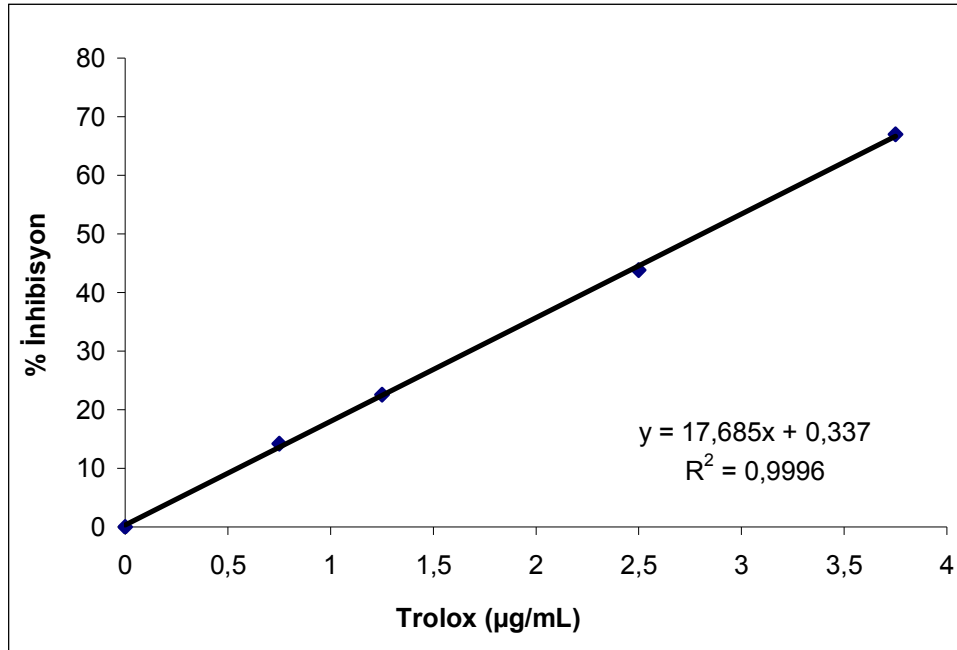
Çizelgedeki değerlerden görüleceği üzere kapari su ekstralarının fenolik bileşik içeriği her iki derişim için de etanol ekstralarınınkinden daha yüksektir. 100 ve 300 µg/mL ekstre derişimleri karşılaştırıldığında hem su hem de etanol ekstresi için derişim artışı ile fenolik bileşik miktarı artışı arasında bir korelasyon yoktur.

4.3. TEAC (ABTS^{•+} RADİKAL GİDERME AKTİVİTESİ) SONUÇLARI

TEAC değerinin tayininde Troloks standart antioksidanının ABTS^{•+} radikalini süpürme etkisi ölçülerek standart çalışma grafiği çizilir (Şekil 4.3). Süpürme etkisi % inhibisyon olarak:

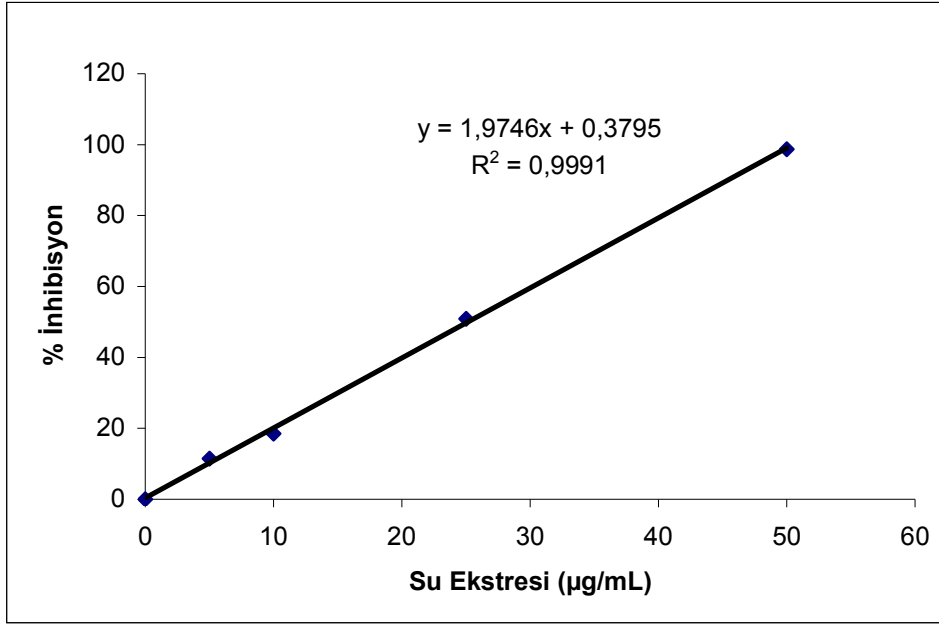
$$\% \text{ Inhibisyon} = \frac{A_6 - A_1}{A_1} \times 100 = \frac{\Delta A}{A_1} \times 100$$

formülünden hesaplanır. Örnek ekstreleri ile de benzer ölçümler yapıldığında elde edilen grafiklerin eğimleri standart grafiğin eğimine (Şekil 4.3) oranlanarak örneklerin Troloks eşdeğeri antioksidan aktivitesi (TEAC) hesaplanır (Gliszczynska-Swiglo, 2006).

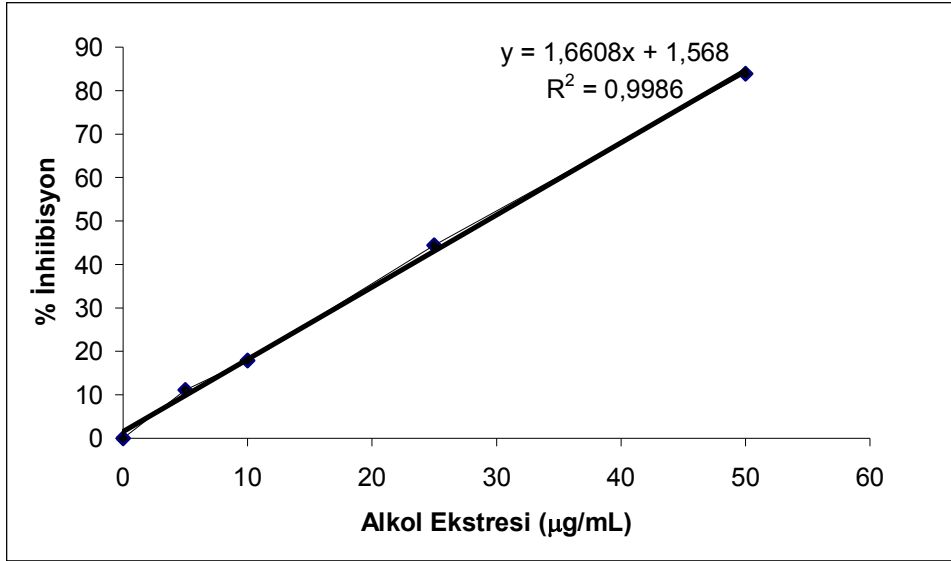


Şekil 4.3 TEAC tayininde kullanılan Troloks standardı çalışma grafiği

Kapari örneğinin su ve alkol ekstrelerinin (5-50 µg/mL) TEAC yöntemi ile belirlenen % inhibisyon grafikleri Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'de görülmektedir.



Şekil 4.4 Kapari su ekstresinin TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS^{•+} radikalini süpürme etkisi



Şekil 4.5 Kapari alkol ekstresinin TEAC yöntemi ile belirlenen ABTS^{•+} radikalini süpürme etkisi

Örnek grafiklerinin eğimleri standart Troloks grafiğinin eğimine oranlanarak hesaplanan TEAC değerleri Çizelge 4. 3'de verilmiştir. Tayinde radikal molekül olarak ABTS kullanıldığı için de sonuçlar TEAC_{ABTS} olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 4.3 Kapari ekstreleri ve standartların TEAC değerleri

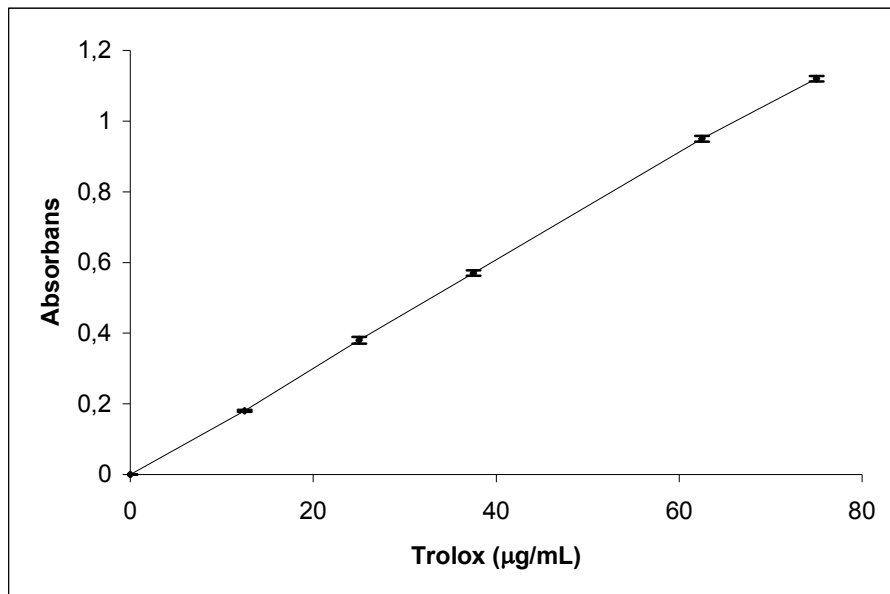
	Troloks	Alkol ekstresi	Su ekstresi	BHT	Tokoferol
Eğim	17,685	1,6608	1,9746	10,263	14,451
TEAC _{ABTS} Değeri	1	0,09391	0,11165	0,58032	0,81713

Not: Eğim değerleri farklı derişimlerdeki örneklerin her birinin 5 kez (n=5) ölçülmesi ile elde edilen değerlerin ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandıktan sonra derişime karşı % inhibisyon grafiklerinden elde edilmiştir.

Çizelge 4.3'den görüldüğü üzere kapari örneğinin alkol ekstresi eşdeğer miktardaki standart Trolox antioksidanının aktivitesinin yaklaşık 0,09'u kadar antioksidan aktivite göstermektedir. Bu değerler su ekstresi, BHT ve α -tokoferol için sırasıyla yaklaşık 0,11; 0,58 ve 0,82 olarak hesaplanmıştır.

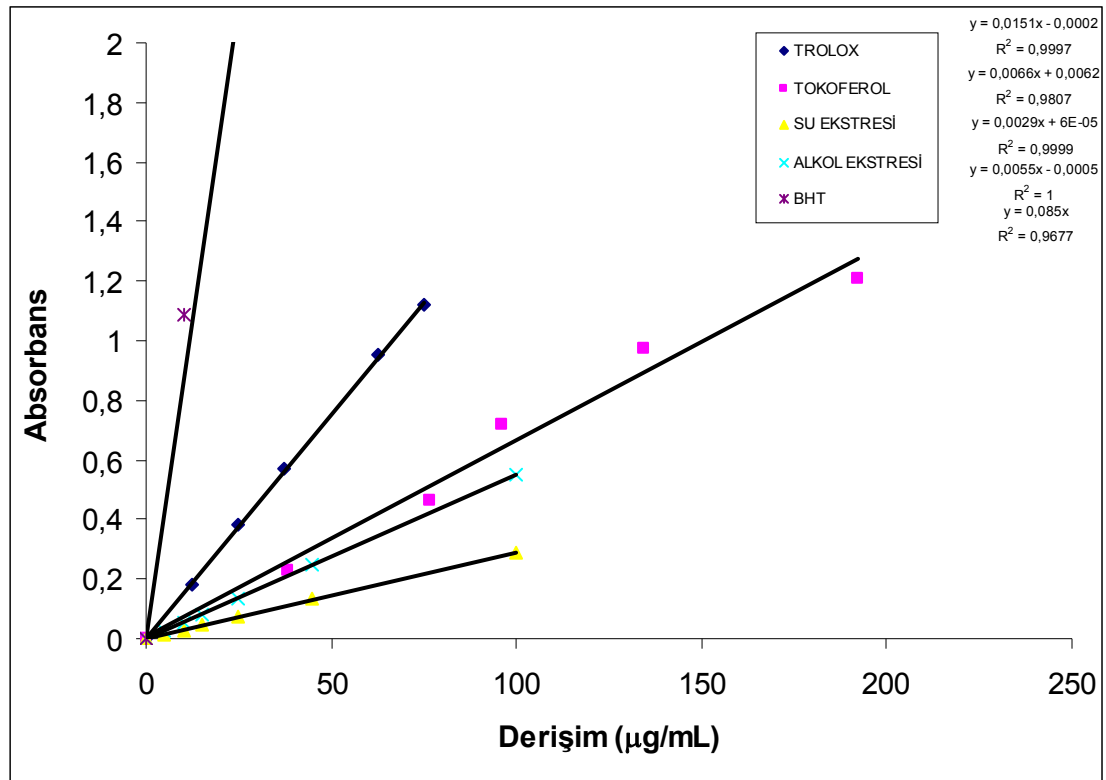
4.4. CUPRAC (BAKIR (II) İNDİRGEYİCİ ANTIOKSIDAN KAPASİTESİ) SONUÇLARI

CUPRAC yöntemi ile çalışılan örnek ekstreleri ve standart antioksidanların derişime karşı absorbans grafikleri çizilerek grafiklerin eğimleri oranlandı. Bu çalışmada Trolox için elde edilen grafik Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6 CUPRAC yöntemi ile antioksidan aktivite tayini için farklı Trolox derişimlerine karşı elde edilen absorbans grafiği

Örnek ve standartların antioksidan derişimine karşı CUPRAC yöntemi ile verdikleri absorbans grafikleri Şekil 4.7’de topluca sunulmuştur.



Şekil 4.7 Örnek ve standartların farklı CUPRAC yöntemi ile verdikleri antioksidan miktarı-absorbans grafiği

Grafikteki her bir doğrunun eğimi Troloks için elde edilen doğru denkleminin eğimine oranlanmış ve $TEAC_{CUPRAC}$ değerleri elde edilmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 Örnek ve standartların $TEAC_{CUPRAC}$ değerleri

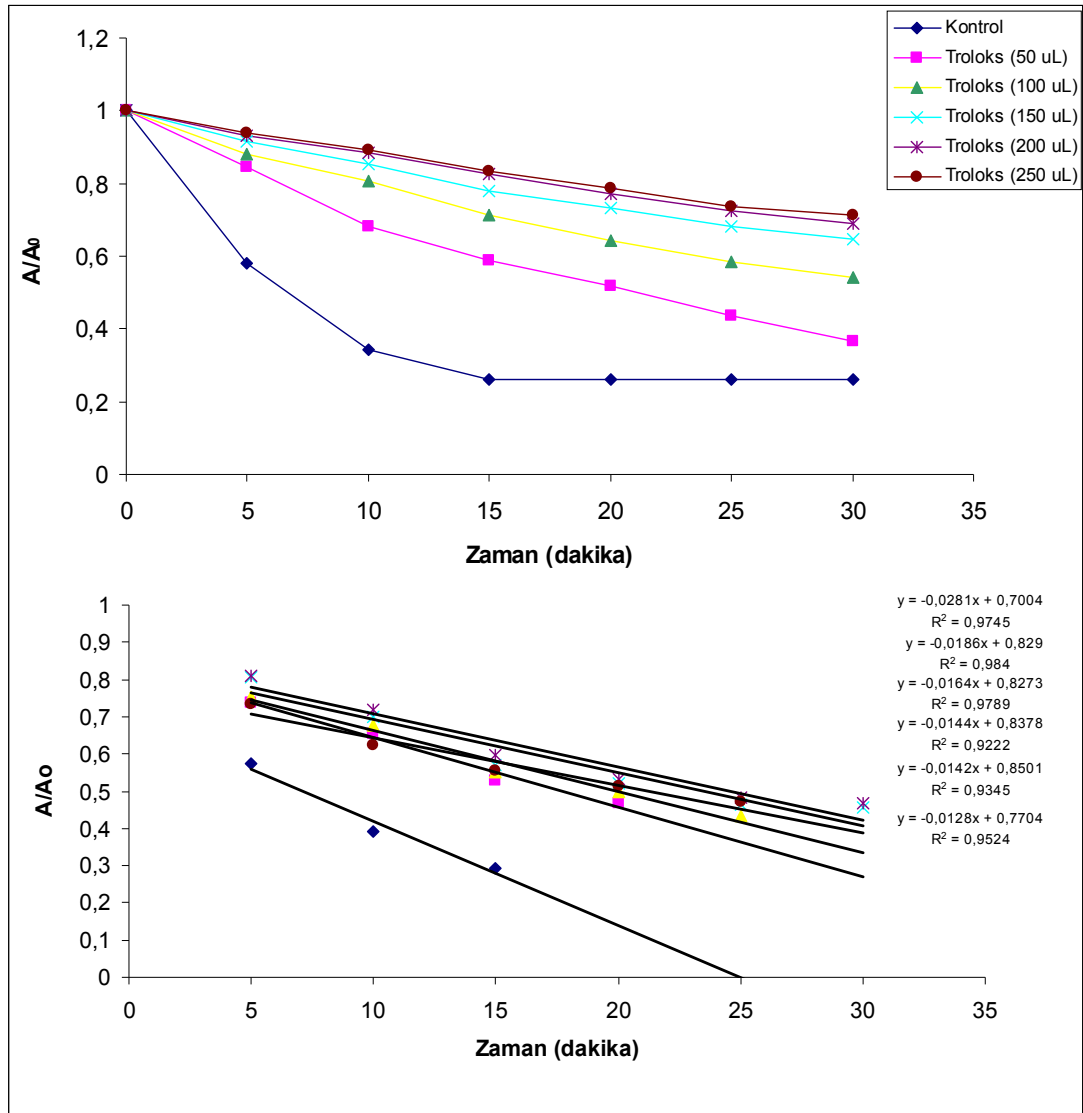
	Troloks	Alkol ekstresi	Su ekstresi	BHT	α -Tokoferol
Eğim	0,0151	0,0055	0,0029	0,085	0,0066
$TEAC_{CUPRAC}$	1	0,36424	0,19205	0,56291	0,43709

Çizelge 4.4’den görüldüğü üzere kapari bitkisinin alkol ekstresi eş değer miktardaki standart antioksidan olarak alınan Troloksun yaklaşık 0,36’sı kadar antioksidan aktivite göstermektedir. Su ekstresi için bu değer yaklaşık 0,19’dur. Diğer standart aktioksidanlar olan α -tokoferol eşdeğer miktarda Troloks’un gösterdiği antioksidan

aktivitenin yaklaşık 0,44'ü kadar antioksidan aktivite göstermektedir. Çok iyi bilinen ve yüksek antioksidan aktivitesi nedeni ile gıdalara koruyucu katkı maddesi olarak eklenen sentetik antioksidan BHT ise eşdeğer miktardaki Troloks'un yaklaşık 5,6 katı daha fazla antioksidan aktivite göstermektedir.

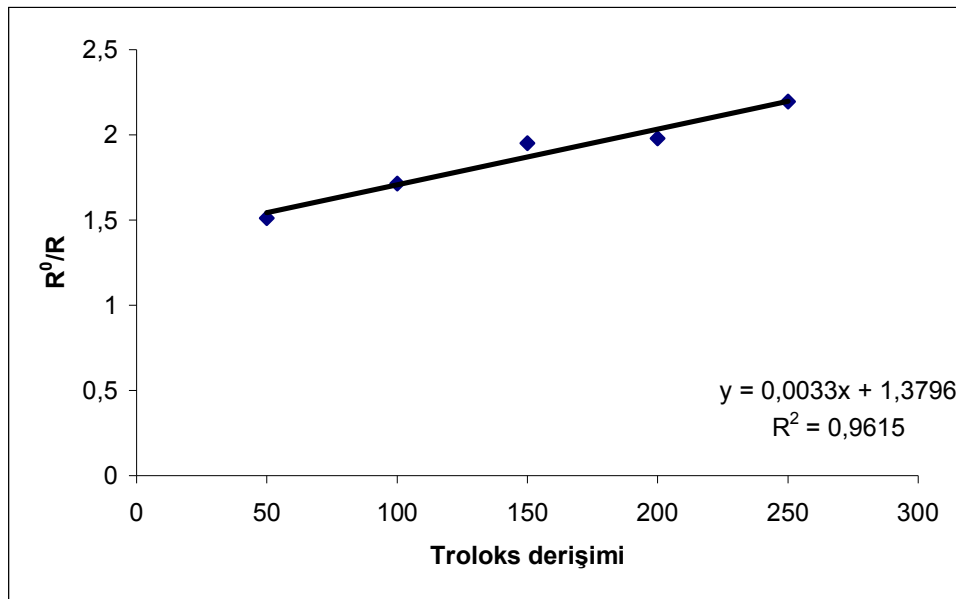
4.5. ORAC (OKSİJEN RADİKAL ABSORBANS KAPASİTESİ) YÖNTEMİ SONUÇLARI

ORAC yöntemi ile pirogallol red kullanılarak yapılan spektrofotometrik antioksidan kapasite tayininde antioksidan maddenin, hedef molekülün (pirogallol red) bir serbest radikal varlığında (ABTS) tüketilmesini engelleme yeteneği ölçülür. Bunun için sabit serbest radikal derişiminde farklı antioksidan derişimleri ile elde edilen reaksiyon kinetikleri incelenir. Bu çalışmada da Troloks, BHT, α -tokoferol, Kapari su ve alkol ekstreleri kinetik olarak incelenmiştir. Hiç antioksidanın bulunmadığı deney kör olarak kabul edilmiş ve absorbansı A_0 olarak alınmış. Antioksidanın varlığında elde edilen absorbanslar ise A olarak okunmuştur. Zamana karşı A/A_0 değerleri kullanılarak elde edilen grafiğe bir örnek olarak Troloks standardına ait grafik Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



Şekil 4.8 ORAC yöntemi ile antioksidan aktivite tayininde farklı Troloks derişimlerinde pirogallol red tüketiminin kinetikleri

Şekil 4.8’de görülen farklı derişimler için elde edilen eğrilerin lineer bölgelerinin eğimleri (R) ile antioksidansız pirogallol red tüketimine ait eğrinin eğimi (R^0) oranlanarak elde edilen bu oran (R^0/R) derişime karşı grafiğe geçirilerek Şekil 4.9 elde edildi.



Şekil 4.9: Troloks için elde edilen derişime karşı R⁰/R grafiği

Şekil 4.9'da Troloks için elde edilen derişime karşı R⁰/R grafiği görülmektedir. Diğer tüm standart antioksidan ve örnekler için de benzer işlem ve hesaplamalar yapıldı ve standart antioksidan ve örnekler için elde edilen doğruların eğimleri Troloks için elde edilen eğime oranlanarak TEAC_{ORAC} değerleri hesaplandı (Çizelge 4.5). Bu hesaplamalar Lopez-Alarcon ve Lissi (2005)'ye göre yapıldı.

Çizelge 4.5: Örnek ve standartların TEAC_{ORAC} değerleri

	Troloks	Alkol ekstresi	Su ekstresi	BHT	α -Tokoferol
Eğim	0,0215	0,0033	0,0014	0,0084	0,0093
TEAC_{ORAC}	1	0,15349	0,06512	0,39070	0,43256

5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada kapari bitkisinin DPPH radikal süpürücü aktivitesi, toplam fenolik bileşik miktarı, Troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi (TEAC), bakır(II) indirgeyici antioksidan kapasitesi (CUPRAC) ve oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC) ayrı ayrı belirlendi. Bu yöntemlerde yüksek antioksidan aktiviteye sahip BHT, α -tokoferol ve Troloks standart maddeleri kullanıldı ve yöntemlerden elde edilen sonuçlar birbirleriyle karşılaştırıldı.

Çizelge 5.1: Örnek ve standartların çalışmada kullanılan yöntemlerle elde edilen IC_{50} , μg GAE/mL, $TEAC_{ABTS}$, $TEAC_{CUPRAC}$, $TEAC_{ORAC}$ değerleri

Yöntem	Troloks	Alkol Ekstresi		Su Ekstresi		BHT	α -tokoferol
DPPH IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0,58	52,81 \uparrow		54,36		2,32	3,52
Fenolik bileşik (μg GAE/mL)	-	1,83 \pm 0,46 ^a \downarrow	4,67 \pm 0,70 ^b \downarrow	3,33 \pm 0,70 \uparrow	6,83 \pm 0,95 \uparrow	-	-
$TEAC_{ABTS}$	1	0,094 \downarrow		0,112 \uparrow		0,580	0,817
$TEAC_{CUPRAC}$	1	0,364 \uparrow		0,192 \downarrow		0,563	0,437
$TEAC_{ORAC}$	1	0,154 \uparrow		0,065 \downarrow		0,391	0,433

Not: Aşağı-yukarı oklar su ve alkol ekstralarının birbirine göre değerlendirmesidir. \uparrow : daha büyük; \downarrow : daha küçük, ^a: Örnek derişimi 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ^b: Örnek derişimi 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Çizelge 5.1'deki IC_{50} değerleri karşılaştırıldığında, Troloks, BHT ve α -tokoferol'ün DPPH' radikali süpürücü aktiviteleri çok yüksek, kaparinin su ve alkol ekstralarının antioksidan aktiviteleri ise düşük bulunmuştur. Eğer kapari bitkisinin antioksidan aktivitesi sadece DPPH yöntemi ile tayin edilmiş olsa idi; standart antioksidanlar ile karşılaştırıldığında kaparinin antioksidan aktivitesinin yok denecek kadar az olduğu söylenebilirdi. Fenolik bileşik miktarlarına bakıldığında da düşük antioksidan aktivitenin düşük fenolik içeriğinden kaynaklandığı da söylenebilirdi. Zira kapari ekstralarının DPPH IC_{50} değerleri ile standart antioksidanların DPPH IC_{50} değerleri arasında yaklaşık 25-100 kat fark vardır.

Kullanılan total fenolik bileşik tayini yöntemi renk reaksiyonuna dayalı bir yöntemdir. Bu yöntemin kullanılabilir olduğu lineer aralık yapılan çalışmalarda genellikle tespit edilmemektedir. Yüksek derişimlerde lineerlikten sapma

gözlenebilen bir durumdur (Singleton *et al.* 1999). Derişimdeki artışın fenolik bileşik miktarında aynı oranda artışa neden olmaması bu sapmadan kaynaklanabilir. Bu analiz ile ilgili olarak bahsedilmesi gereken diğer bir durum da yöntemde kullanılan gallik asit standardının derişimlerinin genellikle 0-50 µg/mL aralığında tutulmasıdır. Bu çalışmada kapari örneklerinin fenolik bileşik içerikleri oldukça düşük olduğu için değerler genellikle orijine yakındır. Ancak gallik asit ile çalışıldığında derişim-absorbans ilişkisi çok düşük derişimlerde de lineer olduğundan grafiğin denkleminin kullanılmasında sakınca olmadığı kanaatine varılmıştır.

Troloks temel karşılaştırma antioksidan bileşigi olarak kullanıldığında hesaplanan TEAC_{ABTS} değerleri, TEAC_{CUPRAC} ve TEAC_{ORAC} yöntemiyle elde edilen sonuçlara bakıldığında ise kapari ekstralarının antioksidan aktiviteleri ile Troloks arasında yaklaşık 3-20 kat fark vardır. Bu çalışmada karşılaştırma maddesi olan Troloks standart bir antioksidan olup katkı maddesi olarak da kullanılan ve çok düşük derişimleri çok yüksek antioksidan aktivite gösteren bir bileşiktir. Kapari su ve alkol ekstralarının ayrı ayrı gösterdiği antioksidan aktivitelerin sinerjisi düşünülecek olursa Troloks ile karşılaştırıldığında kapari için iyi antioksidan özelliği olan bir besindir denebilir. Buradan anlaşılacağı gibi, bir örneğin ölçülen antioksidan kapasitesi ölçüm için hangi teknolojinin ve hangi serbest radikal kaynağı veya oksidanın kullanıldığına bağlıdır. Bu nedenle farklı analitik yöntemlerin karşılaştırılması araştırmacılara yöntem seçiminde ve yöntemin sonuçlarının değerlendirilmesinde yardımcı olabilir. Bu noktadan yola çıkarak çeşitli analitik antioksidan kapasite tayin yöntemlerinin farklı örneklerle karşılaştırıldığı pek çok çalışma vardır. Örneğin, Cao ve Prior (1998) insan serumunda total antioksidan kapasite tayini için üç yöntem kullanmış ve bunları karşılaştırmıştır. Kullandıkları yöntemler ORAC, Randox-TEAC ve FRAP yöntemleridir. Araştırmacılar serum ORAC ve serum FRAP yöntemleri arasında zayıf fakat anlamlı lineer korelasyon tespit etmişlerdir. Serum ORAC ve serum TEAC arasında veya serum FRAP ile serum TEAC arasında korelasyon tespit etmemişlerdir. Bu çalışmada ayrıca serum seyreltilmesinin Randox-TEAC yöntemini etkilediği ifade edilmiştir. FRAP yönteminin basit ve ucuz bir yöntem olmakla birlikte SH- grubu içeren antioksidanları ölçmediği de ifade edilmiştir. ORAC yönteminin yüksek özgünlük gösterdiği ve pek çok antioksidana

cevap verdiği de gösterilmiştir. Ancak ORAC yönteminin uygulaması FRAP ve Randox-TEAC yönteminin uygulamasından daha uzun zamana ihtiyaç duymaktadır.

Yiyeceklerin antioksidan kapasitelerinin ve antioksidan bileşenlerinin bilinmesi tıp ve beslenme uzmanlarının olduğu kadar sağlık ve besin alanındaki araştırmacılarında ilgi alanıdır. Besinlerin bileşenlerinin kompleksleri nedeniyle her bir antioksidan bileşiğin izole edilmesi ve tek başına tayin edilmesi hem pahalı hem de verimsizdir. Bir karışımdaki antioksidan bileşiklerin muhtemel sinerjik ilişkileri de dikkate alındığında bu çabalar anlamsız olarak görülebilir. Bu nedenle total antioksidan kapasiteyi ölçen yöntemler önem kazanmaktadır. Öte yandan tek bir kimyasallı reaksiyona dayanan total antioksidan kapasite tayini gerçekçi olmayabilir. Bu nedenle çok sayıda total antioksidan kapasiteyi ölçtüğü iddia eden yöntem geliştirilmiştir. Fakat besinlerin ve biyolojik örneklerin antioksidan kapasitesini güvenilir olarak ölçen onaylanmış analiz yöntemi yoktur. Bu konuda yayınlanan pek çok derleme ve geliştirilen pek çok yönteme rağmen bunlarda bir söz birliğine ulaşılamamıştır. Frankel ve Meyer (2000) tarafından yapılan bir derlemede bu duruma çok fonksiyonlu besin ve biyolojik kaynaklı antioksidanların değerlendirilmesinde tek-boyutlu yöntemlerin kullanılmasının neden olduğu iddia edilmiştir. Bu araştırmacılara göre genel bir test protokolü;

- a) Biyolojik olarak anlamlı bir substrat seçmeli,
- b) eşitli oksidasyon durumlarını test edebilmeli,
- c) Hem başlangıç ve hem de sekonder oksidasyon ürünlerini lebilmeli,
- d) Aynı molar derişimde aktif bileşen içeren antioksidanları karşılaştırabilmeli,
- e) İndüksiyon periyodu, yüzde inhibisyon, hidrojen peroksit oluşumu veya yıkımı hızı veya IC_{50} (% 50 inhibisyona ulaşmak için gerekli antioksidan derişimi) temelinde kantitasyona izin vermelidir.

Rice-Evans (1999) ve arkadaşları tarafından geliştirilen TEAC yöntemi besin örneklerinin analizinde çok kullanılmaktadır (Re *et al.*,1999). DPPH yöntemi de

meyve sebze sularında veya ekstraktlarında antioksidan kapasitesini ölçmek için başarı ile kullanılmıştır (Sanchez-Moreno, 2002). ORAC yöntemi ise, botanik (Prior ve Cao, 2000) veya biyolojik (Cao ve Prior, 1998) örneklerin antioksidan kapasitesi ölçümünde daha da geniş kullanım alanı bulan bir yöntemdir. TRAP yöntemi de çok kullanılan yöntemlerden birisidir (Ghiselli *et al.*, 2000).

Bütün bu analiz yöntemleri birbirinden kullanılan substrat, prob, reaksiyon koşulları ve kantitasyon metotları açısından farklıdırlar. Bu nedenle Frankel ve arkadaşları (2000) farklı yöntemlerin sonuçlarının karşılaştırılmasının çok zor olduğunu belirtmişlerdir. Bu arada antioksidan kapasiteyi ölçtüğünü iddia eden yeni yöntemler de rapor edilmektedir (Buratti *et al.*, 2001; Cervellati *et al.*, 2001).

Antioksidan konularının karmaşıklığı ve sorgulanabilir yöntemlerin uygun olmayan kullanımları antioksidan araştırmaları yapan araştırmacı ve endüstri çalışanlarını zor durumda bırakabilmektedir. Standart bir yöntemin eksikliği farklı araştırma gruplarının sonuçlarının karşılaştırılmasını olanaksız kılarken, besin ve bitki kaynaklı ilaç endüstrisinin antioksidan ürünlerde sıkı kalite kontrolün yapabilmesini de sınırlamaktadır (Huang *et al.*, 2005).

Sonuç olarak farklı analiz yöntemleri antioksidan aktivite hakkında özgün fakat sınırlı bilgi vermektedirler. Bu nedenle analiz tekniklerinin gücü ve sınırlamaları onların en fazla uygulanabilir oldukları durumları belirler. Bu nedenle antioksidan aktivite tayinlerinde uygun referans maddesinin seçimi, oksitlenebilen maddenin ve oksidasyon koşullarının seçimi, ölçülen parametrenin ne olduğu, analizin hızı, duyarlılığı, uygulanabilirliği ve gereken aygıtların temin edilebilirliği dikkate alınması gereken parametrelerdir. Bu çalışmada da sunulduğu üzere bir örneğin değişik antioksidan aktivite tayin yöntemleri ile ölçülen antioksidan aktiviteleri arasında bir korelasyon olma zorunluluğu yoktur.

KAYNAKLAR

- Alarcon, E., Campos, A. M., Edwards, A. M., Lissi, E. and Lopez-Alarcon, C., 2008. Antioxidant capacity of herbal infusions and tea extracts: a comparison of ORAC-fluorescein and ORAC-pyrogallol red methodologies. **Food Chemistry**, 107: 1114-1119.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E. and Altun, M. 2005. Total antioxidant capacity assay of human serum using copper (II)-neocuproine as chromogenic oxidant: the CUPRAC method. **Free Radical Research**, 39: 949-961.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. and Karademir, S. E. 2004. A novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols, vitamin C and E using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52: 7970-7981.
- Arnao M. B., Cano A. and Acosta, M. 1998. Total antioxidant activity in plant material and its interest in food technology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2: 893-905.
- Arts, M. J. T. J., Dallinga, J. S., Voos, H. P., Haenen G. R. M. M. and Bast, A. 2003. A critical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures. **Food Chemistry**, 80: 409-414.
- Brand-Williams, W., Cavalier, M. E. and Berset, C., 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, 28(1): 25-30.
- Buratti, S., Pellegrini, N., Brenna, O. V. and Mannino, S. 2001. Rapid electrochemical method for the evaluation of the antioxidant power of some

- lipophilic food extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49: 5136-5141.
- Cai, L., Luo, Q., Sun, M. and Corke, H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, 74: 2157-2184.
- Cao, G. and Prior, R.L. 1999. In vivo antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radical Biology and Medicine**, 27: 1173-1181.
- Cao, G. and Prior, R.L. 1998. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. **Clinical Chemistry**, 44(6): 1309-1315.
- Cao, G., Alessio H. M. and Cutler, R. G. 1993. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, 14: 303-11.
- Cervellati, R., Höner, K., Furrow, S. D., Neddens, C. and Costa, S. 2001. The Briggs-Rascher Reaction as a test to measure the activity of antioxidants. **Analytica Chimica Acta**, 84: 3533-3547.
- Cuttler, R.G. and Pryor, W.A. 1984. In free radical in biology. **Free Radicals in Biology**, 6: 371-423.
- Çakmakçı, S. ve Çelik, I. 2000. Gıda Katkı Maddeleri. Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Ders Notu, 249 s., Erzurum.
- Dafni, A., Yaniv, Z. and Palevitch D. 1984. Ethnobotanical survey of medicinal plants in northern Israel. **Journal of Ethnopharmacology**, 10 (3): 295-310.
- Deming, D. M., Boileau, TW-M, Heintz, K. H., Atkinson C. A and Erdman, J. W. 2002. Carotenoids: Linking chemistry, absorption, and metabolism to

potential roles in human health and disease. **Process Biochemistry**, 41: 1773-1778.

Demirsoy, A., Türkan, İ. ve Gündüz, G. 2003. **Genel Biyoloji**. 5. baskı: 382-383.

Dorman, H. J. D, Peltoketo, A., Hiltunen, R. and Tikkanen, M. J. 2003. Characterization of the antioxidant properties of de-odorized aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. **Food Chemistry**, 83(2): 255-262.

Frankel, E. N. and Meyer, A. S. 2000. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agricultural**, 80: 1925-1941.

Gardner, P. T., White, T. A. C., Mcphail, D. B. and Duthie, G. G. 2000. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to antioxidant potential of fruit juices. **Food Chemistry**, 68: 471-474.

Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F. and Scaccini, C. 2000. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical review and experimental data. **Free Radical Biology and Medicine**, 29: 1106-1114.

Gill, M. I., Tomas-Barberan, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M. and Kader, A. A. 2000. Antioxidant activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48(10): 4581-4589.

Güçlü, K., Altun, M., Özyürek, M., Karademir, S. E. and Apak, R. 2006. Antioxidant capacity of fresh, sun-and sulphited-dried Malatya apricot (*Prunus armeniaca*) assayed by CUPRAC, ABTS/ TEAC and folin methods. **International Journal of Food Science and Technology**, 41: 76-85.

Güçlü, K., Sözgen, K., Tütem, E., Özyürek, M. and Apak, R. 2005. Spectrophotometric determination of ascorbic acid using copper (II)-

- neocuproine reagent in beverages and pharmaceuticals. **Talanta**, 65: 1226-1232.
- Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Şat, G. and Küfrevioğlu, Ö. İ. 2005. Evaluation of antioxidant activity of cornelian cherry (*Cornus Mas* L.). **Food Chemistry**, 34: 193-202.
- Halliwell, B. and Aruoma. O. I. 1998. Free radicals and antioxidants: The need for in vivo Markers of Oxidative stress. **Journal of American Oil Chemistry Society**, 75(2): 199–212.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C., 1991. Free radicals in biology and medicine, **Free Radical Biology and Medicine**, 10(6): 449-450.
- Huang, D. B. and Prior, R. L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53: 1841-1856.
- Ikawa, M., Schaper, T. D., Dollord, C. A. and Sosner, J. J. 2003. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51(7): 1811-1815.
- Inocencio, C., Rivera, D., Alcaraz, F. and Tomas-Barberan, F. A. 2000. Flavonoid content of commercial capers (*Capparis spinosa*, *C. sicula* and *C. orientalis*) produced in Mediterranean countries. **European Journal of Food Research and Technology**, 212: 70-74.
- Kahkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S. and Heinonen, M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47: 3954-3962.

- Karakaya, S., El, S. N. and Tas, A. A. 2001. Antioxidant activity of some foods containing phenolic compounds. **International Journal of Food Science and Nutrition**, 52(6): 501-508.
- Kaur, C. and Kapoor H. C. 2001. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. **International Journal of Food Science and Technology**. 37(2): 153-161.
- Keskin, H. ve Erkmen G. 1987. **Besin Kimyası**. Güryay Matbaacılık İstanbul, Beşinci basım:25-35.
- Kılınç, K. ve Kılınç, A. 2002. Oksijen toksisitesinin Aracı Molekülleri Olarak Oksijen Radikalleri. **Hacettepe Tıp Dergisi**, 33(2): 110-118.
- Koleva, I. I., van Beek, A. T., Linszen, J. P. H., de Groot, A. and Evstatieva L. N. 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**, 13: 8-17.
- Landvik, S. V., Diplock, A. T. and Packer, L. 1998. Efficacy of α -tokoferol in human health and disease. **Journal of Clinical Pathology**, 121: 1123-1137.
- Lee, K. W., Kim, Y. J., Kim, D., Lee H. J. and Lee C. Y. 2003. Major phenolics in the apple their contribution to the total antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51: 20-6516.
- Lopez-Alarcon, C. and Lissi, E. 2006. A novel and simple ORAC methodology based on the interaction of pyrogallol red with peroxy radicals. **Free Radical Research**, 40 (9): 979-985.
- Lopez-Alarcon, C. and Lissi, E. 2005. Interaction of pyrogallol red with peroxy radicals. A basis for a simple methodology for the evaluation of antioxidant capabilities. **Free Radical Research**, 39(7): 729-736.

- Miliauskas, G., Venskutonis, P. R. and van Beek, T. A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts **Food Chemistry**, 85 (2): 231-237.
- Mogalhaes, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., Lima, L. L. F. C. and Rangel, O. S. S. 2006. Automatic method for the determination of Folin-Ciocalteu reducing capacity in food products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54 (15): 5241-5246.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Journal of Science and Technology**, 26(2): 211-219.
- Nagai, T., Myoda, T. and Nagashima T. 2005. Antioxidative activities of water extract and ethanol extract from field horsetail (tsukushi) *Equisetum arvense*. **Food Chemistry**, 91: 389-394.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., Deemer, E. K., Prior, R. L. and Huang, D. 2002. Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50: 2772-2777.
- Öztürk, M., Aydoğmuş-Öztürk, F., Duru, M. E. and Topçu, G. 2007. Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant. **Food Chemistry**, 103: 623-630.
- Park, Y. S., Jung, S. T., Kang, S. G., Heo, B. G., Arancibia-Avila, P., Toledo, F., Drzewiecki, J., Namiesnik J. and Gorinstein, S. 2008. Antioxidants and proteins in ethylene-treated kiwifruits. **Food Chemistry**, 107: 640-648.
- Prior, R. L. and Cao, G. H. 2000. Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: A review. **Journal of AOAC International**, 83 (4): 950-956.

- Rao, G. R., Konjilal, G. and Mohan, K. R. 1978. extended application of Folin-Ciocalteu reagent in the determination of drugs. **The Analyst**, 103: 993-994.
- Re, R., Pellegrini, N., Protrgente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, 26: 1231-1237.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, 2: 152-159.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganda, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, 20: 933-956.
- Rice-Evans, C. A. and Miller, N. J., 1984. Total antioxidant status in plasma and body fluids. **Methods in Enzymology**, 234: 279-293.
- Roura, E., Anders-Lacuea, C., Estruch, R. and Lamueala-Rasentos, R. M. 2006. Total Polyphenol Intake Estimated by a Modified Folin-Ciocalteu Assay of Urine. **Clinical Chemistry**, 52: 749-752.
- Sanchez-Moreno, C. 2002. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **International Journal of Food Science & Technology**, 8(3): 121-137.
- Serteser, A. ve Gök, V. 2003. Doğal Antioksidanların Biyoyararlılığı. **3. Gıda Mühendisliği Kongresi**. (2-4 Ekim 2003), Ankara.
- Singleton, V. L., Orthofer , R. and Lamuela-Raventos, R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, 299: 152-178.

- Tosun, İ. ve Karadeniz, B. 2005. Çay ve çay fenoliklerinin antioksidan aktivitesi. **OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi**, 20(1):78-83.
- Trouillas, P., Calliste, C. A., Allais, D. P., Simon, A., Marfak, A., Delage, C. and Duroux, J. L. 2003. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. **Food Chemistry**, 80(3): 399-407.
- Tütem, E., Apak, R., Günaydın, E. and Sözgen, K. 1997. Spectrophotometric determination of vitamin E (α -tocopherol) using copper(II)-neocuproine reagent. **Talanta**, 44: 249-255.
- Tütem, E. and Apak, R. 1991. Simultaneous spectrophotometric determination of cystine and cysteine in amino acid mixtures using copper(II)-neocuproine reagent. **Analytica Chimica Acta**, 255: 121-125.
- Van den Berg, R., Haenen, R. M. M., van den Berg, H. and Bast, A. 1999. Applicability of and improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurement of mixtures. **Food Chemistry**, 66: 511-517.
- Vinson, J., Zubik, L., Bose, P., Sammon, N. and Proch, J. 2005. Dried fruits: excellent in vitro and in vivo antioxidants. **Journal of the American College of Nutrition**, 24(1): 44-50.
- Young, I. S. and Woodside, J. V. 2001. Antioxidants in Health and Disease. **Journal of Clinical Pathology**, 54: 176-186.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Asiye Ardağ

Doğum Yeri Ve Tarihi: Hollanda, 23.01.1981

EĞİTİM DURUMU

Orta Öğretim: Acıpayam Lisesi

Lisans Öğrenimi: Pamukkale Üniversitesi (1999-2003)

Yüksek Lisans Öğrenimi: Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Kimya Anabilim Dalı (2005-)

BİLİMSEL FAALİYETLERİ:

- a) Yayınlar: -
- b) Bildiriler: Antioksidan aktivite tayin yöntemlerinin Kapari (Capparis spinosa L.) örneğinde karşılaştırılması. XXII. Ulusal Kimya Kongresi, 6-10 Ekim 2008, Magosa, Kıbrıs (Poster bildirisi kabul edilmiştir).
- c) Katıldığı projeler: Yüksek lisans tezi FEF-07002 no'lu proje olarak ADÜ-BAP tarafından desteklenmiştir.

İŞ DENEYİMİ

Halen bir özel şirkette kimyager olarak çalışmaktadır.

İLETİŞİM:

e-posta adresi: chemist_ardag@hotmail.com

Tarih: 08.08.2008